

shRNA 静默 CD4⁺ T 细胞 AHNAK1 基因对小鼠甲状腺相关性眼病进程的抑制作用

陈华新^{1,*}, 于少硕^{2,*}, 周维明³, 张 意³

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 30801000)

作者单位: ¹(430070) 中国湖北省武汉市, 广州军区武汉总医院眼科; ²(200433) 中国上海市, 第二军医大学研究生管理大队临床九队; ³(200433) 中国上海市, 第二军医大学免疫学教研室

*: 作者陈华新和于少硕对本文贡献一致。

作者简介: 陈华新, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼整形、眼眶病; 于少硕, 男, 学士, 住院医师, 研究方向: 临床医学。

通讯作者: 张意, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 炎症免疫。
zhangyikulang@sohu.com

收稿日期: 2013-08-21 修回日期: 2013-12-31

Inhibition effect of the thyroid-associated ophthalmopathy in mice through the lentivirus expressing AHNAK1 shRNA on T cells

Hua-Xin Chen¹, Shao-Shuo Yu², Wei-Ming Zhou³, Yi Zhang³

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30801000)

¹Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China; ²Post-graduate Administration Company, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Department of Immunology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Yi Zhang. Department of Immunology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China.
zhangyikulang@sohu.com

Received: 2013-08-21 Accepted: 2013-12-31

Abstract

• AIM: To construct the mice model with lentivirus expressing AHNAK1 shRNA in CD4⁺ T cells, and to study its inhibitory effect on the thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) in mice.

• METHODS: The shRNA sequence with good disturbing potency towards AHNAK1 was designed and selected; then the shRNA was packed into lentivirus; and the CD4⁺ T cells were infected. The infected CD4⁺ T cells of mice by the packed lentivirus were observed to detect the inhibition effect on T cells. And then the immunotherapeutic effects of AHNAK1^{-/-} on TAO were observed by experimental animal model.

• RESULTS: The shRNA with good disturbing potency was successfully screened and correctly inserted into the

lentivirus. The titer of the recombinant lentivirus was 1.0×10^6 TU/mL. The CD4⁺ T cells infected by lentivirus showed the anergy trend and restrained the immune response of inflammation. Suppressing the expression of AHNAK1 in T cells of animal model can effectively control the occurring and proceeding of TAO, which can significantly reduce the expression of IL-2 /IL-1 β /IFN- γ in the T cells of the control group.

• CONCLUSION: This paper successfully constructs mice model with the recombinant lentivirus expressing AHNAK1 shRNA, which has a favorable inhibitory effect on secretion of IL-2, IL-1 β , IFN- γ by T cells. The recombinant lentivirus can effectively inhibit the occurring and proceeding of TAO in mice.

• KEYWORDS: AHNAK1; T cells; RNA interference; thyroid-associated ophthalmopathy; immunoregulation

Citation: Chen HX, Yu SS, Zhou WM, et al. Inhibition effect of the thyroid-associated ophthalmopathy in mice through the lentivirus expressing AHNAK1 shRNA on T cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(2):225-228

摘要

目的: 构建表达小鼠 CD4⁺ T 细胞钙支架蛋白 AHNAK1 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体, 并研究其对小鼠甲状腺相关性眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy, TAO) 的抑制效应。

方法: 设计并筛选对 AHNAK1 具有良好干扰效力的 shRNA 序列, 慢病毒载体包装干扰序列, 感染小鼠 CD4⁺ T 细胞, 检测 AHNAK1 静默对 T 细胞功能的抑制作用, 采用实验动物模型观察 AHNAK1 体内抑制甲状腺相关性眼病的效果。

结果: 成功筛选出具有良好干扰效力的 shRNA, 并包装入慢病毒。病毒滴度为 1.0×10^6 TU/mL, 转染慢病毒的 CD4⁺ T 细胞展现出失能倾向, 抑制炎症免疫反应; 在动物模型中抑制 T 细胞中 AHNAK1 表达可以有效控制甲状腺眼病的发生发展, 显著降低治疗组 T 细胞中 IL-2、IL-1 β 和 IFN- γ 的表达。

结论: 成功构建了表达小鼠 AHNAK1 shRNA 的慢病毒, 具有抑制 T 细胞分泌 IL-2、IL-1 β 和 IFN- γ 的表达效应, 能够有效抑制甲状腺眼病的发生发展。

关键词: AHNAK1; T 细胞; RNA 干扰; 甲状腺相关性眼病; 免疫调控

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.02.07

引用: 陈华新, 于少硕, 周维明, 等. shRNA 静默 CD4⁺ T 细胞 AHNAK1 基因对小鼠甲状腺相关性眼病进程的抑制作用. 国际眼科杂志 2014;14(2):225-228

0 引言

甲状腺相关性眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是当前我国发病率最高的成人眼眶疾病^[1,2],除眼部病征外,还伴有其他不同程度的甲状腺损害症状。但关于TAO的具体发病机制仍不明确,也导致了TAO缺乏有效的治疗手段^[3]。目前认为,TAO是机体免疫系统在自身抗原(甲状腺球蛋白、促甲状腺素受体、G2a蛋白等)长期刺激下,产生自身抗体—甲状腺刺激性抗体(thyroid stimulating antibody, TsAb),造成眼眶和其他组织广泛的炎症损害导致,具体过程以细胞免疫应答为主^[4,5]。T细胞是机体免疫应答的关键环节,初始T细胞受抗原刺激后会发生分化,介导不同类型的免疫应答^[6]。AHNAK1是T细胞胞内的一种钙通道支架蛋白,能够介导钙内流,启动免疫基因转录表达^[7]。最近的研究表明静默AHNAK1表达能导致CD4⁺T细胞发生分化,抑制细胞免疫应答,阻抑炎症反应发生^[8]。研究提示静默AHNAK1表达有可能抑制TAO中细胞免疫应答进程,为此我们观察了AHNAK1静默对T细胞功能的影响和对TAO的治疗效应。

1 材料和方法

1.1 材料 293细胞购自ATCC。小鼠IL-2、IL-1 β 、IFN- γ 的ELISA试剂盒购自RD公司。miRNA表达载体pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR、慢病毒表达质粒pLenti6.3/V5-DEST、病毒包装系统ViraPowerTMPackaging Mix为Invitrogen公司产品。6~8周龄的Balb/c小鼠购自上海必凯公司。

1.2 方法

1.2.1 shRNA重组质粒的构建 利用RT-PCR方法从Balb/c小鼠外周血CD4⁺T细胞中获得AHNAK1的基因序列,将其克隆到真核载体pEGFP-N1中,构建AHNAK1的真核表达载体pEGFP-N1-AHNAK1。依据得到的基因序列,使用在线RNA设计软件ihome设计4种可能具有干扰效力的序列,用BamHI和HindIII双酶切目的基因序列和质粒pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR,以T4DNA连接酶连接载体和目的基因,构建AHNAK1 shRNA重组质粒。

1.2.2 干扰RNA的筛选 将设计的4段序列分别命名为sha121, sha122, sha123, sha124(阴性对照为shaNC),为筛选最佳干扰效率的质粒,将各质粒分别与AHNAK1真核表达载体共转染进入293细胞,72h后收集细胞,抽提胞内蛋白行蛋白质免疫印迹检测。

1.2.3 慢病毒载体的构建和包装病毒 将构建的4段干扰序列中最有效率的一段sha124用Gateway重组技术重组到慢病毒表达载体中,命名为pLenti6.3-sha124,测序验证后进行慢病毒包装,将ViraPowerTMPackaging Mix和慢病毒载体转染入293细胞,48h后收集上清,包装出的病毒命名为Lv-sha124,病毒滴度测定采用倍比稀释法感染293细胞测定。

1.2.4 外源抗原刺激CD4⁺T细胞后ELISA检测细胞因子表达 取12只Balb/c小鼠,将Balb/c小鼠CD4⁺T细胞接种于24孔板中,密度为1 \times 10⁶/mL,每孔1mL,培养24h后分为4组,每组有3只小鼠来源的T细胞:阴性对照组(未感染的CD4⁺T细胞,加入等体积的PBS), sha124非刺激组(sha124感染CD4⁺T细胞,加入等体积PBS), sha124刺激组(sha124感染的CD4⁺T细胞,每孔加入100 μ g

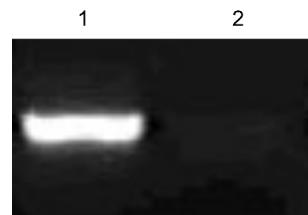


图1 pEGFP-N1-AHNAK1质粒的鉴定 1:pEGFP-N1-AHNAK1; 2:Untransfected。

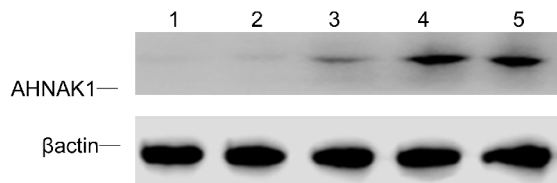


图2 蛋白质印迹检测 shRNA的干扰效率 1: sha124; 2: sha123; 3: sha122; 4: sha121; 5: shaNC。

PHA),阳性对照组(未感染的CD4⁺T细胞,每孔加入100 μ g PHA)。刺激1,6,12,24h后分别收集培养上清行IL-2、IL-1 β 、IFN- γ 的ELISA检测。

1.2.5 小鼠甲状腺眼病动物模型中观察重组慢病毒Lv-sha124对炎症反应进程的阻碍作用 取40只Balb/c小鼠,雌雄各半,分为2组,每组20只(雌雄各10只)。分别于0,3,6wk经双侧胫前肌各注射重组质粒pcDNA3.1/hTSHR 50 μ g,每次质粒免疫前予以胫前肌注射5g/L布匹卡因协助免疫。18wk后处死小鼠,分离提取各小鼠脾细胞,将各小鼠脾细胞经尾静脉注射入第二批40只Balb/c小鼠中(雌雄各半),4wk后获得TAO模型。接下来将实验小鼠分为:生理盐水组(20只,雌雄各半),眼眶局部内注入0.5mL生理盐水;Lv-sha124治疗组(20只,雌雄各半),眼眶局部内采用基因枪注入4 \times 10⁸TU重组慢病毒Lv-sha124,注射时按50mg/kg予以戊巴比妥那麻醉小鼠,消毒后从小鼠右睑下缘中后1/3处进针,分别眼眶注射生理盐水和Lv-sha124,注射后第1,7,14,21,28d分批处死动物,每次每组处死4只大鼠,取眼眶组织灌洗后,收集上清,用磁珠分选CD4⁺T细胞4h,采用Bio-Plex悬浮芯片系统测定其中IL-2、IL-1 β 、IFN- γ 的含量。

统计学分析:结果采用SPSS 17.0统计软件分析处理,组间比较用t检验,P<0.05为具有统计学意义。

2 结果

2.1 鉴定pEGFP-N1-AHNAK1质粒和最有效shRNA的筛选 构建AHNAK1真核表达载体pEGFP-N1-AHNAK1,转染293细胞72h后,裂解细胞行蛋白质印迹检测可见AHNAK1表达(图1)。设计的4段shRNA序列(表1),携带shRNA的载体转染293细胞72h行蛋白质印迹检测(图2),并采用Quantity One软件分析各条带灰度,各条shRNA的抑制效率分别为sha121(5.6 \pm 1.3)%, sha122(35.4 \pm 2.6)%, sha123(79 \pm 3.9)%, sha124(82.6 \pm 2.9)%, shaNC(3.2 \pm 2.1)%,可见sha124抑制效果最佳。

2.2 慢病毒载体的包装滴定 用抑制效率最佳的sha124构建慢病毒载体并包装,得到的病毒滴度为1.0 \times 10⁶TU/mL,在荧光显微镜下可显示成功转染的细胞有荧光蛋白表达(图3)。

表 1 设计的 shRNA 序列

名称	序列(5'-3')
shn121	TGCTGTACAGTGGCTGCCACAAGCACGTTTTCCGCGACTGACTGACGTGCTTGTAGCCACTGTA CCTGTACAGTGGGTAACAAGCACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTGCTGCTGTTAGCCACTGTAC
shn122	TGCTGATAACGTTCCGGCTCTGTGGGTTTTGGCGACTGACTGACCCACAAGACGGAAAAGTTAT CCTGATAACTTTCCGGTCTGTGGGTCAGTCAGTGGCCTAAACCCACAAGAGCGGAAAAGTTATC
shn123	TGCTGTGATCAAGCCATGAAAATATGCGTTTTGGCCACTGTCTGACGCATATTTTGGCTTGATCA CCTGTGATCAAGCGAAAATATGCGTCAGTCAGTGGCCAAAAGGCATATTTCTTGGCTTGATCAC
shn124	TGCTGTTCAAAGATAGACCAACGGCTGTTTTGGCCACTGACTGAGAGCCGTTGGTATCTTTGAA CCTGTTCAAAGATACCAACGGCTGTCTGTCAGTGGCCAAAACAGCGGTTGGTGTATCTTTGAAC
shnNC	TTTCTCCGAACGTGTACAGTTTGAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAAATTTTTTCGCCTGGTAC TCGAGAAAAAATTCTCCGAAGGTGTCACGTTCTCTGAAAACGTGACACGTTCCGAGAAATTCGAA

表 2 CD4⁺T 细胞中细胞因子不同时间点分泌情况比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n=3)

细胞因子		1h	6h	12h	24h
IL-2	阴性对照组	-	34.76±10.13	73.24±23.19	120.23±34.27
	sha124 非刺激组	-	35.98±11.72	71.47±25.36	124.13±36.09
	sha124 刺激组	34.71±19.16	68.21±24.23 ^a	94.12±28.61 ^a	136.15±28.22 ^a
	阳性对照组	48.49±14.65	143.30±30.41	278.65±28.91	375.34±35.21
IL-1β	阴性对照组	-	56.74±12.76	34.71±8.71	5.43±4.46
	sha124 非刺激组	-	58.34±14.15	33.24±7.56	5.87±5.05
	sha124 刺激组	87.65±46.31	146.53±16.72 ^c	21.36±4.12 ^c	120.34±78.24 ^c
	阳性对照组	70.14±20.32	376.47±19.71	251.08±34.53	698.52±60.12
IFN-γ	阴性对照组	-	44.51±80.14	36.34±53.52	-
	sha124 非刺激组	-	46.32±78.86	34.27±56.01	-
	sha124 刺激组	17.43±8.54	810.45±37.11 ^c	1467.31±67.71 ^c	1732.38±160.32
	阳性对照组	78.85±121.36	2865.46±56.73	3632.36±26.41	4346.08±89.02

^aP<0.05 vs IL-2 sha124 非刺激组; ^cP<0.05 vs IL-1β sha124 非刺激组; ^cP<0.05 vs IFN-γ sha124 非刺激组。

表 3 不同时间点甲状腺眼病模型中 T 细胞炎性细胞因子分泌情况 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n=4)

细胞因子		1d	7d	14d	21d	28d
IL-2	sha124 组	24.14±9.42	38.34±15.16	48.43±17.41	46.42±13.21	42.13±10.54
	生理盐水组	120.34±10.75	130.48±18.21	146.63±20.67	136.16±16.42	128.24±12.08
IL-1β	sha124 组	4.38±4.15	3.83±3.01	3.41±2.92	2.86±1.92	1.97±1.51
	生理盐水组	12.44±6.15	8.24±5.26	7.58±4.87	6.48±3.36	4.39±2.08
IFN-γ	sha124	4.38±4.15	3.83±3.01	3.41±2.92	2.86±1.92	1.97±1.51
	生理盐水组	12.24±7.15	18.13±8.11	20.76±10.33	18.78±9.32	14.34±6.04

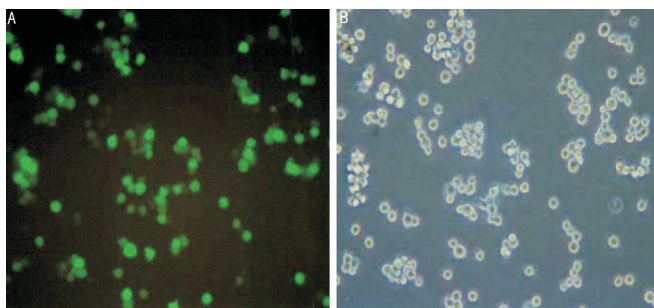


图 3 病毒感染后 CD4⁺T 细胞中 GFP 蛋白表达情况 (200×) A:相差显微镜观察;B:荧光显微镜观察。

2.3 感染 Lv-sha124 的 CD4⁺T 细胞分泌炎性细胞因子显著下降 以 LPS 刺激 Lv-sh124 感染的 NR8383,在刺激后 6~24h 分泌 IL-2、IL-1β、IFN-γ 受到显著抑制(P<0.05,表 2)。

2.4 动物模型中 T 细胞分泌炎性因子减少 按常规方法建立甲状腺眼病动物模型,导入 Lv-sha124,分别于各时间

点处死小鼠,分选收集 CD4⁺T 细胞,采用芯片系统测定,发现 IL-2、IL-1β、IFN-γ 含量显著下降(P<0.05,表 3)。

3 讨论

甲状腺相关性眼病因为高发病率和损伤的不可逆性,长期受到眼科学者们的关注。近年来逐渐认识到眼与甲状腺的共同抗原是导致本病的根本原因^[9]。目前认为可能的自身抗原原有 TSHR,眼外肌抗原(包括 G2s 蛋白、黄素蛋白 Fp 亚基、肌集钙蛋白等),甲状腺球蛋白(Tg)等,在免疫环境下,患者体内自身反应性 T 细胞与这些自身抗原相互作用,使自身反应性 T 细胞激活,分泌多种细胞因子及趋化因子,并促使眼眶组织中黏附分子的表达,在趋化因子及黏附分子的作用下,T 细胞向眼眶组织聚集,并分泌多种细胞因子激活眼眶的成纤维细胞(RF),使 RF 增殖活化,分泌大量的葡萄糖胺聚糖(GAG),GAG 可提高渗透压并结合大量的水分,从而使眼眶组织及眼外肌间质水肿;前脂肪 RF 转化为脂肪细胞,致眶内容增加,眶压增

高、眼球前突;T细胞分泌的前炎症因子,可以引起眼眶组织的炎症;Th2细胞可刺激B淋巴细胞,使其活化,产生自身抗体^[10,11]。由于炎症以及眼眶结缔组织和眼外肌间质的水肿变性、最终纤维化导致了相应的临床症状。甲状腺相关眼病眼眶组织中的炎性免疫细胞浸润是导致眶内容物增加,眼球突出的直接原因^[12]。启动炎症的免疫细胞主要是CD4⁺T细胞。Th1细胞激活时可以分泌IFN- γ 、IL-2以及IL-1 β 等。这些Th1型细胞因子在TAO的始动过程以及自身免疫反应的过程起了重要的作用^[13]。

作为一种钙通道支架蛋白,AHNAK1可以介导T细胞钙内流,启动免疫相关基因表达,参与调控免疫应答反应。但其在胸腺中低表达,推测其与外周血T细胞功能更加密切。Matza等^[14,15]发现,AHNAK1缺陷小鼠对利什曼原虫感染更加敏感,探寻其机制发现AHNAK1^{-/-}小鼠来源的CD4⁺T细胞IFN- γ 表达降低,不能有效地激发Th1效应清除利什曼原虫。进一步研究发现AHNAK1^{-/-}的CD4⁺T细胞增殖能力减弱,同时IL-2的表达水平也显著降低。经靶向阻断小鼠AHNAK1基因表达造成的AHNAK1蛋白缺失,导致TCR刺激诱导的CD4⁺T细胞胞外Ca²⁺的内流降低,影响下游转录因子NFAT的活化^[16,17]。研究提示AHNAK1可通过调节Ca_v1膜定位和钙内流,影响CD4⁺T细胞的功能。综合分析,如果静默眼眶内的CD4⁺T细胞的AHNAK1表达,可能从基因转录水平即抑制炎症细胞因子分泌。继而达到在TAO中控制自身免疫应答进程,减弱免疫细胞对眼眶组织的损伤。

短发夹RNA(shRNA)可以高效、特异地阻断体内特定基因表达,使细胞表现出相关基因缺失表型的过程^[18]。本研究依据网络在线的shRNA设计工具,筛选得到高干扰效率的shRNA,进而通过慢病毒系统实现TLR2基因的静默。其中慢病毒的转染效率较高,而且其安全性较好,不宜引起免疫反应,也逐渐成为病毒转染的首选载体^[19]。

在本研究中,我们从外周血CD4⁺T细胞的AHNAK1序列中筛选了专一靶点序列,并成功构建重组慢病毒用于转染CD4⁺T细胞,干扰其AHNAK1的表达,结果显示sh124有效干扰TLR2表达,其信号通路下游的IL-2、IL-1 β 、IFN- γ 的分泌也明显降低。而体内实验也证实,导入了慢病毒干扰序列的实验组小鼠其眼眶内T细胞分泌炎性细胞因子下降,病理提示眼眶内炎症程度较低,组织损伤轻微。这些研究结果显示CD4⁺T中的AHNAK1在TAO进程中可能起到重要作用,有可能成为TAO治疗的新靶点。但由于TAO发生机制发生非常复杂,对AHNAK1调控眼眶内T细胞炎症反应进程和相关信号转导机制值得进一步的深入探索。

参考文献

- 1 Fatourechi V. Thyroid dermopathy and acropachy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(4):553-565
- 2 Ardley M, McCorquodale T, Laahooti H, et al. Eye findings and immunological markers in probands and their euthyroid relatives from a single family with multiple cases of thyroid autoimmunity. *Thyroid Res*

- 2012;5(1):4
- 3 Gonzales M, Fratianni C, Mamillapali C, et al. Immunotherapy in miscellaneous medical disorders graves ophthalmopathy, asthma, and regional painful syndrome. *Med Clin North Am* 2012; 96(3):635-654
- 4 Yin X, Latif R, Bahn R, et al. Genetic profiling in graves' disease: further evidence for lack of a distinct genetic contribution to graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2012;22(7):730-736
- 5 Bartalena L. Prevention of Graves' ophthalmopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(3):371-379
- 6 Kawanishi K, Ohyama Y, Kanai Y, et al. Sub-acute Demyelinating Polyradiculoneuropathy as an Initial Symptom of Peripheral T Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified (PTCL-NOS). *Intern Med* 2012; 51(15):2015-2020
- 7 Leong S, Nunez AC, Lin MZ, et al. iTRAQ-based proteomic profiling of breast cancer cell response to doxorubicin and TRAIL. *J Proteome Res* 2012;11(7):3561-3572
- 8 Pankonien I, Alvarez JL, Doller A, et al. Ahnak1 is a tuneable modulator of cardiac Ca_v1.2 calcium channel activity. *J Muscle Res Cell Motil* 2011;32(4-5):281-290
- 9 Iyer S, Bahn R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(3):281-289
- 10 Eing F, Abbud CM, Velasco E, et al. Cosmetic orbital inferomedial decompression: quantifying the risk of diplopia associated with extraocular muscle dimensions. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2012;28(3):204-207
- 11 van Steensel L, Hooijkaas H, Paridaens D, et al. PDGF enhances orbital fibroblast responses to TSHR stimulating autoantibodies in Graves' ophthalmopathy patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):E944-E953
- 12 Gillespie EF, Papageorgiou KI, Fernando R, et al. Increased expression of TSH receptor by fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy leads to chemokine production. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E740-E746
- 13 van Steensel L, Paridaens D, van Meurs M, et al. Orbit-infiltrating mast cells, monocytes, and macrophages produce PDGF isoforms that orchestrate orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(3):E400-E408
- 14 Matza D, Badou A, Kobayashi KS, et al. A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity* 2008;28(1):64-74
- 15 Matza D, Badou A, Jha M K, et al. Requirement for AHNAK1-mediated calcium signaling during T lymphocyte cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(24):9785-9790
- 16 Pankonien I, Otto A, Dascal N, et al. Ahnak1 interaction is affected by phosphorylation of Ser-296 on Cav β . *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421(2):184-189
- 17 de Morrée A, Droog M, Grand Moursel L, et al. Self-regulated alternative splicing at the AHNAK locus. *FASEB J* 2012;26(1):93-103
- 18 Moffat J, Sabatini DM. Building mammalian signaling pathways with RNAi screens. *Nat Rev Mol Biol* 2006;7(1):177-187
- 19 Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Turning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 2006;3(9):682-688