دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره ۷۸
دی ۱۳۸۷

مهار بیان ژن GFP به وسیله تداخل RNA (RNAi) در دودمان سلولی کارسینومای جنینی P19

نویسنده: دکتر فریبا اسماعیلی

استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهرکرد

نویسنده مسئول: E-mail: esmail_far@yahoo.com

وصول: ۸۶/۶/۵
ارسال اصلاحات: ۸۷/۴/۳۰
دریافت اصلاحات: ۸۷/۶/۱۰
پذیرش: ۸۷/۹/۱۳

چکیده

مقدمه: تداخل RNA (RNAi) نوعی پدیده خاموشی ژن است که در آن RNA دو رشته‌ای (dsRNA) با تخریب مؤثر mRNA به طور اختصاصی، از بیان ژن جلوگیری می‌کند. واسطه این تخریب، RNAهای تداخل‌گر کوچک (siRNA) ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی هستند. نشان داده شده‌است که استفاده از siRNA به‌عنوان ممانعت‌کننده بیان ژن، روشی مؤثر برای مطالعه عملکرد ژن در سلول‌های پستانداران است.

هدف: بررسی قابلیت siRNA برای خاموشی ژن eGFP در سلول بنیادی کارسینومای جنینی (EC)، P19.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از نوعی سیستم بیان‌کننده siRNA بر اساس وکتوری به نام pSUPER استفاده شد که قادر به القای RNAi در سلول پستاندار (دودمان P19، سلول بنیادی کارسینومای جنینی موش) است. این وکتور قادر به بیان RNA سنجاق سر کوچکی (shRNA) است که نوعی ژن گزارشگر برون‌زاد به نام eGFP را مورد هدف قرار می‌دهد. بیان eGFP در سلول با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: با استفاده از پروتئین eGFP به‌عنوان ژن گزارشگر، نشان داده شد که وکتور بیان‌کننده siRNA می‌تواند به طور اختصاصی بیان ژن eGFP را مهار کند. انتقال این پلاسمید به سلول‌های P19 به طور قابل توجهی تعداد سلول‌های بیان‌کننده eGFP و خاصیت فلورسنتی آن‌ها را کاهش داد. اثر تداخل RNA در هر دو نوع ترانسفکت سلولی موقت و پایدار به طور موفقیت‌آمیز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که استفاده از وکتور بیان‌کننده siRNA سنجاق سری به منظور RNAi روش امیدبخشی برای مهار بیان ژن در سلول‌های پستانداران است.

واژه‌های کلیدی: خاموشی ژن، تداخل RNA (RNAi)، RNAهای تداخل‌گر کوچک (siRNA)، سلول بنیادی کارسینومای جنینی P19

مقدمه

فایر و همکارانش در سال ۱۹۹۸ دریافتند که تزریق RNA دو زنجیره‌ای (dsRNA) به نوعی نماتود به نام C-الگانس (*Caenorhabditis elegans*) به طور مؤثر منجر به خاموشی ژن به طور وابسته به توالی می‌شود. این نوع خاموشی ژن را اصطلاحاً تداخل RNA (RNA interference) (RNAi) گویند [۱]. پیش از این، پدیده مذکور در گیاهان تحت عنوان خاموشی ژن پس از کپی‌برداری (Post transcriptional gene silencing) (PTGS) گزارش شد[۲]. RNAi همچنین در موجودات تک سلولی،

متازوئن‌ها مانند دروزوفیلا و اخیراً پستانداران مشاهده شده‌است [۳،٤،٥،٦و۷]. بر اساس مطالعات اخیر در گیاهان و *C.elegans* حدس زده می‌شود که از جمله نقش‌های بیولوژیکی RNAi دفاع در برابر انگل‌های درونی و اسیدهای نوکلئیک بیماری‌زای برونی است[۸].

ملکول‌های عمل‌کننده در این سازوکار، RNAهای کوتاه ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی هستند. این RNAهای کوتاه siRNA (Short interfering RNA) نامیده می‌شوند. آنزیم Dicer– عضوی از خانواده RNase III – با ایجاد برش در زنجیره‌های طویل dsRNA این ملکول‌ها را تولید می‌کند. معرفی dsRNAهای تولید شده با روش شیمیایی، به سلول منجر به تخریب mRNA همولوگ می‌شود. این یافته، ابزار جدیدی برای مطالعه عملکرد ژن در انواع موجودات، شامل گیاهان، کرم‌های پهن، هیدرها، تریپانوزوم‌ها، مگس سرکه، پشه‌ها و تخمک موش فراهم کرد[۱]. البته باید دانست که قابلیت استفاده از این روش در پستانداران محدود است؛ چرا که معرفی dsRNA طویل‌تر از سی‌نوکلئوتید باعث القای پاسخ غیراختصاصی اینترفرون (IFN) در سلول‌های پستانداران می‌شود[۳]. در طی مسیر اینترفرون، دو آنزیم پروتئین کیناز PKR و '۲–'۵– الیگوآدنیلات سیکلاز (2'-5'-AS) به وسیله dsRNA طویل فعال می‌شوند[۹و۱۰]. آنزیم پروتئین کیناز PKR فعال، باعث توقف ترجمه و در نهایت، مرگ سلول می‌شود؛ در حالی که آنزیم 2'-5'-AS آنزیم دیگری به نام RNase L را فعال می‌کند که خود منجر به تخریب غیراختصاصی mRNA می‌شود[۱]. در این وضعیت، میزان مرگ سلولی افزایش پیدا می‌کند. برای ممانعت از پاسخ IFN، در تحقیقات، با استفاده از تزریق siRNA ۲۳–۲۱ نوکلئوتیدی، به طور موفقیت‌آمیز مهار ژن به روش RNAiدر سلول‌های پستانداران القا شد. بدین منظور، تاشل (Tuschl) و همکارانش siRNA ساخته شده به روش شیمیایی را به سلول‌های پستانداران معرفی کردند[۳]. آن‌ها نشان دادند که siRNAهای ساخته شده در شرایط درون بدن موجود زنده (in vivo) کارآمد بوده، توانستند ژن گزارشگر لوسیفراز را به روش تداخل RNA خاموش کنند[۱]. محدودیتی که در این روش وجود دارد این است که siRNAهای منتقل شده تنها برای چند روز در سلول پستاندار پایدار هستند. برای غلبه بر این مشکل، می‌توان از نوعی وکتور به نام (Suppression of endogenous RNA) pSUPER که قادر به تولید نسخه‌های شبه siRNA (siRNA-like transcripts) است استفاده کرد [۱۱].

با توجه به مراحل ابتدایی مطالعات در پستانداران، در پژوهش حاضر، اثر siRNA بر مهار بیان ژن در دودمان سلولی P19 که نوعی سلول بنیادی کارسینومای جنینی موش است[۱۲و۱۳] با استفاده از ژن افزوده GFP (Enhanced green fluorescent protein) (eGFP) به‌عنوان ژن هدف، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت و ترانسفکشن سلول‌ها: روش ترانسفکشن، با استفاده از پروتکل فسفات کلسیم [۱۳] به طور خلاصه به این ترتیب بود: دودمان سلولی P19 EC، بیست و چهار ساعت پیش از ترانسفکشن تحت شرایط مناسب با غلظت $۱/۵\times۱۰^{٦}$–۱ سلول در ظروف کشت شش میلی‌متری کشت داده شد. پس از افزودن محلول ترانسفکشن ($CaCl_2$ 0.25M، پنج میکروگرم پلاسمید، 2X BES-buffered saline)، تک لایه سلولی به مدت هفت تا نه ساعت تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار پنج درصد CO_2 قرار داده شد. در ترانسفکشن موقت ٤۸ ساعت بعد و در ترانسفکشن پایدار هشت روز بعد، بررسی‌ها انجام گرفت.

پلاسمیدهای مورد استفاده: سلول‌ها به طور همزمان به وسیله پلاسمیدهای pML8 (بیان‌کننده eGFP)، pB17, (بیان‌کننده ژن Pgk-1) و pJC2 (بیان‌کننده siRNA اختصاصی برای eGFP) یا pSUPER (به عنوان کنترل) به ترتیب زیر ترانسفکت شدند:

گروه اول: pML8 + pB17 + pSUPER

گروه دوم: pML8 + pB17 + pJC2

در مورد pJC2 توالی زیر برای eGFP انتخاب شد:

5'-GCTGACCCTGAAGTTCATCT-3'

در همه ترانسفکشن‌ها نسبت مساوی از هر یک از پلاسمیدها (پنج میکروگرم) به کار برده شد. در ترانسفکشن پایدار با استفاده از غلظت ۲۰۰ میکروگرم داروی پیورومایسین (*puromycin*) انتخاب سلول‌ها انجام گرفت.

برای اطمینان از این‌که در ترانسفکشن پایدار، پلاسمیدهای مورد استفاده هیچ‌گونه اثر سمی- ناشی از فعال شدن مسیر اینترفرون - بر سلول ندارند شمارش کلنی انجام شد. با توجه به این‌که کف پتری دیش‌های ۱۵۰ میلی متری به ۳۸ مربع یکسان تقسیم شده‌است، کلنی‌های چهار مربع به طور تصادفی شمارش و میانگین حاصل در عدد ۳۸ ضرب شد. کلنی‌های سلولی به صورت زنده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، ٤٨ ساعت و یا هشت روز پس از ترانسفکشن مشاهده و تصویربرداری شدند.

فلوسایتومتری: شدت خاصیت فلورسنتی به وسیله FACS (Fluorescent-Activated Cell Sorting) تعیین شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار CELLQUEST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

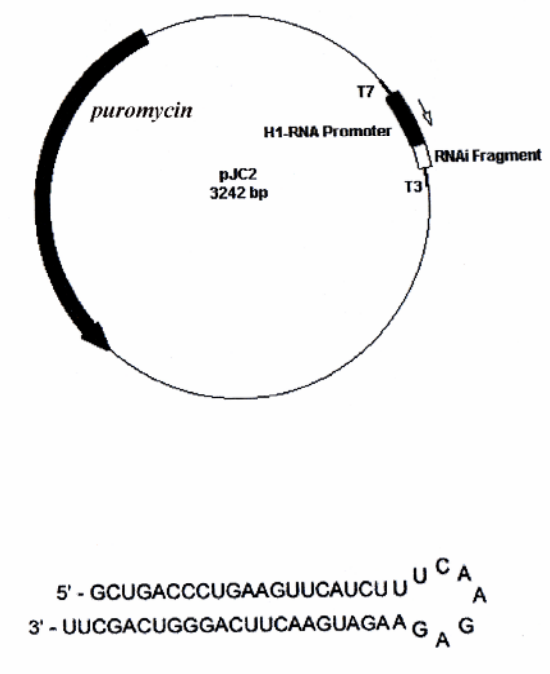
نتایج

به منظور ارزیابی قابلیت RNAi در سلول P19، در این پژوهش از وکتور pSUPER استفاده شد. بر اساس سیستم pSUPER، پلاسمید pJC2 برای تولید siRNA بیست نوکلئوتیدی از ژن eGFP مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). بدین ترتیب، سلول‌های P19 با پلاسمیدهای pB17، pML8 و pSUPER (به‌عنوان کنترل) یا pJC2 ترانسفکت شدند. در ابتدا اثر pJC2 بر بیان موقت eGFP بررسی شد.

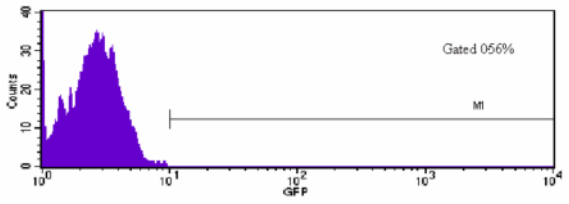
سلول‌های ترانسفکت نشده هیچ‌گونه خاصیت فلورسنتی نشان ندادند (شکل ۲). ٤٨ ساعت بعد از ترانسفکشن، سلول‌های GFP – مثبت به وسیله FACS مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد سلول‌های GFP – مثبت ترانسفکت شده با pML8 و pSUPER، ۸۲/۸۷ درصد بود (شکل ۳ الف). حضور pJC2 درصد چنین سلول‌هایی را به ۵۵/۹۸ درصد کاهش داد (شکل۳ ب).

در پی بررسی نتایج بیان موقت، بر آن شدیم که قابلیت بیان پایدار siRNA را در سلول‌های P19 ارزیابی کنیم. بدین منظور در همه ترانسفکشن‌ها از پلاسمید pB17 استفاده شد. پلاسمید مذکور، محتوی بخشی از ژن *Pgk-1* موشی است که به طور قابل توجهی بیان ژن ترانسفکت شده را افزایش می‌دهد[١٤]. ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌ها بر اساس بیان ژن پیورومایسین انتخاب و تا زمان ارزیابی به مدت هشت روز دیگر کشت داده شدند.

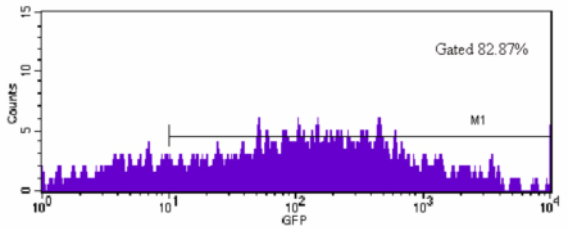
در ترانسفکشن پایدار، نتایج شمارش کلنی در دو گروه آزمایش (گروه اول: ١١١٤ کلنی) و کنترل (گروه دوم: ۱۰۵۵ کلنی) هیچ‌گونه تفاوتی را در تعداد کلنی‌ها نشان نداد.



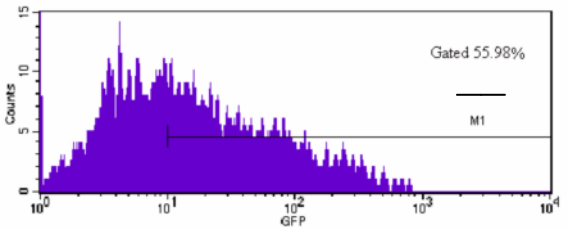
شکل ۱. طرح شماتیک پلاسمیدpJC2 : پروموتور H1-RNA منجر به تولیدRNA تداخل‌گر دو رشته‌ای از ژنGFP می‌شود. این توالی بیست نوکلئوتیدی، شامل رشته های sense وantisense به شکل سنجاق سر است که توسط ناحیه لوپ‌مانند کوتاهی از یکدیگر جدا می‌شوند.



شکل ۲. نتیجه بررسی FACS سلول P19 ترانسفکت نشده نشانگر عدم بیان GFP ژن است.



(الف)

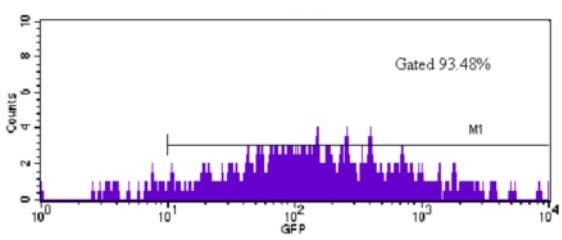


(ب)

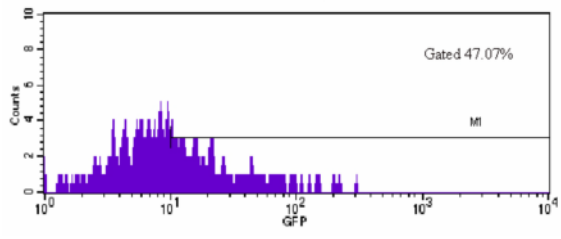
شکل ۳. ترانسفکشن موقت با پلاسمید pJC2: نتیجه بررسی FACS سلول‌های EC، ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن با پلاسمیدهای pSUPER و pML8 (الف) یا pJC2 (ب). علامت بار، نشان‌دهنده منطقه مخصصه (gated region) برای سلول‌های GFP – مثبت است. درصد چنین سلول‌هایی از ۸۲/۸۷ درصد در گروه کنترل به ۵۵/۹۸ درصد در گروه آزمایش کاهش یافته‌است. این کاهش نشان‌دهنده اثر RNAi است.

بررسی‌های FACS نشان داد که ۹۳/٤۸ درصد سلول‌های گروه کنترل، GFP– مثبت بودند (شکل ٤ الف)؛ درحالی که این درصد در گروه pJC2 به ٤۷.۰۷ درصد کاهش یافت (شکل ٤ ب).

تصاویر میکروسکوپ فلورسنت نیز اثر RNAi را در سلول‌های ترانسفکت شده با pJC2 نشان داد (شکل ۵). البته این مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت، حاکی از وجود کلنی‌هایی با دامنه بیان ژن GFP از «کاملاً خاموش تا کاملاً درخشان» بود.



(الف)

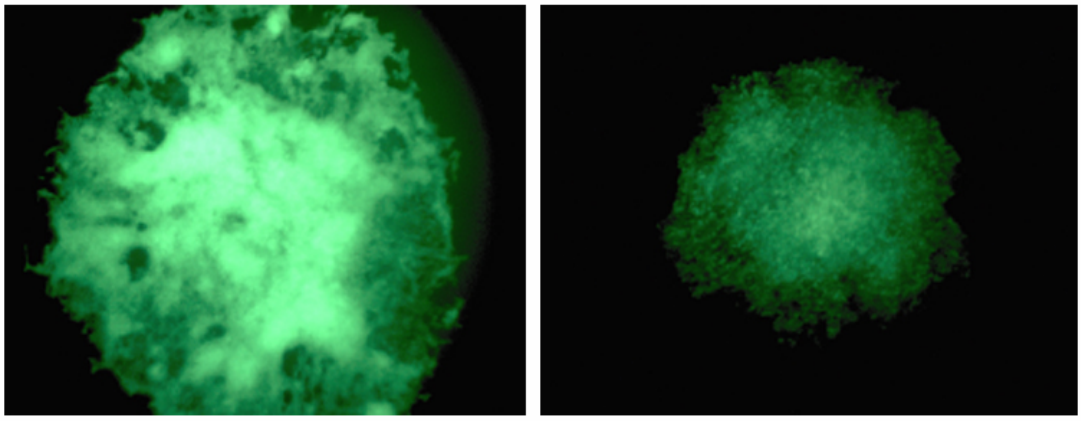


(ب)

شکل٤. ترانسفکشن پایدار با پلاسمید pJC2: نتیجه بررسی FACS سلول‌های EC هشت روز پس از ترانسفکشن با پلاسمیدهای pB17، pSUPER و pML8 (الف) یا pJC2 (ب). علامت بار، نشان‌دهنده منطقه (gate gated region) برای سلول‌های GFP– مثبت است. درصد چنین سلول‌هایی از ۹۳/٤۸ درصد در گروه کنترل به ٤۷/۰۷ درصد در گروه آزمایش کاهش‌یافته‌است. این کاهش نشان‌دهنده اثر RNAi است.

بحث

استفاده از RNA دو رشته‌ای (dsRNA) در کشت سلول‌های پستانداران در خاموشی ژن به روش RNAi موفقیت‌آمیز نیست[۱و۱۵]. علت این امر، تحریک سیستم اینترفرون در اثر dsRNA طویل‌تر از سی‌نوکلئوتید است. این واکنش غیراختصاصی به واسطه نوعی پروتئین کیناز وابسته به dsRNA (PKR) و آنزیم دیگری به نام RNase L رخ می‌دهد. فعالیت این دو آنزیم منجر به پاسخ اینترفرون می‌شود [۱و۱۵]. آنزیم پروتئین کیناز PKR فعال، باعث توقف ترجمه و در نهایت مرگ سلول می‌گردد؛ در حالی که آنزیم 2'-5'-AS آنزیم دیگری به نام RNase L را فعال می‌کند که خود منجر به تخریب غیراختصاصی mRNA می‌شود[۱]. در این وضعیت، میزان مرگ سلولی افزایش پیدا می‌کند. این واکنش غیراختصاصی، مانعی بر سر راه مطالعات در پستانداران



(ب) (الف)

شکل ۵. تصویر میکروسکوپ فلورسنت از کلنی زنده سلول P19 ترانسفکت شده توسط پلاسمیدهای pB17، pSUPER و pML8 (الف) یا pJC2 (ب) هشت روز پس از ترانسفکشن. این تصاویر به‌وضوح اثر RNAi را در خاموشی ژن GFP نشان می‌دهد.

است. برای فائق آمدن بر این مشکل، می‌توان از RNAهای کوتاه (siRNAs) ۲۱-۲۲ نوکلئوتیدی در تحقیقات استفاده کرد. گزارش‌های اخیر نشان داد که siRNA قادر به القای خاموشی ژن از طریق RNAi در چند رده سلول پستاندار است[۳]؛ ولی این خاموشی، موقتی است؛ به طوری که در جنین‌های مورد مطالعه موش و همچنین سلول‌های کشت شده پستاندار، اثر ممانعت از بیان ژن به طور موقت مشاهده شد[۳].

با استفاده از وکتوری به نام pSUPER که تولید نسخه‌هایی از siRNA را کد می‌کند[۱۱] می‌توان بر این مشکل فائق آمد. این وکتور محتوی پروموتور H1-RNA پلی‌مراز- III برای تولید نسخه‌های siRNA به شکل سنجاق سر است[۱۱،۱۶و۱۷]. تشکیل نسخه‌های سنجاق سر از نظر تولید RNA دو رشته‌ای (dsRNA) اهمیت دارد. دلیل انتخاب ژن eGFP به‌عنوان هدف، درخشان بودن محصول پروتئینی آن بود.

بنابراین، در پژوهش حاضر از سیستم مذکور استفاده شد. پلاسمید pJC2 مورد استفاده، حاوی توالی بیست نوکلئوتیدی ویژه‌ای از ژن هدف است. پس از توالی فاصله‌دهنده (Spacer) کوتاهی، مکمل معکوس همین توالی بیست نوکلئوتیدی قرار دارد. بدین‌ترتیب، نسخه حاصل پس از تولید، روی خود برگشته و ساختار سنجاق سری محتوی بیست جفت باز ایجاد می‌کند.

بنابراین در این‌جا با استفاده از siRNA سنجاق سری، امکان خاموشی ژن گزارشگر eGFP - به‌عنوان هدف - در اثر RNAi در دودمان سلولی کارسینومای جنینی P19 نشان داده شد. همچنین ویژگی عملکرد اختصاصی و وابسته به توالی RNAi نیز تأیید شد؛ چرا که siRNAهای سنجاق سری قادر بودند بیان ژن GFP را به طور اختصاصی خاموش کنند. از طرف دیگر، نتایج شمارش کلنی، هیچ تفاوتی را در تعداد سلول‌ها پس از ترانسفکشن نشان نداد. بنابراین با توجه به این دو نکته، یعنی خاموش شدن اختصاصی ژن و عدم مرگ و میر سلولی می‌توان ادعا کرد که نتایج حاصل در این پژوهش تحت اثر سازوکار RNAi است، نه فعال شدن مسیر اینترفرون؛ زیرا همان‌طور که پیش از این نیز تأکید شده، خاموشی ژن از طریق واکنش‌های وابسته به اینترفرون، علاوه بر این‌که غیراختصاصی است مرگ و میر سلولی بالایی را به دنبال دارد[۱،۹،۱۰و۱۵].

به طوری که بررسی‌های فلوسایتومتری نشان داد میزان سلول‌های بیان‌کننده GFP از حدود نود درصد در گروه کنترل (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید کدکننده ژن GFP یعنی pML8) به حدود پنجاه در صد

در گروه آزمایش (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید کدکننده بر علیه ژن GFP یعنی pJC2) کاهش یافت.

تصاویر میکروسکوپ فلورسنت نیز اثر خاموشی ژن را به‌وضوح نشان داد. البته مانند آنچه در *C.elegans* دیده شده‌است[٤] مهار بیان ژن در همه کلنی‌ها به طور کامل اتفاق نمی‌افتد. در این تصاویر، شدت خاصیت فلورسنتی از یک کلنی به کلنی دیگر متفاوت بود. به نظر می‌رسد توزیع ژن ترانسفکت شده در کلنی‌های با خاموشی نسبی ژن یکنواخت نبوده، برخی سلول‌ها به میزان بیش‌تری کپی ژن را دریافت کردند؛ اما در کلنی‌هایی که خاموشی ژن به طور کامل اتفاق افتاده، پلاسمید ترانسفکت شده به طور یکنواخت بین همه سلول‌های کلنی توزیع گردیده و هر سلول، تعداد کپی کمی از ژن ترانسفکت شده دریافت کرده‌است. بنابراین می‌توان احتمال داد که در صورت دریافت تعداد کم‌تر کپی ژن توسط سلول‌های p19 تأثیر RNAi بیش‌تر بوده‌است. البته به منظور بررسی دقیق و مقایسه شدت بیان و یا خاموشی ژن در کلنی‌های متفاوت، لازم است از روش‌هایی مانند northern blot استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهند که‌استفاده از سیستم تولید siRNA روش نویدبخشی برای مهار بیان ژن در سلول‌های پستاندار است. با تولید دودمان‌های سلولی که ژن مورد نظر در آن‌ها به طور پایدار خاموش شده‌است، می‌توان از آن‌ها به منظور بررسی‌های بیوشیمیایی، مطالعات عملکرد ژن و یافتن روش‌هایی برای درمان بیماری‌ها – از طریق ممانعت از بیان ژن – استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در مرکز تحقیقات سرطان (Ottawa regional cancer center) ORCC واقع در اتاوای کانادا انجام شد. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از کارن جاردین و زیائوفنگ یانگ (Xiaofeng Yang & Karen Jardine) به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر می‌کنند.

منابع

1. Dykxhoorn MD, Novina DC, Sharp APh, 2003, Killing the Messenger: Short RNAs that Silence Gene Expression, *Nature Reviews*, 4: 457-467.
2. Jorgensen R, 1990, Altered Gene Expression in Plants due to *Trans* Interaction Between Homologous Genes, *Trends Biotechnol*, 8: 340-344.
3. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T, 2001, Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells, *Nature*, 411: 494-498.
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans, *Nature*, 391: 806-811.
5. Flavell RB, 1994, Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3490-3496.
6. Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA, 1997, Cosuppression in Drosophila: Gene Silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh Transgenes Is Polycomb Dependent, *Cell*, 90: 479-490.
7. Romano N, and Macino G, 1992, Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences, *Mol Microbio*, 6:3343-3353.
8. Hannon GJ, 2002, RNA interference, *Nature*, 418: 244-251.
9. Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB, 1992, Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI, *Mol Cell Biol*, 12: 5238-5248.
10. Minks MA, West DK, Benvin S, Baglioni C, 1979, Structural Requirements of Double-Stranded RNA for the Activation of 2',5'-oligo(A) Polymerase and Protein Kinase of Interferon-Treated HeLa Cells, *J Biol Chem*. 254: 10180- 10183.
11. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R, 2002, A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells, *Science*, 296: 550-553.
12. Lynch SA, Brugge JS, Levine JM, 1986, Induction of altered c-src product during neural differentiation of embryonal carcinoma cells, *Science*, 234: 873-876.
13. MacPherson PA, and McBurney MW, 1995, P19 Embryonal Carcinoma Cells: A Source of Cultured Neurons Amenable to Genetic Manipulation, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7: 238-252.
14. McBurney MW, Yang X, Jardine K, Cormier M, 1998, A Role for RNA Processing in Regulating Expression from Transfected Genes, *Somatic Cell Mol Genet*, 24: 203-215.
15. Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Fillipowicz W, 2001, Specific Interference with Gene Expression Induced by Long, Double-Stranded RNA in Mouse Embryonal Teratocarcinoma Cell Lines, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 25: 14428-14433.
16. Wakiyama M, Matsumoto T, Yokoyama S, 2005, Drosophila U6 Promoter-Driven Short Hairpin RNAs Effectively Induce RNA Interference in Schneider 2 Cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 17: 331(4): 1163-70.
17. Yu J, McMahon AP, 2006, Reproducible and Inducible Knockdown of Gene Expression in Mice, *Genesis,* 44(5): 252-61.