

مهار ژن CREB response element binding protein توسط siRNA در رده سلولی K562

زهرا دیلمی خیابانی^{۱*}، مهدی بنان^۲، علی محمد اصغریان^۳، جلال قره‌سوران^۴، حسین نجم‌آبادی^۵

- ۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران
- ۴- مربی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۵- استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۷

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۲۸

چکیده

هدف: پروتئین CREB یک فاکتور مهم پایین‌دست بسیاری از مسیرهای علامتی به‌شمار می‌رود. با طراحی siRNA کارآمد برای ژن CREB می‌توان مسیرهای علامتی بسیاری از داروها را در سلول‌های مختلف به‌ویژه سلول K562 بررسی نمود. در این تحقیق میزان مهار بیان ژن CREB با به‌کارگیری دو siRNA مختلف برای این ژن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: طراحی siRNA براساس معیار Reynolds انجام گرفت. سلول‌های K562 با روش لیپوفکشن با siRNAها ترانسفکت شدند. بررسی اثر مهار بیان ژن CREB با استفاده از Real-time PCR کمی-نسبی انجام گرفت.

نتایج: طبق نتایج به‌دست آمده یکی از siRNAها اثر مهار بالایی بر روی بیان CREB در سلول‌های K562 نشان داد، و بیان ژن CREB، تا ۸۷ درصد در سلول‌های K562 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که از دو siRNA به‌کار رفته در سلول‌های K562 برای مهار ژن CREB1، فقط یکی از آنها قدرت مهار با کارایی بالا را دارد. با توجه به این‌که هر دو siRNA مطابق با معیارهای Reynolds است، احتمالاً عوامل دیگری هم در مؤثر بودن siRNA دخالت دارند. برای مهار کارآمد یک ژن با siRNA بایستی بیش از یک siRNA برای قسمت‌های مختلف آن طراحی و آزمایش شود.

کلیدواژگان: siRNA، پروتئین CREB، سلول‌های K562، Real-time PCR

۱- مقدمه

مولکول‌های siRNA (small interfering RNA) که از اجزای عملکردی مسیر RNAi (RNA interference) هستند، یکی از مهم‌ترین و مؤثرترین راه‌های خاموش‌سازی ژن‌های سلول‌های جانوری است [۱-۳]. siRNAها، قطعات ۲۱-۲۸

* نشانی مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تحقیق طراحی CREB1 siRNA و بررسی دقیق میزان مهاري آن در سلول‌های اريترولوکيميا K562 بود.

از دو siRNA که در این تحقیق استفاده شد، تنها یکی از آن‌ها مهار قابل توجهی از خود نشان داد و siRNA دیگر هیچ اثر مهاری از خود نشان نداد. نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعاتی که در رابطه با درک مسیر عملکردی بسیاری از داروها که احتمالاً با فعال کردن CREB1 عمل می‌کنند، مؤثر باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلول

سلول‌های K562 از بخش سلولی، دانشگاه Erasmus هلند تهیه شدند. سلول‌ها در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Biosera) همراه با FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد (Biosera) در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند تا به تعداد ۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر رسیدند [۸].

۲-۲- طراحی siRNA

یکی از راه‌های طراحی siRNA استفاده از نرم‌افزارهای موجود، مثل نرم‌افزارهای شرکت MWG است [۹]. برای مهار بیان ژن CREB1 دو نوع مختلف siRNA برای مکان‌های مختلف ژن CREB1 طراحی شد. مولکول siRNA ای که نتوانست به‌طور کارآمد موجب مهار ژن CREB1 شود به توالی ۵۹۸-۶۱۶ mRNA ژن CREB1 متصل شد و اتصال مولکول siRNA با کارایی بالا به ناحیه ۱۲۳۵-۱۲۵۲ ژن CREB1 صورت گرفت.

برای کنترل و تعیین میزان مهار ژن CREB1 لازم بود از یک siRNA منفی (Negative siRNA) نیز استفاده شود که این siRNA با هیچ mRNA ای رابطه مکملی نداشته و در نتیجه هیچ ژنی را مهار نمی‌کند. توالی siRNA منفی مورد استفاده به‌صورت 5' AGGUAGUGUAAUCGCCUUG 3' بود که از شرکت MWG تهیه شد.

نوکلئوتیدی هستند و بیان ژن‌ها را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند. برای خاموش‌سازی ژن، siRNA با مجموعه‌های خاموش‌کننده القاء شده با RNA یا RISC (RNA-Induced Silencing Complex) همراه شده و با اتصال به RNA هدف موجب تجزیه آن می‌شوند [۱]. این سیستم به‌طور طبیعی در سلول‌های یوکاریوتی وجود داشته و در تنظیم بیان ژن‌ها در مرحله پس از رونویسی دخالت می‌کند. استفاده از siRNA یک روش جدید و مطمئن برای مطالعه عملکرد ژن‌ها در سلول‌های جانوری است [۴].

پروتئین CREB (Ca²⁺/cAMP response element binding protein) از فاکتورهای رونویسی است که فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک‌های سلولی مثل Ca²⁺، cAMP، هیپوکسی، نور ماورای بنفش (Ultra Violet: UV) و فاکتورهای رشد افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر در موش‌های ترانس‌ژنیک نشان داده که CREB1 برای بقای سلول‌ها ضروری است. از طرفی بیان بیش از اندازه آن مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) را در سلول‌های T القاء می‌کند [۵، ۶]. با توجه به موارد گفته شده پروتئین CREB1 ممکن در مسیرهای علامتی اکثر فرایندهای سلولی نقش داشته باشد. برای مطالعه عملکرد CREB1 در انواع مسیرهای علامتی می‌توان از siRNA اختصاصی آن استفاده کرده و تأثیر آن را روی سلول مورد نظر بررسی نمود. معیارهای Reynolds یکی از راه‌هایی است که می‌توان برای طراحی siRNA استفاده کرد. براساس آن، ویژگی siRNA با ۳۰-۵۲ درصد GC، وجود سه نوکلئوتید A/U در ناحیه ۱۵ تا ۱۹، U در ناحیه ۱۰ و A در ناحیه ۱۹، عدم حضور تکرارهای داخلی، G/C در ناحیه ۱۹، G در ناحیه ۱۹ است. هرکدام از این موارد دارای یک امتیاز هستند و در نهایت امتیاز siRNA طراحی شده می‌تواند بین ۱ تا ۸ باشد و هر siRNA دارای امتیاز بیشتری باشد، می‌تواند در مهار بیان ژن مؤثرتر باشد [۶].

با این حال علاوه بر طراحی siRNA با اختصاصیت بالا، لازم است siRNA حتماً در یک مدل سلولی مناسب مورد آزمایش قرار گیرد. سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق، سلول‌های K562 هستند. این سلول‌ها اريترولوکيميا (Erythrolukemia) هستند و با توجه به منشأ اريتروئیدی آن‌ها مدل سلولی مناسبی برای مطالعات مسیرهای علامتی تنظیم تولید هموگلوبین هستند [۷]. هدف از این

۲-۴- رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با

pSV-β-Galactosidase

رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با pSV-β-Gal با استفاده از کیت β-Gal Staining Set (Roche) انجام گرفت. این کیت متشکل از بافر حاوی آهن (Iron buffer) (Roche) و (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) X-gal است که با ترکیب این دو محلول با نسبت مشخص می‌توان بیان ژن lacZ باکتریایی را در هر سلول ترانسفکت شده، مطالعه نمود. به این ترتیب سلول‌های ترانسفکت شده و تعداد آن‌ها با کمک میکروسکوپ نوری به راحتی قابل تشخیص هستند. برای تهیه تثبیت کننده (Fixative) مقدار ۵۴۰ میکرولیتر فرمالدهید ۳۷ درصد در ۹/۳۸ میلی لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) اضافه شده و در بن ماری دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم می‌شود. برای تهیه محلول رنگ آمیزی (Staining)، ۱ واحد از X-gal در ۱۹ واحد Iron buffer رقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شد.

برای رنگ آمیزی سلول‌های سوپانسیون K562، رسوب سلولی در ۱۰ میلی لیتر PBS حل شده و دوباره سانتریفوژ شد. محلول PBS حذف شده و سلول‌ها در ۱ تا ۲ میلی لیتر تثبیت کننده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌ها رسوب داده شده و بلافاصله تثبیت کننده حذف شد و رسوب سلولی دو بار با PBS شسته شد. سپس در ۱ تا ۲ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی حل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود. سلول‌های رنگ شده با میکروسکوپ نوری معکوس مطالعه شد.

۲-۵- استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده با siRNAهای CREB1 و منفی با روش RNX انجام شد. رسوب سلول‌ها در ۱ میلی لیتر از محلول RNX-Plus (CinnaGen) اضافه شد و مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به آرامی برداشته شد و هم حجم آن ایزوپروپانول (Merck) اضافه و

5' UGACUUAUCUUCGAUGCA tt3' 3' ACUGAAUAGAAGCUACGU 5'	سنس (Sense) آنتی سنس (Antisense)	توالی siRNA فاقد اثر مهاری بیان ژن CREB
5' GGUGGAAAAUGGACUGGCU tt3' 3' CCACCUUUUACCUGACCGA 5'	سنس آنتی سنس	توالی siRNA فاقد اثر مهاری بالا بیان ژن CREB

۲-۳- ترانسفکشن (Transfection) سلول‌ها

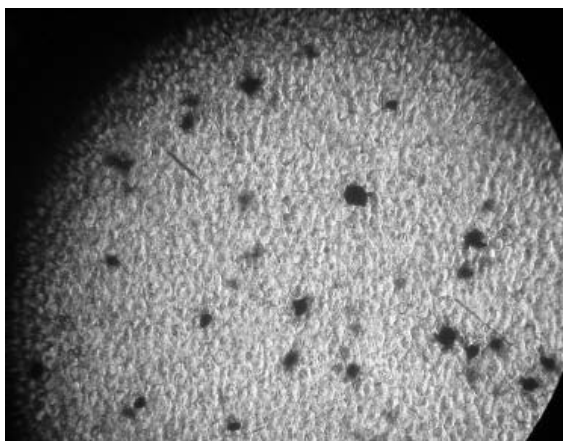
هر دو نوع siRNA ژن CREB1 با استفاده روش لیپوفکشن (Lipofection) به داخل سلول‌های K562 ترانسفکت شدند. برای مطالعه siRNA علاوه بر siRNA هدف، siRNA منفی نیز با توالی 3' AGGUAGUGUAAUCGCCUUG 5' استفاده شد. این siRNA با هیچ mRNA رابطه مکملی نداشته و بنابراین روی بیان هیچ ژنی را تأثیر نمی‌گذارد. برای هر نمونه کمپلکس لیپوفکتامین (Lipofectamine™ 2000) به شرح ذیل آماده شد: مقدار ۱۰۰ پیکومولار از siRNA در ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون سرم، رقیق شده و به آرامی چند بار مخلوط می‌شود. مقدار ۲ میکرولیتر از لیپوفکتامین (Invitrogen) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI بدون سرم مخلوط شده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب siRNA و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط و ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس Lipofectamine-DNA ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می‌شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملاً پخش شود. پلیت در انکوباتور با شرایط ۵ CO₂ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند [۱۰]. برای کنترل کارایی ترانسفکشن، در کنار سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA، در چاهک‌های جداگانه با همان شرایط ترانسفکشن پلاسمید pSV-β-Galactosidase نیز به داخل سلول‌ها ترانسفکت شدند. در صورت وارد شدن پلاسمید به سلول‌ها، بیان β-گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد که با رنگ آمیزی سلول‌ها به رنگ آبی نمایان می‌شوند.

فعال می‌شود. در هر چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که طی ۳۵-۴۰ چرخه ادامه داشت.

با استفاده از رنگ سایبرگرین (SYBR Green) میزان آمپلی‌فیکاسیون (Amplification) در هر چرخه دنبال شد. رنگ سایبرگرین با اتصال به DNA دو رشته‌ای علامت فلورسانت ساطع می‌کند. در چرخه‌ای که واکنش تکثیر وارد مرحله لگاریتمی می‌شود و تحت عنوان C_T (Threshold cycle) گفته می‌شود، میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود.

۳- نتایج

تصویری از میزان ترانسفکشن سلول‌های K562 در شکل ۱ آمده است. با شمارش سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pSV-β-Gal، میزان کارایی ترانسفکشن بررسی شد. تعداد سلول‌های آبی رنگ نمایانگر میزان ترانسفکشن است. در رابطه با سلول‌های K562 ۳۰-۴۰ درصد سلول‌ها آبی رنگ بودند. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و در هر سه مورد کارایی ترانسفکشن در همین حدود بود. در هر دو مورد، تعدادی سلول آبی کم‌رنگ هم مشاهده شد که نشان دهنده آن است که این سلول‌ها ترانسفکت شده‌اند و در مقایسه با سلول‌های پررنگ میزان بیان ژن β-گالاکتوزیداز کم بوده است.



شکل ۱ سلول K562 ترانسفکت شده با پلاسمید pSV-β-Gal سلول‌های آبی رنگ نشان‌دهنده ترانسفکت شدن سلول‌ها و بیان ژن β-گالاکتوزیداز است.

مقدار RNAهای سلول K562 ترانسفکت شده با siRNA

کاملاً مخلوط و سپس در دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. انتها رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل شد. برای تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA علاوه بر اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density: OD) توسط فتومتر (Eppendorf)، در ژل الکتروفورز با آگارز ۱ درصد نیز بررسی شد. یک میکروگرم از RNA استخراج شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-PCR (Bioneer) به کار رفت.

۲-۶- بررسی اثر مهار سی‌آر‌ان‌ا

به‌منظور بررسی میزان مهار ژن CREB1 از کیت SYBR Green QuantiFast (QIAGEN) و دستگاه Real-time PCR (ABI-7500) استفاده شد. واکنش‌ها از نوع کمی-نسبی (Relative quantification) انجام شد که در آن بیان ژن هدف در مقایسه با بیان یک ژن خانه‌دار (House keeping) (*GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به‌عنوان کنترل داخلی مقایسه شد؛ سپس از فرمول زیر برای محاسبه بیان ژن استفاده شد [۱۱، ۱۲]:

$$\frac{\text{نمونه ۱}}{\text{نمونه ۲}} = \frac{2^{C_{T_{B1}} - C_{T_{B2}}}}{2^{C_{T_{A1}} - C_{T_{A2}}}} = 2^{(C_{T_{B1}} - C_{T_{B2}}) - (C_{T_{A1}} - C_{T_{A2}})} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

در آزمایش‌های این تحقیق فرمول فوق به این صورت خواهد بود:

$$2\Delta\Delta C_T = 2(\Delta CREB - \Delta GAPDH)$$

توالی آغازگری ژن *GAPDH* (کنترل داخلی) و *CREB1*

که از سایت اینترنتی Primer Bank طراحی شد، به‌صورت

زیر است:

5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'	GAPDH-آغازگر جلویی
5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'	GAPDH-آغازگر برگشتی
5'-CACCTGCCATCACCACTGTAA-3'	CREB-آغازگر جلویی
5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'	CREB-آغازگر برگشتی

دما و شرایط انجام Real-time PCR به‌صورت زیر بود: گرمادهی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه که طی این مرحله *Taq* پلیمراز شروع داغ (Hot start *Taq* polymerase)

در سلول‌های K562 نشان می‌دهد. اندازه‌گیری مهار بیان CREB1 در کنار یک ژن کنترل داخلی (Endogenous) *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی صورت گرفته است. همچنین آزمایش‌ها به‌صورت دوتایی (Duplicate) انجام شد (شکل ۲).

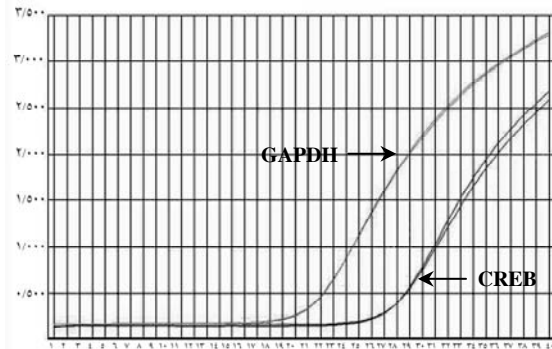
۴- بحث

فعالیت‌های سلول به‌وسیله مسیرهای علامتی هدایت می‌شود و شناسایی ژن‌های پایین‌دست مسیرهای علامتی می‌تواند کمک بزرگی در درمان بسیاری از بیماری‌ها باشد. یکی از راه‌های مطالعه مسیرهای علامتی، استفاده از فناوری siRNA است [۱]. مولکول‌های siRNA رونویسی ژن را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند و به دلیل اختصاصیت و کارایی بالا برای مهار بیان ژن و همچنین امکان انتقال آن به انواع سلول‌های جانوری مورد توجه هستند. در سال‌های اخیر برای مطالعه مسیر علامتی NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) و p53 از سیستم siRNA استفاده شده است که به دنبال آن چندین ژن درگیر در این مسیرها نیز شناسایی شده‌اند [۱۳، ۱۴].

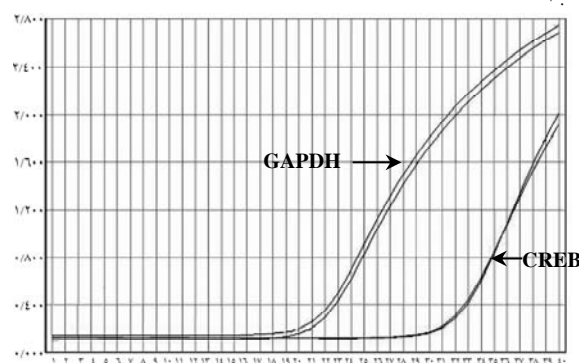
در این تحقیق دو siRNA برای مهار بیان ژن CREB1 در سلول‌های K562 بر طبق معیارهای Reynolds به‌کار گرفته شد و با توجه به این‌که دو توالی siRNA طراحی شده از امتیاز بالایی برخوردار بودند، با این حال تنها siRNA ای که به توالی ۱۲۳۵-۱۲۵۲ متصل می‌شد، با کارایی بالا توانست ژن CREB1 را در سلول‌های اریترولوگمیای K562 مهار کند. براساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ روی ویژگی‌های ترمودینامیکی siRNA انجام شده، مشخص شده که کمپلکس RISC می‌تواند به یکی از دو انتهای مولکول siRNA وصل شده، سپس با خاصیت هلیکازی موجب جدا شدن دو رشته سنس و آنتی‌سنس siRNA شود. پایداری کامل یا نسبی جفت‌بازهای انتهای 5' دو رشته siRNA تعیین می‌کند که کدام یک از رشته‌های siRNA به‌عنوان آنتی‌سنس استفاده شده و در خاموشی ژن دخالت داشته باشد [۱۵]. در بین دو siRNA CREB1 که در این تحقیق استفاده شد، siRNA که اثر مهاری از خود نشان نداد، در هر دو انتها دارای

منفی و CREB siRNA به‌ترتیب ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم میلی‌لیتر بود. میزان OD در ۲۶۰/۲۸۰ در هر نمونه‌های RNA فوق ۱/۸-۱/۹ بود. میزان OD در ۲۶۰/۲۸۰ وجود باندهای 18s و 28s نشان داد که RNAهای استخراج شده از سلول‌ها از کیفیت مطلوبی برخوردار است.

(الف)



(ب)



شکل ۲ منحنی‌های Real-time PCR مربوط به مهار ژن CREB1 در سلول‌های K562 است. الف: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA؛ ب: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA: محور افقی مربوط به تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی مربوط به میزان افزایش فلورسانس سایبرگرین است. C_T سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA منفی در رابطه با ژن *GAPDH* ۲۱ و ژن CREB1 ۲۸ مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA در مورد ژن *GAPDH* ۲۲ و ژن CREB1 ۳۲ است. میزان مهاری ژن CREB با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_T$ محاسبه شد.

نتایج مربوط به CREB1 siRNA اول، اثر بازدارندگی مؤثری نشان نداد و CREB1 siRNA دوم اثر مهاری ۸۷ درصد را در سلول K562 نشان داد.

شکل ۴ منحنی‌های Real time PCR مربوط به مهار ژن‌های CREB1 با siRNA دوم استفاده شده در این تحقیق را

پروتئین CREB1 به عنوان یک فاکتور رونویسی می تواند در پایین دست اکثر مسیرهای علامتی درون سلولی و مسیر علامتی بسیاری از داروها در فعال کردن بیان ژن های خاص نقش داشته باشد. [۱۶]

به این ترتیب طراحی یک siRNA کارآمد و مطمئن برای CREB1، می تواند نقش آن را در رابطه با بسیاری از مسیرها مشخص سازد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام کسانی که در این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

جفت باز A=U بود. به این ترتیب کمپلکس RISC ممکن است به یکی از هر دو انتها متصل شود. در حالی که در مورد CREB siRNA دوم با اثر مهاری بالا، یکی از انتهای دارای جفت باز G=C و انتهای دیگر دارای جفت باز U=A است. به این ترتیب اتصال RISC با انتهای 5' رشته آنتی سنس صورت گرفته و این siRNA به طور کارآمد توانسته با mRNA CREB متصل شده و اثر مهاری را در بیان ژن CREB1 در مرحله قبل از ترجمه انجام دهد.

به نظر می رسد برای استفاده از siRNA در مطالعه عملکرد ژن خاص، طراحی چند مولکول siRNA با هم و همزمان برای قسمت های مختلف ژن لازم باشد.

۶- منابع

- [1] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: application in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(4): 318-28.
- [2] Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* 2004; 33(3): 545-57.
- [3] Lee SH, Sinko PJ. siRNA--getting the message out. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27(5): 401-10.
- [4] Mahmood-ur-Rahman, Ali I, Husnain T, Riazuddin S. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biothechnol Adv* 2008; 26(3): 202-9.
- [5] Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16): 5898-903.
- [6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3): 326-30.
- [7] Delgado-Cañedo A, Chies JA, Nardi NB. Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells—a model based on iron availability signalling. *Med Hypotheses* 2005; 65(5): 932-6.
- [8] Woessmann W, Zwanzger D, Borkhardt A. ERK signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int* 2004; 28(5): 403-10.
- [9] Schramm G, Ramey R. siRNA design including secondary structure target site production. *MWG Biotech* 2005; <http://www.nature.com/naturemethods>.
- [10] Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004; 33(2): 95-103.

- [11] Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169-93.
- [12] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95-125.
- [13] Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S, Schultz PG. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(1): 135-40.
- [14] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004; 428(6981): 431-7.
- [15] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115(2): 209-16.
- [16] Sangerman J, Lee MS, Yao X, Oteng E, Hsiao CH, Li W, Zein S, Ofori-Aquach SF, Pace BS. Mechanism for fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves gamma-globin activation by CREB1 and ATF-2. *Blood* 2006; 108(10): 3590-9.

