

SMC3对肺癌A549细胞增殖、迁移和成球能力的影响

余冬梅 黄颖 安输 杨洋 刘莹 郝倩 徐天瑞* 郭晓汐*

(昆明理工大学生命科学与技术学院细胞信号传导实验室, 昆明 650500)

摘要 该文通过RNA干扰方法下调染色体结构维持蛋白3(structural maintenance of chromosomes protein 3, SMC3)的表达, 探究其对肺癌细胞A549的影响。用Western blot验证SMC3敲低的效果, 用CCK-8实验、Transwell实验检测SMC3敲低对A549细胞的增殖和迁移能力的影响, 用细胞成球等实验检测SMC3敲低对A549细胞干性的影响。结果显示, 该研究成功地构建了pSUPER-SMC3干扰质粒, 将其转染A549细胞后SMC3蛋白质水平明显降低。实验组(pSUPER-SMC3)与正常对照组(control)及阴性对照组(pSUPER)相比, 细胞增殖和迁移能力明显下降($P < 0.01$), 细胞成球数减少, 干性减弱。该实验结果表明, 下调SMC3蛋白质水平可以抑制A549细胞的增殖和迁移能力, 减弱细胞干性, 提示SMC3对肺癌的发生和发展可能具有促进作用。该实验为寻找潜在的抗肺癌方法提供了新的实验依据。

关键词 RNA干扰; A549细胞; SMC3; 增殖; 迁移

Effects of SMC3 on the Proliferation, Migration and Sphere Formation of Lung Cancer A549 Cells

Yu Dongmei, Huang Ying, An Shu, Yang Yang, Liu Ying, Hao Qian, Xu Tianrui*, Guo Xiaoxi*

(Cell Signaling Lab, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract In this study, the level of SMC3 (structural maintenance of chromosomes protein 3) protein was down-regulated by RNA interference, then we explore the effect of SMC3 on human lung cancer cell line A549. The level of SMC3 protein was determined by Western blot. The effect of SMC3 down-regulation on the proliferation and migration of A549 cells was detected by CCK-8 assay and Transwell assay. The effect of SMC3 down-regulation on the stemness of A549 cells was detected by sphere formation. The results showed that the pSUPER-SMC3 interference plasmid was successfully constructed, and the level of SMC3 protein was significantly decreased in A549 cells transfected with the pSUPER-SMC3. Compared with the control group and the negative control group (pSUPER), the cell proliferation and migration ability of the SMC3-knocked down group (pSUPER-SMC3) decreased significantly ($P < 0.01$), and the number of sphere formation and the stemness decreased, indicating that SMC3 could promote the development and progression of lung cancer and might provide a new experimental basis for finding potential anti-lung cancer methods.

Keywords RNA interference; A549 cells; SMC3; proliferation; migration

收稿日期: 2017-04-05 接受日期: 2017-08-07

国家自然科学基金(批准号: U1302225、81460253、81460417、81473342)、云南省高端科技人才基金(批准号: 2012HA008)、云南省教育厅面上项目(批准号: KKJA201426013)和云南省省级自然科学人才培养项目(批准号: KKSYSY201326121)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65939327, E-mail: xtrgfq@hotmail.com; E-mail: gxxzmcn@icloud.com

Received: April 5, 2017 Accepted: August 7, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.U1302225, 81460253, 81460417, 81473342), Yunnan High Tech Talent Fund (Grant No.2012HA008), Yunnan Provincial Department of Education Project (Grant No.KKJA201426013) and Yunnan Provincial Natural Science Personnel Training Project (Grant No.KKSYSY201326121)

*Corresponding authors. Tel: +86-871-65939327, E-mail: xtrgfq@hotmail.com; E-mail: gxxzmcn@icloud.com

网络出版时间: 2017-09-15 11:32:35 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170915.1132.004.html>

肺癌是一种常见的肺部恶性肿瘤,其发病率和死亡率位均居全球第一^[1-2]。肺癌的发生过程中常常伴随着恶性肿瘤的增殖和转移,因此,降低恶性肿瘤的增殖和转移对肺癌的治疗有很大的帮助^[3-4]。研究发现,染色体的不稳定性会促进肺癌的发生^[5]。染色体结构维持蛋白3(structural maintenance of chromosomes protein 3, SMC3)是黏连蛋白的重要组成部分,SMC3和SMC1A亚基通过其铰链结构域二聚化形成“V”形状,这个“V”与底部的双链断裂修复蛋白(double-strand-break repair protein rad 21 homolog, RAD21)亚基连接形成一个封闭的三边环状结构,这个环状结构能够包围姐妹染色体从而介导姐妹染色体黏连蛋白的黏附,并在基因调控中发挥关键作用^[6-8]。SMC3在DNA重组中起着决定性的作用,并能修复DNA的损伤^[9]。除此之外,SMC3在S期可以被乙酰化(acetylation),建立染色质加载的黏连蛋白的黏着性,随后,乙酰化的SMC3被组蛋白去乙酰化酶8(histone deacetylase 8, HDAC8)脱乙酰化,用HDAC8的特异性抑制剂PCI-34051处理后发现,SMC3的乙酰化作用增强,从而破坏了细胞周期进程和细胞的存活^[10]。因此,我们推测,SMC3通过调节染色体结构而参与了肺癌细胞的重要生物学功能,在肺癌的发生和发展过程中可能发挥着重要的作用。A549细胞是研究肺癌常用的一个细胞株,能以稳定的形式传代培养^[11-14]。因此,本研究通过下调SMC3的表达探究其对A549细胞的增殖、迁移及干性的影响,为揭示SMC3在肺癌的发生、发展中的作用以及为寻找潜在的抗肺癌方法提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肺癌A549细胞株购于中国科学院上海细胞库;RPMI-1640细胞培养基购自Hyclone公司;胎牛血清购自Gibco公司;SMC3抗体购自Santa Cruz公司;CD44抗体购自Cell Signaling Technology公司;CD133抗体购自Millipore公司;载体pSUPER-Puro购自OligoEngine公司;限制性内切核酸酶(*Xho* I、*Bgl* II)和T4 DNA连接酶均购自TaKaRa公司;Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司;CCK-8试剂购自碧云天生物技术有限公司;电泳仪和凝胶成像系统购自北京六一生物科技有限公司;酶标仪购自BMG LABTECH公司。

1.2 pSUPER-SMC3真核表达载体的构建及鉴定

分别设计SMC3-shRNA的正向DNA片段5'-GAT CCC CGT TAC TGG TCC TCG TGT TAT TTT CAA GAG AAA ATA ACA CGA GGA CCA GTA CTT TTT C-3'和反向DNA片段5'-TCG AGA AAA AGT ACT GGT CCT CGT GTT ATT TTC TCT TCA AAA ATA ACA CGA GGA CCA GTA CGG G-3',并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将DNA片段稀释至40 μmol/L,使正义链和反义链以等摩尔的量在退火缓冲液中退火并结合成双链,载体pSUPER-puro用限制性内切核酸酶*Xho* I、*Bgl* II进行酶切,再用T4 DNA连接酶使载体pSUPER-puro和双链DNA连接,然后转化感受态大肠杆菌DH5α,挑取单克隆、摇菌并测序,将测序正确的克隆扩增并提取重组质粒。

1.3 细胞转染及阳性单克隆细胞株的筛选

将处于对数期的A549细胞均匀地接种在6孔板中,当细胞生长至50%~80%汇合时进行转染。按照Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书操作,6 h后加入含血清的培养基进行培养,24 h后把细胞传到直径为10 cm的细胞培养皿中,并在1 d后加入终浓度为0.3 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选。每3 d换1次含有嘌呤霉素的筛选培养基,大约筛选12 d至单克隆细胞长出。挑取单克隆细胞,进一步在6孔板中扩大培养。实验分为3组:正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)和实验组(pSUPER-SMC3)。

1.4 Western blot法检测细胞中SMC3蛋白的表达水平

收集3组细胞,用RIPA裂解液进行裂解,提取细胞总蛋白并用BCA标准曲线法进行定量,加入RIPA裂解液和上样缓冲液补齐,98 °C变性5 min。配置5%的浓缩胶和10%的分离胶,25 μg总蛋白经恒压150 V电泳1 h后,120 V电转70 min至PVDF膜。10%的脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入SMC3抗体(1:4 000)、GAPDH抗体(1:2 000),4 °C摇床孵育过夜。1×TBST洗膜3次,每次8 min,加入相应的二抗后室温摇床孵育1 h,1×TBST洗膜3次后运用ECL法检测。

1.5 CCK-8检测细胞增殖

取RNA干扰成功的实验组(pSUPER-SMC3)、阴性对照组(pSUPER)和正常对照组(control)的A549细胞,调整细胞密度,以 2×10^3 /孔接种于96孔培养板中。每孔100 μL培养基,设置5个复孔,96孔板放入细胞培养箱中继续培养24、48、72、96 h,每孔加

入10 μL 的CCK-8试剂后放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育1.5 h, 然后用酶标仪检测490 nm波长处的D值。

1.6 Transwell实验检测细胞迁移

实验分别分为实验组(pSUPER-SMC3)、阴性对照组(pSUPER)和正常对照组(control), 每组设置3个复孔。在实验之前先用血清饥饿12 h, 之后用胰蛋白酶消化并制作细胞悬液, 均加入100 μL (1×10^5)的细胞悬液于Transwell小室上腔, 加入600 μL 完全培养基于小室下腔, 放于置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、含5% CO_2 的培养箱中培养24 h, 用PBS洗涤后加入4%的多聚甲醛固定20 min, 1%结晶紫染色液染色10 min, 棉签擦去上室内细胞, 拍照并进行细胞计数。

1.7 细胞成球实验

将培养瓶中培养至80%汇合的实验组(pSUPER-SMC3)、阴性对照组(pSUPER)和正常对照组(control)的细胞进行胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液并进行计数, 将计数好的细胞铺在低黏附的24孔板里, 每孔1 000个细胞, 并设3个复孔。每孔加入无血清培养液[EGF(20 ng/mL)+Basic-FGF(20 ng/mL)+B27添加剂(1:50)+肝素钠(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+青/链霉素混合液(100 \times)2 mL]。细胞置于培养箱内培养10~14 d, 每2~3 d加入100 μL 培养基, 观察克隆球的形成情况。细胞培养14 d左右, 即可进行拍照、计数。

1.8 Western blot法检测细胞中CD133和CD44蛋白质水平

按照1.4的方法把3组细胞的总蛋白进行SDS-PAGE、转膜和封闭后, 分别加入CD133抗体(1:2 000)、CD44抗体(1:4 000)、SMC3抗体(1:4 000)和GAPDH抗体(1:2 000)摇床孵育过夜, 1 \times TBST洗膜3次, 每次8 min, 加入相应的二抗后室温摇床孵育1h, 1 \times TBST洗膜3次后运用ECL法检测。

1.9 统计学方法

实验中所获得数据都采用GraphPad Prism 5进行处理分析, 计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用One-Way ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pSUPER-SMC3的稳转降低了A549细胞中SMC3蛋白的表达水平

Western blot方法检测pSUPER-SMC3稳转到A549细胞中SMC3蛋白质水平。如图1所示, 转染pSUPER-SMC3的实验组与正常对照组、阴性对照组相比,

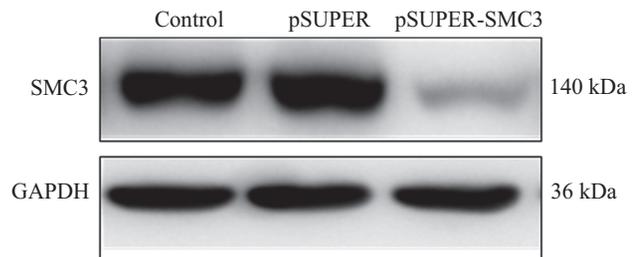
SMC3蛋白质水平明显减少, 说明pSUPER-SMC3的稳转能够显著降低A549细胞中SMC3蛋白质水平。

2.2 下调SMC3蛋白质水平抑制A549细胞的增殖

通过CCK-8法检测稳转pSUPER-SMC3后对A549细胞增殖情况。如图2和表1所示, 稳转pSUPER-SMC3的A549细胞的增殖能力与对照组和阴性实验组相比明显下降, 并且具有统计学意义($P < 0.01$), 说明SMC3的下调抑制了A549细胞的增殖。

2.3 下调SMC3蛋白的表达抑制A549细胞的迁移

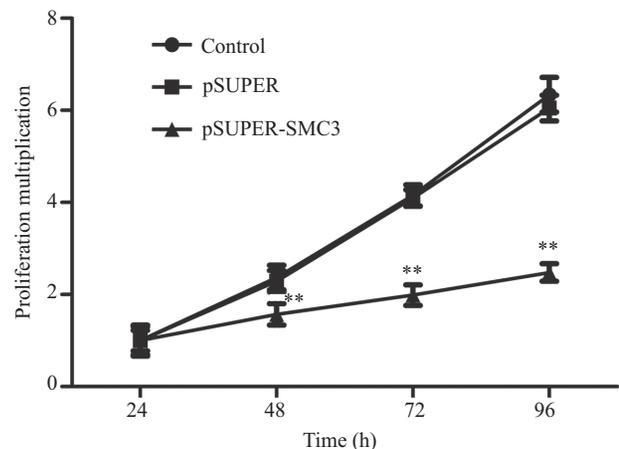
Transwell实验结果如图3所示, 转染pSUPER-SMC3的实验组细胞穿过滤膜进入下室的细胞数为 56.000 ± 7.200 , 而正常对照组和阴性对照组细胞进入下室的细胞数分别为 146.667 ± 6.100 、 145.000 ± 7.500 ,



Control: 正常的A549细胞; pSUPER: 转染pSUPER空载体的A549细胞; pSUPER-SMC3: 转染pSUPER-SMC3质粒的A549细胞。
Control: A549 cells; pSUPER: A549 cells transfected with pSUPER; pSUPER-SMC3: A549 cells transfected with pSUPER-SMC3.

图1 pSUPER-SMC3的转染降低A549细胞中SMC3蛋白质水平

Fig.1 SMC3-shRNA transfection decreased the level of SMC3 protein in A549 cells



** $P < 0.01$, 与正常对照组(control)和阴性对照组(pSUPER)比较。

** $P < 0.01$ compared with the normal control group and the negative control group (pSUPER).

图2 下调SMC3蛋白质水平抑制了A549细胞增殖

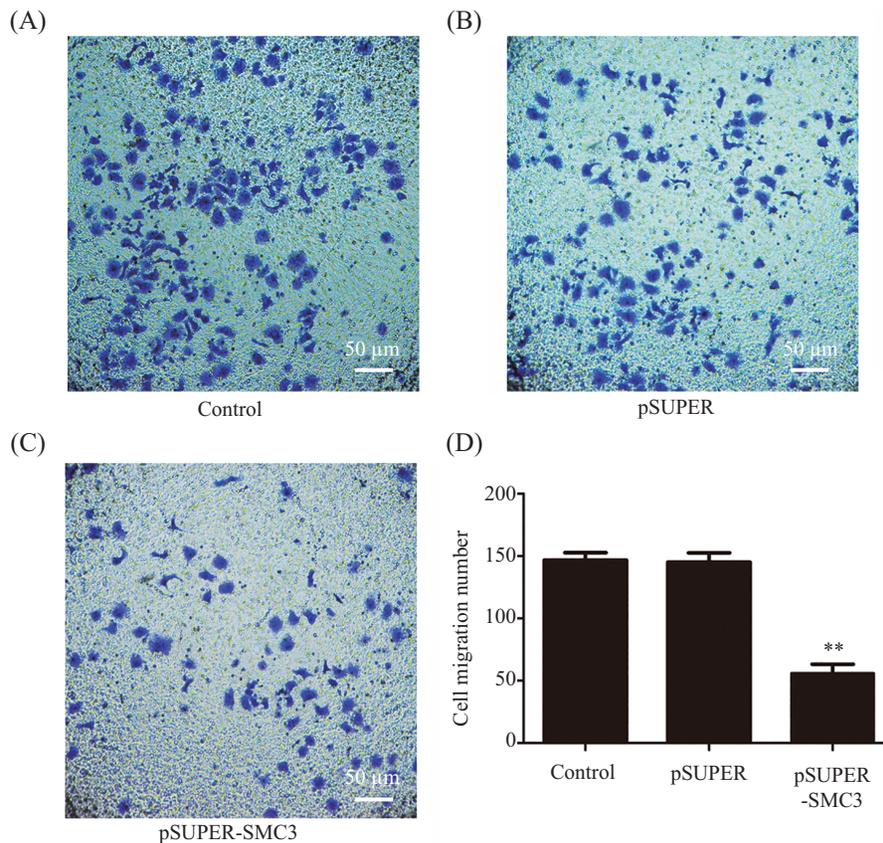
Fig.2 Down-regulation of SMC3 protein level inhibited A549 cell proliferation

表1 下调SMC3蛋白的表达对A549细胞增殖的影响(D值)

组别 Group	时间(h) Time (h)			
	24	48	72	96
Control	0.229±0.077	0.543±0.061	0.951±0.053	1.451±0.086
pSUPER	0.223±0.068	0.510±0.053	0.913±0.040	1.347±0.063
pSUPER-SMC3	0.221±0.049	0.347±0.052**	0.439±0.049**	0.548±0.042**

表中数据均采用均数±标准差表示。** $P < 0.01$, 与正常对照组(control)和阴性对照组(pSUPER)比较。

The data in the tables are all expressed by $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ compared with the normal control group and the negative control group (pSUPER).



A~C: 普通倒置显微镜下分别观察正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)和实验组(pSUPER-SMC3)的A549细胞迁移数; D: 对A~C实验进行统计分析, 数值以均值±标准误差表示, ** $P < 0.01$, 与正常对照组(control)和阴性对照组(pSUPER)比较。

A~C: the number of A549 cells in normal control group, negative control group and SMC3 knock-down group were observed under normal inverted microscope; D: A~C experimental data were analyzed statistically and the values were expressed as $\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$ compared with the normal control group and the negative control group (pSUPER).

图3 下调SMC3蛋白质水平抑制了A549细胞迁移

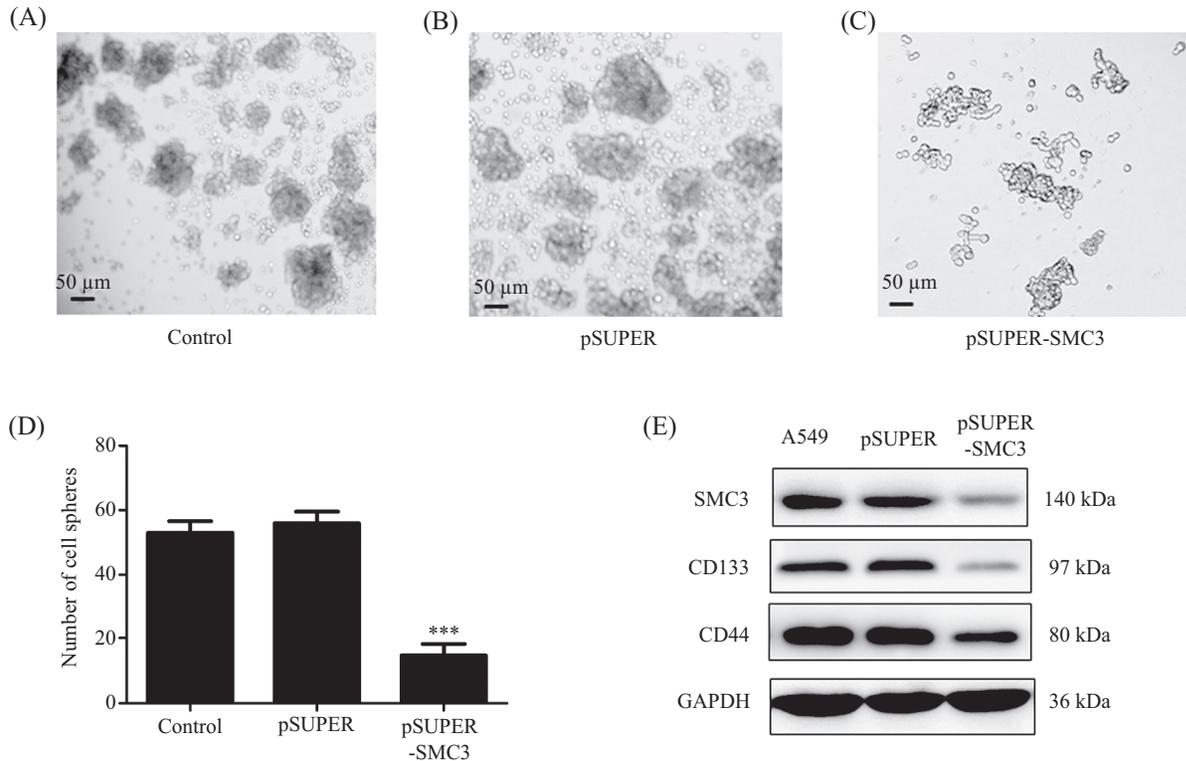
Fig.3 Down-regulation of SMC3 protein level inhibited A549 cell migration

实验组细胞数明显少于正常对照组和阴性对照组的细胞数, 且差异具有显著性意义($P < 0.01$), 证明下调SMC3蛋白质确实会抑制A549细胞的迁移。

2.4 下调SMC3蛋白质水平可降低A549细胞克隆球的形成能力

实验组(pSUPER-SMC3)、正常对照组(control)和

阴性对照组(pSUPER)的A549细胞用干细胞培养液培养14 d后发现, 实验组的细胞成球数为(19.667±3.055)明显少于正常对照组(54.333±4.041)和阴性对照组(54.667±3.786), 差异具有极显著性意义($P < 0.001$), 而正常对照组和阴性对照组细胞成球数无显著性意义($P > 0.05$)(图4A~图4D); Western blot实验显示, 细胞干



A~C: 普通倒置显微镜下分别观察正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)和实验组(pSUPER-SMC3)的A549细胞成球数; D: 对A~C实验进行统计分析, 数值以均值±标准误差表示, *** $P < 0.001$, 与正常对照组(control)和阴性对照组(pSUPER)比较; E: Western blot检测正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)和实验组(pSUPER-SMC3)A549细胞中干性标志物CD133和CD44蛋白的表达水平。

A~C: the number of A549 cell spheres formation in the normal control group, the negative control group (pSUPER) and SMC3 knock-down group (pSUPER-SMC3) were observed under normal inverted microscope; D: A~C experimental data were analyzed statistically and the values were expressed as $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.001$ compared with the normal control group and the negative control group; E: Western blot was used to detect the levels of CD133 and CD44 protein in the normal control group, the negative control group (pSUPER) and SMC3 knock-down group (pSUPER-SMC3).

图4 下调SMC3蛋白质水平抑制A549细胞成球数

Fig.4 Down-regulation of SMC3 protein level inhibited the number of A549 cell spheres formation

性标志物CD133和CD44降低(图4E)。以上说明, 下调SMC3蛋白质水平使A549细胞成球数减少, 干性减弱。

3 讨论

在大多数恶性肿瘤的细胞中都能观察到染色体的不稳定性, 而Choesin复合体在维护染色体的稳定性方面发挥着关键性的作用。研究发现, Choesin复合体以及它的辅助因子功能缺失会引起癌症的发生与发展^[15-17], 而SMC3是Choesin复合体核心亚基之一, 因此, 我们推测, SMC3与肺癌的发生也有一定的相关性。研究发现, 在人结肠癌和遗传性易患息肉的小鼠肠道肿瘤中都存在SMC3的高表达^[18]。在肠上皮细胞中, 腺瘤性结肠息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)/ β -连环蛋白(β -catenin)/转录因子4(transcription factor 4, TCF4)反式激活通路的正常运行使SCM3的表达量受到控制, 然而该通路在结肠癌中会受到破坏, 从而使SMC3的表达量过高^[19], 过

表达SMC3的NIH3T3成纤维细胞会使细胞之间的接触受到抑制, 这导致细胞独立增长最终引起组织病变。因此, SMC3的过表达与癌症的发生确实具有一定的联系, 但在肺癌中SMC3的生物功能和作用机制尚不明确。

本研究采用稳定转染的方法^[20-22], 将pSUPER-SMC3质粒在Lip 2000脂质体的介导下稳转入人肺癌A549细胞中, 进一步研究下调SMC3蛋白质水平对A549细胞的影响。即在外源基因表达载体上带有抗嘌呤霉素的基因, 当外源基因导入A549细胞中时, 则带有抗嘌呤霉素的外源基因表达载体整合到A549细胞的基因组DNA上, 在细胞的培养过程中加入嘌呤霉素筛选就会得到含有目的基因的A549细胞, 这种方法能够维持较长时间SMC3基因的沉默, 并且能够稳定地存在于细胞中。

我们用Western blot检验A549细胞中SMC3蛋白质水平, 发现SMC3-shRNA能有效地抑制目的基因的

表达。以此为基础,我们又通过CCK-8检测了A549细胞增殖率,发现实验组(pSUPER-SMC3)细胞的增殖速度和正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)相比显著减慢($P<0.01$)。因此,下调SMC3蛋白会抑制A549细胞的增殖。我们通过Transwell小室实验检测下调SMC3蛋白对A549细胞迁移能力的影响。实验结果显示,实验组(pSUPER-SMC3)细胞的迁移能力和正常对照组(control)、阴性对照组(pSUPER)相比显著降低($P<0.01$),这说明SMC3的沉默会抑制A549细胞的迁移。除此之外,细胞成球实验中显示,下调SMC3蛋白会使A549细胞成球数减少,细胞干性减弱。

总之,SMC3敲低会抑制A549细胞的增殖、迁移和成球能力,减弱细胞的干性,这些均是癌细胞生存和肿瘤发展的重要生物学功能。因此,SMC3有望成为新的肺癌诊断的生物标志和治疗的药物靶点。

参考文献 (References)

- Xie LY, Piao HL, Fan M, Zhang Z, Wang C, Bigner DD, *et al.* Immunotoxin therapy for lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130(5): 607-12.
- Zahnd WE, Jenkins WD, Mueller-Luckey GS. Cancer mortality in the Mississippi Delta region: Descriptive epidemiology and needed future research and interventions. *J Health Care Poor Underserved* 2017; 28(1): 315-28.
- 伍潇怡, 卢圆圆, 胡轲轲, 蓝林华, 谢德耀, 刘永章, 等. 下调线粒体转录因子A对肺腺癌细胞A549成瘤能力和药物敏感性的影响. *中国细胞生物学学报(Wu Xiaoyi, Lu Yuanyua, Hu Keke, Lan Linhua, Xie Deyao, Liu Yongzhang, et al. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells. Chinese Journal of Cell Biology)* 2016; 38(4): 375-81.
- Wang Y, Zhao M, Liu J, Ni J, Jiao Y, Bai C. Up regulation of IL-6 is involved in di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induced migration and invasion of non small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 89: 1037-44.
- Sexton T, Cavalli G. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell* 2015; 160(6): 1049-59.
- Hill VK, Kim JS, Waldman T. Cohesin mutations in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1866(1): 1-11.
- Gligoris TG, Scheinost JC, Bürmann F, Petela N, Chan KL, Uluocak P, *et al.* Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science* 2014; 346(6212): 963-7.
- Beckouët F, Hu B, Roig MB, Sutani T, Komata M, Uluocak P, *et al.* An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Mol Cell* 2010; 39(5): 689-99.
- Chavda AP, Ang K, Ivanov D. The torments of the cohesin ring. *Nucleus* 2017; 27: 1-7.
- Dasgupta T, Antony J, Braithwaite AW, Horsfield JA. HDAC8 inhibition blocks SMC3 deacetylation and delays cell cycle progression without affecting cohesin-dependent transcription in MCF7 cancer cells. *J Biol Chem* 2016; 291(24): 12761-70.
- Liang S, Xu JF, Cao WJ, Li HP, Hu CP. Human decorin regulates proliferation and migration of human lung cancer A549 cells. *Chin Med J* 2013; 126(24): 4736-41.
- HuangL, Li F, Deng P, Hu C. MicroRNA-223 promotes tumor progression in lung cancer A549 cells via activation of the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Res* 2016; 24(6): 405-13.
- Li Z, Li B, Niu L, Ge L. miR-592 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SOX9. *Oncol Rep* 2017; 37(1): 297-304.
- Dong Z, Zhao L, Lu S, Xiong J, Geng Z. Overexpression of TSPAN8 promotes tumor cell viability and proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2016; 31(10): 353-9.
- Mazumdar C, Majeti R. The role of mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2017; 105(1): 31-6.
- Zhou P, Xiao N, Wang J, Wang Z, Zheng S, Shan S, *et al.* SMC1A recruits tumor-associated-fibroblasts (TAFs) and promotes colorectal cancer metastasis. *Cancer Lett* 2017; 385: 39-45.
- Yun J, Song SH, Kang JY, Park J, Kim HP, Han SW, *et al.* Reduced cohesion destabilizes high-level gene amplification by disrupting pre-replication complex bindings in human cancers with chromosomal instability. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(2): 558-72.
- Shimizu K, Shirataki H, Honda T, Minami S, Takai Y. Complex formation of SMAP/KAP3, a KIF3A/B ATPase motor-associated protein, with a human chromosome-associated polypeptide. *J Biol Chem* 1998; 273(12): 6591-4.
- Ghiselli G, Coffee N, Munnery CE, Koratkar R, Siracusa LD. The cohesin SMC3 is a target for beta-catenin/TCF4 transactivation pathway. *J Biol Chem* 2003; 278(22): 20259-67.
- O'Brien PJ, Elahipanah S, Rogozhnikov D, Yousaf MN. Bio-orthogonal mediated nucleic acid transfection of cells via cell surface engineering. *ACS Cent Sci* 2017; 3(5): 489-500.
- Janune D, Takigawa M. *In vitro* transfection with and expression of CCN family of genes. *Methods Mol Biol* 2017; 1489: 107-13.
- Mock U, Machowicz R, Hauber I, Horn S, Abramowski P, Berdien B, *et al.* mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(11): 5560-71.