

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1391، دوره چهارم، شماره سیزدهم، صفحه 6-1

تولید و تخلیص پروتئین Tax و ویروس HTLV-1 از طریق تکنولوژی DNA نو ترکیب و ایمونوفینیتی کروماتوگرافی

محمد رضا ذوالفقاری¹، محمد خوشرو²، عبدالرضا وارسته³، محمدرضا عباس زادگان⁴، مزده صفری⁵

- 1- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
- 2- دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قم، دانشکده پزشکی، قم، ایران
- 3- استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، موسسه بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- 4- دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، موسسه بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- 5- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران

نویسنده مسؤول: محمد خوشرو. دانشگاه علوم پزشکی قم، دانشکده پزشکی، قم، ایران. Mohammad.khoshroo@yahoo.com

دریافت: 91/4/11 پذیرش: 91/6/28

چکیده

زمینه و هدف: عفونت سلولهای T انسان با ویروس HTLV-1 (*Human T Lymphotropic Virus-1*) باعث نامیرا شدن این سلولها و بروز لوسمی سلول T بالغین (Adult T Cell Leukemia) می شود. ترانسفورمیشن سلولهای T، در مراحل اولیه توسط پروتئین Tax و ویروس HTLV-1 صورت می گیرد. استان خراسان و بخصوص شهر مشهد یک منطقه اندمیک با شیوع حدود 5 درصد برای این ویروس می باشد. از پروتئین Tax در تهیه کیت های تشخیصی جهت غربالگری و نیز برای شناسایی آنتی بادی ضد Tax در سرم افراد آلوده می توان استفاده نمود. بنابراین هدف در این پروژه تهیه پروتئین Tax توسط تکنولوژی نو ترکیب بوده است.

روش بررسی: بعد از ترانسفورمیشن *E. coli* با پلاسمید حاوی ژن Tax برای اطمینان از ترانسفورمیشن واکنش PCR انجام شد. به منظور بیان پروتئین tax در باکتری باکتریهای ترانسفرم شده بر روی محیط کشت LB کشت داده شد و سپس پروتئین تولید شده با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. جهت خالص سازی پروتئین از ایمونوفینیتی کروماتوگرافی و جهت بررسی خلوص از رنگ آمیزی نیترا نقره و دات بلات استفاده شد.

یافته ها: نتیجه واکنش PCR که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tax صورت گرفته بود دلالت بر ترانسفرم شدن باکتری ها داشت. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی با نیترا نقره و دات بلات نشانگر بیان پروتئین Tax در باکتری و تخلیص آن توسط افینیتی کروماتوگرافی بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهند گرچه تولید پروتئین Tax بوسیله این روش صورت گرفته اما میزان پروتئین تولید شده کم بوده است.

واژه های کلیدی: ویروس HTLV-1، پروتئین Tax، DNA نو ترکیب، ایمونوفینیتی کروماتوگرافی.

تولید و تخلیص پروتئین Tax ویروس HTLV-1 از ...

مقدمه

آلوده به ویروس و تیتراژ کمی آنتی بادی ضد Tax ارتباط دارد (10).

هم اکنون تشخیص آلودگی HTLV-1 در مراکز انتقال خون کشور و به خصوص به صورت روتین در شهر مشهد توسط آزمون الایزا و تایید آن با روش وسترن بلات انجام می شود. خرید این کیتها که از خارج وارد می شوند سالیانه هزینه زیادی به کشور تحمیل می کند، از این رو تولید پروتئین Tax برای تهیه کیتهای سرولوژیک تشخیص ویروس HTLV-1 ضروری می باشد. هدف در این پروژه تولید و تخلیص پروتئین بوده است. روشی که در این پروژه بکار گرفته شد نسبت به سایر روشها از کارایی کمتری برخوردار بوده است.

روش بررسی

ترانسفورمیشن *E.coli* با پلاسمید حاوی ژن tax ویروس HTLV-1: پس از مستعد کردن باکتری *E.coli* بوسیله کلرید کلسیم 30 mM این سلول ها با روش زیر ترانسفرم شدند. ابتدا 1 μL پلاسمید Expression vector pEF حاوی ژن tax (11) به 50 μL سلول مستعد اضافه شده و مخلوط گردید. پس از 2 ساعت انکوباسیون در 4 درجه، به مدت 90 ثانیه در 42 درجه به آن شوک گرمایی وارد شد. بوسیله محیط کشت LB آگار حاوی پنی سیلین با غلظت 100mg/ml باکتری های ترانسفرم شده جدا شدند.

واکنش PCR برای تایید وجود پلاسمید حاوی ژن tax در داخل باکتریهای ترانسفرم شده: برای حصول اطمینان از وجود پلاسمید حاوی ژن tax در *E.coli* ترانسفرم شده از PCR با پرایمرهای اختصاصی (Forward, GGA TAC CCA GTCTAC GTG TTT G; Reverse, CGC AAC ATT GGTGAG GAA GGC; GenBank accession no. Lo 3562) استفاده شد (11). پس از جدا سازی پلاسمید از باکتری با روش قلیایی مخلوط PCR حاوی 10 پیکومولار از هر پرایمر، 200 میکرومولار از هر dNTP، 50 میلی مولار KCl، 10 میلی مولار تریس (pH: 8.3)، 1/5 میلی مولار MgCl₂ و 1 واحد از آنزیم ترموس اکوآتیکوس (Taq، سیناژن) تهیه شد.

این مخلوط واکنش در دستگاه Thermal (perkin-Elmer) Cycler با پارامترهای 95 درجه سانتی گراد 5 دقیقه، سپس 30 سیکل 95 درجه سانتی گراد 1 دقیقه، 58 درجه سانتی گراد 1 دقیقه، 72 درجه سانتی گراد 1 دقیقه و سپس 5 دقیقه

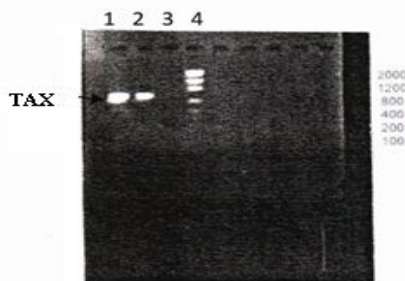
ویروس لوسمی سلول T انسانی نوع یک یا HTLV-1 اولین ویروس سرطان زای شناخته شده انسانی است. این ویروس عامل نوعی سرطان خون بنام لوسمی سلول T بالغین (ATL) (1-2) و چندین بیماری دیگر شامل پاراپلازما اسپاستیک میلوپاتیک، پلی میوزیت و یووئیت می باشد. مناطق اندمیک ویروس جزایر کارائیب (3) و ژاپن بوده و در ایران استان خراسان و بخصوص شهر مشهد از سال 1370 به عنوان یک منطقه اندمیک با شیوع 5% به دنیا گزارش شده است (3-5). پروویروس HTLV-1 ساختاری مشابه با سایر رتروویروسها دارد. یعنی دارای یک تکرار انتهایی بلند یا Long Terminal Repeat (LTR) در دو انتهای ژنوم و توالی های gag و env و pol است. یکی از ویژگی های ژنوم HTLV-1 وجود ناحیه موسوم به PX می باشد که بین ژن env و 3'LTR واقع شده است. این ناحیه حاوی چندین ژن کمکی شامل tax, rex, p12, p21, p13 می باشد. در بین این ژنها، ژن tax نقش مرکزی را در رونویسی از ژن همانند سازی ویروس و تکثیر سلولهای آلوده به ویروس دارد. پروتئین Tax رونویسی ژنهای ویروسی را از ناحیه LTR 5' و از طریق واکنش با پروتئین اتصال به عنصر پاسخگو به AMP حلقوی افزایش می دهد. Tax همچنین با فاکتورهای سلولی واکنش داده و مسیر های سلولی مثل AP-1 و NFκB را فعال می کند (9-6). بعنوان مثال فعال شدن NFκB باعث القای رونویسی از سایتوکین های مختلف و گیرنده آنها و نیز القای ژنهای آنتی آپتوتیک مثل bcl-xL می شود. ثابت شده است فعال شدن NFκB برای ایجاد تومر توسط ویروس کاملاً ضروری است. Tax همچنین با عملکردهای MAD1 P53, P16 عملکردهای TGFβ انتقال علامت TGFβ را مهار می کند و مهار رشد بوسیله این سایتوکین می رهند (10).

پاسخ ایمنی و بخصوص پاسخ ایمنی سلولی نقش مهمی در کنترل رشد سلول آلوده به ویروس HTLV-1 ایفا می کند (10). پاسخ CTL بر ضد ویروس مورد مطالعه فراوانی قرار گرفته است و مشخص شده است پروتئین Tax آنتی ژن غالب است که توسط سلول های کشنده شناسایی می شود. همچنین یافته ها نشان داده اند که شروع ATL با تکثیر بالای سلول

برای تخلیص، محلول حاوی پروتئین Tax که با روش ترسیب توسط سولفات آمونیوم تهیه شده بود از ستون عبور داده شد. با تغییر pH، پروتئین Tax از آنتی بادی های متصل به ژل جدا گردید. سپس pH محلولهای خارج شده خنثی گردید. اندازه گیری پروتئین توتال با روش برادفورد انجام شد. برای بررسی خلوص از SDS-PAGE و رنگ آمیزی نیترا نقره و دات بلات استفاده شد. به جای تست الایزا از دات بلات استفاده شد.

یافته ها

در این پروژه پس از مستعد کردن کردن باکتری *E. coli* بوسیله کلرید کلسیم 30mM این سلول ها با پلاسمید حاوی ژن tax ترانسفرم شدند. برای اطمینان از اینکه پلاسمید درون باکتری قرار گرفته است، پس از رشد *E. coli* مورد نظر در محیط کشت LB، پلاسمید با روش قلیایی جدا شد. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی، ژن tax تکثیر داده شد. در شکل 1 باند 522 بازی مربوط به tax می باشد. بعنوان کنترل مثبت از سلول آلوده به HTLV-1 (رده سلولی MT2) استفاده شد که در ستون 2 مشاهده می شود. ستون 3 کنترل منفی می باشد که فاقد DNA هدف است.



شکل 1. الکتروفورز محصول PCR : ستون 1. محصول PCR پلاسمید حاوی ژن tax، ستون 2. محصول PCR نمونه DNA جدا شده از رده سلولی MT2، ستون 3. محصول PCR فاقد DNA هدف، ستون 4- استاندارد وزن مولکولی.

پس از تخلیص پروتئین Tax با روش ایمونوافینیتهی کروماتوگرافی خلوص آن توسط SDS-PAGE، رنگ آمیزی نیترا نقره (شکل 2) و دات بلات (شکل 3) بررسی شد.

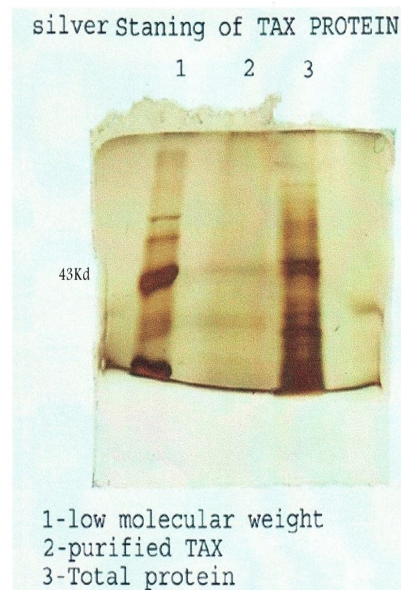
در 72 درجه سانتی گراد قرار داده شد. فرآورده PCR در ژل آگارز 1/5% الکتروفورز شد و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و سپس بوسیله دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و عکس برداری گردید.

بیان و تخلیص پروتئین Tax: برای بیان پروتئین Tax، باکتری در دو ارلن یک لیتری حاوی محیط کشت LB و 2 میلی لیتر پنی سیلین با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر در 37 درجه سانتی گراد به مدت 12 ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت 150 rpm کشت داده شد (12). برای ترسیب پروتئین Tax توسط سولفات آمونیوم، پس از سانتریفوژ محیط کشت LB در 4 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه با سرعت 4000 rpm و سپس حل کردن رسوب در بافر تخلیص (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 2ME 10 mM, pH:8)، سوسپانسیون حاوی باکتری با روش سونیکات (12 مرتبه و هر مرتبه 10 ثانیه با 35 ثانیه زمان استراحت) متلاشی شد. سپس محلول حاصل از سونیکات به لوله از پیش سرد شده اولترا سانتریفوژ انتقال یافت و با سرعت 100000g در 4 درجه به مدت 40 دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی به لوله فالكون 50 میلی لیتر انتقال یافت و به آن سولفات آمونیوم اضافه شد تا محلول سولفات آمونیوم 1 مولار تهیه شود. پس از قرار گیری محلول سولفات آمونیوم بر روی روتاتور در یک حالت افقی به مدت 2 ساعت در یخچال، محلول درون لوله فالكون به مدت 45 دقیقه با دور 100000g در 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. سپس رسوب در 4 میلی لیتر بافر تخلیص حل شده و در مقابل 4 لیتر بافر تخلیص دیالیز گردید. برای خالص سازی پروتئین Tax از روش ایمونوافینیتهی کروماتوگرافی استفاده شد. در این روش سه گرم ژل سفارز 6B در 20 میلی لیتر 0/1HCl مولار حل شده و 15 دقیقه بر روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. پس از شستشوی ژل با 0/1HCl مولار، محلول حاوی آنتی بادی ضد Tax به آن اضافه شده و 4 ساعت بر روی روتاتور قرار گرفت. در مرحله بعد و پس سانتریفوژ به مدت 4 دقیقه با دور 500g و جدا کردن مایع رویی، 15 میلی لیتر گلاسیسین 0/2 به آن اضافه گردید و 2 ساعت در دمای محیط بر روی روتاتور قرارداده شد. در نهایت ژل با بافر استات و تریس شستشو داده شد. آنتی بادی ضد Tax از سرم بیماران مبتلا به HTLV-1 که با الایزا و سپس وسترن بلات در سازمان انتقال خون مشهد تایید شده بود با روش ترسیب توسط روش سولفات آمونیوم تهیه گردید.

در دات بلات، واکنشگری مشاهده شده مربوط به پروتئین Tax می باشد. این واکنشگری هم قبل و هم بعد از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی دیده می شود.

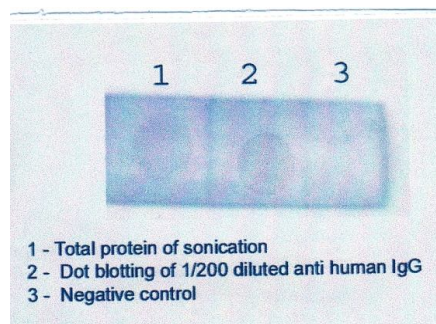
بحث

پروتئین Tax که محصول ژن P^X است، نقش مهمی در تکثیر ویروس HTLV-1 و ترانسفورمیشن لنفوسیت دارد. علاوه بر این، پروتئین Tax نقش در رونویسی ویروس و پاتوژنز بیماری های ایجاد شده بوسیله آن ایفا می کند (6 و 16). مشخص شده است که Tax انکوژن می باشد چرا که فیبروبلاستهای جوندگان و سلولهای T انسانی را ترانسفرم و نامیرا می کند (16). Tax از طریق مسیرهای CREB, NF κ B پروموتورهای سلولی مثل اینترلوکین-13 و اینترلوکین-15 و نیز گیرنده اینترلوکین-2 و مولکول های کمک تحریکی را فعال کرده و منجر به افزایش این پروتئین ها و فعال شدن ابشار انتقال علامت می شود. Tax همچنین از طریق اتصال مستقیم به کینازهای وابسته به سیکلین و یا غیر فعال کردن ژن های سرکوب گر تومور مستقیما رشد سلول را تحریک می کند. بعلاوه Tax باعث ناپایداری DNA و افزایش احتمال جهش در سلول می گردد (7, 17, 18). با استفاده از ترانسفورمیشن باکتری *E. coli* توسط پلاسمید حاوی ژن tax ویروس HTLV-1 و سپس بیان ژن tax در این باکتری این پروتئین به صورت نوترکیب تولید شد. سپس با روش ایمونوافینیتی کروماتوگرافی خالص گردیده و با رنگ آمیزی نیترات نقره و دات بلات تعیین ویژگی گردید. با توجه به وجود سرم های حاوی آنتی بادی ضد Tax و در دسترس بودن آن، در این روش از ایمونوافینیتی استفاده شد (11). پروتئین Tax که توسط افراد مختلفی تا کنون تخلیص شده است به مقاصد متفاوتی بوده و بر اساس نوع مقصود، روش تخلیص نیز متفاوت بوده است. در سال 1987 KuanTehJeang با استفاده از وکتور بیانی باکلوویروس پروتئین Tax را تخلیص نمود (13). این پروتئین دارای فعالیت بیولوژیک بود. در این پروژه برای تولید پروتئین Tax از پلاسمید pEF و باکتری سویه Top10 استفاده شد. هدف در این پروژه تولید Tax برای مقاصد تهیه کیت و نیز بعنوان مدل آزمایشی تهیه آن از طریق ایمونوافینیتی کروماتوگرافی بود. مشخص شده است که وجود آنتی بادی ضد Tax احتمال انتقال عمودی و جنسی ویروس را افزایش می دهد. به همین دلیل تولید پروتئین Tax خالص



شکل 2. رنگ آمیزی نیترات نقره پس از الکتروفورز SDS-PAGE: ستون 1. استاندارد وزن مولکولی، ستون 2. نمونه حاصل از سونیکاسیون بعد از گذرانده شدن از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون 3. نمونه حاصل از سونیکاسیون قبل از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی

باند موجود در محدوده 43 کیلوالتون در رنگ آمیزی نیترات نقره مربوط به پروتئین Tax می باشد. باند اضافه ای در بخش پایینی هم مشاهده شد که احتمالاً حاصل شکست این پروتئین می باشد.



شکل 3. آزمون دات بلات. ستون 1. نمونه حاصل از سونیکاسیون قبل از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون 2. نمونه حاصل از سونیکاسیون بعد از گذرانده شدن از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون 3. نمونه بافر سالین به عنوان کنترل منفی.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشانگر تولید پروتئین Tax و ویروس HTLV-1 از طریق تکنولوژی نوترکیب به منظور استفاده در کیت های تشخیصی بوده است. رنگ آمیزی با نیترات نقره و دات بلات وجود پروتئین تخلیص شده را نشان می داد اما میزان آن کم بود به نحوی که روش مورد استفاده نیازمند اصلاح می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پشتیبانی علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت های مالی از این طرح پژوهشی تقدیر و تشکر می گردد.

References

- 1- Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:7415-9.
- 2- Roman GC, Vernant JC, Osame M. *HTLV-1 and the Nervous System*. Neurology and Neurobiology Vol.51, 1989.ed.
- 3- Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, Ahkami R, Franchini G. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1996; 12:1185-1190
- 4- Farid R, Etemadi M, Baradaran H, Nikbin B. *Seroepidemiology and virology of HTLV-1 in the city of Mashhad, northeastern Iran*. Serodiagn. Immunother. Infect. Disease. 1993; 5: 251-252.
- 5- Taebi SZ. *Human T Lymphotropic Virus (HTLV-1) Related Diseases*. Iran Red Crescent Med J.2011; 13(6) 374-376.
- 6- Yoshida M. *Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control*. Annu Rev Immunol. 2001; 19:475-496.
- 7- Franchini G, Fukumoto R, Fullen JR. *T-cell control by HTLV-1*. Int J Hematol. 2003; 78:280-296.
- 8- Jeang K, Giam CZ, Majone F, Aboud M. *Life, death and tax: Role of HTLV-1 oncoprotein in genetic instability and cellular transformation*. J Biol Chem. 2004; 279:31991-31994.
- 9- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. *Retrovirology*. 2004; 1:20.
- 10- Mortreux F, Gabet AS and Watte E. *Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo*. Leukemia. 2003; 17:26-38.

برای تهیه کیت ضروری است، تا بتوان از آن برای تشخیص آنتی بادی ضد Tax استفاده کرد. در سال 1992 Shimotohno و همکارانش نوعی آنتی ژن Tax را توسط روش نوترکیبی ژنتیکی تولید کردند که به صورت اختصاصی با پنج نوع آنتی بادی مونوکلونال ضد Tax واکنش میداد. وقتی آنتی بادیهای موجود در سرم و آنتی بادیهای مونوکلونال ضد Tax از نظر ویژگی اتصال به آنتی ژن Tax نوترکیب مقایسه شدند، مشاهده شد که آنتی بادیهای مونوکلونال به صورت رقابتی از اتصال آنتی بادیهای موجود در سرم جلوگیری می کنند. یعنی از نظر ویژگی اتصال به آنتی ژن مشابه اند (14). با این استدلال که طی پروسه افینیتی کروماتوگرافی در این پروژه از آنتی بادی ضد Tax موجود در سرم استفاده شده است، بنابراین از این آنتی ژن می توان برای غربالگری سرم های حاوی آنتی بادی ضد Tax استفاده نمود. احتمالاً بدلیل مناسب نبودن پلاسمید و سوبه بکار رفته در این پروژه، میزان محصول بدست آمده کمتر از حد انتظار نسبت به سایر روشها بوده است. زیرا John Brady در سال 1991 محصول تولید شده در پی استفاده از پلاسمید pX5 و سوبه HB101 را یک میلی گرم در لیتر مایع محیط کشت ذکر می کند. در ضمن او از روش zink chelate affinity chromatograph استفاده کرد که در این پروژه این کار عملی نبود (15). بدلیل کم بودن پروتئین تولید شده و محدودیت تشخیصی رنگ آمیزی کوماسی بلو، از رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. آزمون دات بلات نیز که صورت گرفت نشان از وجود Tax در نمونه گذرانده شده از ستون کروماتوگرافی داشت. اما مطابق با نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی نیترات نقره و دات بلات میزان کمی از پروتئین Tax وجود داشت که همانطور که گفته شد میزان آن کمتر از سایر روشهای مورد استفاده بود. در ضمن ناکارآمدی روش احتمالاً موجب شکسته شدن پروتئین شده بود که در رنگ آمیزی نیترات نقره به صورت باند اضافی دیده می شود. می توان باند اضافی را به پروتئین های باکتری که لیز شده است نسبت داد اما در صورتی که باند اضافی مربوط به پروتئین های اشریشیا کلی باشد، منطقی به نظر می رسد تعداد باندهای اضافی بیشتر باشد. در نهایت می توان توصیه نمود با اصلاح روشهای مورد استفاده می توان با استفاده از امکانات موجود پروتئین Tax را به میزان بیشتری تولید و تخلیص نمود.

11. Abbaszadegan MR, Gholamin M, Tabatabaee A, FaridR, Houshmand M, Abbaszadegan M. *Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 among Blood Donors from Mashhad, Iran*. Journal of Clinical Microbiology. 2003;2593-2595
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 2nd edition ;1989
13. Jeang KT, Giam CZ, Nerenberg M, Khoury G. *Abundant Synthesis of Functional Human T-Cell Leukemia Virus Type I p40x Protein in Eucaryotic Cells by Using a Baculovirus Expression Vector*. Journal of Virology. 1987;63:707-713.
14. Tanaka Y, Masuda M, Yoshida A, Shida H, Nyunoya H, Shimotohno K, Tozawa H. *An antigenic structure of the trans-activator protein encoded by human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I), as defined by a panel of monoclonal antibodies*. AIDS Res Hum Retroviruses.1992;8:227-235.
15. Lindholm PF, Marriott SJ, Gitlin SD, Brady JN. *Differential precipitation and zinc chelate chromatography purification of biologically active HTLV-I Tax1 expressed in E. coli*. J Biochem Biophys Methods.1991;22:233-241
16. Grassmann R, Aboud M , Jeang KT. *Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-I Tax*. Oncogene. 2005; 24: 5976–5985
17. Kim YM , Rami´rez JA , Mick JE, Giebler HA, Yan JP, Nyborg JK. *Molecular Characterization of the Tax-containing HTLV-I Enhancer Complex Reveals a Prominent Role for CREB Phosphorylation in Tax Transactivation*. THE JB Chmistry. 2007; 282:18750-18757.
18. Ho YK, Zhi H, DeBiaso D, Philip S, Shih HM, Giam CZ. *HTLV-1 Tax-Induced Rapid Senescence Is Driven by the Transcriptional Activity of NF-κB and Depends on Chronically Activated IKKα and p65/RelA*. J. Virol. 2012; 86:9474-9483.