ساخت وکتور ریپورتر القایی لوسیفراز برای ردیابی فعالیت ویروس HTLV-1

مجتبی فتاحی عبدی زاده: دانشجوی دکتری ویروس شناسی بخش ویروس شناسی، دانشگاه جندی شاپور علوم پزشکی اهواز و بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. mojtabafattahi@gmail.com

***منوچهر مکوندی:** استاد ویروس شناسی، مرکز بیماری های عفونی گرمسیری، بخش ویروس شناسی، دانشگاه جندی شاپور علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران (*نویسنده مسئول). manoochehrmakvandi29@hotmail.com

علیرضا سمر باف زاده: دانشیار ویروس شناسی، بخش ویروس شناسی، دانشگاه جندی شاپور علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران. alirezasamarbaf78@hotmail.com

مریم لطیف نیا: رزیدنت داخلی، بیمارستان حضرت رسول اکرم، تهران، ایران. maryamlatifnia@yahoo.com

کیهان آزادمنش: دانشیار بیوتکنولوژی بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. k.azadmanesh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ویروس HTLV-1 (Human T_cell lymphotropic virus type) با حدود ۲۰ میلیون نفر آلوده در جهان یک مشکل بهداشت جهانی است که در مناطقی مثل ژاپن و خراسان ایران اندمیک است. این ویروس عامل بیماری پیشرونده لوسمی سلول های T بزرگسالان (ATL) می‌باشد که دارویی تائید شده موثر بر علیه آن تاکنون وجود ندارد. به دلیل خصوصیات غیر سیتولیتیکی و انتقال سلول به سلول این ویروس، مطالعات دارویی در کشت سلولی بر روی این ویروس با روش های معمول در آزمایشگاه (In vitro) کم بوده و منحصر به چند رده سلولی آلوده به آن می‌باشد. بنابراین ساخت وکتور ریپورتر برای ارزیابی عفونت ویروس HTLV1 در کشت سلولی به جهت مطالعات دارویی ضروری به نظر می رسد. ریپورتر های ساخته شده برای رتروویروس ها معمولاً بر اساس ترانس اکتیویشن ناحیه LTR می باشد. ناحیه LTR در ژنوم ویروس شامل پروموترویروس است که در تکثیرو نسخه برداری آن، تحت تاثیر پروتئین ویروسی Tax نقش دارد.

روش کار: منطقه پروموتری LTR ویروس با استفاده از آنزیم محدود کننده از پلاسمید pUCLTR-Lacz بریده و در وکتور بدون پروموتر pGL4.17 که حامل ژن ریپورتر لوسیفراز است در بالادست ژن لوسیفرازساب کلون شد. ابتدا کلونینگ با colony PCR، هضم آنزیمی وتعیین توالی تایید شد. سپس سلول ۲۹۳T باوکتور نوترکیب ترانسفکت شد وبیان القایی لوسیفراز مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: وکتور نوترکیب تولید شده درسلول ۲۹۳T پس از کوترانسفکت با وکتور بیانیTax باعث بیان قابل ملاحظه ی لوسیفراز تا ۵۰ برابر درسلول‌های مورد آزمایش نسبت به کنترل شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به قابلیت بالای وکتور نوترکیب تولید شده، می تواند درمطالعات بعدی درساخت رده سلولی نشانگر برای ویروس HTLV-1، به جهت مطالعات پایه ای و دارویی به کار رود.

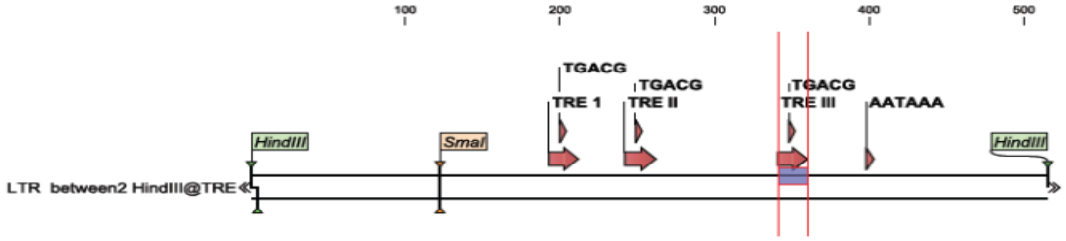
کلیدواژه‌ها: لوسیفراز، وکتور ریپورتر، HTLV-1.

مقدمه

ویروس لنفوتروپیک سلول‌های T انسانی تیپ ۱ (HTLV-1) اولین رتروویروس انسانی است که در اوایل سال ۱۹۸۰ کشف شد (۱). این ویروس در مناطقی ازجهان مثل ژاپن، حوزه دریای کارائیب، افریقا و خراسان ایران اندمیک است (۲). در حال حاضر ۲۰ میلیون نفرازجمعیت دنیا به این ویروس آلوده‌اند که حدود ۵-۳ درصد آن ها به سوی بیماری‌های مختلف از جمله دو بیماری عمده میلوپاتی وابسته به HTLV-1 / پاراپارزی اسپاستیک تروپیکال (HAM/TSP) و لوسمی/لنفوم سلول‌های T بزرگسالان (ATLL) سوق پیدا می‌کنند (۳). بیماری ATLL یک بیماری پیشرونده، با متوسط طول عمر کمتر از۶ ماه درنوع حاد می باشد که به ۴ نوع حاد، مزمن، smoldering و لنفوما تقسیم بندی می‌شود (۴). تاکنون شیمی درمانی روتین در مورد دیگر لوسمی‌ها، بر علیه این بیماری موثر نبوده است و مطالعات دارویی کمی با توجه به خصوصیات ویروس بر روی آن صورت گرفته است (۵).

ویروس HTLV-1 یک ویروس وابسته به سلول است و انتقال آن معمولاً از طریق انتقال لنفوسیت‌ها صورت می‌گیرد. این ویروس غیر سیتولیتیکی است که با روش‌های معمول ویروس شناسی در کشت سلولی براحتی قابل بررسی نیست و معمولاً از روش‌های ملکولی و سنجش پرووایرال و یا سنجش کمی آنتی ژن ویروس مانندP19 اندازه گیری

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]



تصویر ۱- ۳ عنصر ژنی در ناحیه HTLV-1LTR پاسخ دهنده به پروتئین Tax (TREs)

می‌شود. ازطرفی اندازه گیری آنتی ژن‌های ویروسی به وسیله ELISA جهت بررسی تیتر ویروسی و مونیتورینگ پیشرفت ویروس گران می باشد. اندازه‌گیری ژنوم ویروسی نیز قابلیت تمایز ویریون آلوده کننده ازغیرآن را ندارد (۶و ۷). روش‌های دیگری همچون Cell Viability assay، RT assay، دیدن ویروس با میکروسکپ الکترونی، هیبریداسیون و روش‌های مختلف بر پایه PCR موجود است (۸).

ریپورترها ابزار با ارزشی هستند که در مطالعات بیان ژن، تکثیر، انتقال، ادغام و موارد بسیاری دیگر که در علم بیولوژی ملکولی و پزشکی کاربرد وسیع دارند. از جمله کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT)، بتا گالاکتوزیداز (β gal) و GFP (پروتئین گرفته شده از نوعی ماهی با خاصیت فلورسانس) که با منطقه LTR HIV جفت شده‌اند (۱۲-۹). اما این روش‌ها نیازمند اندازه گیری محصول تجمع یافته در محیط کشت (CAT وفیکس سلول (β gal) می‌باشد. در این میان GFP علی رغم سادگی، حساسیت پایینی نسبت به استفاده از لوسیفراز به عنوان ژن گزارشگر دارد. به طوری که میزان نسبتاً بالای بیانGFP برای فلورسانس واضح نیاز است (حداقل $۱۰^{۶}$ ملکول در هر سلول). تکنیک های ذکر شده جهت توسعه رده‌های سلولی مختلف برای ویروس ها ی ویژه، به خصوص HIV به کار برده شده است (۱۲).

با توجه به مزایای حساسیت بالا، دامنه دینامیکی زیاد و عدم فعالیت داخلی لوسیفرازی در اغلب سلول‌های یوکاریوتی، استفاده از لوسیفراز در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته است (۱۳).

منطقه تکرار انتهایی طولانی ویروس(LTR) در دو انتهای پرووویروس قرار گرفته است. معمولاً ً LTR– ´۵ به عنوان پروموتر ویروس برای تکثیر و نسخه برداری ژن های ویروس می باشد و شامل بر ۳ منطقه U_3, R, U_5 است. در منطقه U_3، در بین دو ناحیه غنی از GC سه عنصر ژنی حفظ شده تکراری ۲۱ بازی که به نام (TREs) یا عناصر ژنی پاسخ دهنده به Tax نامیده می‌شوند، وجود دارد (۱۴) که ساختاری شبیه به CRE (Cyclic AMP Response Element) دارند. این ۳ ناحیه مسئول بیشترین رونویسی از پروویروس HTLV-1 تحت کنترل Tax هستند (۱۵) (تصویر شماره ۱).

هدف از این تحقیق ساخت وکتور ریپورتر لوسیفرازی برای ارزیابی عفونت ویروس HTLV1 در کشت سلولی به جهت مطالعات دارویی در آینده می‌باشد. نتایج به دست آمده حاکی از موفقیت در ساخت این وکتور و قابلیت کاربرد آن برای ساخت یک رده سلول نشانگر می باشد.

روش کار

HTLV1 – LTR: منطقه پروموتری ویروس HTLV-1،LTR می‌باشد که در مطالعات قبلی، LTR ویروس HTLV1 از یک بیمار ناقل ویروس، تکثیر و در وکتور pUC LTR- LacZ کلون شده بود (۱۶).

قطعهLTR از وکتور ذکر شده با استفاده از آنزیمHind III (فرمنتاس) بریده و در جایگاه MCS وکتور ریپورتر لوسیفراز PGL4.17 (Promega.USA) در بالا دست ژن لوسیفراز ساب کلون شد. بدین ترتیب که قطعه حدود 515 bp LTR از وکتور pUC LTR- LacZ بریده و روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز شد (تصویر شماره ۲). سپس قطعه مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت High Pure PCR (Qiagen) Product تخلیص شد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

تهیه سلول Competent: باکتری E.coli سویه $DH_5\alpha$ در طول شب (overnight) در محیط LB مایع (Luria Bertani) کشت داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری تازه رشد کرده به ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتری LB مایع انتقال داده شد و پس از رسیدن OD به حدود ۰/۳۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار و طبق پروتکل (Sambrook&Russell) باکتری مستعد تهیه شد.

Ligation: وکتور بدون پروموتر PGL4.17 به همراه قطعه تخلیص شده LTR با استفاده از آنزیم T_4 لیگاز (TAClone)،(Fermentas و با نسبت مولی ۱ به ۵ تحت آزمایش ligation در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به صورت overnight قرار گرفت.

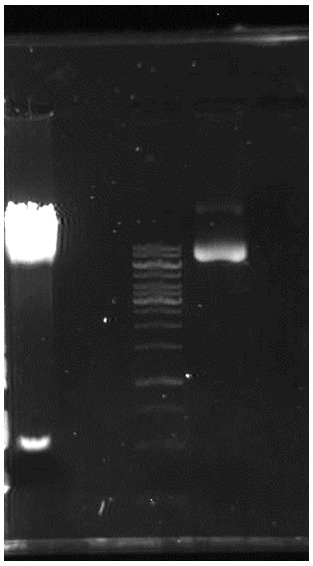
ترانسفورماسیون: باکتری $DH_5\alpha$ مستعد شده، با محصول ligation، طبق پروتکل ترانسفورم شد و باکتری پس از یک ساعت رشد در محیط LB مایع در ۳۷ درجه سانتی گراد به روی پلیت LB آگار حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر پاساژ داده شد. صحت کار ترانسفورماسیون و نیز باکتری های مستعد شده با استفاده از پلاسمید pTZ57R مورد بررسی قرار گرفت.

Colony PCR: از آنجایی که احتمال چسبیدن خود به خود وکتور (backbone self ligattion) و ورود آن به باکتری، قابلیت رشد را به باکتری در حضور آمپی سیلین می دهد، غربالگری باکتری‌های رشد کرده با استفاده از پرایمر یونیورسال F: CTAGCAAAATAGGCTGTCCCC RV3 و پرایمر R: TAGGTGGAAGCGTTTGGC PGL4-LTR-Rev و با روش Touchdown PCR انجام گرفت. دمای Annealing سیکل اول ۶۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰ ثانیه با ۰/۵ درجه سانتی گراد کاهش در هر سیکل برای ۱۰ سیکل در نظر گرفته شد. تعداد سیکل‌ها ۲۰ سیکل مشخص شد. قطعه LTR در کلنی هایی که محصول PCR آن‌ها حدود ۱۷۰۰bp بود، تایید شد. PCR دوم با استفاده از پرایمر RV3 به عنوان پرایمر فوروارد و پرایمر R: (LTR-Rev) ACTAAGCTTGAACGCGCTCAACCGGCGTGGAT به عنوان پرایمر ریورس با پروتکل قبلی انجام شد با این تفاوت که دمای Annealing سیکل اول ۶۳ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد.

تکثیر باکتری های ترانسفورم شده و استخراج پلاسمید کلنی هایی که در محصول Colony PCR، حاوی قطعه داخل شده LTR بودند در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین به مدت ۱۶-۱۲ ساعت کشت داده شده و سپس با استفاده از کیت(Qiagen) miniprep طبق دستورالعمل کیت، استخراج وکتور ریپورتر نوترکیب PGL4LTR-Luc، صورت گرفت.

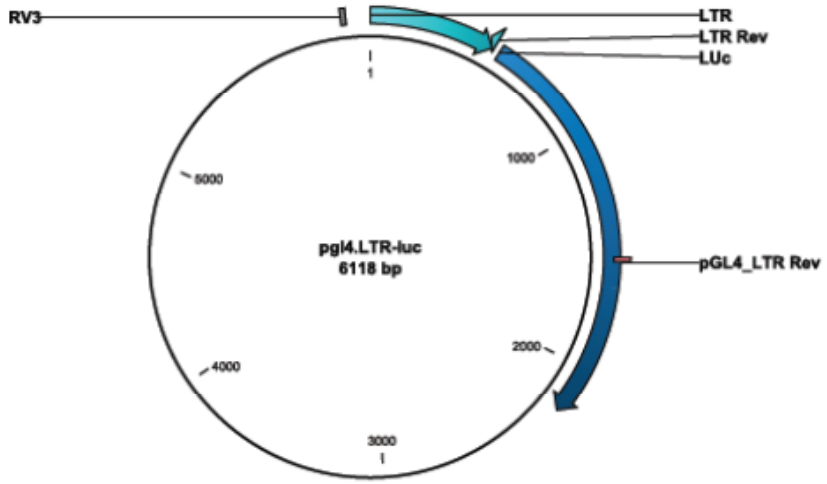
ترانسفکشن: سلول 293T، تهیه شده از بانک سلول انستیتو پاستور ایران، در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۲ L گلوتامین میلی مول، پنی سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی متر، استرپتومایسین 100 میکروگرم در هر میلی متر، درشرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ Co_2 کشت داده شد.

شب قبل از ترانسفکشن ۸×۱۰^۴ سلول در پلیت ۲۴ چاهکی (SPL) کاشته شد و روز بعد، ۳ ساعت قبل از ترانسفکشن، محیط آن با محیط کشت تازه



تصویر ۲- سمت چپ قطعه LTR بریده شده با آنزیم Hind III از وکتور pUCLTR-LacZ درروی ژل کمی بالاتراز باند bp ۵۰۰ مارکر لامبدا ۱ کیلوبایت (باند دوم از پایین) دیده می شود. سمت راست وکتور بریده نشده دیده می شود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]



تصویر ۳- نقشه وکتور نوترکیب PGL4-LTR-Luc. کلونینگ HTLV-1LTR در بالادست ژن ریپورتر لوسیفراز در وکتورpGL4.17 به همراه پرایمر ها دیده می شود.

جایگزین شد و سپس سلول‌ها با استفاده از کیت polyfect (Qiagen) و ۰/۴ میکروگرم وکتور نوترکیب به تنهایی وهمراه با وکتور بیانی پروتئین Tax (pCDNA3.1^{+}Tax) (۱۶) ترانسفکت شدند. به عنوان کنترل آزمایش، سلول‌ها با وکتور بدون پروموتر PGL4.17 (به عنوان کنترل منفی) به تنهایی وهمراه با وکتور بیانی پروتئینTax (pCDNA3.1^{+}Tax) ترانسفکت شدند. پس از ۴۸ ساعت بیان لوسیفراز با استفاده از کیت OneGlo (Promega) و بر اساس دستورالعمل کیت با دستگاه لومینومتر Synergy4 (BioTeK.USA) بررسی شد. به عنوان کنترل مثبت از Quantilum (Promega) تجاری استفاده شد. شرایط ترانسفکشن با استفاده از وکتور pEGFP-N1 (Clontech) نرمالایز شد.

یافته‌ها

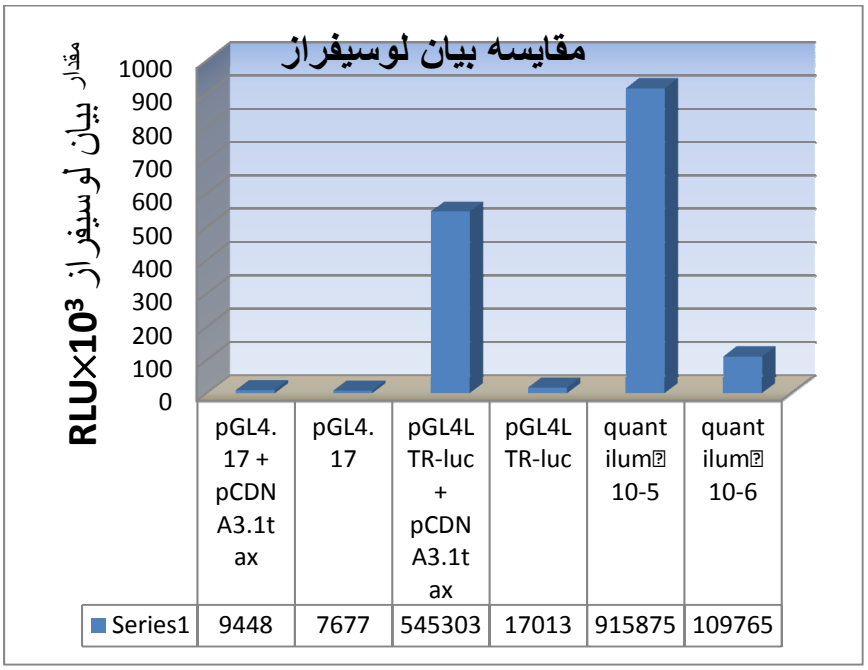
ارزیابی کلونینگ: با توجه به این که احتمال چسبیدن خود به خود وکتوربدون وارد شدن قطعه LTR وجود دارد، و ورود آن به باکتری، قابلیت رشد را به باکتری در حضور آمپی سیلین می‌دهد، پس از ترانسفورماسیون، ۸۰ کلنی از کلنی‌های رشد کرده روی محیطLB آگار حاوی آمپی‌سیلین، مورد آزمایش Colony PCR قرار گرفتند که ۳۰ کلنی حاوی قطعه LTR وارد شده به وکتور PGL4.17 بودند. از طرفی نظر به اینکه هر دو سر ´۳، ´۵ LTR با یک آنزیم (Hind III) بریده شده بود احتمال قرار گیری LTR به طور معکوس وجود داشت. برای بررسی درست بودن جهت قرار گیری LTR، از پرایمرسومی که در داخل قطعه LTR طراحی شده بود به عنوان پرایمر ریورس استفاده شد و از پرایمر یونیورسال RV3 به عنوان پرایمر فوروارد استفاده شد. از ۳۰ کلنی حاوی قطعه LTR، فقط ۱۶ کلنی،حامل قطعه LTR بودند که در جهت صحیح کلون شده بود (تصویر شماره ۳).

این کلنی‌ها با روش هضم دو آنزیمی، Double Digestion (SmaI/XbaI) نیز مورد تایید قرار گرفتند. از بین کلنی های انتخاب شده ۲ کلنی تعیین توالی شد و تراسه آن Blast شده و حضور قطعه HTLV-LTR حاوی سه عنصر پاسخ دهنده به Tax (TREs) تایید شد.

بیان لوسیفراز: میزان بالای بیان لوسیفراز در کوترانسفکشن (co-transfection) سلول ۲۹۳T با وکتور ریپورتر نوترکیب ونیز با وکتور بیانی Tax دیده شد. سلول ۲۹۳T رده سلولی از جنین کلیه انسان است که پذیرا بودن (Premissive) آن برای ویروس HTLV1 که در گزارش های قبلی نشان داده شده بود، علت انتخاب این سلول بود و امکان استفاده آن در مطالعات آینده لحاظ شد.

در آزمایش‌های مشابه سلول های ۲۹۳T با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]



نمودار ۱- در این نمودار نشان داده شده است که میزان بیان لوسیفراز در سلول های ۲۹۳ ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب PGL4-LTR-Luc در مقایسه با وکتور pGL4.17 در حضور وکتور بیانی pCDNA3.1+ Tax بیشتر از ۵۰ برابر بوده است. نتایج، حاصل میانگین آزمایش ها در ۳ سری و در 3 روز متفاوت می باشد. از Quantilum در رقت های ۶-۱۰ و ۵-۱۰ به عنوان کنترل مثبت لوسیفراز استفاده شد.

وکتور نوترکیب و بدون پلاسمید بیانی Tax ترانسفکت (transiant transfection) شد. همچنین سلول با وکتور PGL4.17 باو بدون وکتور بیانی Tax، ترانسفکت شدند (به عنوان کنترل منفی). نتایج حاکی از بیان بیشتر از ۵۰ برابر لوسیفراز در سلول هایی که همزمان با PGL4-LTR-Luc و نیز pCDNA3.1+Tax ترانسفکت شده بودند نسبت به کنترل‌های منفی بود (نمودار شماره ۱).

بحث و نتیجه گیری

ابزار محدودی برای بررسی ویروس HTLV-1 درکشت سلولی به جهت خصوصیات غیر سیتولیتیکی و وابسته به سلول بودن این ویروس برخلاف ویروس HIV فراهم است. علاوه برگرانی بعضی روش های موجود، از دیگر معایب آن ها عدم امکان مونیتورینگ آلوده کنندگی ویروس، که شرط لازم و حیاتی برای مطالعات مختلف بنیادی و کلینیکی از جمله بررسی میزان موتاسیون، مراحل مختلف چرخه تکثیر ویروس و آنالیز مقاومت دارویی است، می‌باشد.

از این جهت ساخت یک سیستم بیولوژیکی برای این ویروس ضروری به نظر می رسد. ژن های ریپورتر متعددی از جمله (Luc،GFP ،CAT) وجود دارد که در سیستم‌های بیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند. در این مطالعه، با توجه به حساسیت بالای لوسیفراز، وکتوری بر مبنای ترانس اکتیویشن HTLV-1LTR و بیان ریپورتر لوسیفرازساخته شد و بیان القایی لوسیفراز در سلول۲۹۳ توسط وکتور بیانی Tax، بیشتر از ۵۰ برابر نسبت به کنترل منفی دیده شد.

در مطالعه ی که آزادمنش و همکارانش بااستفاده از وکتور ریپورتر بتا گالاکتوزیداز داشتند، بیان القایی در برابر وکتور بیانی Tax، ۱۰ برابر نسبت به کنترل بیشتر بود (۱۷). درمطالعه حاضر این اختلاف بسیار بیشتر بود و اعتقاد ما بر این است که دلیل این تفاوت، استفاده آن ها از وکتور ریپورتر بتا گالاکتوزیداز می باشد که حساسیت پاین تری نسبت به لوسیفراز دارد.

از طرفی با توجه به این که پروموتر ویروس می تواند تحت تاثیر مسیر های سیگنالینگ سلولی با توجه به تشابه (همان طور که قبلا اشاره شد تشابه TRE با Cyclic AMP Response Element یا همان CRE) آن قرار گیرد، امکان بیان زمینه ی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

لوسیفراز بدون القا توسط پروتئین Tax وجود دارد. بیان زمینه ی در این مطالعه بسیار کمتر نسبت به مطالعه قبلی بود و تفاوت بیان تست نسبت به بیان زمینه ی تا ۳۰ برابر دیده شد و بر خلاف مطالعه قبلی بیان زمینه‌ی قابل اغماض بود. علاوه بر این، اگر چه مزیت روش آن ها به روش حاضر، امکان بررسی کیفی در آن روش بود ولی لزوم فیکساسیون ورنگ آمیزی از معایب روش آن هانسبت به این مطالعه است. در این مطالعه سنجش فقط با استفاده از لیز سلولی همچنین با تعداد سلول کمتر براحتی قابل انجام است.

نتایج به دست آمده در این مطالعه هم راستا با مطالعات Yoshida، و همکارانش بود. وی در کنارمطالعه بر روی ساخت یک رده سلولی برای HIV، با استفاده از همان استراتژی سیستمی براساس HTLV-1LTR و با استفاده از رده سلولیH9 ایجاد نمود و بیان القایی لوسیفراز را تا بیشتر از ۴۰ برابر مشاهده نمود. البته ازیک روش قدیمی برای انتخاب سلول ریپورتر با یک وکتور جداگانه جهت پایدار کردن سلول استفاده کرد. بر خلاف آن در این مطالعه از نسل چهارم وکتور استفاده شد که حامل مارکر بوده و نیاز به مراحل فوق نداشت.

بنابراین وکتور نوترکیب ساخته شده می تواند در ساخت یک رده سلولی نشانگر در آینده ، برای مطالعات پایه ی از جمله مطالعات کشف دارو با توجه به نبود داروی موثر برای بیماری های ناشی از این ویروس و یا بررسی مراحل ورود و تکثیر ویروس به کار رود.

تقدیر و تشکر

این طرح به صورت مشترک در بخش ویروس شناسی دانشگاه جندی شاپور علوم پزشکی اهواز و نیز بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور تهران انجام گرفت ونویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند تا ازمرکز بیماری های عفونی گرمسیری دانشگاه جندی شاپور علوم پزشکی اهواز (قسمتی از طرح مصوب ۱۲۹۰/د/۸/۲۰پ مورخ ۱۳۸۹/۴/۲۸) و نیز انستیتو پاستور تهران به خاطر تامین بودجه این طرح قدر دانی نمایند.

منابع

1. Cooper SA, van der Loeff MS, Taylor GP. The neurology of HTLV-1 infection. Pract Neurol. 2009 Feb; 9(1):16-26.

2. Balestrieri E, Ascolani A, Igarashi Y, Oki T, Mastino A, Balzarini J, et al. Inhibition of cell-to-cell transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 in vitro by carbohydrate-binding agents. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug; 52(8):2771-9.

3. Tsukasaki K, Tanosaki S, DeVos S, Hofmann WK, Wachsman W, Gombart AF, et al. Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia/lymphoma by using oligonucleotide microarrays. Int J Cancer. 2004 May 10; 109(6):875-81.

4. Balestrieri E, Matteucci C, Ascolani A, Piperno A, Romeo R, Romeo G, et al. Effect of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleoside on human T-cell leukemia virus type 1 infection in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jan; 52(1):54-64.

5. Ishikawa T. Current status of therapeutic approaches to adult T-cell leukemia. Int J Hematol. 2003 Nov; 78(4):304-11.

6. Yoshida A, Piroozmand A, Sakurai A, Fujita M, Uchiyama T, Kimura T, et al. Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. Microbes Infect. 2005 May; 7(5-6):820-4.

7. Nagao T, Yoshida A, Sakurai A, Piroozmand A, Jere A, Fujita M, et al. Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene. Int J Mol Med. 2004 Dec; 14(6):1073-6.

8. Yarchoan R, Broder S. Progress in the development of antiviral therapy for HTLV-III-associated diseases. Important Adv Oncol. 1987:293-311.

9. Merzouki A, Patel P, Cassol S, Ennaji M, Tailor P, Turcotte FR, et al. HIV-1 gp120/160 expressing cells upregulate HIV-1 LTR directed gene expression in a cell

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

line transfected with HIV-1 LTR-reporter gene constructs. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1995 May; 41(3):445-52.

10. Gervaix A, West D, Leoni LM, Richman DD, Wong-Staal F, Corbeil J. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 29; 94(9):4653-8.

11. Kimpton J, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. J Virol. 1992 Apr; 66(4):2232-9.

12. Rizzuto RB, Piazzo M, Murgia P, Welsh M, Hall SB, Chimeric JC. Green fluorscent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. Currbiol. 1995; 5635-642.

13. Spenlehauer C, Gordon CA, Trkola A, Moore JP. A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1. Virology. 2001 Feb 15; 280(2): 292-300.

14. Connor LM, Marriott SJ. Sequences flanking the cAMP responsive core of the HTLV-I tax response elements influence CREB protease sensitivity. Virology. 2000 May 10; 270(2):328-36.

15. Kitado H, Chen IS, Shah NP, Cann AJ, Shimotohno K, Fan H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. Science. 1987 Feb 20; 235(4791):901-4.

16. Azadmanesh K, Roohvand F, Arashkia AS, Kazanji M. Evaluation of stimulatory effects of HTLV-I Tax protein on CREB and NFkB related signaling pathways using two newly designed beta galactosidase based reporter plasmids. Yakhteh Medical Journal. 2005; 6(24):218-20.

17. Saffar SKA, Golmohammadi T, Golkar M, Amminian M, Mirshahabi H, Rafatpanah H. Production of recombinant Human T Lymphotropic Virus type 1 Tax protein in Rosetta (DE3) bacterial host.Journal of Paramedical Sciences. 2010; 1(4):35-42.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

Construction of an inducible luciferase reporter vector for detection of HTLV-1 virus activity

Mojtaba Fatahi Abdizadeh, PhD. Virology Department, Ahvaz Jondishapor University of Medical Sciences, Ahvaz and Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. mojtabafattahi@gmail.com
***Manoochehr Makvandy,** PhD. Tropical Medicine Research Center, Virology Department Ahvaz Jondishapor University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (*Corresponding author). manoochehrmakvandi29@yahoo.com
Alireza Samarbafzadeh, PhD. Virology Department, Ahvaz Jondishapor University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. alirezasamarbaf78@hotmail.com.
Maryam Latifnia, MD. Rasuol akram hospital, Tehran, Iran. maryamlatifnia@yahoo.com.
Keyhan Azadmanesh, MD PhD. Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. k.azadmanesh@gmail.com

Abstract

Background: HTLV-1 (Human T_cell lymphotropic virus type), with about 20 million individuals infected worldwide, is a global health problem and is endemic in certain area such as Japan and Khorasan province of Iran.
HTLV-1 is the causative agent of progressive diseases, Adult T cell Leukemia (ATL), and HTLV-I Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) which have no yet approved effective treatment. Due to non cytolytic characteristic of this virus and the cell associated properties, there is no routine producer for drug study in vitro and its confined to some HTLV infected cell lines. Therefore construction of a reporter vector is necessary to evaluate HTLV-1 infectivity in cell culture for drug studies. Designed reporters for retroviruses are usually based on LTR transactivatin. LTR region of HTLV-1 contains virus promoter that plays the most important role in replication and transcription by Tax transactivation effect.
Methods: LTR region was digested from pUCLTR-Lacz by HindIII and subcloned into MSC region of a promoterless reporter vector, pGL4.17, upstream to luciferase gene. Colonies were screened by Colony PCR, then selected colonies were confirmed by RE digestion and sequencing. HEK 293T cell line was transfected by recombinant vector and inducibility expressing of luciferase was evaluated.
Results: Recombinant vector has expressing levels more than 50 folds compared to control when co-transfected with Tax expressing vector into HEK293T cells.
Conclusions: According to high functionality of produced recombinant vector, it seems a good applicable tool to make an indicator cell line in subsequent basic and drug studies.

Keywords: Reporter vector, HTLV-1, Luciferase.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]