

國立陽明交通大學  
生化暨分子生物研究所  
碩士論文

Department of Institute of Biochemistry and Molecular Biology  
National Yang Ming Chiao Tung University  
Master thesis

解析 AGO2 在 saRNA 所引起的基因轉錄活化中扮演的角  
色以及它的應用

Dissect the roles of AGO2 in saRNA-mediated transcriptional  
gene activation in human cells and its application

研究生:李培潔 (LI, PEI-CHIEH)  
指導教授:張崇德 (CHANG, CHUNG-TE)

中華民國一一二年七月

July 2023

解析 AGO2 在 saRNA 所引起的基因轉錄活化中扮演的角  
色以及它的應用

Dissect the roles of AGO2 in saRNA-mediated transcriptional  
gene activation in human cells and its application

研 究 生：李培潔  
指 導 老 師：張崇德 博士

Student : Pei-Chieh Li  
Advisor : Dr. Chung-Te Chang



Submitted to Institute of Biochemistry and Molecular Biology  
College of Life Sciences  
National Yang Ming Chiao Tung University  
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science  
in  
Biochemistry

July 2023  
Taiwan, Republic of China

中華民國 一一二年七月

**國立陽明交通大學****博碩士學位論文電子檔著作權授權書**

(請裝訂於紙本論文書名頁之次頁For authors to bind after the title page)

本授權書所授權之學位論文，為本人於 國立陽明交通大學 生化暨分子生物研究所 \_ \_ \_ \_ \_ 組，  
111 學年度第 二 學期取得 碩士 學位之論文。

論文題目：解析AGO2在saRNA所引起的基因轉錄活化中扮演的角色以及它的應用  
指導教授：張崇德

本人授權將本著作以非專屬、無償授權國立陽明交通大學、台灣聯合大學系統圖書館及國家圖書館。

論文上載網路公開之範圍及時間：	
中英文摘要	<input checked="" type="checkbox"/> 立即公開
論文全文於本校及台灣聯合大學系統區域網路	<input checked="" type="checkbox"/> 不公開
論文全文於國家圖書館內部網路	<input checked="" type="checkbox"/> 不公開
論文全文於校外網際網路	<input checked="" type="checkbox"/> 不公開

說明：基於推動「資源共享、互惠合作」之理念與回饋社會及學術研究之目的，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟或數位化等各種方式收錄、重製與利用；於著作權法合理使用範圍內，讀者得進行線上檢索、閱覽、下載或列印。

授權人： 李培潔 (親筆簽名)

中華民國 112 年 07 月 18 日

# 國立陽明交通大學碩士學位論文審定同意書

生化暨分子生物 研究所 李培潔 君 所提之論文

題目：(中文)解析 AGO2 在 saRNA 所引起的基因轉錄活化中扮演的角

色以及它的應用

(英文)Dissect the roles of AGO2 in saRNA-mediated

transcriptional gene activation in human cells

and its application

經學位考試委員會審查通過，特此證明。

學位考試委員會 (簽名)

口試委員：

姜為中

(召集人)

陳亭紋

張崇堯

論文已完成修改

指導教授

張崇堯

(簽名)

所 長

鄭子豪

(簽名)

中 華 民 國

112 年

7 月

11 日

## 國立陽明交通大學 / 國家圖書館

博碩士學位論文【延後公開】申請書

## Application for Embargo of Thesis/Dissertation

(請裝訂於電子檔授權書之次頁 For authors to bind after authorization to copyright of ETD)

申請日期：中華民國 112 年 07 月 18 日

Application Date: 2023 / 07 / 18 (YYYY/MM/DD)

申請人姓名 Applicant Name	李培潔	學位類別 Graduate Degree	碩士	畢業年月 Graduation Date (YYYY/MM)	民國 112 年 7 月 2023 / 7 (YYYY/MM)
學號 Student ID	310303019	系所名稱 Department	生化暨分子生物研究所		
論文名稱 Thesis/Dissertation Title	解析AGO2在saRNA所引起的基因轉錄活化中扮演的角色以及它的應用				
延後公開原因 Reason for embargo	<input checked="" type="checkbox"/> 準備申請專利，請說明 Filing for patent registration. Please specify: 申請準備中 <input type="checkbox"/> 涉及國家機密，請說明 Contains information pertaining to the national secret. Please specify.: <input type="checkbox"/> 依法不得提供，請說明 Withheld according to the law. Please specify.:			公開日期 Delayed Until	民國115年7月17日 2026/7/17 (YYYY/MM/DD)

申請人簽名：  
Applicant  
Signature:

李培潔

系所審議章戳  
Seal of the  
Department指導教授簽名：  
Advisor Signature:

張崇德

## 【說明】

1. 以上所有欄位請據實填寫並檢附證明文件，缺項或簽章不全，恕不受理。
2. 延後公開須訂定合理期限，請依實際需求設定延後公開日期，自申請日期起算至多3年，若超過3年或未填寫延後公開日期者，一律以3年期限辦理。

## 【Notes】

1. Please fill in all blanks. The application form will not be accepted for processing until all information, signatures, and stamps are included.
2. The delay should be a reasonable period of no more than 3 years. If the applicant fills in a date that creates a period longer than 3 years, the delayed period for public viewing period will be fixed at 3 years.

## 致謝

兩年的碩士生涯，匆匆忙忙地度過，過程卻是無比的充實。零基礎的自己在經過實驗的累積以及指導教授的教導下也逐漸培養出客觀理性分析事物的能力。

首先，我要衷心感謝張崇德教授對我論文的指導和支持，您專業的知識和豐富的經驗在整個研究過程中給予了我寶貴的建議，時常激發我的思考，使我能夠更好地理解研究問題並找到解決方案。除此之外，也感謝您在研究過程中對我的耐心指導，對於跨領域的我，您總是願意從基礎知識開始講起，協助我重新穩固基礎。同樣地，我也要向姜為中老師以及陳亭玟老師致上誠摯的謝意，兩位老師對於學生論文的指正以及專業且精闢的見解，使本論文更加完備。

感謝已經畢業的靜宜學姊，當我的實驗遇上困難時，妳總是給予我支持與協助，即使不是自己的實驗，妳也會陪著我找出實驗失敗的原因。再來要感謝我的同學品甄，我們兩個的實驗環環相扣著，過程中勢必要同甘苦共患難，做事風格處於光譜兩端的兩人卻能完美彌補彼此的短處，突破實驗中的逆境完成計畫，果然不愧對教授加封於我們的「RNA 雙煞」這個稱號。還有學妹宇玆，感謝妳總是作為 R505 的大家長，管理著不受控的幾位小朋友。除此之外，還要謝謝實驗之餘一同奮鬥的大學同學們，每次在我低潮時適時地傾聽，每次報完 seminar 後都為努力的自己乾一杯，讓我的碩士生涯成為永生難忘的回憶。

最後，要感謝我的父母，在享受退休生活之餘不忘記自己還有個兒子，當我遇上挫折時給我鼓勵，無條件的為我付出，並且相信我的每一個決定。沒有你們就不會有今天的我，你們的支持永遠會是我努力下去的動力。



## 中文摘要

RNA 激活 (RNA activation, RNAa) 是一種重要的基因表達調控方式，它能透過促進目標基因轉錄的進行，上調特定基因的表達，這對研究基因功能以及治療基因缺陷相關的疾病上有著極高的價值。RNAa 的作用機制雖與 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 類似，但涉及的功能性蛋白稍有不同，且與 RNAi 中的基因沉默現象相反，RNAa 能夠對基因表達進行正向調控，繼而影響細胞的功能性與適應性。

目前已知 RNAa 的核心複合體 RITA (RNA-induced transcriptional activation complex) 主要由 AGO2、saRNA (small activating RNA) 和 RHA (RNA helicase A) 組成。其中 saRNA-AGO2 負責引導 RITA 複合體至目標基因，RHA 繼而促進基因的激活，三者各自具備重要的功能。因此，深入了解它們如何相互作用以形成功能完整的 RITA 複合體，將能為之後 RNAa 的研究建立起良好的基礎。

在本研究中，我利用蛋白質過表達的方法，在細胞內分析了 AGO2 和 RHA 之間的結合關係，發現了兩者的最小結合域，從而更清晰地揭示了 RITA 複合體的形成機制。此外，我藉由對 RNAa 分子機制的理解，利用生物工程將 AGO2 和 RHA 的主要功能區域製作成融合蛋白，並通過多項測試驗證其功效，顯示 RNAa 具有廣泛的應用價值。隨著對 RNAa 機制的進一步深入研究，未來還將開發出更多不同的應用方式。

關鍵字: RNA 激活、RITA 複合體、AGO2、saRNA、RHA

## 英文摘要

RNA activation (RNAa) is an important mechanism for regulating gene expression. It involves the promotion of target gene transcription, resulting in the upregulation of specific gene expression. This process holds great value in the study of gene function and the treatment of diseases related to gene defects. While the mechanism of RNAa is similar to RNA interference (RNAi), it involves slightly different functional proteins. Unlike the gene silencing phenomenon in RNAi, RNAa can positively regulate gene expression, thereby influencing the functionality and adaptability of cells.

The RITA (RNA-induced transcriptional activation complex) of RNA activation (RNAa) is known to be primarily composed of AGO2, saRNA, and RHA. The saRNA-AGO2 guides the RITA complex to the target gene, while RHA facilitates gene activation. Each component possesses crucial functionalities. Therefore, understanding of their interactions to form a fully functional RITA complex will establish a solid foundation for future research in RNAa.

In this study, I used protein overexpression methods to analyze the binding relationship between AGO2 and RHA in cells and discovered their minimum binding domain, thereby revealing the mechanism of RITA complex formation more clearly. Additionally, based on RNAa, I bioengineered the main functional domains of AGO2 and RHA into fusion proteins and validated their efficacy through multiple tests, demonstrating the broad application potential of RNAa. With further in-depth research on the mechanism of RNAa, more diverse applications will be developed in the future.

Keywords: RNA activation, RITA complex, AGO2, saRNA, RHA.



# 目錄

致謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vi
第一章 緒論.....	1
1.1 RNA 干擾路徑 (RNA interference pathway).....	1
1.1.1 小片段 RNA (small RNA, sRNA).....	2
1.1.2 Argonaute 蛋白 (AGO).....	3
1.2 RNA 激活路徑 (RNA activation pathway).....	4
1.2.1 RNA 誘導轉錄活化複合體 (RITA).....	6
1.2.2 RHA 蛋白 (RNA helicase A).....	7
1.2.3 RNAa 潛在的應用價值.....	8
1.3 研究動機與目標.....	9
第二章 實驗結果.....	10
2.1 RHA 與 AGO2 的交互作用.....	10
2.2 RHA (265-1270)與 AGO2 的交互作用.....	12
2.3 RHA (265-830)與 AGO2 (1-447)為 RITA 內的最小結合區域.....	14
2.4 AGO2 具有轉錄活化的能力.....	18
2.5 NLS-AD-AGO2 活化抑癌基因 p21.....	20
2.6 RNA-seq / ChIP-seq 挑選出細胞內受 RNAa 所調控的內源性基因.....	23
2.7 NLS-AD-AGO2 活化受 RNAa 所調控的內源性基因.....	25
第三章 討論.....	28

第四章 實驗方法.....	33
4.1 質體構築.....	33
4.2 重組蛋白在人類細胞的表現與分析.....	35
4.3 自動誘導蛋白表現系統 (Autoinduction of protein expression system).....	38
4.4 蛋白與蛋白間結合能力之分析 (Pull-down assay).....	38
4.5 冷光報告基因活性檢測 (Luciferase assay).....	39
4.6 定量反轉錄 PCR (RT-qPCR).....	39
4.7 染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	40
第五章 參考文獻.....	42
第六章 附錄.....	47



## 圖目錄

Fig 1.	RNA 激活路徑示意圖.....	5
Fig 2.	RHA 與 AGO2 依靠 RNA 協助進行交互作用.....	11
Fig 3.	RHA(265-1270)與 AGO2 之間存在物理性結合.....	13
Fig 4.	RHA 以及 AGO2 區域劃分示意圖.....	15
Fig 5.	RHA(265-830)與 AGO2 (1-447)為兩者之間的最小結合域.....	16
Fig 6.	RHA(265-830)與 AGO2 (1-447)在體外仍具有交互作用.....	17
Fig 7.	AGO2 在細胞內具有轉錄活化能力.....	19
Fig 8.	HEK293T 細胞株中 p21 基因受到 RNAa 所調控.....	21
Fig 9.	NLS-AD-AGO2 活化 p21 基因的表現水平.....	22
Fig 10.	RNA-Seq 分析火山圖 (Volcano Plot)呈現基因表現的分佈情形.....	24
Fig 11.	RNA-seq / ChIP-seq 尋找目標基因示意圖.....	24
Fig 12.	NLS-AD-AGO2 活化 RNAa 所調控與癌症疾病相關的基因.....	26
Fig 13.	NLS-AD-AGO2 活化 RNAa 所調控其他不同功能性的基因.....	27
Fig 14.	RITA 複合體內三個蛋白之間的交互作用.....	30
Fig 15.	NLS-AD-AGO2 對 p21 以及內源性基因進行轉錄活化.....	30
Fig 16.	RNAa 以及 RNAi 調控細胞內 RNA 表現水平實驗示意圖.....	31
Fig 17.	ChIP-seq 分析之目標基因在細胞質同樣受 RNAi 所調控.....	32

# 第一章 緒論

## 1.1 RNA 干擾路徑 (RNA interference pathway)

RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 是一種由小片段 RNA 所介導的基因調控機制，可以通過特定的序列，靶向並調節目標基因的表達。(Liu et al., 2018)

RNAi 的機制中，小片段 RNA (small RNA, sRNA) 包含通過病毒或是人工引入的外源性 (exogenous) siRNA (small interfering RNA)；以及由內生性 (endogenous) 轉錄形成的 miRNA (microRNA)。在 RNAi 執行的過程中，siRNA 或是 miRNA 能夠結合 Argonaute (AGO) 蛋白，之後再與 Trinucleotide repeat containing 6 (TNRC6) 共同形成 RISC (RNA-induced silencing complex) 複合體作為作用的核心 (Gebert & MacRae, 2019)；通過 RISC 複合體中的 siRNA 或 miRNA，與目標 mRNA 序列互補配對之後，進行轉錄後基因沉默 (Post-transcriptional gene silencing and transgene silencing)。

在這個過程中，TNRC6 蛋白招募 CCR4-NOT 腺苷酶複合體，從而引起目標 mRNA 的 3' 端脫腺苷化和降解。同時，TNRC6 還招募 Dcp 1/2 decapping complex，去除 mRNA 的 5' 端帽，進一步降低 mRNA 的穩定性。除此之外，AGO 蛋白的結合還可以阻礙核糖體附著於 mRNA，從而抑制轉譯的進行。透過這些過程，可以使目標 mRNA 受到降解或抑制其轉譯，進一步調控基因的表達。(Liu et al., 2018)

### 1.1.1 小片段 RNA (small RNA, sRNA)

小片段 RNA (small RNA, sRNA) 一般泛指長度小於 200 個核苷酸大小的 RNA 分子，包含 miRNA、siRNA、saRNA 等等，其中又以 miRNA (microRNA) 最廣為人知。miRNA 為大約 18-22 個核苷酸大小的小片段非編碼核糖核酸，可以調控細胞內的基因表達，主要參與 RNAi pathway 的進行。它能夠與 AGO 蛋白結合並根據 miRNA 上由 5' 端開始向 3' 端計算 2-8 個核苷酸序列的種子序列 (seed region) 與目標 mRNA 的 3' UTR (Untranslated region) 互補配對，使目標 mRNA 受到降解 (Gebert & MacRae, 2019)。

miRNA 必需經過多個步驟的加工才能形成 matured miRNA。首先，於細胞核內轉錄出具有 hairpin 結構之 pri-miRNA，並與兩個 DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) 蛋白相結合，以固定其 stem loop 結構 (Kwon et al., 2016; Nguyen et al., 2015)。同時，Drosha 蛋白負責辨認單股 RNA 與雙股 RNA 的交界處，並對該部位進行隨機的切割產生不同序列之 miRNA (Kim et al., 2017; Neilsen et al., 2012)。此一步驟完成後，經初步加工的 miRNA 稱之為 pre-miRNA。

Pre-miRNA 具有大約 70 個核苷酸的 hairpin 雙股 RNA 結構，當 pre-miRNA 被製作出來後，Exportin-5 會識別序列中多餘的單股 RNA 部分，將 pre-miRNA 通過核孔運輸至細胞質 (Okada et al., 2009)。運送至細胞質之後，RNase III 酵素 Dicer 會通過識別 5' 的磷酸分子、3' 序列多餘的部分和髮夾結構來結合 pre-miRNA (MacRae et al., 2007; Park et al., 2011; Tian et al., 2014; Tsutsumi et al., 2011)。Dicer 會根據不同物種來對 pre-miRNA 進行不同長度的切割，並產生雙股的 matured miRNA；此時 Dicer 進行不同長度的切割也可以導致 isomirs 的生成 (Neilsen et al., 2012)。最後，雙股的 matured miRNA 包含了一股 passenger strand 以及另一股 guide strand，其中 guide strand 會被裝載至 AGO 蛋白中並執行 RNAi，而 passenger strand 則被丟棄 (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005; Zamore et al., 2000)。

### 1.1.2 Argonaute 蛋白 (AGO)

AGO 是 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的主要成員之一，也是 RNAi pathway 中的關鍵蛋白。他主要能與特定的小片段 RNA 分子 (如 miRNA、siRNA、saRNA) 相互作用，並藉由它們引導至目標基因上，從而調控基因的表達 (Gebert & MacRae, 2019)。

AGO 主要包含了 Amino-terminal domain (N-terminal)、Piwi-argonaute-zwille domain (PAZ)、Middle domain (MID) 以及 P-element-induced wimpy testes domain (PIWI) 四個區域，另外還包含兩個連接區域 (L1 和 L2)；L1 和 L2 分別連接兩個不同的區域，L1 連接 N-terminal 和 PAZ，而 L2 連接 PAZ 和 MID。

MID 和 PIWI 能夠與 miRNA 的 5' 端結合，而 PAZ 則結合了 miRNA 的 3' 端 (Nakanishi et al., 2012; Schirle & MacRae, 2012; Wang et al., 2008)；N-terminal 具有解旋活性，能夠解旋雙股的 miRNA，使 guide strand 裝載於 AGO，並丟棄 passenger strand；PIWI 的功能是將 RNA 進行切割或是與 TNRC6 結合，進而執行 RNAi 的作用 (Giorgi et al., 2012)。

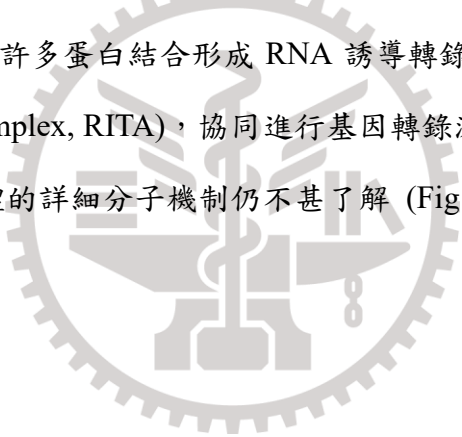
在哺乳動物的基因中，編碼了四種 Argonaute (AGO1-4)，其中又以 AGO2 具有最高的表現水平且最主要參與 RNAi 的作用 (Diederichs & Haber, 2007; Liu et al., 2004)。此外也有相關研究指出，相比於其他的 Argonaute，AGO2 在 RNA 激活路徑 (RNAa) 中也扮演重要角色 (Li et al., 2006)。

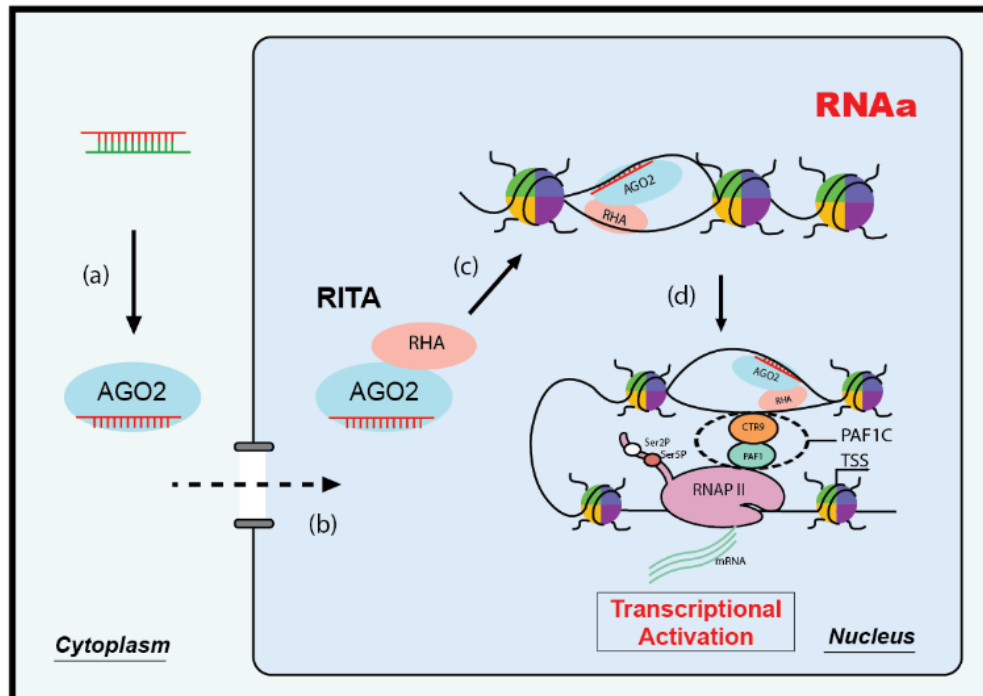


## 1.2 RNA 激活路徑 (RNA activation pathway)

在近期的研究中越來越多的證據表明，除了參與 RNAi 的基因沉默現象外，某些小片段 RNA 還可以對基因表達進行正向調控，這種現象被稱為 RNA 激活 (RNA activation, RNAa)，並且從 *Caenorhabditis elegans* 到人類的演化過程中被保留著 (Li, 2017)。

目前已知在 RNAa 的機制當中，主要參與作用的小片段 RNA 為外來的 saRNA (small activating RNA)。相較於 RNAi 主要在細胞質中作用，由 siRNA 或 miRNA 將 AGO2 靶向目標 mRNA 序列執行基因沉默；RNAa 則主要作用於細胞核。在 RNAa 中，由 saRNA 來引導 AGO2 進入細胞核並且靶向與 saRNA 序列互補的 DNA promoter region，這個過程中 saRNA-AGO2 還會與許多蛋白結合形成 RNA 誘導轉錄活化複合體 (RNA-induced transcriptional activation complex, RITA)，協同進行基因轉錄激活。然而，迄今為止，關於 RNAa 形成 RITA 複合體的詳細分子機制仍不甚了解 (Fig 1)。





**Fig 1. RNA 激活路徑示意圖**

(a) AGO2 結合 saRNA 並且解旋留下 guide strand，丟棄 passenger strand。 (b) saRNA-AGO2 複合物進入細胞核，與 RHA 形成 RITA 複合體。 (c) saRNA 引導 RITA 複合體與目標 DNA 進行互補配對。 (d) 透過 RHA 徵招 RNA pol II 以及 PAF1 複合體刺激轉錄起始與延長的進行 [RHA: RNA helicase A；PAF1C: PAF1 Complex；RNAP II: RNA polymerase II；TSS: Transcription start site]。

### 1.2.1 RNA 誘導轉錄活化複合體 (RITA)

已有相關研究結合 ChIRP (chromatin isolation by biotinylated RNA pulldown) 以及質譜的分析，證實了 saRNA-AGO2 還會與許多參與 RNAa 過程的蛋白結合，並且將其命名為 RNA 誘導轉錄活化複合體 (RNA-induced transcriptional activation complex, RITA) (Hu et al., 2012; Schwartz et al., 2008)。RITA 複合體中主要包含有 RHA、CTR9、PAF1 及多種 hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)、TNRC6 蛋白質家族成員等等 (Fig 1)。

RITA 複合體中最為主要的作用核心包含 saRNA (small activation RNA)、AGO2 以及 RNA/DNA 解旋、轉錄活化和組蛋白修飾相關的蛋白質，包括 RHA、CTR9 和 PAF1。RHA 是一種 RNA/DNA 解旋酶，能夠藉由招募 RNApol II 來協助轉錄活化的進行 (Tang et al., 2009; Zhang & Grosse, 1994)；CTR9 和 PAF1 則是 PAF1 複合體 (RNAP II-associated paf1 complex, PAF1C) 的組成成員之一 (Kim et al., 2010; Mueller & Jaehning, 2002)，PAF1C 能夠直接促進轉錄作用的啟動和延伸 (Jaehning, 2010; Krogan et al., 2002; Marton & Desiderio, 2008; Rondón et al., 2004; Zhang et al., 2009)，通過招募 E2/E3 泛素連接酶對組蛋白進行修飾，將 H2B 泛素化或是 H3K4、H3K79 甲基化，從而活化基因的表現 (Chu et al., 2007; Chu et al., 2010; Kim et al., 2010; Li et al., 2006; Marton & Desiderio, 2008; Turunen et al., 2009; Yue et al., 2010)。其中，RHA 在 RITA 複合體當中更是不可缺少的角色，主要由它執行基因轉錄活化作用 (Tang et al., 2009; Zhang & Grosse, 1994)。

### 1.2.2 RHA 蛋白 (RNA helicase A)

RHA 蛋白存在於人類細胞中，又稱為 DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 9 (DHX9) 或 nuclear DNA helicase II (NDHII)，隸屬於 DExH 解旋酶家族的一員，具有催化雙股 DNA 及 RNA 由 3' 到 5' 解旋的能力。目前已知 RHA 也是 RITA 複合體當中重要的成員之一，他能夠藉由招募 RNA pol II 來協助轉錄活化起始的進行 (Fidaleo et al., 2016)。

RHA 由 1270 個胺基酸所組成，分子量約為 142 kD，其主要包含 8 個結構域 (Lee et al., 1999)；其 N 端含有雙股 RNA 結合域 (RNA-binding domain, dsRBD I 和 dsRBD II) 以及最小轉錄活化域 (Minimal transactivation domain, MTAD)。RHA 的 dsRBD 對雙股 RNA 以及部分的單股 DNA 皆具有特異性的親和力；除此之外，dsRBD 也能夠結合特定 mRNA 的 5' 非編碼區 (Post-transcriptional control elements, PCEs)，調控其轉譯的進行 (Hartman et al., 2006; Zhang & Grosse, 1997)。RHA 的中央部分含有一個保守的 ATPase 依賴性解旋酶結構域，由 DEAD-like helicase superfamily ATP binding domain (DExDc) 和 Helicase superfamily C-terminus domain associated with DExH/D box proteins (HELICc) 所組成，此外還含有兩個未知功能的區域，Helicase-associated domain 2 (HA2) 以及 Domain of unknown function (DUF) (Ranji et al., 2011; Zhang & Grosse, 1997)。

而在 RHA 的 C-端含有重複的 arginine 和 glycine (RG-rich domain, RGG-box)；RGG-box 會與其他區域協同作用以增加與核酸之間的親和力，並參與 G quadruplex structures (G4) 相關的 RNA 結合 (Darnell et al., 2001; Ghisolfi et al., 1992; Kiledjian & Dreyfuss, 1992)。除此之外，在哺乳動物的 RHA 中還存在一個高度保守的 19 個氨基酸殘基的核定位信號 (Nuclear Localization Signal, NLS)，而在 *Drosophila* 和 *Caenorhabditis elegans* 中則沒有類似的信號 (Aratani et al., 2006; Wilson et al., 1994; Zhang et al., 2004)。

目前已知在基因轉錄調控過程中，RHA 能夠藉由最小轉錄活化域 (Minimal transactivation domain, MTAD) 與 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 結合，並參與 cAMP-responsive element binding protein (CREB)-dependent transcription 的過程；當 CREB 經 PKA catalytic domain 磷酸化後，便會與 CREB binding protein (CBP) 緊密結合，而 CBP 則藉由與 RHA 的交互作用，引領 RNA polymerase II 進行 cAMP-responsive element (CRE) 下游基因的轉錄進行 (Aratani et al., 2001; Nakajima et al., 1997; Schlegel et al., 2003)。

### 1.2.3 RNAa 潛在的應用價值

RNAa 與 RNAi 有著相似的作用機制，因此也具有相同應用方向，包括基因功能研究、疾病治療等等。通過設計序列，可以生成小片段 RNA 重組質體，用於調控目標基因的功能，進而影響基因表達。除此之外，由於 RNAa 主要作用的位置為細胞核，小片段 RNA 較不容易受到降解，因此以 RNAa 為基礎的藥物可能具有更持久的藥效。(Janowski et al., 2007; Li et al., 2006; Place et al., 2010; Wang et al., 2012)。

過去已發表過一項關於 RNAa 藥物的臨床前研究。當時主要利用表達 shRNA (short hairpin RNA) 的方式進行轉錄激活，探討其能否促進血管新生，shRNA 成功使缺血性後肢的血管密度及血流獲得改善 (Turunen et al., 2009)。此外，也有另一篇研究報告針對 p21 啟動子進行 saRNA 藥物的開發。通過使用低密度 saRNA 篩選系統，尋找出一段能夠激活 p21 的 saRNA (dsP21-322) 序列，其有效地將 p21 活性提高至 14 倍以上 (Place et al., 2012)。

總的來說，RNAa 作為一種潛在的治療方法，已經在許多測試中有優秀的表現。其具有廣泛的應用價值，隨著對 RNAa 機制的深入了解，未來它將有機會成為各種疾病治療的新方針。

### 1.3 研究動機與目標

由過去的研究得知，RITA 複合體的組成最主要包含了 saRNA、AGO2、RHA。由 saRNA 作為引導者，將整個 RITA 帶向目標基因 DNA promoter region；RHA 則能夠藉由與 RNA 聚合酶 II 結合，活化下游基因的轉錄。然而到目前為止，對於 RITA 複合體中三者之間是如何結合並形成功能完整的作用核心，確仍知之甚少。雖然先前有文獻提出過，AGO2 與 RHA 之間會依靠 miRNA 的協助進行連結 (Fu & Yuan, 2013)，但是並沒有完整探討整體 RHA 的區域，而是只有針對特定區域進行實驗，因此在本論文中決定將 RHA 與 AGO2 之間結合的關係進行詳細的剖析，藉此使得 RITA 複合體內的作用機制獲得更全面的瞭解。

除此之外，本論文也嘗試將研究中的發現結合過往的研究成果，利用生物工程製作出以 RNAa 機制作為基礎的融合蛋白，使其有機會成為與 RNAa 相關研究的工具，甚至進一步成為疾病治療的方法。

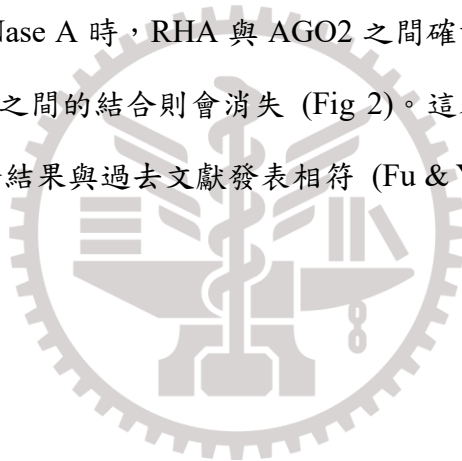


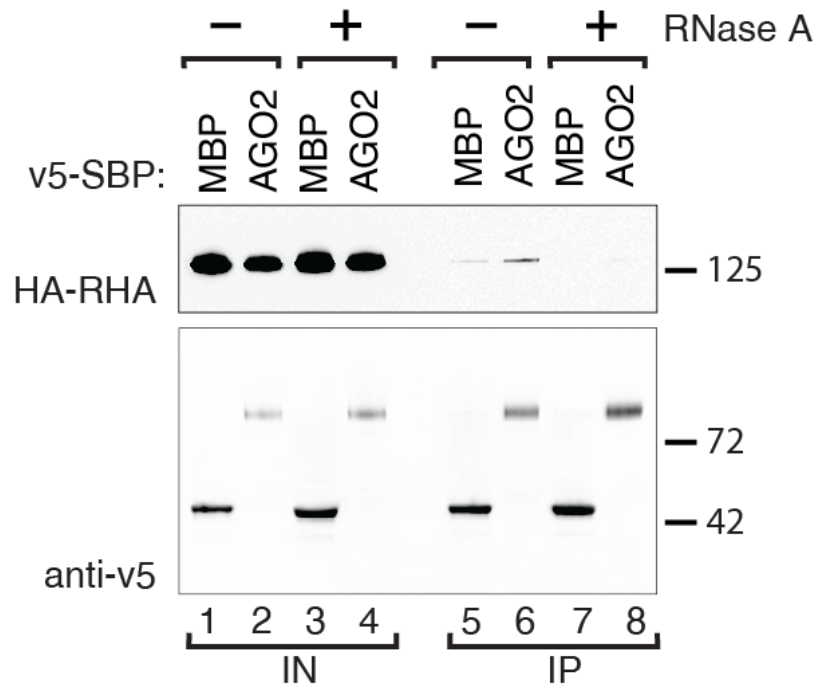
## 第二章 實驗結果

### 2.1 RHA 與 AGO2 的交互作用

由於到目前為止對於 RNAa 機制的瞭解仍然不夠詳細，因此，我將對於 RITA 複合體內的 RHA 以及 AGO2 進行探討，解析兩者間的交互作用 (Interaction) 是如何進行。

首先，我在 HEK-293T WT 細胞株中，於  $-/+RNase A$  的條件下，利用免疫共沉澱實驗來觀察 RHA (Full-length) 與 AGO2 間的交互作用，並利用西方墨點法分析結果。實驗結果顯示，在尚未加入 RNase A 時，RHA 與 AGO2 之間確實存在交互作用；然而，當添加 RNase A 之後，兩者之間的結合則會消失 (Fig 2)。這表明兩者之間的交互作用依靠著 RNA 的協助，此部分結果與過去文獻發表相符 (Fu & Yuan, 2013)。





**Fig 2. RHA 與 AGO2 依靠 RNA 協助進行交互作用**

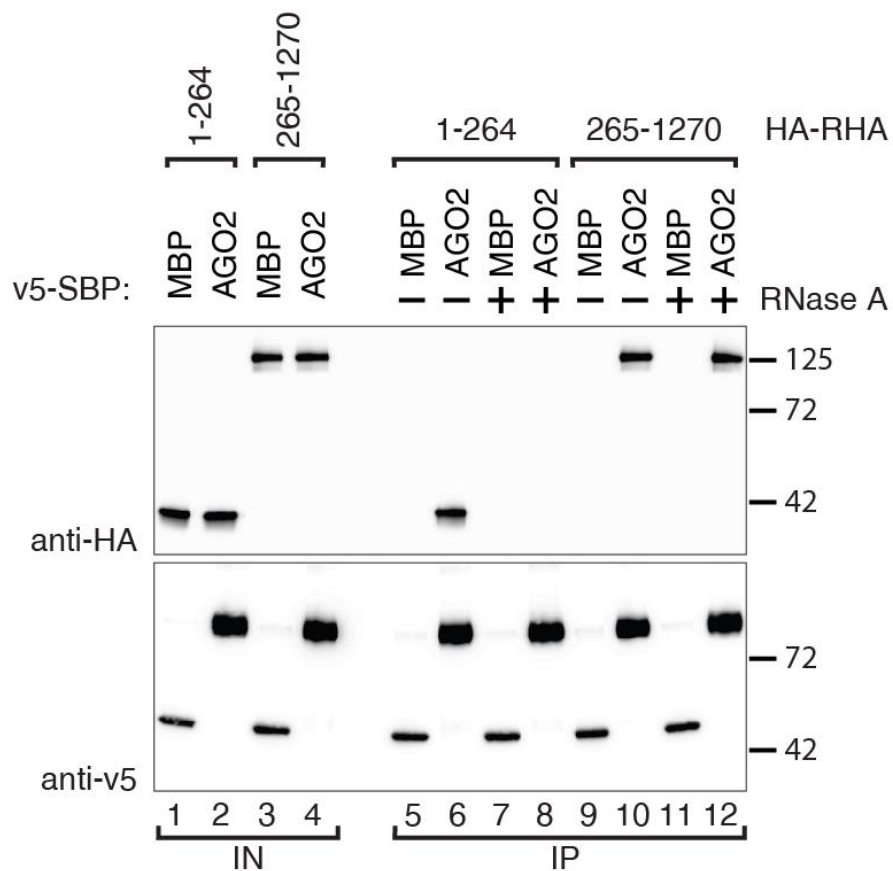
將 v5-SBP-AGO2 以及 HA-RHA 質體轉染至 HEK 293T WT 細胞，進行免疫共沉澱實驗 (依需求添加 RNase A)；以 Streptavidin resin beads 純化出 v5-SBP-AGO2 以及與其交互作用之蛋白分子，最後利用 anti-HA-HRP 以及 anti-v5 抗體進行 Western blot 分析結果。

## 2.2 RHA (265-1270)與 AGO2 的交互作用

過去的研究中，普遍認為 RHA 與 AGO2 之間的結合是經由 RNA 協助所形成的，並且已經有研究試圖尋找出兩者之間的最小結合區域，他們將 AGO2 區分為 N-terminal、MID、PAZ、PIWI 與 RHA 的片段 1-264 (dsRBD)進行免疫沉澱。由結果顯示，AGO2 藉由 MID 區域與 RHA 的 dsRBD 結合；並且加入 RNase A 後，兩者之間的結合消失，因此更進一步驗證兩個蛋白之間的交互作用是由 RNA 來協助完成的 (Fu & Yuan, 2013)。

不過在前人的研究當中並未提及 RHA 的其他區域，並且只有針對 RHA 的 dsRBD 來進行測試，此外 AGO2 的 MID 以及 RHA 的 dsRBD 區域本身主要的功能便是與 RNA 結合，因此這項結果並不足以完整說明兩個蛋白之間具有交互作用。因此，我決定更詳細地區分 RHA，將兩者之間的最小結合區域進行完整的剖析。

首先，我將 RHA 區分為 1-264 (dsRBD)以及其餘的部分 265-1270，與 AGO2 全長 (Full-length)進行免疫沉澱。結果顯示，當未加入 RNase A 時，兩段片段皆會與 AGO2 結合；而在加入 RNase A 後，RHA dsRBD 與 AGO2 的結合消失，此發現與過去的結果相符；然而意外地，我們發現 RHA(265-1270)在加入 RNase A 後仍然與 AGO2 結合，這部分尚未有人提及過。我們據此推測 AGO2 與 RHA 之間除了在 RHA dsRBD 在有 RNA 協助下的結合外，在 RHA(265-1270)的部分亦存在無須藉由 RNA 協助的交互作用 (Fig 3)。



**Fig 3. RHA (265-1270)與 AGO2 之間存在物理性結合**

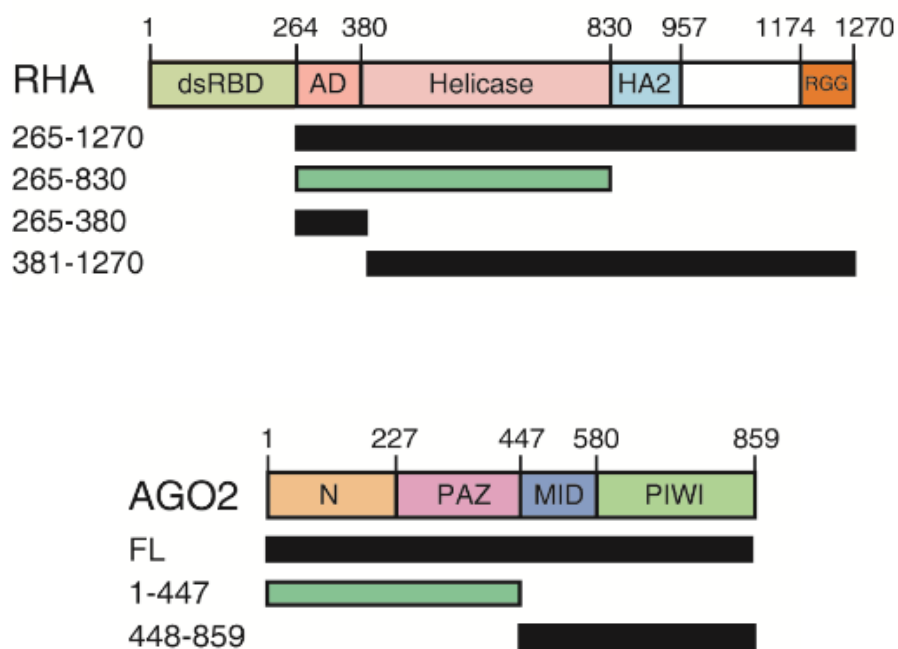
將 v5-SBP-AGO2 以及 HA-RHA (1-264 / 265-1270) 質體分別轉染至 HEK 293T WT 細胞，進行免疫沉澱實驗 (依需求添加 RNase A)；以 Streptavidin resin beads 純化出 v5-SBP-AGO2 以及與其交互作用之蛋白分子，最終利用 anti-HA-HRP 與 anti-v5 抗體進行 Western blot 分析結果。

## 2.3 RHA (265-830)與 AGO2 (1-447)為 RITA 內的最小結合區域

為了進一步探討這項機制，將前述的 RHA (265-1270)再次劃分為 Helicase domain (265-830)、Activation domain (265-380)、C-terminal (381-1270)三段區域分別與 AGO2 全長 (full-length)進行免疫共沉澱。同樣地，我也將 AGO2 劃分為 1-447 和 448-859 兩段區域與 RHA (265-1270)進行免疫共沉澱。結果顯示 AGO2 (1-447)與 RHA (265-830)在 *in vivo* 的條件之下作為兩者之間的最小結合區域 (Fig 4-6)。

接著，我將 AGO2 (1-447)與 RHA (265-830)兩段片段蛋白質體轉形至 *E.coli* 中，藉由自動誘導系統 (Autoinduction of protein expression system)表達，以 Amylose resin 純化 MBP-HA-RHA (265-830)作為實驗 Input (IN)；以 Streptavidin 純化 v5-SBP-AGO2 (1-447)之後與 RHA (265-830)混合適當時間作為 Pull-down 之產物，最後利用西方墨點法分析結果。通過 Pull-down assay 在 *in vitro* 條件下進行交互作用分析，得以確立兩個片段之間的交互作用不受其他蛋白質的影響 (Fig 6)。

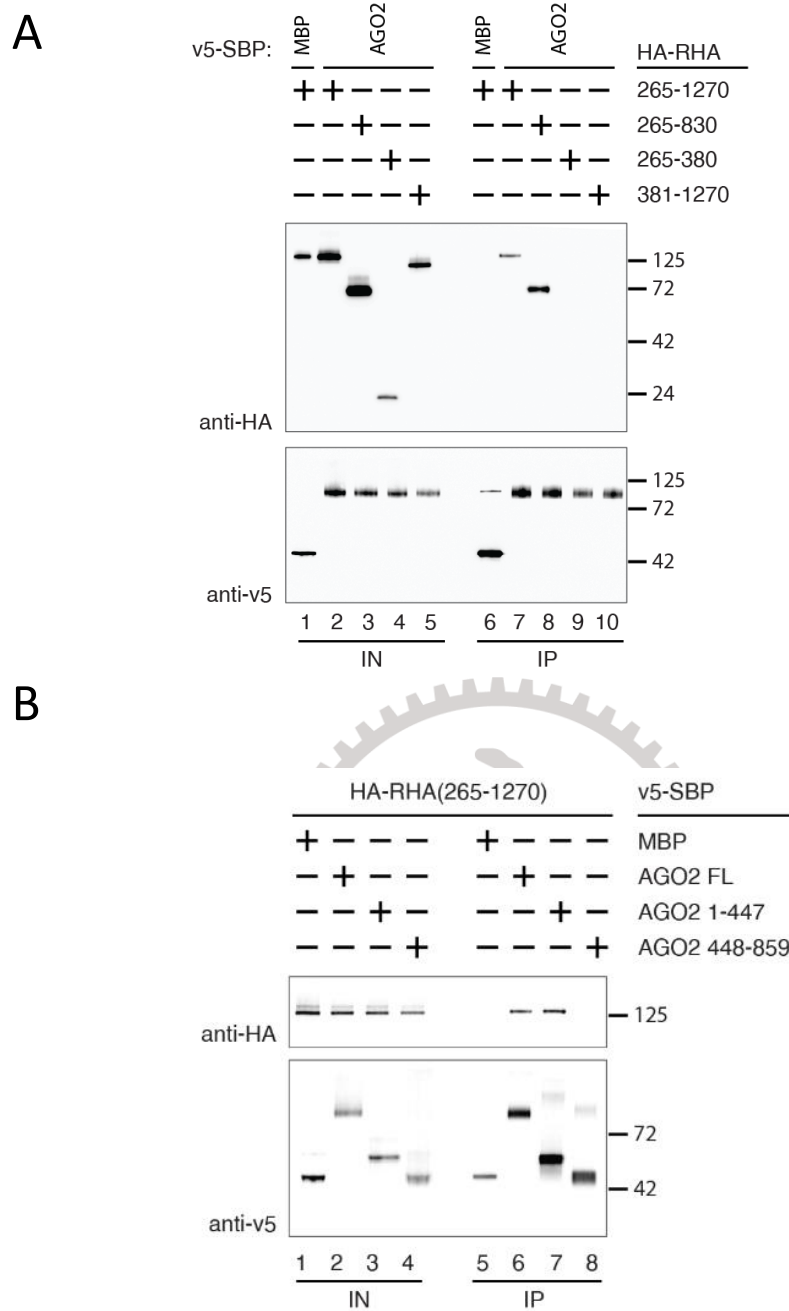
綜合 Fig 5 和 Fig 6 的實驗結果，我們確立了 RHA 與 AGO2 之間的交互作用並非完全依靠 RNA，而是在 RHA (265-830)與 AGO2(1-447)之間同時存在直接的交互作用。



**Fig 4. RHA 以及 AGO2 區域劃分示意圖**

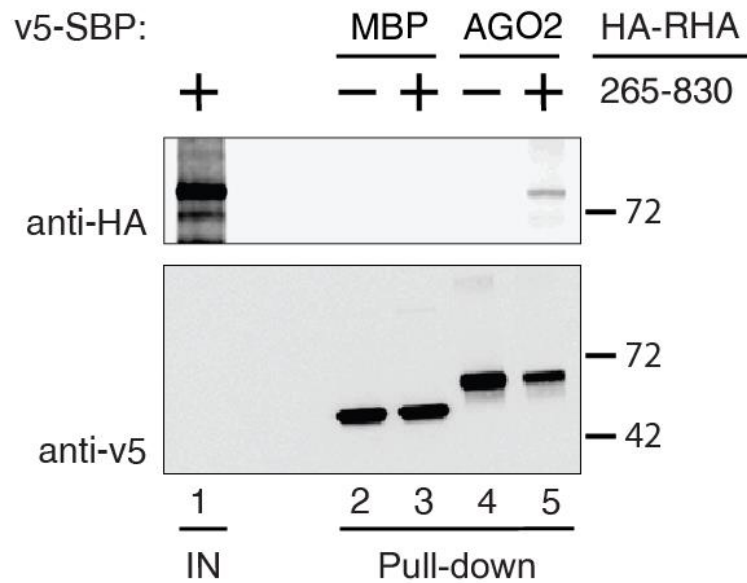
將 RHA (265-1270)劃分為 Helicase domain (265-830)、Activation domain (265-380)、C-terminal (381-1270) 三段區域。將 AGO2 劃分為 1-447 和 448-859。





**Fig 5. RHA (265-830)與 AGO2 (1-447)為兩者之間的最小結合域**

(A) 在 HEK 293T WT 細胞中共轉染 v5-SBP-AGO2 以及 HA-RHA (265-1270) / (265-830) / (265-380) / (381-1270)，免疫共沉澱之後進行 Western blot 分析結果。(B) 在 HEK 293T WT 細胞株中共轉染 HA-RHA (265-1270)以及 v5-SBP-AGO2 (1-447) / (448-859)，免疫共沉澱之後進行 Western blot 分析結果。



**Fig 6. RHA (265-830)與 AGO2 (1-447)在體外仍具有交互作用**

經過 Amylose resin 純化 MBP-HA-RHA (265-830)作為實驗 Input (IN) (1)；在 Streptavidin 純化過後的 v5-SBP-AGO2 (1-447)中加入 HA-RHA (265-830)適當混合，進行 Pull-down 試驗後，作為 Pull-down 之產物 (2-5)，利用 Western blot 分析結果。

## 2.4 AGO2 具有轉錄活化的能力

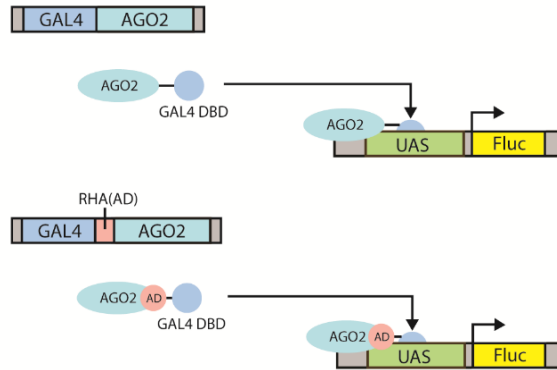
在前面的實驗中，我們對於 RNAa 當中 RITA 複合體的形成有更加深入的瞭解。接著，我希望將研究中的發現利用生物工程 (bioengineering) 發展為與 RNAa 相關研究的工具，更進一步成為疾病治療的新方法。

根據過去的研究，已知在 RITA 複合體當中，AGO2 能依靠 saRNA 辨識目標基因之互補 DNA 序列，RHA 的 AD (activation domain) 則能夠活化目標基因表現，並且 AGO2 以及 RHA 之間存在直接的交互作用。因此，我想依據 RNAa 的機制製作出一種融合蛋白，包含 AGO2 以及 RHA 的 AD，藉由簡化整條 RNAa 的路徑，使得目標基因能夠更為直接且有效率的受到活化。

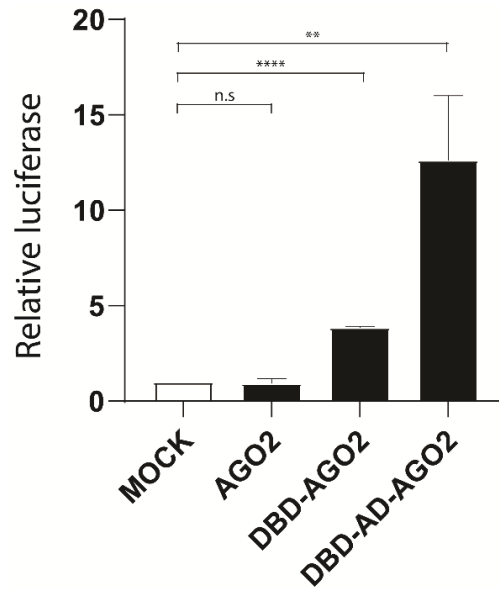
為了進一步確立 AGO2 在細胞內的轉錄活化能力，同時測試我所製作的融合蛋白能否有效活化目標基因，我運用 GAL4/UAS 表現系統，以 GAL4 的 DBD (DNA binding domain) 引導 AGO2 至 UAS 序列，並將 UAS 序列設計於 Fluc 前端，藉此由冷光強度來判斷 AGO2 的轉錄活化能力。

結果顯示 DBD-AGO2 以及 DBD-AD-AGO2 皆能有效地提高冷光強度，驗證了 AGO2 自身即具備轉錄活化能力，且在融合了 RHA 的 AD (activation domain) 之後大幅的提高轉錄活化的功效 (Fig 7)。

A



B



**Fig 7. AGO2 在細胞內具有轉錄活化能力**

(A) GAL4/UAS 表現系統示意圖。(B) 將 TK-RLuc 和 pUAS-luc2 各 100 ng 與 300 ng pLNHA-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-AD-HsAGO2 混合均勻，以 pCDNA3 質體將各組補至 4  $\mu$ g 後，轉染至 12-well 之 HEK293T 細胞中，以冷光報告基因活性檢測分析，進行三重複試驗，藉此比較彼此 Luciferase 活性的不同；所得之結果經平均後取 $\pm$ 標準差 (n = 3)；\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05。

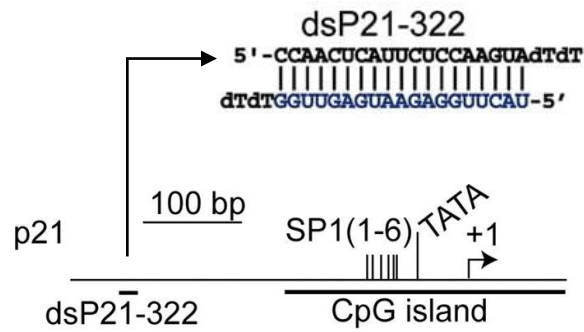
## 2.5 NLS-AD-AGO2 活化抑癌基因 p21

在確立了 AD-AGO2 融合蛋白確實具有提高轉錄活化能力後，下一步，我利用與目標基因序列互補的 saRNA，來進一步測試 AD-AGO2 融合蛋白於 RNAa 機制中的轉錄活化效果。為此，我挑選已有相關研究發表，在多種人類細胞內均受到 RNAa 所調控之抑癌基因(p21)，並且參考文獻中的序列設計，針對其製作出對應的小片段雙股 RNA (saP21) (Li et al., 2006)。

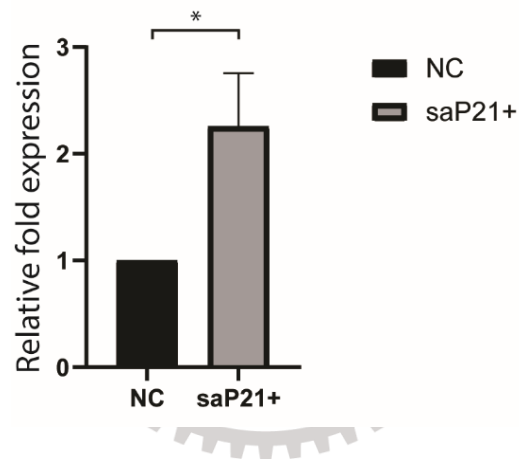
首先，為了驗證 p21 基因在本實驗室所選用的 HEK293T 細胞株同樣受到 RNAa 所調控，因此我轉染 saP21 至野生型細胞，運用 qPCR 進行分析。結果顯示在過表達 saP21 後，能有效地提高 HEK293T 細胞 p21 的 mRNA 表現水平，這同時也驗證了 RNAa 機制確實存在於 HEK293T 細胞株 (Fig 8)。

接下來，我共表達了 saP21 以及融合蛋白(AD-AGO2)於 HEK293T 細胞中，來進一步測試 AD-AGO2 能否有效提升 p21 基因的表現量。此外，為了使 AD-AGO2 得以迅速進入細胞核內執行作用，我另外在 AD-AGO2 前端多設計一段 NLS 序列，改良原本的融合蛋白後一同進行測試。由結果顯示，加入 AD-AGO2 後有效地提升了 mRNA 的表現量，並且加入 NLS 改良過後更能顯著地提升活化的效果 (Fig 9)。

A



B



**Fig 8. HEK293T 細胞株中 p21 基因受到 RNAa 所調控**

(A) 與 p21 基因對應的小片段雙股 RNA (saP21) 示意圖。(B) 將 2  $\mu$ g pSUPER.puro / pSUPER.puro-saP21 (-322)，以 pCDNA3 質體將各組補至 4  $\mu$ g 後，轉染至 12-well 之 HEK 293T 細胞中，以 RT-qPCR 分析，進行三重複試驗，pSUPER.puro 作為 NC；所得之結果經平均後取 $\pm$ 標準差 (n = 3)；\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05。



Relative fold expression

saP21- saP21+

MOCK  
HA  
HA-AGO2  
HA-AD-AGO2  
HA-NLS-AD-AGO2

n.s. n.s. n.s. n.s. \*\*\*\* \*\* n.s. n.s.

Condition	saP21- (Relative fold expression)	saP21+ (Relative fold expression)
MOCK	~1.0	~1.0
HA	~0.9	~1.0
HA-AGO2	~0.8	~1.2
HA-AD-AGO2	~0.8	~1.5
HA-NLS-AD-AGO2	~0.7	~3.4



p21 基因的表现水平

22

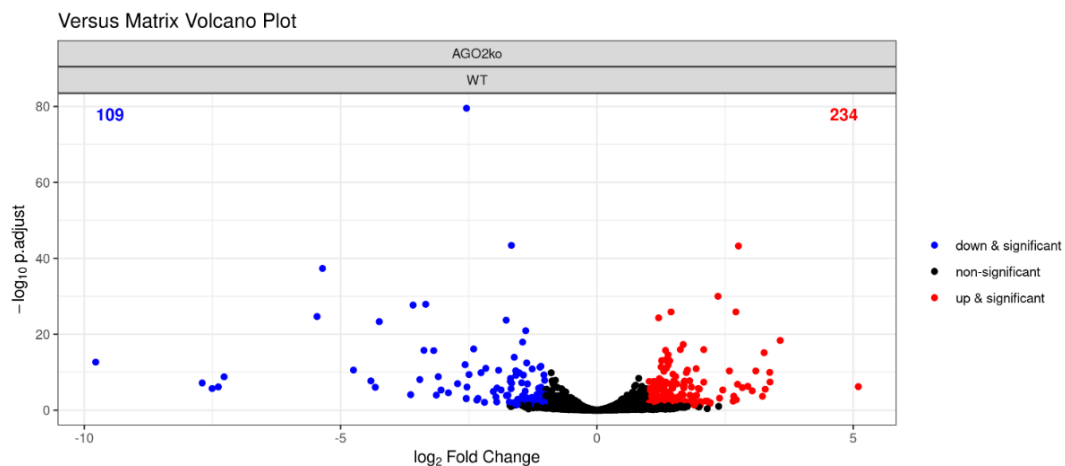
## 2.6 RNA-seq / ChIP-seq 挑選出細胞內受 RNAa 所調控的內源性基因

在先前的實驗中，我們已經確立了 HEK293T 細胞株中存在 RNAa 機制。然而，我們對於 RNAa 機制所調控的內源性基因仍然了解有限。為了深入研究此機制，我決定進一步在細胞內尋找出更多受到 RNAa 所調控的內源性基因。我們運用 RNA-seq (RNA sequencing) 以及 ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) 對 HEK293T 細胞株進行高通量序列分析，以利往後對於 RNAa 研究的進行。

首先，我們利用 CRISPR/Cas9 系統將 HEK293T 細胞株中的 AGO2 基因敲除 (knockout)，建立起 AGO2-KO 細胞株。在萃取 WT 與 AGO2-KO 細胞株的 RNA 後進行次世代定序 (Next-generation sequencing, NGS)。運用生物資訊的方法比對兩者之間各基因的表現水平，從中尋找出在 AGO2-KO 細胞株之中 mRNA 表現量呈現下降的基因，即為受到 AGO2 正調控之基因 ( $\log_2 \text{Fold Change} < 0$ ) (Fig 10)。

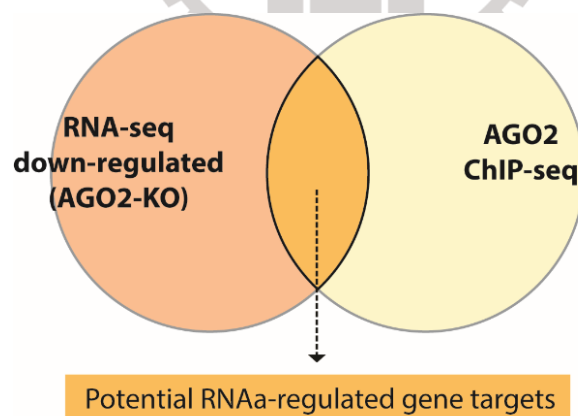
另外，我將 HA-AGO2 轉染到 AGO2-KO 細胞株中，並且利用 anti-HA 的抗體進行染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)，再將實驗後的產物送往進行定序。藉由定序的結果，能夠尋找出細胞內與 AGO2 結合的 DNA 片段序列，並且能夠從序列位置判斷對應的目標基因。

最終由陽明交通大學生物資訊及系統生物研究所，陳亭紋老師實驗室協助將 RNA-seq 以及 ChIP-seq 的實驗數據結合，並且對各基因組進行疾病與功能性的分析，藉此得以挑選出同時受到 AGO2 正向調控，並且 DNA 的 promoter region 會與 AGO2 結合之基因，將這些基因作為後續實驗測試的目標對象 (Fig 11)。



**Fig 10. RNA-Seq 分析火山圖 (Volcano Plot) 呈現基因表現的分佈情形**

火山圖分析 AGO2-KO 與 WT 的 Fold change 與 pvalue/p.adjust 的關係。將差異倍數取  $\log_2$  後為橫座標；顯著性檢驗的 pvalue/p.adjust 值取  $-\log_{10}$  後為縱座標。(紅色和藍色點分別代表正 / 負調控表現且  $pvalue < 0.05$  或  $p.adjust < 0.005$  的基因，左右上方數字表示該標籤下的基因數量。各組比較以陣列型式呈現，組別名稱列於圖的上方，上為實驗組下為對照組。)



**Fig 11. RNA-seq / ChIP-seq 尋找目標基因示意圖**

將 RNA-seq 以及 ChIP-seq 的實驗數據結合，藉此尋找同時受到 AGO2 正向調控，並且 DNA 的 promoter region 會與 AGO2 結合之基因。

## 2.7 NLS-AD-AGO2 活化受 RNAa 所調控的內源性基因

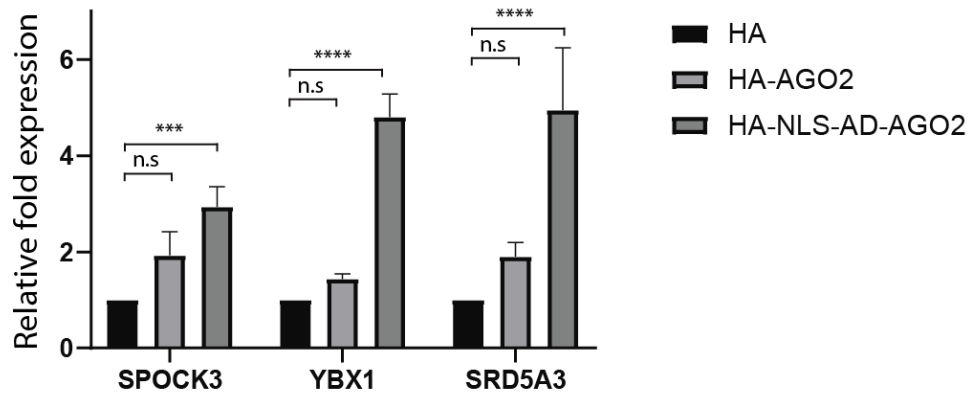
建立起 HEK 293T 的 RNA-seq 和 ChIP-seq 資料庫以後，我將從中挑選基因運用回補實驗 (compensation assay) 進行驗證；其中主要以 RNA-seq fold change 差異較大，並且在分析結果中具有顯著差異之基因作為挑選對象。此外，也將挑選基因依照疾病和功能性分類，找出與癌症相關之基因進行後續的驗證。

在此挑選 SPOCK3、YBX1、SRD5A3 三組基因，將 AGO2 以及 NLS-AD-AGO2 轉染至 AGO2-KO 細胞株之後，利用 qPCR 分析各組 mRNA 的表現水平；結果顯示 AGO2 順利地回補三組基因的表現量，並且 NLS-AD-AGO2 也顯著地對各組產生活化。

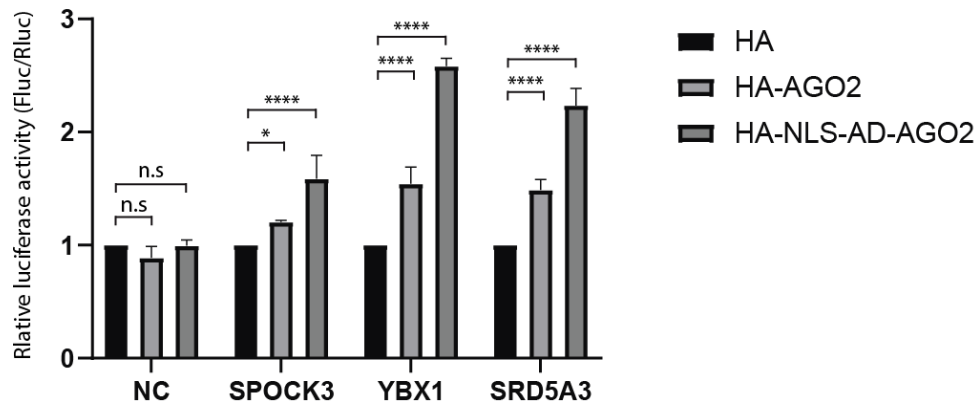
除此之外，我也以 HEK 293T 細胞株的 gDNA (genomic DNA) 作為模板，選殖出三組基因的 promoter region 與 Firefly luciferase (Fluc) 冷光酵素進行質體重組，製作出 pSPOCK3-luc2、pYBX1-luc2、pSRD5A3-luc2 並執行冷光報告基因活性檢測 (Luciferase assay)。測定各組冷光強度之後，得出與前面相符的結果，NLS-AD-AGO2 有效地增加了 Fluc 的表現水平 (Fig 12)。

另外我也挑選更多不同功能性的基因，運用與上述相同的方法進行測試；同樣地，NLS-AD-AGO2 皆顯著地活化目標基因的表現。根據前面各種實驗反覆驗證的結果，能夠確立 NLS-AD-AGO2 除了活化已知的目標基因 p21 之外，也有效地活化由 RNA-seq 以及 ChIP-seq 挑選出的內源性基因 (Fig 13)。

A

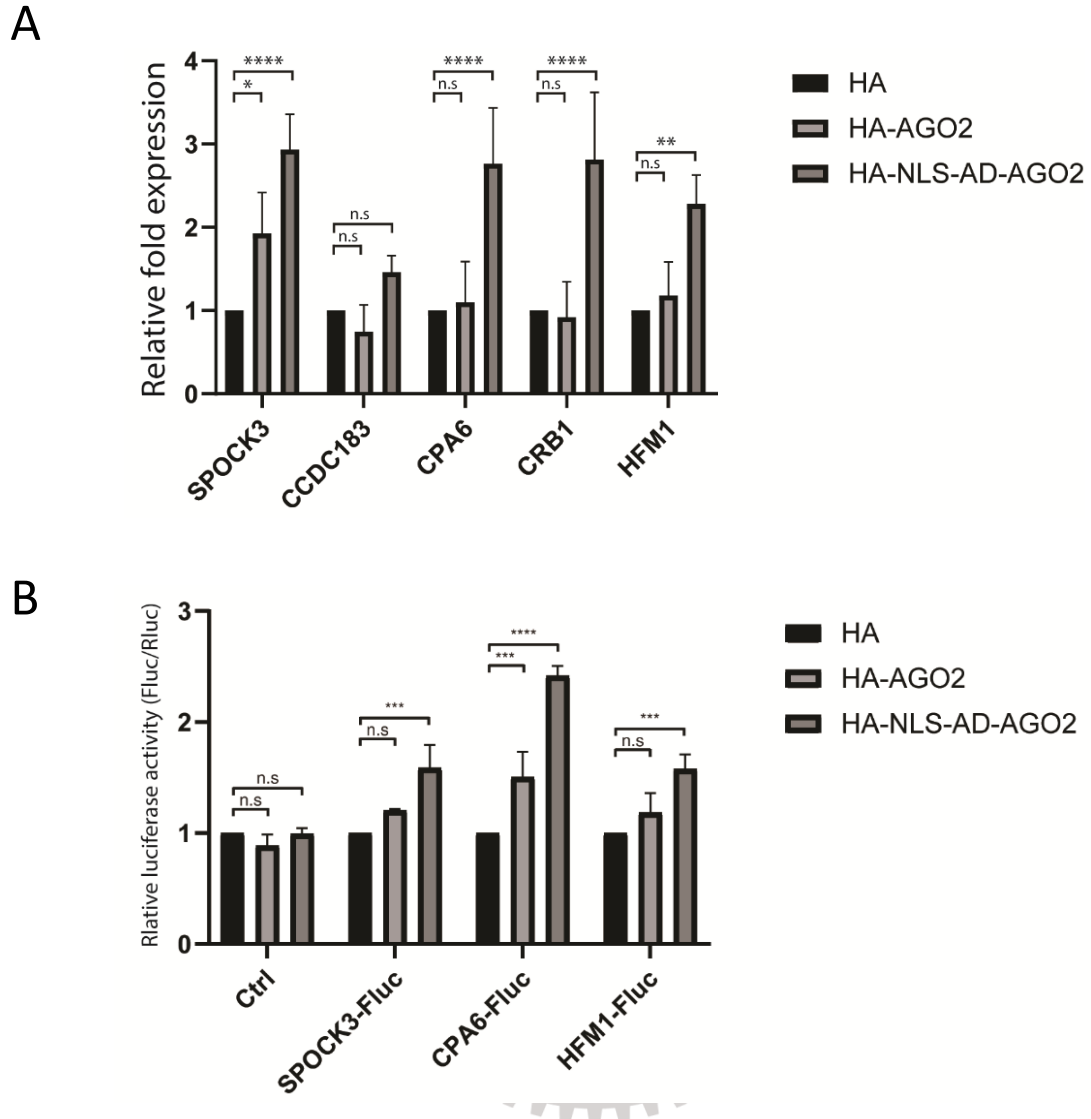


B



**Fig 12. NLS-AD-AGO2 活化 RNAa 所調控與癌症疾病相關的基因**

(A) 將 2  $\mu$ g pCIneo-LNHA / pCIneo-LNHA-AGO2 / pCIneo-LNHA-NLS-AD-HsAGO2，轉染至 12-well 之 293T 細胞中，72 小時後以 GENEzol TriRNA Pure kit 純化並進行 SPOCK3 / YBX1 / SRD5A3 基因專一性反轉錄，最後以 qPCR 偵測各樣本的 mRNA 含量。(B) 將 TK-RLuc 和 pSPOCK3-luc2 / pYBX1-luc2 / pSRD5A3-luc2 各 100 ng 與 300 ng pLNHA-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-AD-HsAGO2 混合均勻，以 pCDNA3 質體將各組補至 4  $\mu$ g 後，利用 PEI 轉染至 12-well 之 293T 細胞中，24 小時後以冷光報告基因活性檢測分析，進行三重複試驗，藉此比較彼此 Luciferase 活性的不同；所得之結果經平均後取 $\pm$ 標準差 (n=3)；\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05。



**Fig 13. NLS-AD-AGO2 活化 RNAa 所調控其他不同功能性的基因**

(A) 與 Fig 12 相同方法轉染至 12-well 之 293T 細胞中，72 小時後純化並進行 SPOCK3 / CCDC183 / CPA6 / CRB1 / HFM1 基因專一性反轉錄，以 qPCR 偵測各樣本的 mRNA 含量。(B) 將 TK-RLuc 和 pSPOCK3-luc2 / pCPA6-luc2 / pHFM1-luc2 各 100 ng 與 300 ng pLNHA-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-HsAGO2 / pLNHA-GAL4 DBD-AD-HsAGO2 混合均勻，以 pCDNA3 質體將各組補至 4  $\mu$ g 後，利用 PEI 轉染至 12-well 之 293T 細胞中，24 小時後以冷光報告基因活性檢測分析，進行三重複試驗；所得之結果經平均後取 $\pm$ 標準差 (n = 3)；\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05。

### 第三章 討論

關於 AGO2 與 RHA 之間的交互作用，我們發現了 RITA 複合體內未被提及過的連結關係 (Fig 2-6)。然而，由 Fig 2 的結果得知，AGO2 (FL)與 RHA (FL)在失去 RNA 的協助後，彼此之間的連結會隨之消失；然而，當我們將 RHA 進行劃分後，我們在 RHA (265-830)的區域卻發現了直接的連接，這與之前的結果存在著顯著的矛盾。這個發現暗示我們需要進一步討論 RITA 複合體的組成。在本實驗室的研究中，我們了解到 RITA 複合體中存在著另一個重要的蛋白，即 TNRC6A。TNRC6A 在 AGO2 和 RHA 間的交互作用中扮演著關鍵的橋樑角色。因此，進一步研究和探索 TNRC6A 的功能將有助於解釋這一矛盾現象。

我認為 AGO2 與 RHA 之間的交互作用確實有一部分是依靠 RNA 來協助連結的；除此之外，還會以 TNRC6A 會作為兩者之間的媒介，並且使 RHA 產生結構上的改變，暴露出 265-830 的區域與 AGO2 結合，藉此使得 AGO2 與 RHA 之間的交互作用更加緊密，形成完整的 RITA 複合體作為 RNAa 反應的主要核心 (Fig 14)。

另外，我根據 RNAa 的作用機制所製作出的融合蛋白 (NLS-AD-AGO2)，在細胞內皆能順利活化已知會受到 RNAa 所調控的目標基因 p21 以及由 RNA-seq / ChIP-seq 挑選出的內源性基因。這項工具的出現能夠有效協助之後 RNAa 的研究，並且它也具有成為疾病治療新藥的潛力 (Fig 15)。

目前已經存在以 RNAi 作為基礎之藥物，並且在應用上持續有重大的突破，因此與 RNAi 有著相似作用機制的 RNAa 也具有同等的研究價值。此外，我認為它與目前已被廣泛運用的 CRISPR-Cas9 基因編輯系統有著相同的重要性。在 CRISPR-Cas9 系統當中，會由引導序列 (gRNA)引導 Cas9 (CRISPR associated protein 9)使目標基因的 DNA 序列



形成一個雙股斷裂，之後細胞會對 DNA 進行修復，從而導致基因變異，藉此達成編輯基因的目的。這項系統的出現，對於所有生物領域的研究有著重大的貢獻，但是在部分條件下仍然存在限制，比如 gRNA 的設計需要考量 NGG 序列，或是 Cas9 本身分子大小相當龐大 (大約 160 kDa) 以至於無法進行更多的蛋白修飾。而 AGO2 分子大小約 95 kDa，相比於 Cas9 小許多，因此能夠更為靈活的應用，此外小片段雙股 RNA 的設計上並不受到序列的限制，使得目標基因的選擇更加彈性。綜上所述，以 RNAa 機制作為基礎的工具有著不容小覷的前景，不過目前的研究都屬於起步階段，要進入實際應用階段仍然需要更多有力的實驗數據佐證。

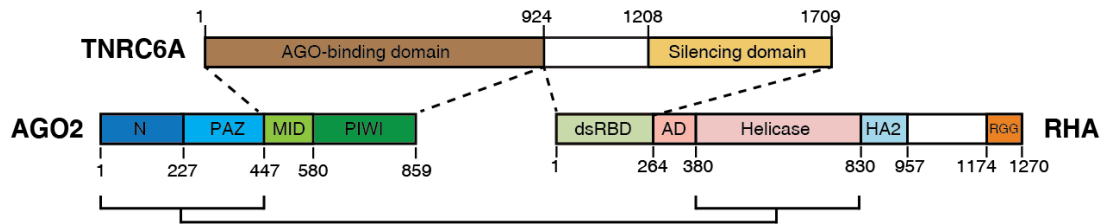
最後，由於目前尚無法解釋細胞如何區分 RNAa 和 RNAi 的機制，因此我們設計了一套實驗，試圖證明 RNAa 是否也依賴於 miRNA 的引導作用。我們推測 RNAa 與 miRNA 之間可能存在特定的相互作用機制。透過這些實驗，我們希望能夠提供證據支持 RNAa 是由 miRNA 引導的假設，並進一步了解細胞如何利用 miRNA 調控 RNAa 過程。我將經由 ChIP-seq 分析後會與 AGO2 結合的片段序列設計於 Fluc 的 3' 端，其中包含了 sense 以及 antisense 的片段序列，將兩組重組質體 (pCIneo-Fluc-sense sequence 以及 pCIneo-Fluc-antisense sequence) 轉染至細胞後，經由 Fluc 的訊號強度確認此片段序列在細胞質內是否同樣受到 miRNA 辨識並執行 RNAi (Fig 16)。

由結果顯示，對應基因的 miRNA 分別辨識 SPOCK3 的 antisense 以及 SRD5A3 的 sense 序列，並對其進行 RNAi 調控。而 YBX1 的 sense 以及 antisense 兩者均能夠受到辨識，這表示 YBX1 可能經由多種 miRNA 同時進行 RNAa 的調控 (Fig 17)。

藉此，我們為 RNAa 以及 RNAi 的機制作出更加全面的解釋。由於在細胞核內能夠受 RNAa 所調控之目標序列，在細胞質同樣能夠受到 RNAi 所調控。因此推測，或許對特定基因而言，當基因表現過量時，AGO2 會執行 mRNA 的降解對其進行調控；相反地，表現不足時，AGO2 無法在細胞質內尋找到互補的 mRNA 序列，便會進入細胞核活

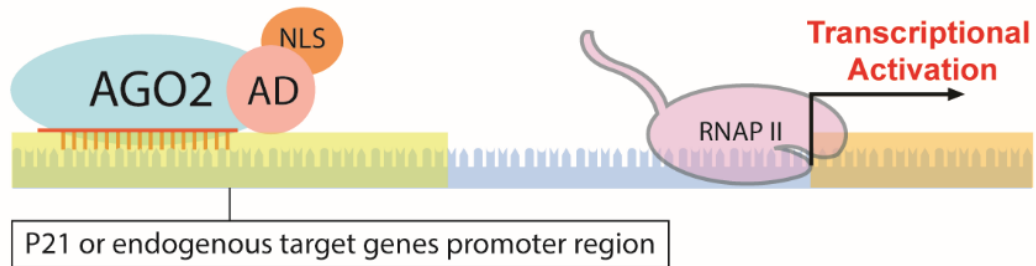


化其他相關基因的表現，間接調控此特定基因，使得細胞內整體的 RNA 表現水平達成平衡。



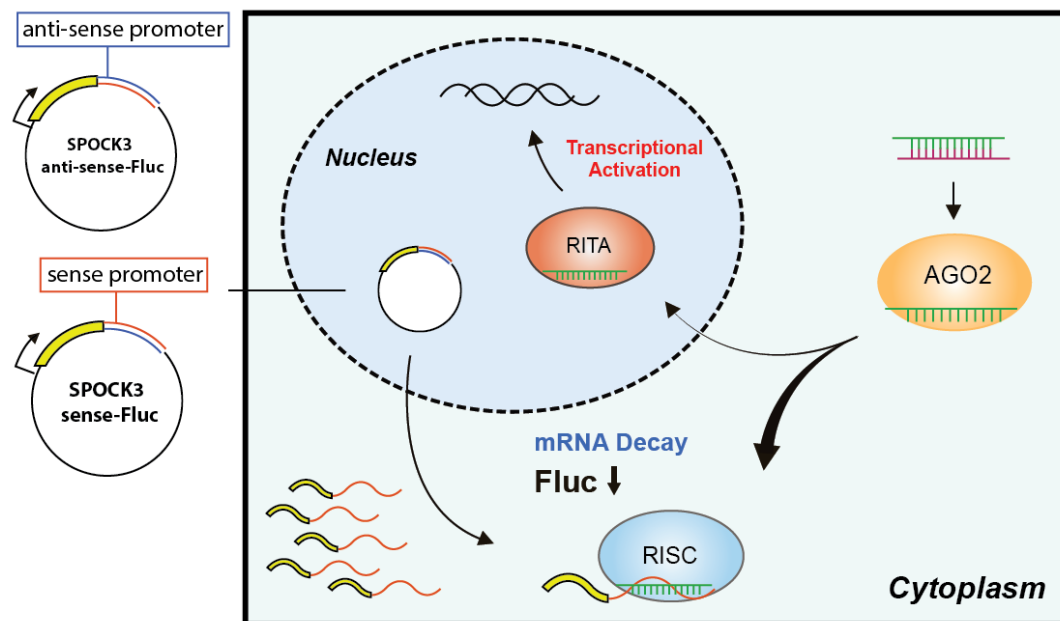
**Fig 14. RITA複合體內三個蛋白之間的交互作用**

TNRC6A 負責將 AGO2 以及 RHA 進行連結並且造成 RHA 結構上的改變，使 RHA (265-830)區域暴露與 AGO2 結合，增強 AGO2 與 RHA 之間的交互作用。



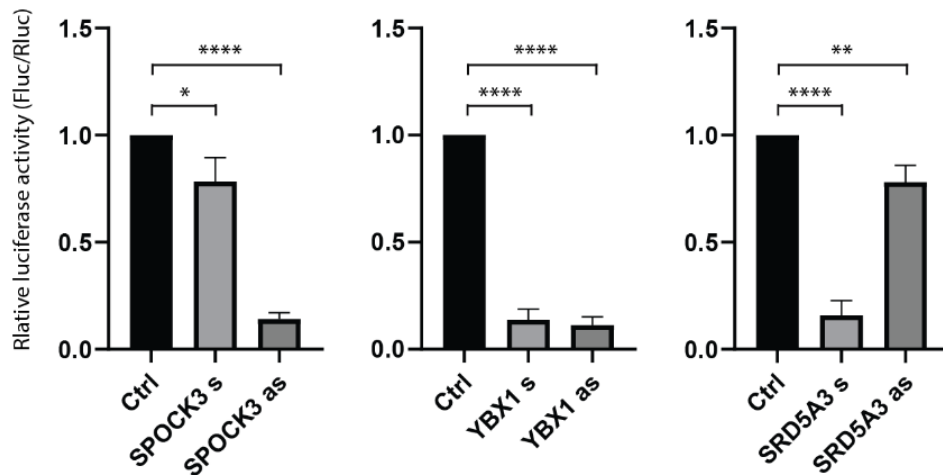
**Fig 15. NLS-AD-AGO2對p21以及內源性基因進行轉錄活化**

NLS-AD-AGO2藉由saRNA引導，與序列互補的目標基因DNA promoter region結合，徵招RNA polymerase II協助進行轉錄活化。



**Fig 16. RNAa 以及 RNAi 調控細胞內 RNA 表現水平實驗示意圖**

將經由 RNA-seq 以及 ChIP-seq 分析後受 AGO2 正向調控，並且能夠與 AGO2 結合的片段序列設計於 Fluc 的 3' 端；其中包含了 sense 以及 antisense 的片段序列，分別製做兩組重組質體，轉染至細胞後，藉由 Fluc 的訊號強度確認片段序列是否受到 miRNA 辨識並進行 RNAi 調控。



**Fig 17. ChIP-seq 分析之目標基因在細胞質同樣受 RNAi 所調控**

將 TK-RLuc 和不同基因的重組質體 pCIneo-Fluc-sense sequence / pCIneo-Fluc-antisense sequence 各 100 ng 混合均勻後，以 pCDNA3 質體將各組補至 4  $\mu$ g，轉染至 12-well 之 293T 細胞中，以冷光報告基因活性檢測分析，進行三重複試驗，比較彼此 Luciferase 活性的不同；所得之結果經平均後取 $\pm$ 標準差 (n=3)；\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05。

## 第四章 實驗方法

### 4.1 質體構築

#### 4.1.1 引子設計及模板製備

依目標序列設計一對長度約 18-24 個核苷酸的引子對 (Primer pair)，並以含有此序列的適當質體作為模板 (Template)，接著利用聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 放大選殖出核酸片段，作為質體重組時所需之材料。

#### 4.1.2 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

將 2  $\mu\text{g}$  DNA 模板、25  $\mu\text{M}$  引子對各 1.0  $\mu\text{l}$ 、10x Taq buffer 5  $\mu\text{l}$  / 5x GC buffer 10  $\mu\text{l}$ ，10 mM dNTP 1  $\mu\text{l}$ ，Taq / Phusion Plus DNA Polymerase (ThermoFisher) 1  $\mu\text{l}$  依序加入 200  $\mu\text{l}$  微量離心管，並以滅菌二次水添補總體積至 50  $\mu\text{l}$ ，混合均勻後置入儀器反應。

首先於 94°C 加熱 3 分鐘，使模版 DNA 變性；之後循環進行 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C (聚合反應時間依目標片段長度調整，選殖 1kb 的核酸片段，給予 1 分鐘時間聚合) 步驟 25-30 次；最終於 72°C 持續聚合反應 7 分鐘，所得之產物儲於 4°C 備用。

#### 4.1.3 DNA 酵素切截及核酸片段的純化 (Digestion)

以適當酵素依各酵素使用指示切截質體或 PCR 產物，提供帶有適當接合序列的載體 (vector) 及核酸片段 (insert)，經 PCR clean kit (Geneaid) 純化後作為重組質體材料。

#### 4.1.4 目標片段和載體的接合 (Ligation)

將經切截純化出的載體 (vector) 50 ng 和目標片段 (insert) 50 ng 充分混合後，加入 2  $\mu$ l 10x Ligase buffer、1  $\mu$ l Ligase (ThermoFisher)，以二次水添補總體積至 20  $\mu$ l，混合均勻置於室溫反應至隔夜，接合之產物可儲於 4°C 備用。

#### 4.1.5 質體的轉型 (Transformation)

由 -80°C 冰箱取出轉形用勝任細胞 (Competent cell)，置於冰上約 10 分鐘待解凍後取 50  $\mu$ l 於微量離心管，加入接合完成的重組質體 10  $\mu$ l，輕靜置冰上 15 分鐘，接著放入 42°C 加熱板 45 秒，再立即放回冰上；隨後加入 1 ml LB 液態培養液，並以 37°C 培養 1 小時使勝任細胞修復，之後塗布於含適當抗生素的固態 LB agar 培養基，置入 37°C 培養箱 16-18 小時，待菌落生成。

#### 4.1.6 小片段雙股 RNA 質體的構築

根據目標基因的 mRNA 序列設計一段長度約為 18-20 個核苷酸的小片段 RNA 序列。取設計好的序列 (Fw 以及 Rev) 各 6  $\mu$ l (3  $\mu$ g/ $\mu$ l)，補 annealing buffer 至 50  $\mu$ l，混勻後置入聚合酶連鎖反應儀器開始反應。首先於 94°C 加熱 4 分鐘，之後每經過 1 分鐘下降 1°C，至 37°C 停止。

取 PCR 反應產物以適當酵素切割，接入帶有適當接合序列並含有 RNA 聚合酶 III (RNA Polymerase III) 轉錄啟動子的質體載體 (pSUPER)，加入 1  $\mu$ l Bgl/II，於 37°C 孵化 30 分鐘去除沒有成功接入小片段 RNA 序列的載體，最終接合之產物可儲於 4°C 備用。

## 4.2 重組蛋白在人類細胞的表現與分析

### 4.2.1 細胞培養 (Cell culture)

本實驗室選用 HEK-293T 細胞株，以含有 10%胎牛血清 (FBS, HyClone)的 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco)，並添加 2 mM L-glutamine、3.7 g / L Sodium Bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )，於 37°C、二氧化碳濃度 5%的培養箱中培養。間隔約 3-4 天以 Trypsin-EDTA 將細胞從培養盤上切下，取約 20%的細胞進行繼代培養。

### 4.2.2 轉染 (Transfection)

#### Polyethyleneimine (PEI)轉染

前一天在 10 公分盤中 seeding 適量細胞 ( $\sim 5 \times 10^6$ )使隔天細胞約 8 成滿。將 20  $\mu\text{g}$  的質體 DNA 和 60  $\mu\text{l}$  的 PEI 以 1 : 3 比例分別稀釋於 500  $\mu\text{l}$  的 opti-MEM 後，接著再混合成 1000  $\mu\text{l}$  之混合液。在室溫孵化 15 分鐘後均勻加入 10 公分盤中。

#### Lipofectamine 2000 轉染

前一天在六孔盤中 seeding 適量細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$ )使隔天細胞約 8 成滿，按照操作說明將 4  $\mu\text{g}$  的質體和 10  $\mu\text{l}$  的 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher)分別稀釋於 250  $\mu\text{l}$  的 opti-MEM，於室溫靜置 5 分鐘，再將兩者混合。於室溫再次孵化 20 分鐘後均勻加入 6 well 中。

### 4.2.3 細胞蛋白的萃取及處理

轉染適當時間後，倒除細胞培養液，吸除剩餘液體，加入 NET buffer 將細胞溶解，並收入微量離心管，在 4°C 15000 rpm 高速離心，將細胞殘渣沉澱除去，取含有細胞蛋

白的上清液進行各項實驗。

#### 4.2.4 免疫沉澱 (Immunoprecipitation)

轉染 48 小時後小心去除培養基，加入 1 ml Lysis buffer 於冰上孵化 10 分鐘裂解細胞，以 4°C、15000 rpm 高速離心 10 分鐘，將細胞上清液移至新的離心管。取 50 µl 上清液 1:1 加入 2x PBS 作為 Input。900 µl 上清液加入 30 µl Streptavidin beads (Thermofisher)，依需求加入 2 µl RNase A (100 mg / ml, Qiagen) 去除 RNA，在 4°C 轉動混合孵化 2 小時後以 2000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，再以 NET buffer 清洗 beads 2 次，去除大部分液體後加入 30 µl 2x PBS 並以 95°C 加熱 5 分鐘作為 IP 的產物，產物可儲於 -20°C 備用。

#### 4.2.5 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS Poly-acrylamide-gel-electrophoresis, SDS-PAGE)

##### Acrylamide gel 的製備 (Bis-Tris MOPS system)

	10% Separating gel (12 mL)	5% Stacking gel (6 mL)
30% Acrylamide / Bis Solution (29 :1)	4 ml	1 ml
1 M Bis-Tris (3x, pH 6.5)	4 ml	2 ml
H <sub>2</sub> O	4 ml	3 ml
10% APS	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	3 µl
Running buffer = MOPS-SDS running buffer		

將蛋白質樣本 loading 到預先製好的 Acrylamide gel 中，以 150~170V 在 MOPS-SDS running buffer 中進行電泳。完成電泳後可以使用 Coomassie Brilliant Blue 進行蛋白染色，之後再以脫色劑進行脫色，將脫色完的 Acrylamide gel 置於白光上進行觀察，用以確認蛋白表現，也可以將完成電泳的膠體往後進行西方墨點法。

#### 4.2.6 西方墨點法 (Western blot)

蛋白質電泳完成後，將所需要的膠體切下，浸泡在 transfer buffer 中 10-15 分鐘進行 buffer 置換。將 transfer 卡匣按照 (負極/3M paper/protein gel/Nitrocellulose Membrane/3M paper/正極)的順序擺放好，以 0.35A 電流轉漬 1 小時。將轉漬完成的 Nitrocellulose Membrane 在室溫下用 blocking buffer 震盪 1 小時，阻斷非特異性結合位，再依比例加入目標蛋白對應的抗體，在 4°C 震盪隔夜。第 2 天以 TBST 清洗 membrane 5 分鐘 3 次去除非特異性結合的抗體。接著以 1:5000 的比例在 blocking buffer 中加入連結了 HRP 的二級抗體，在室溫震盪 1 小時，再以 TBST 清洗 membrane 5 分鐘 3 次。最後以 TBS 進行最後清洗，之後加入 ECL 在室溫下均勻混合 1 分鐘，ECL 反應完成後，使用 GE LAS-4000 影像擷取系統偵測反應發出的冷光。



### 4.3 自動誘導蛋白表現系統 (Autoinduction of protein expression system)

將欲純化的融合蛋白質體轉型至 Rosetta 之後塗布於含適當抗生素的固態 LB agar 培養基，置入 37°C 培養箱 16-18 小時，待菌落生成。接種隔夜培養之菌珠至 2 ml 不含抗生素 LB 培養液，震盪培養 6-8 hr，取 200  $\mu$ l 菌液至 400 ml 含有 40 mg/ml kanamycin (50 mg/ml, 0.8 ml) 的 ZYP-5052 rich medium (372 ml ZY, 0.4 ml 1M  $MgSO_4$ , 8 ml 50x 5052, 20 ml 20x NPS) 中，於 37°C 震盪培養 16-18 小時。

取隔夜培養之菌液分裝於四管 50 ml 的塑膠離心管中，於 4°C，6000 rpm 離心 10 分鐘，去除培養基，以 NET buffer 重新懸浮菌塊，隨後利用超音波震盪器 (Sonicator) 進行破菌，作用強度為 25 瓦，震盪破菌時間為 1 秒，間隔時間為 1 秒，全部震盪破菌時間為 10 分。經超音波震盪器破菌後，將菌液於 4°C 下，8000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液於 -20°C 儲存備用。

### 4.4 蛋白與蛋白間結合能力之分析 (Pull-down assay)

取 1.5 ml 備妥的 MBP 融合蛋白加入 50  $\mu$ l Amylose beads，在 4°C 下混合 1 小時；接著離心去除上清液，以 1 ml NET buffer 洗滌 beads 2 次；之後加入 50  $\mu$ l 2x PBS 與 beads 混合均勻後，在 95°C 加熱 5 分鐘作為 Input。

取 1.5 ml 備妥的 SBP 融合蛋白加入 30  $\mu$ l Streptavidin resin beads，在 4°C 下混合 1 小時後離心去除上清液，以 1 ml NET buffer 洗滌 beads 2 次。再加入目標蛋白，在 4°C 下混合 1 小時後離心去除上清液，以 1 ml NET buffer 洗滌 beads 2 次；之後加入 30  $\mu$ l 2x PBS 與 beads 混合均勻，在 95°C 加熱 5 分鐘作為 Pull-down 之產物。隨後進行西方墨點法分析，以 GE LAS-4000 影像擷取系統偵測反應發出的冷光。

#### 4.5 冷光報告基因活性檢測 (Luciferase assay)

轉染適當時間後去除細胞培養液，加入適量 NET buffer，晃動細胞培養盤使細胞脫離；接著將細胞萃取液收入微量離心管，在 4°C 以 15000 rpm 高速離心分離出上清液。

於各組取等量之細胞萃取上清液，加入不透明的 96 well plate，備妥冷光測定受質 (Firefly / Renilla assay buffer)，設定冷光分析儀後，即可開始測定各組冷光強度，所得讀值即代表各組細胞萃取液中 Luciferase 的活性，並利用同時轉染於細胞中之 Rluc 質體，測量 Rluc 的活性，藉此計算轉染效率以校正結果之數值。

#### 4.6 定量反轉錄 PCR (RT-qPCR)

依照 RNA extraction kit (Geneaid) 的指示進行 RNA 萃取，從各組取 2 µg RNA 與 2 µl Oligo (dT) (100µM) 均勻混合靜置 5 分鐘等待其反應，加入 1 µl dNTP (10 mM)、5x RT buffer 10 µl、MMLV-RT 5 µl，補 30 µl ddH<sub>2</sub>O 至 50 µl，在 37°C 反應 1 小時進行反轉錄。

取 2 µl 反轉錄產物作為模板，加上 1 µl primer mix (Fw + Rev) (5 µM)，10 µl 2x Luna Universal qPCR Master Mix (NEB) 補 7 µl ddH<sub>2</sub>O 到 20 µl。進行 40 個 denaturation-extension 循環 (95°C 加熱 1 分鐘，使模版 DNA 變形；之後循環進行 95°C 15 秒、60°C 30 秒；最終進行一次 Melting curve 循環)，期間偵測 SYBR channel 訊號。以 GAPDH 的 CT 值作為對照組，以  $2^{-(CT\ Expression - CT\ Control)}$  計算 mRNA 相對水平。

#### 4.7 染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

將 HEK 293T 細胞株培養於 10 公分培養基，生長適當時間後，以 0.95% Formaldehyde 於室溫進行 crosslink 9 分鐘。加入 0.125M Glycine 反應 10 分鐘 (阻斷 Formaldehyde 的作用，避免過度 crosslink)。用預先冰過的 PBS 清洗細胞 3 次後，將細胞以 1 mL PBS (Protease inhibitor, 0.05% TX100)刮下至微量離心管中，2000 rpm、4°C 離心 5 分鐘並去除上清液。

以 200 uL FA Lysis buffer (3 M cells / 100 uL)重新懸浮細胞塊，將細胞核裂解完整。接著進行超音波震盪約 10 分鐘 (30-40%震幅，每一輪 20 秒震盪、30 秒停止)。完成後在 4°C 以 15000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液作為 chromatin solution 進行後續的實驗。

取 150 uL 的 chromatin solution 到 1.5 mL 微量離心管，以 300 uL Dilution buffer 進行稀釋。取 5 uL 稀釋過後的 chromatin solution 作為 Input，儲存於 4°C。將剩下稀釋過後的 chromatin solution 與 antiHA-Agarose-Protein G matrix 於 4°C 均勻混合至隔天。  
[ antiHA-Agarose-Protein G matrix 的製備: 取 15 ul dynal protein G 磁珠至 1.5 ml 微量離心管，以 PBS (0.5% BSA, 0.05% TX100)清洗，去殘液之後以 400 uL PBS (0.5% BSA, 0.05% TX100)重新懸浮。加入 2 ug antiHA-Agarose 抗體，於 4°C 隔夜旋轉混合，最終再以 PBS (0.5% BSA, 0.05% TX100)清洗一次。]

隔夜混合以後，將離心管安裝於磁力架上，確定磁珠抗體完整吸附於管壁上，以傾倒的方式去除殘液。接著以 High salt buffer 清洗磁珠 3 次 (每次 1 ml 緩慢旋轉混合 5 分鐘)，清洗完成後，以 1 ml EB buffer (Qiagen)重新懸浮磁珠進行最後一次清洗，並移至新的管子。

將離心管安裝於磁力架上，用 p1000 微量吸管完全去除殘液，只留下磁珠。加入 100 uL Elution Buffer 均勻混合，置於 65°C 15 分鐘；重新安裝於磁力架後，將上清液小心移至新的微量離心管。同時取出前一天儲存於 4°C 的 Input 加入 95 uL Elution Buffer。

最終將產物進行 Reverse crosslinking 釋放出 DNA 片段序列，加入 4 uL 5 M NaCl 並且加熱至 65°C 4 小時，接著加入 10 ug RNase A (DNase I free), 45°C 2 小時，再加入 10 ug Protease K (Sigma) 55 °C 1 小時。從加熱板上取下 Reverse crosslinking 之產物，等待其冷卻。加入 4 uL 1 M Tris pH 6.5 (PCR 純化管柱只能在低 pH 的條件下與 DNA 結合，pH < 7)，輕拍管柱，再加入 0.5 mL PB buffer (Qiagen kit) 並執行 Qiagen DNA extraction protocol，最終使用 50 uL EB 進行 elute。最終之產物能夠儲存於 -20°C 用以進行後續的 ChIP-qPCR 驗證或是 ChIP-seq 分析。



## 第五章 參考文獻

- Aratani, S., Fujii, R., Oishi, T., Fujita, H., Amano, T., Ohshima, T., Hagiwara, M., Fukamizu, A., & Nakajima, T. (2001). Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, 21(14), 4460-4469. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.14.4460-4469.2001>
- Aratani, S., Oishi, T., Fujita, H., Nakazawa, M., Fujii, R., Imamoto, N., Yoneda, Y., Fukamizu, A., & Nakajima, T. (2006). The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- $\alpha$ 3. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(1), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.161>
- Chu, Y., Simic, R., Warner, M. H., Arndt, K. M., & Prelich, G. (2007). Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *Embo j*, 26(22), 4646-4656. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601887>
- Chu, Y., Yue, X., Younger, S. T., Janowski, B. A., & Corey, D. R. (2010). Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter. *Nucleic Acids Res*, 38(21), 7736-7748. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq648>
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., & Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, 107(4), 489-499. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00566-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00566-9)
- Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131(6), 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.032>
- Fidaleo, M., De Paola, E., & Paronetto, M. P. (2016). The RNA helicase A in malignant transformation. *Oncotarget*, 7(19), 28711-28723. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7377>
- Fu, Q., & Yuan, Y. A. (2013). Structural insights into RISC assembly facilitated by dsRNA-binding domains of human RNA helicase A (DHX9). *Nucleic Acids Res*, 41(5), 3457-3470. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt042>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(1), 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F., & Erard, M. (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem*, 209(2), 541-548. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17318.x>
- Giorgi, C., Cogoni, C., & Catalanotto, C. (2012). From transcription to translation: new insights in the structure and function of Argonaute protein. *Biomol Concepts*, 3(6), 545-559. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0024>

- Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R., & Boris-Lawrie, K. (2006). RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(6), 509-516. <https://doi.org/10.1038/nsmb1092>
- Hu, J., Chen, Z., Xia, D., Wu, J., Xu, H., & Ye, Z. Q. (2012). Promoter-associated small double-stranded RNA interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 to induce transcriptional activation. *Biochem J*, 447(3), 407-416. <https://doi.org/10.1042/bj20120256>
- Jaehning, J. A. (2010). The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim Biophys Acta*, 1799(5-6), 379-388. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.001>
- Janowski, B. A., Younger, S. T., Hardy, D. B., Ram, R., Huffman, K. E., & Corey, D. R. (2007). Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat Chem Biol*, 3(3), 166-173. <https://doi.org/10.1038/nchembio860>
- Kiledjian, M., & Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo j*, 11(7), 2655-2664. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05331.x>
- Kim, B., Jeong, K., & Kim, V. N. (2017). Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates. *Mol Cell*, 66(2), 258-269.e255. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.013>
- Kim, J., Guermah, M., & Roeder, R. G. (2010). The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS. *Cell*, 140(4), 491-503. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.050>
- Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., & Greenblatt, J. F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*, 22(20), 6979-6992. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.20.6979-6992.2002>
- Kwon, S. C., Nguyen, T. A., Choi, Y. G., Jo, M. H., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. S. (2016). Structure of Human DROSHA. *Cell*, 164(1-2), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.019>
- Lee, C. G., Eki, T., Okumura, K., Nogami, M., Soares Vda, C., Murakami, Y., Hanaoka, F., & Hurwitz, J. (1999). The human RNA helicase A (DDX9) gene maps to the prostate cancer susceptibility locus at chromosome band 1q25 and its pseudogene (DDX9P) to 13q22, respectively. *Somat Cell Mol Genet*, 25(1), 33-39. <https://doi.org/10.1023/b:scam.0000007138.44216.3a>
- Li, L. C. (2017). Small RNA-Guided Transcriptional Gene Activation (RNAa) in Mammalian Cells. *Adv Exp Med Biol*, 983, 1-20. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9_1)
- Li, L. C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., Urakami, S., Enokida, H., & Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad*



- Sci U S A*, 103(46), 17337-17342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607015103>
- Liu, H., Lei, C., He, Q., Pan, Z., Xiao, D., & Tao, Y. (2018). Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer*, 17(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0765-5>
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- MacRae, I. J., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 14(10), 934-940. <https://doi.org/10.1038/nsmb1293>
- Marton, H. A., & Desiderio, S. (2008). The Paf1 complex promotes displacement of histones upon rapid induction of transcription by RNA polymerase II. *BMC Mol Biol*, 9, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-4>
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), 607-620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>
- Mueller, C. L., & Jaehning, J. A. (2002). Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol Cell Biol*, 22(7), 1971-1980. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.7.1971-1980.2002>
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., & Montminy, M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*, 90(6), 1107-1112. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80376-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80376-1)
- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., & Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486(7403), 368-374. <https://doi.org/10.1038/nature11211>
- Neilsen, C. T., Goodall, G. J., & Bracken, C. P. (2012). IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet*, 28(11), 544-549. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.005>
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, 161(6), 1374-1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 326(5957), 1275-1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
- Park, J. E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), 201-205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- Place, R. F., Noonan, E. J., Földes-Papp, Z., & Li, L. C. (2010). Defining features and exploring chemical modifications to manipulate RNAa activity. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(5), 518-

526. <https://doi.org/10.2174/138920110791591463>
- Place, R. F., Wang, J., Noonan, E. J., Meyers, R., Manoharan, M., Charisse, K., Duncan, R., Huang, V., Wang, X., & Li, L. C. (2012). Formulation of Small Activating RNA Into Lipidoid Nanoparticles Inhibits Xenograft Prostate Tumor Growth by Inducing p21 Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*, 1(3), e15. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.5>
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621-629. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- Ranji, A., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Musier-Forsyth, K., & Boris-Lawrie, K. (2011). Features of double-stranded RNA-binding domains of RNA helicase A are necessary for selective recognition and translation of complex mRNAs. *J Biol Chem*, 286(7), 5328-5337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176339>
- Rondón, A. G., Gallardo, M., García-Rubio, M., & Aguilera, A. (2004). Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO Rep*, 5(1), 47-53. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400045>
- Schirle, N. T., & MacRae, I. J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 336(6084), 1037-1040. <https://doi.org/10.1126/science.1221551>
- Schlegel, B. P., Starita, L. M., & Parvin, J. D. (2003). Overexpression of a protein fragment of RNA helicase A causes inhibition of endogenous BRCA1 function and defects in ploidy and cytokinesis in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 22(7), 983-991. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206195>
- Schwartz, J. C., Younger, S. T., Nguyen, N. B., Hardy, D. B., Monia, B. P., Corey, D. R., & Janowski, B. A. (2008). Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 15(8), 842-848. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1444>
- Tang, W., You, W., Shi, F., Qi, T., Wang, L., Djouder, Z., Liu, W., & Zeng, X. (2009). RNA helicase A acts as a bridging factor linking nuclear beta-actin with RNA polymerase II. *Biochem J*, 420(3), 421-428. <https://doi.org/10.1042/bj20090402>
- Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J. B., Park, J. E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol Cell*, 53(4), 606-616. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.003>
- Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., & Tomari, Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol*, 18(10), 1153-1158. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2125>
- Turunen, M. P., Lehtola, T., Heinonen, S. E., Assefa, G. S., Korpisalo, P., Girnary, R., Glass, C. K., Väisänen, S., & Ylä-Herttuala, S. (2009). Efficient regulation of VEGF expression by promoter-targeted lentiviral shRNAs based on epigenetic mechanism: a novel example of epigenetherapy. *Circ Res*, 105(6), 604-609. <https://doi.org/10.1161/circresaha.109.200774>



- Wang, X., Wang, J., Huang, V., Place, R. F., & Li, L. C. (2012). Induction of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation. *Biochem J*, 443(3), 821-828. <https://doi.org/10.1042/bj20111491>
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2008). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219), 209-213. <https://doi.org/10.1038/nature07315>
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., & et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature*, 368(6466), 32-38. <https://doi.org/10.1038/368032a0>
- Yue, X., Schwartz, J. C., Chu, Y., Younger, S. T., Gagnon, K. T., Elbashir, S., Janowski, B. A., & Corey, D. R. (2010). Transcriptional regulation by small RNAs at sequences downstream from 3' gene termini. *Nat Chem Biol*, 6(8), 621-629. <https://doi.org/10.1038/nchembio.400>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80620-0)
- Zhang, S., & Grosse, F. (1994). Nuclear DNA helicase II unwinds both DNA and RNA. *Biochemistry*, 33(13), 3906-3912. <https://doi.org/10.1021/bi00179a016>
- Zhang, S., & Grosse, F. (1997). Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Biol Chem*, 272(17), 11487-11494. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11487>
- Zhang, S., Schlott, B., Görlach, M., & Grosse, F. (2004). DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) phosphorylates nuclear DNA helicase II/RNA helicase A and hnRNP proteins in an RNA-dependent manner. *Nucleic Acids Res*, 32(1), 1-10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg933>
- Zhang, Y., Sikes, M. L., Beyer, A. L., & Schneider, D. A. (2009). The Paf1 complex is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2153-2158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812939106>
- Liu, Z., Johnson, S. T., Zhang, Z., & Corey, D. R. (2019). Expression of TNRC6 (GW182) Proteins Is Not Necessary for Gene Silencing by Fully Complementary RNA Duplexes. *Nucleic Acid Ther*, 29(6), 323-334. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0815>
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *Rna*, 16(11), 2043-2050. <https://doi.org/10.1261/rna.2414110>

## 第六章 附錄

### 質體列表

重組質體	載體	目標片段來源	切 位 (5'/3')
pLNHA-RHA_1-264	pLNHA-C1	RHA_1-264	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-RHA_265-1270	pLNHA-C1	RHA_265-1270	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-RHA_265-830	pLNHA-C1	RHA_265-830	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-RHA_265-380	pLNHA-C1	RHA_265-380	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-RHA_381-1270	pLNHA-C1	RHA_381-1270	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pCIneo-V5-SBP-HsAGO2	pCIneo-V5-SBP	HsAGO2	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>
pCIneo-V5-SBP-HsAGO2_1-447	pCIneo-V5-SBP	HsAGO2_1-447	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>
pCIneo-V5-SBP-HsAGO2_448-859	pCIneo-V5-SBP	HsAGO2_448-859	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>
pETM-41P-His-MBP-SBP	pETM-41P-His-MBP	SBP	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
pETM-41P-His-MBP-SBP-AGO2_1-447	pETM-41P-His-MBP	SBP-AGO2_1-447	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
pETM-41P-His-MBP-HA-RHA_265-830	pETM-41P-His-MBP	HA-RHA_265-830	<i>KpnI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-GAL4 DBD-HsAGO2	pLNHA-C1	GAL4 DBD-HsAGO2	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pLNHA-GAL4 DBD-AD-HsAGO2	pLNHA-GAL4 DBD-HsAGO2	RHA_255-380 (AD)	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>

重組質體	載體	目標片段來源	切 位 (5'/3')
pLNHA-NLS-AD-HsAGO2	pLNHA--C1	NLS-AD-HsAGO2	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>
pHFM1-luc2	pUAS-luc2	HFM1 Promoter region (chr1:91387235-91387570)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pCRB1-luc2	pUAS-luc2	CRB1 Promoter region (chr1: 197354684-197354996)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pCPA6-luc2	pUAS-luc2	CPA6 Promoter region (chr8: 67585338-67585658)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pSPOCK3-luc2	pUAS-luc2	SPOCK3 Promoter region (chr4: 166573917-166574237)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pCCDC183-AS1-luc2	pUAS-luc2	CCDC183-AS1 Promoter region (chr9: 136802878-136803215)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pSRD5A3-luc2	pUAS-luc2	SRD5A3 Promoter region (chr4:55328032-55328346)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pYBX1-luc2	pUAS-luc2	YBX1 Promoter region (chr1:42709018-42709341)	<i>KpnI</i> / <i>HindIII</i>
pCIneo-Fluc-SPOCK3(s/as)	pCIneo-Fluc	SPOCK3 Promoter region (s / as) (chr4: 166573917-166574237)	<i>EcoRI</i> / <i>EcoRI</i>
pCIneo-Fluc-SRD5A3(s/as)	pCIneo-Fluc	SRD5A3 Promoter region (s / as) (chr4:55328032-55328346)	<i>EcoRI</i> / <i>EcoRI</i>
pCIneo-Fluc-YBX1(s/as)	pCIneo-Fluc	YBX1 Promoter region (s / as) (chr1:42709018-42709341)	<i>EcoRI</i> / <i>EcoRI</i>

\*註: 下列質體由實驗室所提供

pCDNA3、pCIneo-V5-SBP-MBP、pLNHA-HsAGO2、pP21-luc2、TK-Rluc、pSUPER.puro、  
pSUPER.puro-saP21(-322)

## RT-qPCR 引子列表

基因名稱	序列 (5' → 3')
p21	Fw: GCCCAGTGGACAGCGAGCAG Rev: GCCGGCGTTTGGAGTGGTAGA
GAPDH	Fw: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG Rev: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
SPOCK3	Fw: TGACCTGCTATTGGACCAGTC Rev: AGAATGCCTTGGTACACTGTTC
YBX1	Fw: GGGGACAAGAAGGTCATCGC Rev: CGAAGGTACTTCCTGGGGTTA
SRD5A3	Fw: TGGCTGCACAGCTTACGAAG Rev: TCAGCACAGTTAGGCCAACAA
CCDC183-AS1	Fw: CGGGGCCTGTACCGATCATA Rev: GCTCCCGTTCAGAGTGTCT
CPA6	Fw: GGGCAGACGATCACGACTC Rev: AAAGGCAGGACCAATCCATTC
CRB1	Fw: CAGGTGCCTCTCAAATTCTTGC Rev: ACAGGAACCAATGGTAGTTTCAC
HFM1	Fw: ATGAATTGGACTCTCACATTGGC Rev: ACATGCCTTCTCCGATTTCAG

## 溶液配方列表

名稱	配方
Annealing buffer	100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH7.4)
NET buffer	0.05M Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.1% Triton X-100
Protein sample buffer (2x)	4% SDS, 20% Glycerol, 200 mM DTT, 0.02%, Bromophenol blue, 120 mM Tris-HCl (pH6.8)
MOPS-SDS running buffer (10x)	30 g Tris-base, 144 g Glycine, 10 g SDS in 1L H <sub>2</sub> O
脫色劑	20% methanol, 10% acetic acid in 1L H <sub>2</sub> O
Transfer buffer	1x MOPS-SDS running buffer with 20% methanol
Blocking buffer	5%安佳脫脂奶粉溶 in TBST
ECL	100 mM Tris-HCl (pH8.8), 1.25 mM luminol, 2 mM 4IPBA, 5.3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ZY	10 g N-Z-amine AS, 5 g yeast extract in 1L H <sub>2</sub> O
NPS (20x)	66 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 136 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 142 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1L H <sub>2</sub> O
5052 (50x)	250 g Glycerol, 25 g Glucose, 100 g α-lactose in 1L H <sub>2</sub> O
Firefly Assay Buffer (3x)	100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 15 mM DTT, 0.6 mM Coenzyme A, 0.45 mM ATP, 4.2 mg / mL Luciferin

名稱	配方
Renilla Assay Buffer (3x)	30 mM Na pyrophosphate, 1.425 mM NaCl, 45 mM EDTA, 0.01mM CTZ
RT buffer (5x)	250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT
TBS	20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl
TBST	20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20
FA Lysis buffer	50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 140 mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 0.1% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, Protease inhibitor
Dilution buffer	50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Protease inhibitor
High salt buffer	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl
Elution buffer	1% SDS in EB buffer (Qiagen) (pH 8.0)

## 抗體列表

名稱	廠牌貨號
Anti HA-HRP	Roche 12013819001
Mouse anti V5-Tag	Bio-Rad MCA1360GA
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab	GE Healthcare NA931

