

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

探討人類 D 型肝炎病毒基因體複製之啟動子序列

Determination of the HDV RNA replication promoter sequences

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91 - 2320 - B - 040 - 045

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：許國堂

共同主持人：助理教授

計畫參與人員：碩士研究生：賴宗伯 廖威超 朱慧娟 劉馨儒

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

發表之論文一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學 毒理所

中華民國 92 年 10 月 21 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討人類 D 型肝炎病毒基因體複製之啟動子序列

Determination of the HDV RNA replication promoter sequences

計畫編號：NSC 91 - 2320 - B - 040 - 045

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：許國堂

執行機構及單位名稱：中山醫學大學 毒理所

計畫參與人員：賴宗伯，廖威超，朱慧娟，劉馨儒

一、中文摘要

人類的 D 型肝炎病毒(HDV)具有一個環狀單股的核酸(RNA)做為它的基因體。因此，使用其 RNA 為鑄模來做為合成新基因體之用。所以，D 型肝炎病毒之所以能夠在動物細胞內複製，一定使用到細胞攜帶的核酸聚合酶(RdRP)。曾經有文獻報告指出，核酸聚合酶的 pol III 可能是主要的核酸聚合酶用來複製 HDV，可是 pol II 只能使用 DNA 為鑄模，如何扭轉它的專一性，還未有任何合理的解釋。由於缺乏適合的模式研究被感染的細胞，以及可靠的試管內定性，使得尋找這個 HDV 專一的核酸聚合酶無法有效的進展。D 型肝炎病毒是唯一的會感染人類而且只在染色體外複製的 RNA 病毒，而且 D 型肝炎病毒進入細胞之後的複製和 B 型肝炎病毒無關。我們知道細胞內未知的核酸複製組合可以複製 D 型肝炎病毒，但是其中所含有之成分以及它的運作機制並未清楚地被證明出來。

由先前的研究中得知，在 HDV cDNA 中不論基因股或反基因股都有 promoter 的活性存在，並證實在反基因股中一段 29 個 nt 的位置(相對於 HDV 1.9 的第 999~1028 個 nt)具有 promoter 的活性，但對於基因股的 promoter 活性的探討，則缺乏有利的證據加以證明。

在本實驗中以 GFP (Green Fluorescent Protein) 作觀察，利用含有外來 promoter (CMV promoter) 帶有 HDV cDNA 序列並接有 GFP 基因於 HDV cDNA 之 3' 端之質體 (pKS/HDV-GFP)，轉染 COS 7 細胞株，觀察是否有 GFP 螢光蛋白的表達，藉以了解在有外生性啟動子的情況下，HDV cDNA 是

否能增加誘導 GFP 基因的表現。之後再以内切酶作用將 pKS/ HDV- GFP 質體所攜帶的外生性啟動子 (CMV promoter) 去除，構築成一個沒有外生性啟動子的質體 (pKS/HDV-GFP-CMV (-))，並轉染 COS 7 細胞株，觀察是否有螢光蛋白的表達，用以證明在 HDV cDNA 中確實有內生性的 promoter-like 序列存在。接著以 RT-PCR 的方法來確定 HDV cDNA promoter-like 序列是否有方向性並進而大略的確認 HDV cDNA promoter-like 序列在 HDV cDNA 的相對位置。之後，再將完整的 HDV cDNA 序列接入不含有外生性啟動子的 luciferase reporter 質體中 (pGL-3/ HDV- 1.9)，藉由 luciferase 活性及 RT-PCR 來觀察由在沒有外生性啟動子的不同質體內，HDV cDNA promoter-like 序列是否有相同的活性出現，如此才能在對於 HDV cDNA 上未知的內生性啟動子作更進一步的探討，進而精確的定出 HDV cDNA 上未知的內生性啟動子的所在。

因此本實驗就以尋找 HDV cDNA promoter-like 序列進行研究，利用 GFP 作為 reporter，藉以快速的得知實驗結果，進而證明在 HDV cDNA 基因股中具有 promoter 活性。接著確認 HDV cDNA 中基因股與反基因股中的 promoter-like 序列的位置，發現在 HDV cDNA 反基因股中的 promoter-like 序列與之前的研究所提出的位置大致相同，然而在基因股中的 promoter-like 序列則有新的發現，由實驗得知 HDV cDNA 基因股的 promoter-like 序列坐落於 HDAg ORF 內 (相對於 HDV-1.9 的

第 571~713 nt 與第 431~571 nt 之間)。之後，再以同步定量 PCR (Real-Time PCR) 對基因股的 promoter 活性做定量測試，結果顯示 HDV cDNA 基因股的 promoter 活性較正常基因的表現低許多。本實驗顯示在基因股上發現新的 promoter-like 序列位於 HDAg ORF 內，或許可利用此段 promoter-like 序列相對於 HDV 基因股 RNA 上的序列對 HDV 基因股 RNA 的複製機制提供新的解釋。

關鍵詞：

人類的 D 型肝炎病毒，啟動子序列，病毒複製

Abstract

Human hepatitis delta virus (HDV) has a single-stranded circular RNA genome that replicates by RNA-directed RNA synthesis. The virus encodes only a single protein product, the hepatitis delta antigen (HDAg). The HDAg lacks sequence homology to known RNA polymerases, suggesting that the virus employs a cellular polymerase for HDV replication (Lai, 1995). It has been proposed that replication of HDV is mediated by RNA polymerase II, a cellular DNA-directed RNA polymerase (Modahl et al, 2000). Due to the lack of natural infection for *in vivo* model and a reliable *in vitro* transcription assay system, the hunt for the human cellular RNA-directed RNA polymerase (RdRP) is hampered.

In previously study indicated that HDV cDNA contains endogenous promoters both in genomic and antigenomic strands. It has been demonstrated that the antigenomic HDV cDNA promoter-like sequence was located to a 29-nucleotide region (corresponded to HDV-1.9 nucleotides 999~1028), whereas the promoter activity of the genomic HDV cDNA was unclear.

In this study we attempt to identify the promoter-like sequence of the HDV cDNA both in genomic and antigenomic directions. First, we using GFP as a reporter gene to identify the HDV cDNA genomic promoter

activity. Our results confirm that genomic HDV cDNA have endogenous promoter activity with the observation of GFP. Furthermore, we used RT-PCR to demonstrate the promoter-like sequence in genomic and antigenomic HDV cDNA. Our results indicated that the promoter-like sequence of antigenomic strand was similar with previously study, but we found the novel location of the genomic strand promoter-like sequence that localized to HDAg ORF (corresponded to HDV-1.9 nucleotides 571~713 and 431~571). Finally, we used Real-Time PCR to compare the genomic HDV cDNA promoter activity. In this finding we determined that genomic strand promoter activity were less than normal gene that expressed in cells.

Overall, we have identified both of the genomic and antigenomic HDV cDNA sequence that containing promoter-like sequence, especially the location of novel promoter-like sequence in genomic HDV cDNA. The novel promoter-like sequence may be used for HDV genomic RNA replication mechanism study in the future.

Keywords:

HDV, GFP, replication

二、緣由與目的

研究動機

對於 HDV RNA 複製的起始點及終止點，至今仍是一個不能確定的謎，在近期的報導中指出位於 HDV RNA 的第 1608- 1669 個核酸有類似 promoter 的功能可促進 HDV RNA 的生合成 (Beard et al., 1996)。另外在 HDV cDNA 上的第 1650 個核酸附近則對於基因股或反基因股的 HDV RNA 皆有促進生成的功能 (Macnaughton et al., 1993a; Tai et al., 1993)。由之前的文獻報告中指出，以不帶有外來 promoter 的完整之環狀 HDV cDNA 對細胞進行轉染，可在宿主細胞中偵測到 HDV RNA 的複製，因此猜測 HDV cDNA 序列中應該有其內生性 (endogenous) promoter 的存在，進而將 HDV cDNA 做不同大小片段的刪減，以 CAT (Chloramphenicol

Acetyltransferase) assay 找出在 HDV ORF 中的某些特定區域,對於基因股或反基因股都有 promoter 活性存在。

三、結果與討論

對於 HDV 在細胞內的研究,在現今可分為三種方法對細胞進行轉染來討論,分別為利用 multimer 的 HDV cDNA 加上外生性的 promoter 直接轉染細胞(Kuo et al., 1989; Macnaughton et al., 1993b),也可利用 RNP (RNA and Protein) 的方式 (Bichko et al., 1996; Dingle et al., 1998; Sheu and Lai, 2000)或以 HDV RNA 加上 Cap HDV ORF RNA (Modahl and Lai, 1998)做轉染,借以了解 HDV 的複製及 HDV 的生合成等等作用機制。針對以 multimer HDV cDNA 加外生性 promoter 轉染細胞的方式,此方式存在有許多的限制,例如不能完整的模仿 HDV 在細胞內是以 RNA 的模式存在,並且以 multimer HDV cDNA 生成 multimer HDV RNA 也與真正的 HDV 生理機制有所出入。

由之前的文獻報導中指出,將單一個 HDV cDNA 在不外加外生性 promoter 的情況下,將其轉染細胞,也可觀察到 HDV 的複製(Macnaughton et al., 1993a; Tai et al., 1993),由此可推測在 HDV cDNA 的序列中可能含有內生性的 promoter 存在,並對於在 HDV cDNA 中的內生性 promoter-like 序列,以 CAT 活性分析加以探討指出,分別在 genomic 與 antigenomic 兩股都有存在 promoter 的活性。

本實驗是以尋找 HDV cDNA 中的內生性 promoter-like 序列為出發點來進行研究,由於經由 CAT 活性分析的速度較慢且比較繁雜。所以本實驗中使用 GFP 作為 reporter gene,可直接於螢光顯微鏡下作觀察,快速的能得到結果進行研究。

而為了針對 HDV cDNA 中的 promoter-like 序列進行研究,於是利用一個含有外

生性 promoter (CMV promoter) 之 HDV cDNA monomer 質體,在此質體 HDV cDNA 的 3' 端接上 GFP 基因合成一個新的質體 (pKS/HDV-GFP (圖一)),另外,再將 pKS/HDV-GFP 質體以內切酵素作用將質體上的外生性 promoter (CMV promoter) 去除,合成另一個質體 (pKS/HDV-GFP-CMV (-) (圖二)),本篇實驗中就藉由這兩個質體對細胞進行轉染來作 HDV cDNA promoter-like 序列作探討。

利用 pEGFP, pKS/HDV-GFP 與 pKS/HDV-GFP-CMV (-) 三種質體轉染 COS 7 細胞,觀察綠色螢光蛋白的表達中發現,綠色螢光蛋白在三種質體中的表達量有明顯的變化,若以 pEGFP 轉染後所呈現的綠色螢光蛋白作為控制組,可比較出 pKS/HDV-GFP 與 pKS/HDV-GFP-CMV (-) 的表達量明顯的較控制組少,其中又以 pKS/HDV-GFP-CMV (-) 的表達量最低,由此可得知在 HDV cDNA 之基因股中確實含有 promoter-like 序列存在,並且若在 HDV cDNA 前含有外來的 promoter 則會加強 GFP reporter 的活性 (圖三)。此項結果與先前的研究(Macnaughton et al., 1993a; Tai et al., 1993) 所提出在 HDV cDNA 基因股中含有 promoter 活性是可相互符合的結果。此外,也證實以 GFP 作為 reporter 基因對於 HDV cDNA promoter-like 序列的研究,提供了一種更加快速的方法,不需經過較繁雜的實驗,直接觀察就可了解實驗的結果。

對於尋找一個基因的 promoter 的方法上,多數的研究中都會採用 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 的方法來進行實驗,藉以得知 promoter 的序列,但此方法對於尋找 HDV cDNA promoter 比較不適用,因為 HDV 是一個以知的基因體,其序列已被研究的相當透徹,所以可利用 RT-PCR 的方法大略的找出 promoter-like 序列在 HDV cDNA 的相對位置,在從已知的

序列中進行 deletion 來進行探討即可，而本研究中即採用 RT-PCR 的方式來作探討，在先前的研究指出(Macnaughton et al., 1993a; Tai et al., 1993)，HDV cDNA 中含有基因股及反基因股之 promoter 活性，而在本實驗中，我們以對基因股及反基因股 HDV RNA 特異性之 primer 作 RT-PCR 來加以證明(圖四)，顯示在基因股與反基因股之 HDV cDNA 中的確都可幫助 RNA 生成，此代表在此正反兩股的 HDV cDNA 具有 promoter 的活性存在。

對於 HDV cDNA promoter 的活性在先前的研究中對反基因股的 promoter-like 序列有較精確的了解，並提出主要的 promoter 活性位在反基因股的 HDAg ORF 前端 29 個 nt 的位置(相對於 HDV-1.9 序列的第 999 ~ 1028 nt) 並且若再加上此段序列上游的 224 個 nt (相對於 HDV-1.9 序列的第 1029~1252 nt) 則會使其 promoter 活性加強；但對於 HDV cDNA 基因股 promoter 序列的研究則仍不清楚，於是我們以漸進式 RT-PCR 的方法來確認 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列的相對位置，並對反基因股的 promoter-like 序列加以重新驗證。由實驗結果顯示，在 HDV cDNA 反基因股中的 promoter 活性可能是由第 947~1151 nt 之間而來，由此驗證了先前研究的正確性(圖五)。而在 HDV cDNA 基因股的結果中則顯示(圖六)，在 HDV cDNA 基因股上至少含有兩個以上的 promoter-like 序列，而其中有兩個序列是位於 HDAg ORF 內，一個位於第 571~713 nt 之間，此段序列的 promoter 活性較強；另一個 promoter-like 序列則位於第 431~571 nt 中，此段序列的 promoter 活性則相對的較弱。相較於先前的文獻(Macnaughton et al., 1993a; Tai et al., 1993) 中所指出的，HDV cDNA 之基因股上雖有 promoter 的活性但活性非常小，並且可能坐落於 HDAg ORF 之外，位於接近 HDAg

ORF 的位置。而他們的結果相較於本篇實驗中所得到的結果有很大的出入。此不同的實驗結果，推測可能是因為在文獻中主要是針對是否有 HDV cDNA promoter 能夠啟動 HDAg RNA 的複製進而活化轉錄生成 HDAg 做討論，因而沒有使用全長的 HDV cDNA 與 HDAg ORF 序列進行研究，而採用 HDAg ORF 之外的 non coding region 來進行研究，所以沒有對 HDAg ORF cDNA 作 promoter 活性的測試，造成忽略了 HDAg ORF 序列的對於 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列的重要性，所以造成差異，也由此項實驗結果，使得在對於 HDV cDNA 基因股上的 promoter-like 序列有新的發現。

為了了解 HDV cDNA 基因股上之 promoter-like 序列在細胞內的活性大小，於是我們利用同步定量 PCR (Real-Time PCR) 的方式來精確的計算在細胞內 HDV-GFP RNA 的相對量，藉以預測 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列的活性，由實驗計算的結果(圖九)可看出，HDV-GFP RNA 的量相對於控制組 GAPDH RNA 的量，兩者之間有很明顯的差異，HDV-GFP RNA 比 GAPDH RNA 少了 $2^{13.8}$ 倍(表一)。由此可推測，HDV cDNA 基因股上的 promoter-like 活性相較於細胞內正常基因的表現是低了許多，因此可推測 HDV cDNA 基因股 promoter 的活性不高，並不會影響在細胞內的正常基因表現，造成正常基因在短期間內對此 promoter 所轉錄之 RNA 或進而轉譯之蛋白引發生理反應。

針對我們所找出的 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列是否正確，於是我們將 HDV-1.9 的 cDNA 序列轉殖到 pGL-3 殖體內(圖七)以 luciferase 作為 reporter 基因，藉以觀察本篇中對於 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列的各個實驗是否有重複性。由實驗的結果得知，以 pGL-3/HDV-1.9 轉染細胞並無法測得有 luciferase 活性的變化，然而卻可經由 HDV

cDNA 基因股 promoter-like 序列轉錄生成 RNA (圖八)，我們推測可能因為在此質體中所用的 HDV cDNA 為全長的 HDV cDNA，因此的 promoter 經由內生性所產生的 RNA 中，具有約 1.2-1.3 kb 長的 non-coding sequence 而使 luciferase 生成無法達到可偵測的標準，這個由 HDV 序列所轉錄生成的 RNA 序列，可能影響接再前後方之 luciferase 的轉譯效力 (translation efficiency)，未來可能經由刪除內生性 promoter 與 luciferase 之間的不相關的序列來加強 luciferase 的活性表達。

HDV 在自然的狀況下，是經由 HDV RNA 以雙滾圈 (double rolling circle) 的方式進行複製，DNA 並不會在此機制中出現，因此 HDV cDNA 的 promoter 活性是不會出現於正常的 HDV 生命週期內扮演任何的角色，然而 HDV cDNA 的序列與結構，和 HDV RNA 環狀且摺疊形成桿狀的構造非常類似，或許可以經由 HDV cDNA 上的 promoter-like 序列對應到 HDV RNA 之中，借以找出 HDV RNA 真正的內生性 promoter 位置。

在本實驗結果中發現，在 HDV cDNA 基因股上存在有 promoter-like 序列，其活性足夠使得某些基因活化形成蛋白，又因此段 HDV cDNA 基因股相對於 HDV RNA 序列中形成桿狀結構的區域之內，更增加了此段序列可用於研究 HDV RNA 內生性 promoter 的重要性，又從近期的文獻中指出，HDV 基因股 RNA 的複製可能是受 RNA polymerase II，但在 HDV 反基因股 RNA 則可能有其他的機制進行調控 (Macnaughton et al., 2002; Modahl et al., 2000)。所以進而可推測此段位於 HDV cDNA 基因股 promoter-like 序列相對於 HDV 基因股 RNA 上的序列，是否與 RNA polymerase II 在 HDV 基因股 RNA 的複製作用有關。

本篇實驗中，只有粗略的找出在 HDV cDNA 基因股的 HDAg ORF 序列中在特定的片

段 (第 571~713 nt 與第 431~571 nt) 內具有 promoter 的活性存在 (圖十)，但並沒有完整的定出此 promoter-like 序列的最小序列限制位置所在，需要在進一步的對 HDV cDNA 序列做刪減 (deletion)，以增強對 reporter 基因的表達，找出在 HDV cDNA 基因股上的內生性 promoter，再由所找出的序列來推測 HDV RNA 的內生性 promoter，進而解開對於 HDV RNA 複製的謎。

參考文獻

1. Beard, M.R., MacNaughton, T.B. and Gowans, E.J. (1996) Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter. *J Virol*, **70**, 4986-4995.
2. Bichko, V.V., Khudyakov, Y.E. and Taylor, J.M. (1996) A novel form of hepatitis delta antigen. *J Virol*, **70**, 3248-3251.
3. Dingle, K., Bichko, V., Zuccola, H., Hogle, J. and Taylor, J. (1998) Initiation of hepatitis delta virus genome replication. *J Virol*, **72**, 4783-4788.
4. Kuo, M.Y., Chao, M. and Taylor, J. (1989) Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol*, **63**, 1945-1950.
5. Lai, M.M. (1995) The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem*, **64**, 259-286.
6. Macnaughton, T.B., Beard, M.R., Chao, M., Gowans, E.J. and Lai, M.M. (1993a) Endogenous promoters can direct the transcription of hepatitis delta virus RNA from a recircularized cDNA template. *Virology*, **196**, 629-636.
7. Macnaughton, T.B., Wang, Y.J. and Lai,

- M.M. (1993b) Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *J Virol*, **67**, 2228-2234.
8. Macnaughton, T.B., Shi, S.T., Modahl, L.E. and Lai, M.M. (2002) Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol*, **76**, 3920-3927.
 9. Modahl, L.E. and Lai, M.M. (1998) Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *J Virol*, **72**, 5449-5456.
 10. Modahl, L. E, Macnaughton, T. B., Zhu, N., Johnson, D. L., and Lai, M. M. C. (2000) RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Mol Cell Biol* 20: 6030-9.
 11. Sheu, G.-T and Lai, M..M..C. (2000). Recombinant hepatitis delta antigen from *E. coli* promotes hepatitis delta virus RNA replication only from the genomic strand but not the antigenomic strand. *Virology*, 278, 578-586.
 12. Tai, F.P., Chen, P.J., Chang, F.J. and Chen, D.S. (1993) Hepatitis delta virus cDNA monomer can be used in transfection experiments to initiate viral RNA replication. *Virology*, **197**, 137-142.

Figure 1

圖一、pKS/HDV-GFP 質體

pKS/HDV-GFP 質體之示意圖。將 HDV-1.9 接於 *SnaB I* 及 *EcoR V* 的切位間，GFP 接於 *EcoR V* 切位間。

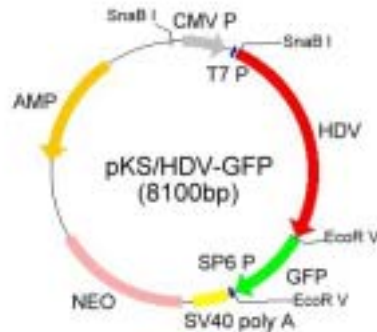


Figure 2

圖二、pKS/HDV-GFP-CMV (-) 質體

pKS/HDV-GFP-CMV (-) 質體示意圖。將 HDV-1.9 接於 *SnaB I* 及 *EcoR V* 的切位間，GFP 接於 *EcoR V* 切位間。

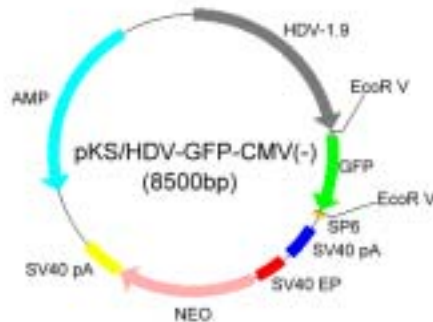
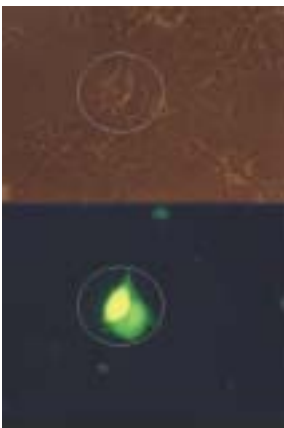


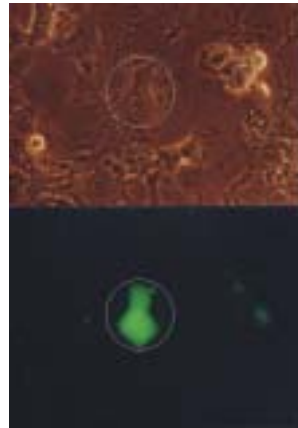
Figure 3

圖三、比較各個不同的質體，轉染 COS 7 細胞株後，綠色螢光蛋白的表現。(a) 代表 pEGFP，(b) 代表 pKS/HDV-GFP，(c) 代表 pKS/HDV-GFP-CMV (-)。

(a) pEGFP



(b) pKS/HDV-GFP



(c) pKS/HDV-GFP-CMV (-)

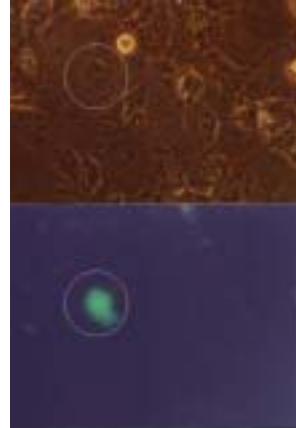


Figure 4

圖四、確認 pKS/HDV-GFP-CMV (-) 質體轉染 COS 7 細胞株後，所表現 HDV-GFP RNA 的方向性。

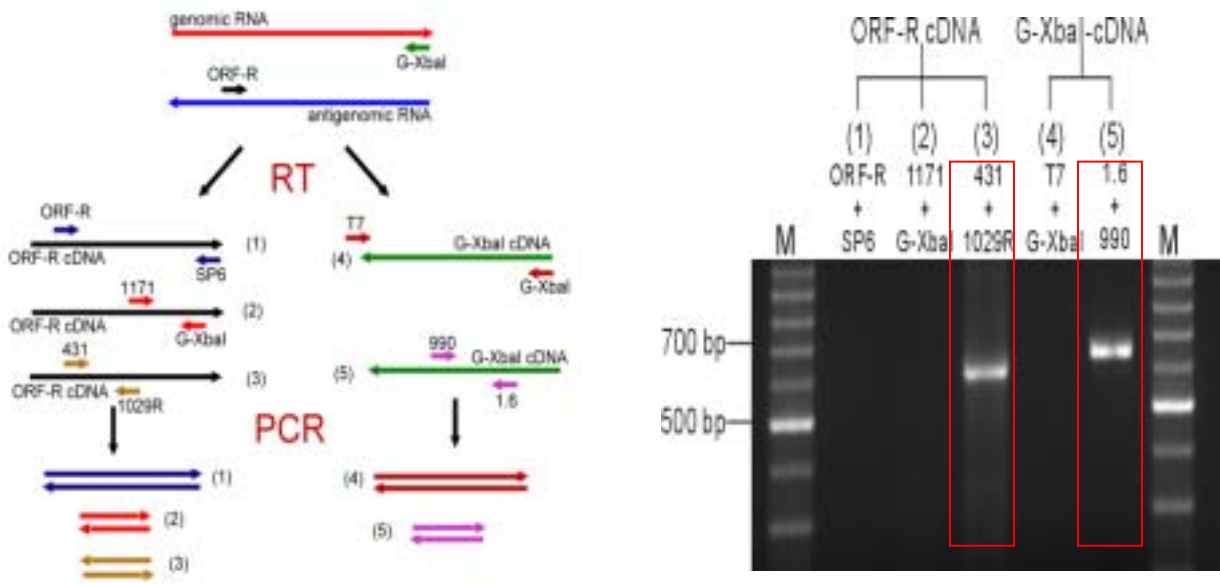


Figure 5

圖五、使用 HDV-GFP 序列上各個不同位置 primer 作 RT-PCR，進而確認反基因股上之 promoter-like 區域之大概位置。

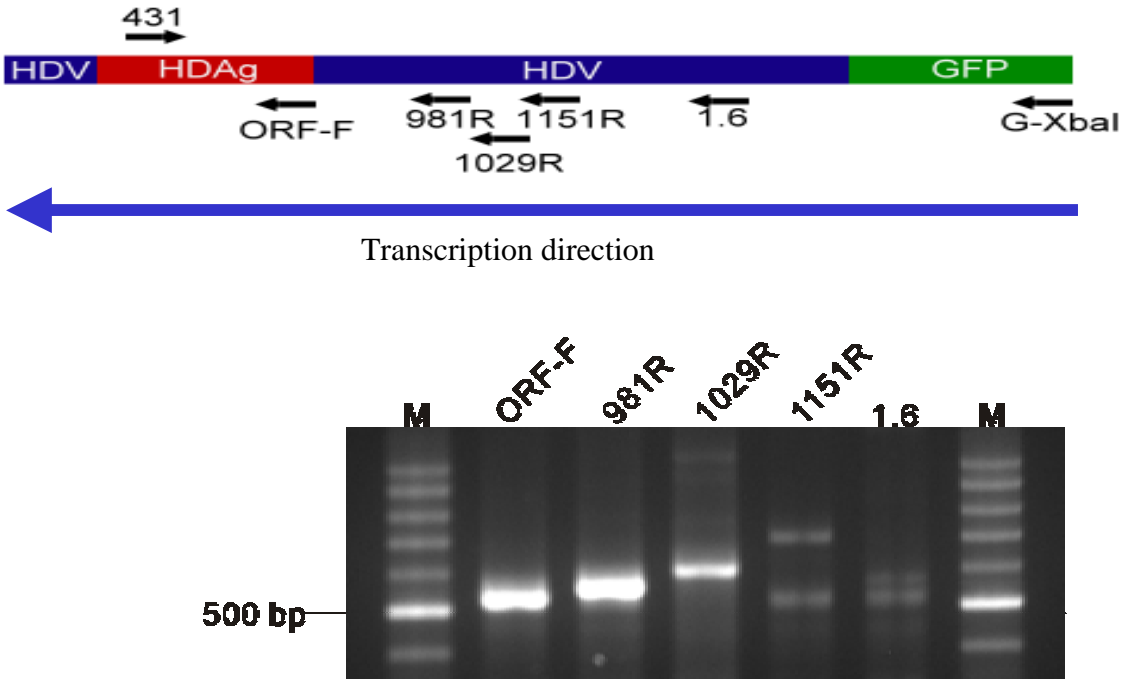


Figure 6

圖六、嘗試使用 HDV-GFP 序列上各個不同位置的 primer 作 RT-PCR，進而確認此基因股上 promoter-like 區域之大概位置。

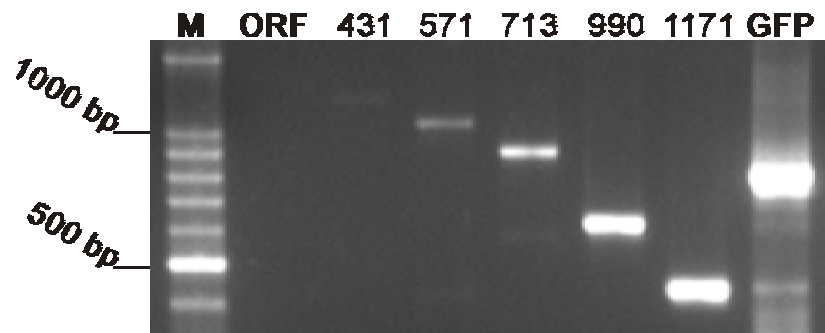
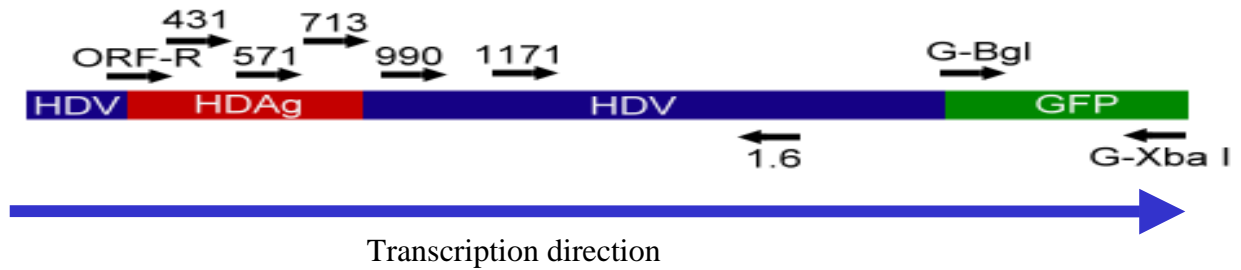


Figure 7

圖七、pGL3/HDV-1.9 質體

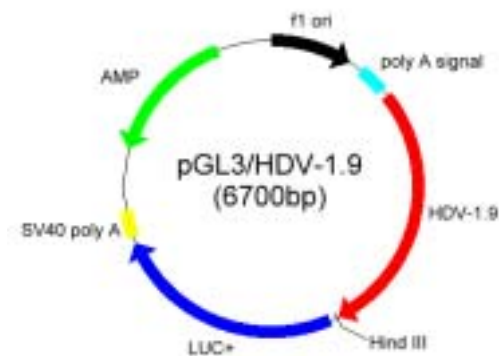


Figure 8

圖十一、以 pGL-3/HDV-1.9 轉染細胞，觀察 HDV cDNA promoter-like 序列之再現性。

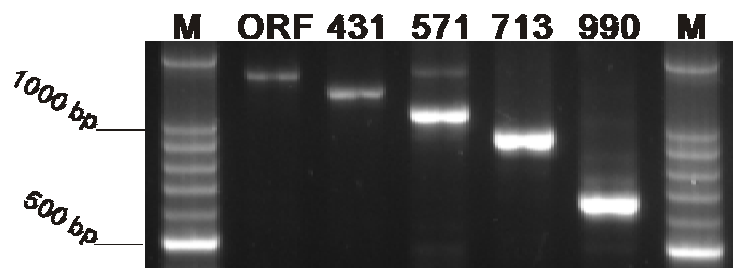
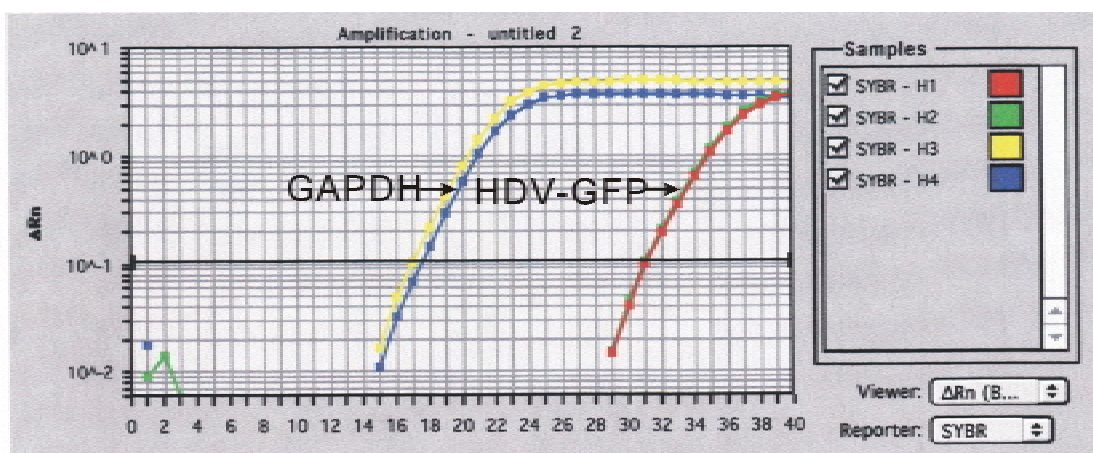


Figure 9

圖十、以同步定量 PCR (Real-Time PCR) 測定 HDV-GFP RNA 與 GAPDH RNA 在 COS 7 細胞內之相對量。



表一、經 Real-Time PCR 測定 HDV-GFP RNA 與 GAPDH RNA 在 COS 7 細胞內相對量之數據計算。

Primer	AVG Ct	S.D.	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$
GAPDH	17.27	0.34		
HDV-GFP	31.07	0.05	13.8	$2^{-13.8}$

AVG Ct : 每一樣本作 2 重複，取其 Threshold Cycle (Ct) 平均值。

S.D. : 標準偏差值。

ΔCt : HDV-GFP Ct – GAPDH Ct。

$2^{-\Delta Ct}$: HDV-GFP 與 GAPDH 之相差比率。

Figure 10

圖十、總結 HDV cDNA promoter-like 序列相對 HDV RNA genome 之位置圖

