

## تولید سلول‌های ناپذیرا برای مطالعه HIV-1 vif

\*  
احمد پیروزمند

## خلاصه

**سابقه و هدف:** مولکول APOBEC3G، به عنوان فاکتور سلولی دخیل در میانکشی با HIV-1 vif عمل می‌کند که برای بررسی میانکشی آن با HIV-1 vif، از سلول‌های ناپذیرای طبیعی و ذاتی مثل H9 و PBMC انسانی مولد APOBEC3G استفاده می‌شود. به دلیل ناکارآمدی آنها در این نوع بررسی‌ها، نیازمند سلول‌های ناپذیرایی بودیم که به طور ثابت و به میزان بالا تولید APOBEC3G بنمایند. لذا از سلول‌های 293T برای ایجاد این دسته از سلول‌ها استفاده شد.

**مواد و روش‌ها:** از سلول‌های 293T برای تولید سلول‌های ناپذیرا (non-permissive) استفاده شد که این کار پس از ترانسفکشن با کلون‌های مولکولی p<sup>cdNA</sup>-APO3G صورت گرفت و سپس با روش وسترن بلاتینگ، میزان بیان آنها بررسی شد. همچنین فعالیت رپلیکاسیون HIV-1 با استفاده از RT assay و عفونت‌زایی آنها به وسیله MAGI assay بررسی شد.

**نتایج:** در این مطالعه، تعدادی رده سلولی 293T ابرازکننده یک فاکتور انسانی ضد HIV-1 به نام APOBEC3G تهیه شد. به آسانی از طریق ایمونوبلاتینگ اثبات شد که چهار کلون از هفت کلون مورد بررسی، APOBEC3G را ابراز می‌کنند. به ویژه مشخص شد که دو کلون (A3G-C1, A3G-C4) تولید مقادیر بالاتری از APOBEC3G را در مقایسه با کلون‌های سلولی Pooled می‌نمایند. اثربخشی ترانسفکشن همه این کلون‌ها مشابه سلول‌های والد بود؛ با تولید سطح قابل‌قیاسی از ویرونها در نتیجه ترانسفکشن کلون‌های DNA ویروسی نوع وحشی و vif منفی (-vif). به علاوه سطح ابرازی APOBEC3G در بهترین رده سلولی (A3G-C1)، بسیار بالاتر از سطح ابرازی در یک رده سلولی لنفوسیتی APOBEC3G مثبت و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بود. در نهایت دخول APOBEC3G در ویرونها تولید شده در A3G-C1 مونیتور و پیگیری شد. APOBEC3G به راحتی در ذرات ویروسی پروژنی در نتیجه ترانسفکشن کلون پروویروسی vif منفی، و نه در کلون نوع وحشی، تشخیص داده شد.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج مشخص ساختند که رده سلولی جدید تولید شده برای مطالعات مختلف بررسی میانکشی APOBEC3G انسانی و HIV-1 vif مفید است.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های ناپذیرا، HIV-1 vif، APOBEC3G، سلول‌های H9، PBMC

۱- استادیار گروه میکروبی‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

\* نویسنده مسوول: احمد پیروزمند

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ویرولوژی

پست الکترونیک: apiroozmand@gmail.com

تلفن: ۰۹۱۲ ۲۶۲ ۳۵۲۳

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۶۱۱۲

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۷

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۹/۱۰

## مقدمه

همانندسازی ویروسی می‌باشد [۴، ۵]. HIV-1 vif از بسته‌بندی شدن APOBEC3G به داخل ویرونها در حال تولید ممانعت می‌کند [۹-۶]. HIV-1 بدون ژن کارکردی vif در سلول‌های ابرازکننده APOBEC3G نظیر رده سلولی لنفوسیتی به نام H9 و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) قادر به رشد نمی‌باشد [۱۱، ۱۰]. بنابراین این سلول‌ها به نام ناپذیرا (non-permissive) نامیده می‌شوند. سلول‌های هدف ناپذیرا که به طور

ملکول APOBEC3G، یک فاکتور سلولی بالقوه ضد HIV-1 است که تنظیم‌کننده DNA رشته منفی ویروسی در هنگام نسخه‌برداری معکوس است و منجر به تخریب یا اینتگره شدن آن در داخل DNA کروموزوم میزبان شد. و به عنوان یک پروویروس بسیار جهش یافته تلقی می‌گردد. [۳-۱]. اثر منفی و آسیب‌رسان APOBEC3G در HIV-1، ناشی از بسته‌بندی آن به داخل ویرونها پروژنی در مرحله assembly چرخه

anti-HIV-1 Gag P24 (NIH AIDS Research and Reference Reagent, catalogue no 6521) به همان نحوی که قبلا بیان شده است، انجام شد. عصاره سلولی برای ایمونوبلاتینگ از سلول 293T ترانسفکت شده با کلون‌های مختلف به وسیله بافر لیزکننده CHAPS تهیه شد و به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE تفکیک شد. پروتئین‌ها به طریق الکتروفوریتیک به غشای پلی‌وینیلیدین فلوراید (PVF) منتقل شدند. سپس غشاها با آنتی‌بادی منوکلونال ضد APOBEC3G (شرکت Invitrogen) مواجه شدند. برای آشکارسازی از معرف-های آشکارسازی مخصوص بلاتینگ به نام ECL plus Buckinghamshire, England (Amersham Biosciences) استفاده شد [۱۶].

**سنجش نسخه‌برداری معکوس (RT assay):** نحوه سنجش RT با استفاده از 32P-dTTP قبلا توضیح داده شده است. به منظور بهینه سازی برخی تغییرات در این روش انجام شد که بدین نحو می باشد: با ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی کشت با ۵۰ میکرولیتر از یک مخلوط واکنش RT که دربردارنده یک پرایمر لگس از  $5 \mu\text{g/ml}$  (A) n و  $12-18 \mu\text{g/ml}$  dT در  $5\text{mM}$  Tris (pH 7.8)،  $2\text{mM}$  DTT،  $7.5 \text{mM}$  KCl،  $50\text{mM}$  MgCl<sub>2</sub> (32P)،  $0.05\%$  Nonidet P-40،  $0.5 \mu\text{Ci}$  از  $32\text{P}$  (400Ci/mmol) dTTP می‌باشد، مخلوط شد. به دنبال یک انکوباسیون ۹۰ دقیقه‌ای در  $37^\circ\text{C}$ ، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش بر روی کاغذهای واتمن (DEAE ion-exchange paper) لکه-گذاری شد و ۴-۶ مرتبه در  $2\times \text{SSC}$ ، به علاوه  $0.015$  کلرید سدیم) برای حذف dTTP (32P) داخل نشده، شستشو شد. سپس لکه‌ها به وسیله شمارش‌گر سنتیلاسیون قابل مشاهده گردید [۱۷].

**سنجش MAGI:** عفونت‌زایی و ویرونی‌های تولید شده در رده‌های سلولی مختلف 293T ترانسفکت شده با کلون‌های DNA پروویرال در سلول‌های MAGI همان طور که قبلا توضیح داده شده است، تعیین شد [۱۸]. سلول‌های MAGI-CCR5 در یک میکروپلیت ۹۶ خانه در یک روز قبل از عفونت تهیه شدند. سلول‌ها در روز قبل از عفونت در ۳۰-۴۰ درصد confluency بودند. سلول‌ها پس از حذف محیط از هر چاهک و افزودن رقت-هایی از ویروس در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر از DMEM کامل با ۲۰ میکروگرم از دکستران-DEAE در ۱ml عفونی شدند. پس از ۳-۵ ساعت انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$  در یک انکوباتور  $5\% \text{CO}_2$  دو قطره از DMEM به هر چاهک اضافه شد. سلول‌ها برای ۴۸ ساعت تحت همان شرایط انکوبه شدند. سپس محلول رویی حذف شده و دو قطره از محلول فیکس‌کننده (فرمالدئید ۱ درصد،

معمول برای مطالعات بیولوژیکی یا بیوشیمیایی بر روی میانکنش vif و APOBEC3G مورد استفاده قرار می‌گیرند، از رده سلولی لنفوسیتی می‌باشند. به اثبات رسیده است که ترانسفکشن رده‌های سلولی لنفوسیتی و لنفوسیت‌های اولیه با DNAهای مورد آزمایش، کارآمد نیست و به دست آوردن نتایج مکرر یکسان (Reproducibility) مشکل می‌باشد. برای بررسی‌های ویرولوژیک مولکولی Vif و APOBEC3G، رده‌های سلولی APOBEC3G مثبت با کارایی ترانسفکشن بالا مورد نیاز هستند. ولی برای انجام این تست‌ها تنها یک رده سلولی تک‌لایه گزارش شده است که به طور ثابت و پایدار APOBEC3G را ابراز می‌کند و به ترانسفکشن، بسیار حساس و مستعد می‌باشد [۸]. در این مطالعه رده‌های سلولی 293T ابرازکننده پایدار APOBEC3G که برای آنالیز ترانسفکشن مناسب هستند، تهیه شد. در این جا به وضوح نشان داده شد که رده سلولی تهیه شده 293T/A3G-C1 مقادیر بسیار زیادی از APOBEC3G کارکردی بر ضد HIV-1 را در مقایسه با سلول‌های هدف طبیعی تولید کرد.

#### مواد و روش‌ها

**سلول‌ها:** یک رده سلولی تک لایه 293T [۱۲] در محیط کشت EME دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده توسط حرارت (در  $56^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه) نگهداری شد. یک رده سلولی لنفوسیتی H9 [۱۳]، در محیط کشت RPMI-1640 و دارای سرم جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت نگهداری شد. PBMC‌های انسانی تا زمان استفاده در نیتروژن مایع نگهداری شدند. سلول‌ها قبل از استفاده سریعاً ذوب شده، شسته شده و برای ایجاد عفونت آماده شدند [۱۴].

**ساختارهای DNA:** یک کلون DNA عفونی از HIV-1 به نام PNL432 [۱۵] و موتانت Vif منفی آن به نام pNL-Nd که قبلا توصیف شده‌اند طراحی شد. یک وکتور ابرازی از APOBEC3G انسانی به نام  $\text{P}^{\text{cDNA-APO3G}}$  و یک وکتور انتخابی به نام PTK-Hyg (Clontech) برای ایجاد رده‌های سلولی 293T ابرازکننده APOBEC3G مورد استفاده قرار گرفتند.

**توانسفکشن:** ترانسفکشن سلول‌های 293T با روش رسوب هم‌زمان با کلسیم فسفات به همان روشی که قبلا گزارش شده است، انجام شد [۱۵].

**وسترن بلاتینگ:** آنالیز ایمونوبلاتینگ با استفاده از:

anti-myc (Invitrogen)  
anti-APOBEC3G (NIH AIDS Research and Reference Reagent program, catalogue no 9906)  
anti- $\beta$ -actin (sigma)

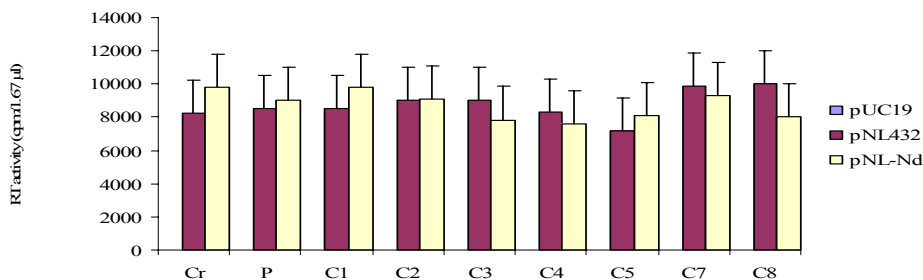
عفونت HIV-1، از رده سلول لنتوئیدی می‌باشند و معمولاً وارد کردن کلون‌های مولکولی به داخل آنها از طریق ترانسفکشن مشکل است. ما از طریق آزمایشات ترانسفکشن، علاقه مند به بررسی واکنش متقابل یک فاکتور ذاتی سلولی ضد ویروسی به نام APOBEC3G با HIV-1 Vif که دارای فعالیتی مخالف با APOBEC3G است، بودیم. دسترسی اخیر به وکتور ابرازی  $P^{cDNA-APO3G}$  [۹] ما را به تولید رده‌های سلولی تک لایه مولد APOBEC3G تشویق کرد. رده سلولی 293T [۱۲] بدین منظور انتخاب شد که اثربخشی و کارایی ترانسفکشن آن بالاست و میزان زیادی از ویروئیدهای پروژنی را در اثر ترانسفکشن کلون‌های پروویرال HIV-1 تولید می‌کند. به منظور تثبیت و ایجاد رده‌های سلولی ابرازکننده پایدار APOBEC3G، سلول‌های 293T به طور هم‌زمان با  $P^{cDNA-APO3G}$  (یا PUC19 به عنوان کنترل) و  $P^{TK-Hyg}$  به نسبت تقریباً 20:1 ترانسفکت شدند و در حضور Hygromycin (200mg/ml) برای مرحله انتخاب، کشت داده شدند. از کلون‌های سلولی به دست آمده، هفت کلون برای ابراز APOBEC3G، به وسیله آنالیز ایمونوبلاتینگ مورد بررسی قرار گرفتند (شکل A).

A

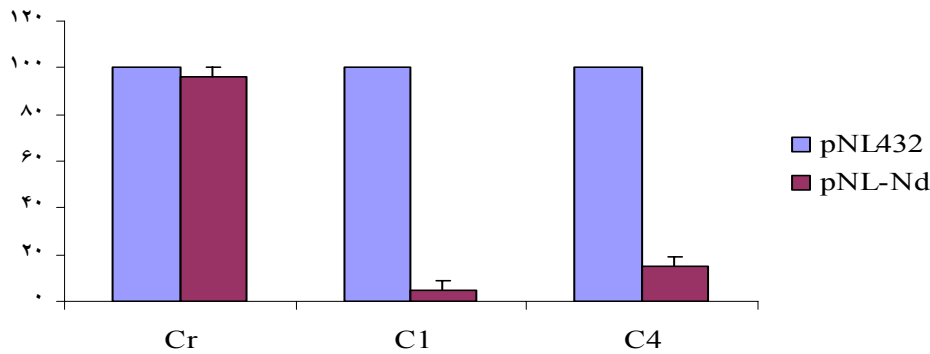
Cr P C1 C2 C3 C4 C5 C7 C8



شکل ۱- تعیین خصوصیات کلون‌های مختلف 293T ایجاد شده در این مطالعه: (A) سطوح ابرازی APOBEC3G در رده‌های سلولی ایجاد شده توسط ترانسفکشن توام  $P^{cDNA-APO3G}$  و  $P^{TK-Hyg}$  (تا A3G-C8 تا A3G-C1). عصاره‌ها از رده‌های سلولی تهیه شدند و با استفاده از آنتی‌بادی‌های معین توسط ایمونوبلاتینگ بررسی شدند. Cr، رده سلولی به دست آمده از طریق ترانسفکشن هم‌زمان PUC19 و  $P^{TK-Hyg}$ ، و Pooled A3G سلولی P



(B) تولید RT در رده‌های سلولی مختلف در نتیجه ترانسفکشن کلون‌های پروویرال. هر کلون سلولی با PNL432 یا PNL-Nd، ترانسفکت شده و دو روز بعد، فعالیت RT در مایعات سلولی تعیین شد. Cr و P همانند مرحله قبل

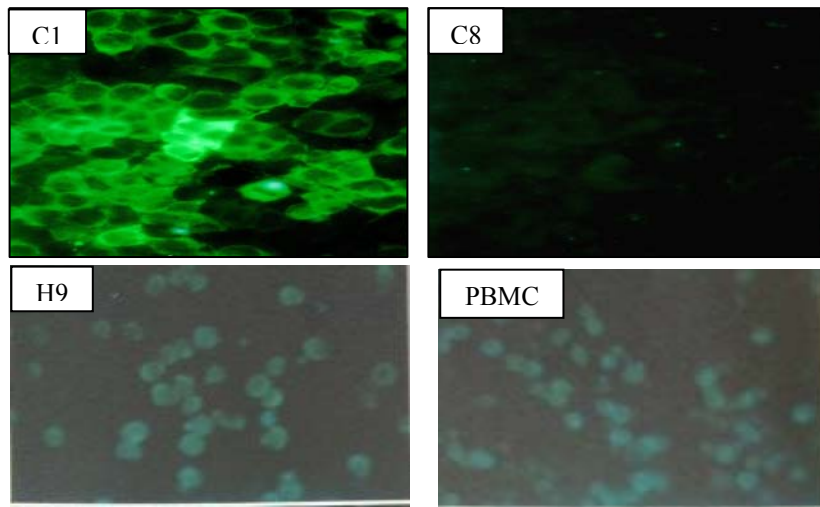


شکل ۲- عفونت زایی و ویرونی‌های تولید شده در رده‌های سلولی 293T مختلف. نمونه‌های ویروسی از سلول‌های (Cr و A3G-C4, A3G-C1) ترانسفکت شده با pNL432 یا pNL-Nd تهیه شدند و عفونت‌زایی آنها در سلول‌های MAGI تعیین شد. Cr همانند شکل ۱.

سلول‌ها بر اساس روش‌های ایمونوفلورسانس و وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۳A نتایج سنجش IF را نشان می‌دهد. در اینجا گرچه شدت IF در سلول‌های A3G-C1 خیلی قوی‌تر از PBMC و H9 بود، ولی APOBEC3G در سیتوپلاسم هر سه نوع سلول بارز بود. همچنین دیده شد همان طوری که توسط IF مورد قضاوت قرار گرفت برخی جمعیت‌های سلولی A3G-C1 سطح بالایی از APOBEC3G را تولید می‌کرد. درک واقعی بیولوژیکی علت مشاهده چنین وضعیتی در حال حاضر شناخته شده نیست. برای مقایسه کمی سطح ابراز APOBEC3G در انواع مختلف سلولی، عصاره آنها تهیه شد و مورد بررسی ایمونوبلاتینگ قرار گرفت که در شکل ۳B نشان داده شده است. منطبق با نتایج حاصل از شکل ۳A، کلون A3G-C1 نسبت به دیگر سلول‌ها سطح بالاتری از APOBEC3G را ابراز می‌کنند. در انتها، ورود APOBEC3G سلول‌های A3G-C1 به داخل ذرات ویروسی در غیاب Vif مونتور شد. بدین صورت که سلول‌های A3G-C1 و کنترل 293T، با pNL432 یا pNL-Nd ترانسفکت شدند و ویرونی‌های پروژنی تولید شده در روز دوم پس از ترانسفکشن به همان صورتی که قبلاً توضیح داده شده است، جمع‌آوری و تغلیظ شدند [۲۰]. همان طور که در شکل ۴A نشان داده شده است و انتظار هم می‌رفت، تنها ویرونی‌های رها شده از سلول‌های A3G-C1 با کلون موتانت vif، واجد APOBEC3G بودند. به علاوه یک شمای Gag غیرطبیعی در ویرونی‌های موتانت تولید شده از سلول‌های A3G-C1 مشاهده نشد، که گمان می‌رود ممکن است vif بر مورفولوژی ویرونی HIV-1 تاثیر نگذارد (شکل ۴B).

برای مشاهده سطح ابرازی متوسط، ده‌ها کلون سلولی جمع‌آوری شده و کشت داده شدند و سپس برای حضور APOBEC3G بررسی شدند. به طور کاملاً غیره منتظره تنها ۴ تا ۷ کلون، APOBEC3G را ابراز کردند. در میان چهار کلون به دست آمده، دو تای آنها یعنی (A3G-C1, A3G-C4) میزان بالاتری از APOBEC3G را نسبت به دیگر کلون‌ها و نمونه جمع‌آوری شده ابراز کردند. سپس اثربخشی ترانسفکشن این سلول‌ها مقایسه شدند به این صورت که سلول‌ها با کلون‌های پروویرال ترانسفکت شدند و تولید RTها (Reverse Transcripts) در سوپرناتانت کشت در روز دوم پس از ترانسفکشن تعیین شدند. همان طور که در شکل ۱-B نشان داده شده است هیچ اختلاف معنی‌داری در نتایج قابل مشاهده نبود. اثربخشی ترانسفکشن مشاهده شده برای این سلول‌ها مشابه با سلول‌های 293T والد بود (نتایج نشان داده نشده است). برای تعیین اینکه آیا A3G-C4 و A3G-C1 می‌توانند APOBEC3G فعال از نظر عملکرد را ابراز کنند یا نه؛ یعنی دارای توانایی سرکوب کردن همانندسازی HIV-1 بدون Vif (Vif-) می‌باشند یا نه؛ عفونت‌زایی ویرونی‌های پروژنی تولید شده از A3G-C1 و A3G-C4 ترانسفکت شده، در سلول‌های MAGI مورد بررسی قرار گرفتند. همان طور که در شکل ۲ واضح است، هر دو رده سلولی به طور ثابت می‌توانند همانند سلول‌های ناپذیرای طبیعی، APOBEC3G را ابراز کنند. در کل و بر اساس نتایج به دست آمده در اشکال ۱ و ۲ نتیجه گرفتیم که A3G-C1 بهترین کلون موجود در بین کلون‌های موجود می‌باشد. سپس به طور مقایسه‌ای ابراز APOBEC3G در سلول‌های لنفوسیتیک H9 و سلول‌های PBMC از یک طرف و سلول‌های جدیداً ایجاد شده A3G-C1 را آنالیز و بررسی کردیم. این

۳A

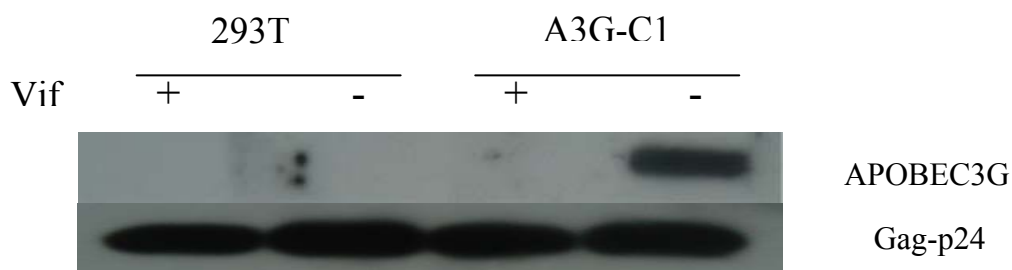


۳B

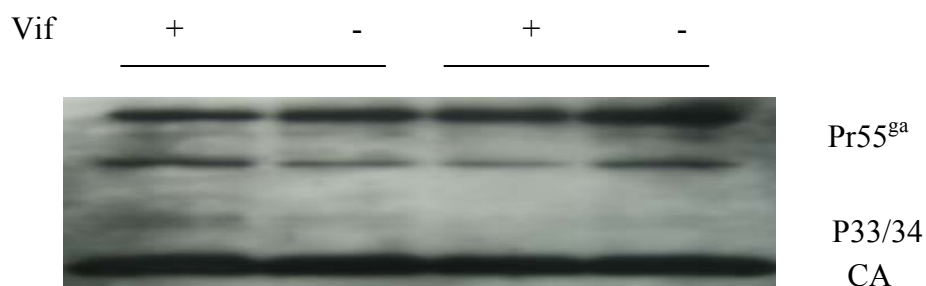


شکل ۳- ابراز APOBEC3G در کشت های 293T/A3G-C1، 293T/A3G-C4، H9 و PBMC. ابراز APOBEC3G در انواع مختلف سلولی توسط سنجش های IF (A) و ایمونوبلاتینگ (B) مونیتور و بررسی شد. برای آشکار سازی APOBEC3G از anti-APOBEC3G استفاده شد A3G-C8 به عنوان یک کنترل منفی استفاده شد (شکل ۱ را ببینید).

4A



4B



شکل ۴- وارد شدن APOBEC3G به ویرونی های HIV-1 تولید شده در غیاب vif. ذرات ویروسی از سلول های 293T و A3G-C1 ترانسفکت شده با (+) PNL432 یا (-) PNL-Nd، تهیه شدند و عصاره آنها برای بررسی ایمونوبلاتینگ استفاده شد. برای آشکار سازی APOBEC3G از anti-APOBEC3G استفاده گردید. (B) برای آشکار سازی abnormality Gag processing از anti-CA استفاده گردید.

## نتیجه‌گیری

بیولوژیکی عملکردی بود (اشکال ۲ و ۴). بنابراین به ترانسفکشن بسیار حساس بود و سطح بالایی از ویرونی‌های HIV-1 را تولید کرد (شکل شماره ۱). در نهایت این که با استفاده از سلول‌های A3G-C1 ما قادر به بررسی آسان‌تر اساس مولکولی میانگش APOBEC3G و HIV-1vif خواهیم بود.

در نتیجه اثبات می‌شود که رده سلولی A3G-C1 یک زیررده جدیداً ایجاد شده از 293T است که می‌تواند برای مطالعات زیستی و زیست مولکولی بر روی HIV-1vif بسیار مناسب باشد. این زیررده، سطح بالایی از APOBEC3G را ابراز کرد (اشکال ۱ و ۳) و APOBEC3G ابراز شده در آن از نظر

## References:

- [1] Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of Vif protein. *Science* 2003;300:1112-4.
- [2] Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003;113:803-9.
- [3] Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defense by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003;424:99-103.
- [4] Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002;418:646-50.
- [5] Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 2003;114:21-31.
- [6] Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 2003;9:1398-403.
- [7] Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 2003;9:1404-7.
- [8] Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 2003;302:1056-60.
- [9] Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* 2003;77:11398-407.
- [10] Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine W, et al. Role of Vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 1992;66:6489-95.
- [11] Sakai H, Shibata R, Sakuragi J, Sakuragi S, Kawamura M, Adachi A. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J Virol* 1993;67:1663-6.
- [12] Lebkowski JS, Clancy S, Calos MP. Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression. *Nature* 1985;12:169-71.
- [13] Mann DL, O'Brien SJ, Gilbert DA, Reid Y, Popovic M, Read-Connoles E, et al. Origin of the HIV-susceptible human CD4<sup>+</sup> cell line H9. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989;5:253-5.
- [14] Ueno F, Shiota H, Miyaura M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, et al. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes Infect* 2003;5:387-95.
- [15] Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986;59:284-91.
- [16] Khamisri B, Murao F, Yoshida A, Sakurai A, Uchiyama T, Shirai H, et al. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpr/Vpx proteins. *Microbes Infect* 2006;8:10-5.
- [17] Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, et al. In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* 1988;62:139-47.
- [18] 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;66:2232-9.
- [19] Uchiyama T, Takeda K, Yamanouchi K. Replication of measles virus and localization of the viral antigens in long-term infection in organotypic cultures of hamster dorsal-root ganglion. *Jpn J Exp Med* 1985;55:109-21.

[20] Akari H, Uchiyama T, Fukumori T, Iida S, Koyama AH, and Adachi A. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 by vesicular stomatitis virus G protein does not reduce the cell-dependent requirement of Vif for optimal infectivity: functional difference between Vif and Nef. *J Gen Virol* 1999;80:2945-9.