

## Silencer 및 DNA methylation에 의한 JC virus early promoter의 뇌교세포 특이적인 조절

김희선<sup>#</sup> · 우문숙

이화여자대학교 의과대학 뇌신경과학교실

(Received February 19, 2002; Revised March 5, 2002)

### Glial Cell-specific Regulation of the JC virus Early Promoter by Silencer and DNA Methylation

Hee-Sun Kim<sup>#</sup> and Moon-Sook Woo

Department of Brain and Neuroscience, Ewha Institute of Neuroscience,

College of Medicine, Ewha Womans University, 70 Jongno 6-Ga, Jongno-Gu, Seoul 110-783, Korea

**Abstract** — The human polyomavirus JC virus is the etiologic agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). The JC virus early promoter directs cell-specific expression of the viral replication factor large T antigen, thus transcriptional regulation constitutes a major mechanism of glial tropism in PML. Here we found that pentanucleotide sequence immediately upstream of the TATA sequence functions as a cell-specific silencer in the JC virus transcription. In vitro binding studies showed that synthetic oligonucleotides spanning a pentanucleotide sequence, designated “oligo 2”, interacts with nuclear proteins from non-glial cells in a cell-specific manner. Furthermore, the sequence preferentially repressed the heterologous thymidine kinase promoter activity in non-glial cells. We also tested whether JC virus transcription is controlled by DNA methylation. Transient transfection of in vitro methylated JC virus promoter abolished transcription in both the glial and non-glial cells. The repression fold was much larger in glial cells than in non-glial cells. Taken together, this finding suggests that glial cell-specific expression of the JC virus is controlled by DNA methylation as well as cell-specific silencers.

**Keywords** □ JC virus, progressive multifocal leukoencephalopathy, silencer, pentanucleotide, DNA methylation

DNA polyomavirus의 일종인 JC virus는 정상인의 약 70~80%에서 발견되고 있는데 건강한 상태에서는 JC virus의 T antigen이 발현되지 않아 잠재적인 상태(latent status)로 있으나 AIDS를 비롯한 면역결핍이 된 상태에서는 뇌의 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte) 및 일부 성상세포(astrocyte)에 감염하여 JC virus의 복제 및 전사에 중요한 역할을 하는 T antigen을 발현함으로써 그 세포들의 사멸을 유도한다. 그 결과 희소돌기 아교세포에서 생성되는 신경의 중요한 구성성분인 myelin이 만들어지지 못하게 되어 뇌의 백질부분이 점차적으로 파괴되어가는 인간이 치명적인 demyelinating disease인 progressive multifocal leukoencephalopathy(PML)을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 현재까지 JC virus는 AIDS 환자의 약 5~7% 정도에서 발견되는

것으로 알려져 있으며 PML의 주요증상으로는 myelin의 결핍으로 인한 중추신경의 손상, 운동신경마비, 시력감퇴 등을 들 수 있다. 한때는 흔하지 않은 질환이었으나 최근에 AIDS 환자가 늘어남에 따라 PML 환자도 늘어나는 것으로 보고되어 있다.<sup>2)</sup> 최근에는 이 바이러스가 뇌종양을 유발한다는 보고들이 늘어나고 있고 또한 multiple sclerosis과도 관계된다는 몇몇 보고들도 있다.<sup>3,4)</sup>

JC virus 유전자는 주로 전사단계(transcription level)에서 조절되는 것으로 알려져 있는데 면역이 결핍된 상태에서는 JC virus promoter 유전자의 재배열에 의하여 병을 유발하는데 중요한 역할을 하는 large T antigen의 발현이 활성화되는 것으로 보고되어 있다. 이러한 뇌세포 특이적인 JC virus의 발현은 주로 다수의 전사인자(transcription factor)들의 단백질 상호작용(protein-protein interaction) 및 promoter 유전자와 단백질간의 상호작용(DNA-protein interaction)에 의하여 조절되며 그외의 cyclic AMP와 같은 물질에 의하여도 조절됨이 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 또한 최근의 연구결과에 의하면 AIDS를 일으키는 HIV로부터 발현되는 Tat

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-760-5502 (팩스) 02-760-5524  
(E-mail) hskimp@mm.ewha.ac.kr

나 Tax와 같은 단백질에 의하여도 JC virus의 발현이 증가됨이 보고되었다.<sup>6)</sup>

이러한 JC virus의 유전자발현에 관한 많은 연구에도 불구하고 아직까지도 JC virus의 뇌교세포 특이성(glial cell-specificity)을 결정하는 인자는 명확히 밝혀지지 않은 상태이다. 현재까지 보고된 바에 의하면 세포특이적인 전사조절은 주로 선택적인 전사활성화(selective activation)이나 탈전사억제(derepression)을 통하여 이루어진다. TATA sequence의 바로 위에 인접한 위치에 존재하는 염기들이 heterologous promoter를 약하게 억제하는 것을 발견하였는데 이 sequence에는 다섯 개의 염기의 중복서열(5'TCCCTTCCCT)이 존재하고 이는 SV40 basal promoter와 비교시 차이를 보이는 부분이다. 따라서 이 sequence는 transcriptional repressor가 붙는 잠재적인 결합부위로 간주되었다. 지금까지 이 sequence에 붙는 여러 단백질들이 밝혀졌지만 주로 JC virus의 late promoter에 대한 작용을 중심으로 결과들이 보고되었고 또한 교세포 특이성과의 연관성은 명확하지 않다.<sup>7,8)</sup>

세포특이적인 전사활성을 조절하는 유전자외적인 소인으로는 염색체의 구조나 DNA의 메틸화를 들 수가 있다. Promoter내에 존재하는 CpG dinucleotides의 cytosine 염기의 methylation은 유전자 발현조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. Methyl group은 아마도 입체적 장애나 cellular methyl-CpG binding proteins(e.g. MeCP1, MeCP2)과의 competition을 통하여 promoter로의 전사인자의 결합을 직접 방해하여 전사를 억제하는 것으로 보고되어 있다.<sup>9)</sup> JC virus promoter의 전사시작점 근처에 세개의 CpG dinucleotides가 존재하는데 이는 methylation을 통해 JC virus promoter가 세포특이적으로 조절될 가능성을 암시해준다.

본 연구에서는 pentanucleotide를 포함하는 sequence가 JC virus early promoter의 발현을 세포특이적으로 조절하는 silencer의 역할을 하는지 알아보기 위하여 이 sequence를 포함한 oligonucleotide를 probe로 하여 U87MG 및 HeLa 핵 단백질을 이용한 gel-shift assay를 실시하였다. 또한 이 sequence를 herpes simplex virus의 thymidine kinase promoter앞에 연결하여 그 활성을 세포특이적으로 억제하는지를 측정하였다. 그 결과 이 sequence가 세포특이적인 silencer로 작용함을 알 수 있었다. DNA methylation에 의한 JC virus의 전사조절 가능성을 알아보기 위하여 MH1 JC virus early promoter를 SssI methylase로 메틸화한 후 U87MG glioma 세포 및 HeLa 세포에 transfection을 하였을 때 전사가 강하게 억제되는 것을 관찰하였다. 따라서 methylation은 JC virus의 세포특이성을 조절하는 또 하나의 기전으로서 추측된다.

## 실험방법

**세포배양** - U87MG 사람 뇌종양세포, HeLa 자궁경부암세포를

10% fetal bovine serum(Hyclone) 및 penicillin(100 U/ml)/streptomycin(100 µg/ml)를 포함한 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)를 이용하여 배양 및 유지하였다.

**Transient transfection assays** - Transfection은 standard calcium phosphate 방법을 이용하였다.<sup>10)</sup>  $2 \times 10^5$ 의 세포를 4 µg의 reporter plasmid, 1 µg의 RSV-βgal, 다양한 양의 effector plasmid, pUC19 plasmid를 포함한 총 10 µg의 DNA로 transfection하였다. T antigen과 cotransfection하기 위해서는 reporter 유전자의 십분의 일 몰(mole)에 해당하는 양을 사용하였다. Transient transfection에 사용하기 위한 plasmid는 모두 Qiagen column을 이용하여 분리하였다. DNA 침전물간의 transfection 효율의 차이를 보정하기 위하여 reporter 유전자에 의한 luciferase activity를 ONPG assay를 이용한 β-galactosidase activity 또는 총단백질 양을 이용하여 normalize하였다.

**Plasmids** - pMH1long-luc reporter construct는 JC virus large T antigen 유전자의 위쪽에 존재하는 408 bp의 sequence를 firefly luciferase 유전자에 붙인 plasmid이다.<sup>11)</sup> JC virus promoter상의 염기치환을 위하여는 Quickchange PCR-based site-directed mutagenesis kit(Stratagene)를 이용하였다. 이때 pMH1long-luc을 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. Pentanucleotide 및 TATA sequence의 mutant를 만들기 위하여 사용한 oligonucleotide는 전에 기술한 바와 같다.<sup>12)</sup> Pentanucleotide 및 TATA sequence를 포함하는 oligo 2를 single 또는 four copy 형태로 PBLCAT2<sup>13)</sup>의 thymidine kinase promoter 앞에 크로닝하였다. 먼저 oligo 2의 sense 및 antisense strand oligonucleotide(sequence는 아래 EMSA 방법란에서 기술)를 annealing한 후 PAGE gel을 이용하여 double strand oligonucleotide를 분리하고 kination, Klenow filling, ligation을 순차적으로 실시하여 single 또는 four copy에 해당하는 oligonucleotide를 분리한 후 PBLCAT2의 *SaII* site에 크로닝하였다. 위의 plasmid를 sequencing한 후 single 또는 four copy의 oligo 2가 정방향으로 크로닝된 plasmid를 각각 oligo II-M/CAT2, oligo II-T/CAT2라 명명하였으며 transfection에 사용하였다. JC virus의 large T antigen을 발현하는 pJC-T plasmid에 관한 정보는 전에 기술한 바와 같고<sup>13)</sup> 본 실험에서 effector plasmid로 사용하였다.

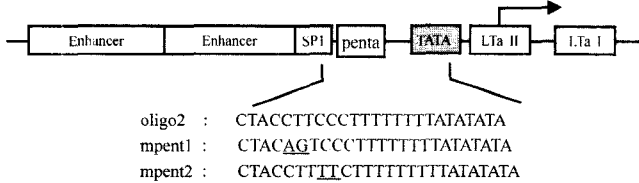
**Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)** - 각 세포로부터 핵 단백질을 Dignam 등이 기술한 방법<sup>15)</sup>에 따라 분리하였다. Oligo 2의 sequence에 해당하는 sense, antisense oligonucleotides는 다음과 같은 sequence로 합성하였다 : 5'-CTACCTTCCCTTTTTTTTATATATA-3'(sense), 5'-TATATA-TAAAAAAGGGAAGGTA-3'(antisense). Competition assay에 사용한 mutant oligonucleotides의 nucleotide sequence는 다음과 같다 : mPent1(5'-CTACAGTCCCTTTTTTTTATATATA-3' and 5'-TATATATAAAAAAAGGGACTGTGA-3'), mPent2 (5'-

CTACCTTTTCTTTTTTTTATATATA-3' and 5'-ATATATA-AAAAGGTA-3'. 그 외 consensus p53 및 AP2 sequence는 전에 기술한 바와 같다.<sup>16,17)</sup> Sense와 antisense oligonucleotides를 annealing한 후 PAGE을 이용하여 double strand oligonucleotide을 분리, 정제하고 T4 DNA kinase를 이용하여 <sup>32</sup>P로 표지화한 후 EMSA에 probe로 사용하였다. 약 30,000~50,000 cpm의 probe와 10~30 µg의 핵 단백질을 이용하여 최종 20 µl의 반응조건으로 EMSA를 실시하였다. 반응액 조성은 다음과 같다 : 12.5% glycerol, 12.5 mM HEPES(pH 7.9) 4 mM Tris-HCl(pH 7.9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 µg의 poly(dI-dC). Competition binding assay를 위해서는 <sup>32</sup>P로 표지화한 probe를 넣기전에 표지화되지 않은 oligonucleotides를 과량으로 넣어 반응을 실시하였다.

**DNA methylation** - pMH1long-luc plasmid에 존재하는 CpC cytosines을 메틸화하기 위하여 SssI methylase(New England Biolabs)를 처리하였다. DNA 1 µg당 1-2 unit의 SssI methylase를 가하여 37°C에서 3-4 시간동안 배양한 후 65°C에서 15분간 methylase를 비활성화시킨 후 에탄올로 DNA를 침전시켰다. Methylation된 DNA를 U87MG 및 HeLa 세포에 transfection한 후 unmethylated DNA에 의한 transcription activity와 비교하였다.

**실험결과 및 고찰**

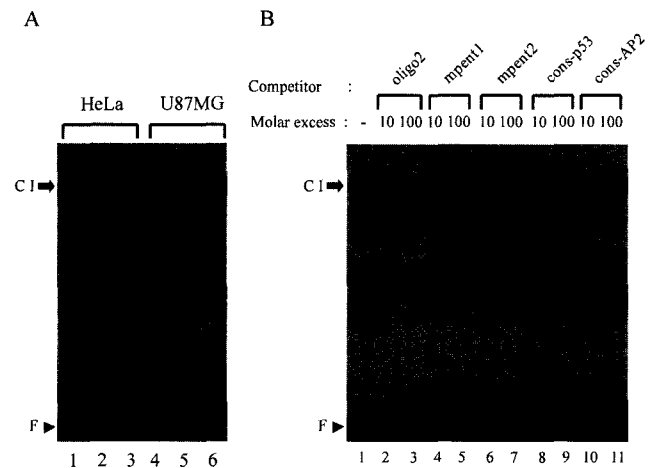
**Pentanucleotide를 포함한 oligo-2 sequence에 결합하는 silencer 후보단백질의 확인** - JC virus promoter는 promoter의 활성을 강하게 해주는데 중요한 역할을 하는 enhancer 부분과 교세포 특이적인 유전자의 발현을 조절하는 proximal promoter 부분으로 나뉜다(Fig. 1). 본 연구자들은 JC virus의 proximal promoter region에 두 개의 T antigen 결합부위가 있음을 확인한 바 있고 large T antigen에 의해 MH1 JC virus early promoter의 전사활성이 HeLa 세포를 포함한 비 교세포(non-glia



**Fig. 1** - Schematic diagram of the MH-1 JC virus early promoter. Enhancer region and proximal promoter region containing Sp1 binding site, pentanucleotide and TATA sequence are indicated. Two T antigen binding sites are also depicted. The arrow indicates the transcription start site. The sequence of the oligo 2 spanning pentanucleotide region is depicted along with its mutant sequences used in this study. The underlines indicate mutated sequences.

cell)에 특이적으로 200~300배 이상 증가함을 보고하였다.<sup>12,14)</sup> 이는 비 교세포에서의 silencer의 존재를 암시해주는 결과라고 볼 수 있다. 또한 basal promoter 부분의 염기치환에 의한 돌연변이 결과 T antigen에 의한 전사활성에 TATA 및 TATA 바로 앞쪽에 존재하는 pentanucleotide sequence가 중요한 역할을 함이 밝혀졌다.<sup>12)</sup>

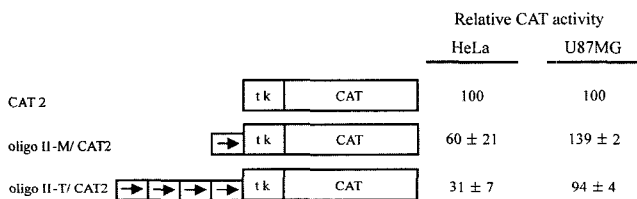
위의 결과들을 토대로 하여 pentanucleotide를 포함하는 sequence가 JC virus의 발현을 세포특이적으로 조절하는 silencer로서 작용을 하는지 알아보기 위하여 이 sequence를 포함한 oligonucleotide(oligo 2로 명명)를 probe로 하여 U87MG 및 HeLa 핵 단백질을 이용한 gel-shift assay를 실시하였다. 동일한 양의 핵 단백질을 사용시 HeLa의 단백질과 결합한 DNA-protein 복합체가 U87MG 단백질과의 복합체 보다 강한 밴드를 보였다(Fig. 2A). 이는 HeLa 세포에 존재하는 silencer protein의 존재를 암시한다고 볼 수 있다. 이 복합체가 oligo 2에 특이적인 것



**Fig. 2** - Oligo 2 containing pentanucleotide sequence interacts with nuclear protein(s) in a cell-specific manner. A, 25 bp oligo 2 formed a complex (CI) with nuclear extracts (20 µg) from HeLa and U87MG cells. Three different batches of HeLa (lanes 1-3)and U87MG (lanes 4-6) nuclear extracts were used for exact comparison of binding. The complex from HeLa cells produced a much stronger signal than that of U87MG cells, indicating that oligo 2 interacts with nuclear proteins in a cell-specific manner. B, CI is a sequence-specific complex. Twenty micrograms of HeLa nuclear extracts were incubated with the radiolabeled oligo 2. We used 10-fold (lanes 2, 4, 6, 8, 10) or 100-fold (lanes 3, 5, 7, 9, 11) molar excesses of indicated cold oligonucleotides for competition. CI was competed by oligo 2 cold oligonucleotide but not by mpent1, p53 or AP2 sequences. By 10-fold molar excess of mpent2, the intensity of CI was not changed and by 100-fold molar excess of mpent 2, CI complex was diminished. Thus, the extent of competition by mpent 2 was rather small compared with that by oligo 2. These results suggest that the complex CI is specific for pentanucleotide sequence. The band below CI is non-specific binding because it was not competed by oligo 2.

인지를 알아보기 위하여 과량의 cold oligonucleotides를 이용하여 competition assay를 실시하였다. 그 결과 자신의 sequence인 oligo 2에 의해서 complex의 형성이 현저하게 감소되거나 소실되었다(Fig. 2B). Pentanucleotide의 앞쪽 또는 뒤쪽의 repeat가 mutation된 oligonucleotide로 competition시 complex의 형성에 변화가 전혀 없거나 약간 감소함을 알 수 있었다. 이는 pentanucleotide가 complex 형성에 직접적으로 관여함을 보여주며 mpent1에서 변화된 첫 번째 pentanucleotide의 CT가 더 중요함을 암시해준다. T antigen은 p53과 복합체를 이루는 것으로 알려져 있는데<sup>17)</sup> oligo 2에 결합한 핵 단백질이 p53인지 알아보기 위하여 consensus p53 sequence를 가지는 oligonucleotide를 competitor로 사용시 변화가 없었다. 또한 p53에 대한 항체를 이용하여 supershift assay를 했을때에도 supershifted band를 형성하지 않았다(data not shown). 이는 후보 silencer 단백질이 p53이 아님을 보여주는 결과이다.

**Single 또는 multiple copy의 oligo-2 sequence에 의한 heterologous promoter의 세포 특이적인 억제효과** – pentanucleotide sequence를 포함한 oligo 2가 세포특이적인 silencer motif로서 역할을 하는지 알아보기 위하여 단일 또는 4개의 oligo 2 sequence를 heterologous thymidine kinase promoter 앞쪽에 붙여 oligo II-M/CAT2, oligo II-T/CAT을 만들었다. 이 plasmid 들을 HeLa 및 U87MG glioma 세포에 transfection하여 그 전사활성을 PBLCAT2와 비교하였다. 그 결과 HeLa 세포에서 oligo II-M 및 oligo II-T/CAT의 전사활성은 CAT2와 비교시 각각 60% 및 30%로 감소하였다(Fig. 3). 반면 U87MG 세포에서는 거의 변화가 없었다. 이 결과는 oligo 2가 세포특이적인 silencer임을 암시하며 특히 이 sequence중의 pentanucleotide가 중요한 역할을 하리라 추정된다. 왜냐하면 oligo

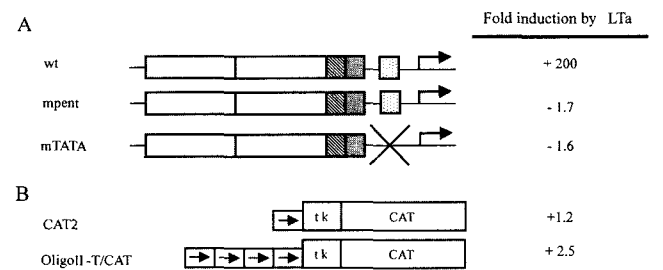


**Fig. 3** – Effect of oligo 2 on the heterologous TK promoter. Left panel: Schematic illustration of reporter gene constructs containing oligo 2. Single or four copies of oligo 2 were subcloned (M, monomer, T, tetramer) in front of the TK promoter. The arrow indicate the orientation of oligo 2. After transfection of these plasmids into HeLa or U87MG cells, the CAT activities driven by each construct were normalized by the β-galactosidase activities and presented as relative values by defining the CAT activity driven by PBLCAT2 as 100 in each cell line. Right panel: The relative values are presented as mean ± SEM values from six to nine independent samples. This experiment was repeated once more in triplicate, using plasmid constructs independently prepared, and resulted in similar patterns.

2의 3' 쪽에 존재하는 polyT tract(8개의 T) 또는 TATA는 전사를 활성화하는 것으로 알려져 있기 때문이다.<sup>12,18)</sup> Pentanucleotide sequence만을 가지는 oligonucleotides가 oligo 2와 동일한 결과를 보인다면 pentanucleotide의 silencer motif로서의 역할에 대한 더 충분한 증거를 제공할 수 있으리라 생각된다. 앞으로 UV crosslinking 또는 human brain cDNA library 검색을 실시하여 pentanucleotide에 결합하는 silencer 단백질을 규명한다면 이 virus의 교세포 특이적인 발현기전을 좀더 명확히 밝힐 수 있으리라 생각된다.

**Large T antigen에 의한 JC virus의 전사활성에 있어서 oligo 2의 역할** – 본 연구자들은 T antigen이 JC virus의 전사를 세포특이적으로 조절하며 pentanucleotide 및 TATA sequence가 중요한 역할을 함을 보고한 바 있다.<sup>12)</sup> 즉 pentanucleotide 또는 TATA가 mutation된 경우 T antigen에 의한 활성화가 소실되는 것을 볼 수 있다(Fig. 4A).

이 motif 단독으로도 T antigen에 의한 활성을 부여하는 지 알아보기 위하여 pentanucleotide 및 TATA sequence를 가지는 oligo II-T/CAT 및 CAT2를 JC virus T antigen expression plasmid와 함께 cotransfection하여 T antigen에 의하여 전사가 활성화되는 지를 비교하였다. 그 결과 T antigen에 의하여 CAT2는 약 1.2배 활성화가 되었고 oligo II-T/CAT는 약 2.5배 활성화가 되었다(Fig. 4B). 이 활성화정도는 T antigen에 의한 JC virus의 full promoter의 200-300 배의 전사활성과 비교시 매우 미약한 수준이다. 따라서 이 결과는 T antigen에 의한 비 교세포 특이적인 활성화에는 여러 cis-regulatory elements 및 transcription



**Fig. 4** – Regulation of JC virus promoter by T antigen. Transfections were performed using 0 or 4 μg of pJC-T/plate into HeLa cells, the cells were harvested 48 h after transfection, and luciferase expression was measured and normalized to protein concentration. Luciferase expression in the presence of T antigen was divided by expression in the absence of T antigen, thus negative values represent -fold repression of the JC virus promoter, whereas positive values represent -fold activation. A & B, Left panel: (panel A) schematic illustration of wild-type MH1 promoter, mutants of pentanucleotide (mpent) or TATA sequence (mTATA). Dotted boxes represent TATA sequences, striped boxes represent Sp1 binding sites and gray boxes represent pentanucleotide sequences. (panel B) PBLCAT2, oligo II-T/CAT2. Right panel: induction fold by T antigen is presented for each construct.

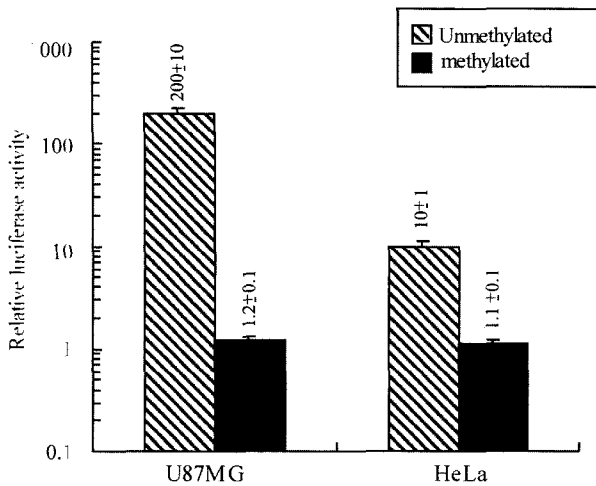


Fig. 5 - Methylation inhibits JC virus early promoter activity. The MH1long-luc plasmid was either methylated at every CpG cytosine residue or mock methylated then transiently transfected into HeLa or U87MG cells. Relative luciferase activity is presented as mean  $\pm$  SEM values from six to eight samples on a logarithmic scale.

factors들의 상호작용이 필요하다는 것을 시사한다고 볼 수 있다.

**DNA methylation에 의한 JC virus의 발현 조절** - Promoter 내에 존재하는 CpG dinucleotides의 cytosine 염기의 methylation은 유전자 발현조절에 관여한다. JC virus promoter의 전사시작점 근처에 세개의 CpG dinucleotides가 존재하는데 이는 methylation을 통해 JC virus promoter가 세포특이적으로 조절될 가능성을 암시해준다. 이에 근거하여 본 실험에서는 MH1 JC virus early promoter를 SssI methylase(1  $\mu$ l)로 *in vitro*에서 methylation한 후 U87MG glioma세포 및 HeLa cell에 transfection하여 그 전사활성을 측정하였다. 이때 대조 실험으로 methylation시키지 않은 DNA를 transfection한 후 전사활성을 비교하였다. 그 결과 methylation을 통하여 U87MG 및 HeLa cell에서 JC virus의 전사활성이 강하게 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 5). JC virus의 basal promoter activity는 HeLa와 비교시 U87MG 세포에서 약 20~30 배 높다. 그러나 methylation된 DNA를 transfection한 후 전사활성이 U87MG 및 HeLa에서 unmethylated DNA에 비하여 각각 200 배, 10 배 감소하여 두 세포에서 거의 비슷한 활성에 도달하였다. U87MG세포에서는 methylation에 의하여 그 전사활성의 감소정도가 HeLa cell과 비교시 약 20배 정도 높았는데 이는 methylation에 의한 JC virus의 세포특이적인 전사조절 가능성을 암시하는 결과라고 볼 수 있다.

**결 론**

JC virus의 뇌교세포 특이적인 조절기전중 silencer에 의한 조절가능성을 밝히기 위하여 silencer로서 가능성이 있는

pentanucleotide sequence를 포함한 oligonucleotide(oligo 2)를 이용하여 HeLa 및 U87MG 핵 단백질을 이용한 gel-shift assay를 실시하였다. 그 결과 oligo 2에 HeLa의 단백질이 U87MG의 단백질보다 더 강한 복합체를 이루는 것을 확인하였다. oligo 2는 heterologous thymidine kinase promoter를 HeLa 세포에서만 특이적으로 억제하였다. 따라서 앞으로 이 silencer motif에 결합하는 단백질을 규명한다면 JC virus에 의해 유도되는 PML, multiple sclerosis을 포함한 다른 교세포 특이적인 질환의 치료에 기여하리라 생각된다. 또한 본실험을 통하여 T antigen에 의한 활성화는 pentanucleotide나 TATA만으로 충분하지 않으며 여러 cis-regulatory elements 및 transcription factors의 상호작용이 중요하리라 하는 것을 추측할 수 있었다. 마지막으로 DNA methylation에 의한 조절가능성을 알아보기 위하여 *in vitro*에서 methylation시킨 JC virus DNA를 transfection시켰을 때 그 전사활성이 저하되는 것을 통하여 methylation도 세포특이적인 JC virus 유전자의 조절기전 중의 하나로 사료된다.

**감사의 말씀**

본 연구는 이화여자대학교 교내연구비(2000-2001)에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

**문 헌**

- 1) Zu Rhein, G. M. and Chou, S.-M. : Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science* **148**, 1477 (1965).
- 2) Bacellar, H., Munoz, A., Miller, E. N., Cohen, B. A., Besley, D., Selens, O. A., Becker, J. T. and McArthur, J. C. : Temporal trends in the incidence of HIV-related neurological diseases. *Neurology* **44**, 1892 (1994).
- 3) Krynska, B., Del Valle, L., Croul, S., Gordon, J., Katsetos, C. D., Carbone, M. and Khalili, K. : Detection of human neurotropic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **28**, 11519 (1999).
- 4) Altschuler, E. L. : Is JC polyoma virus the cause of ulcerative colitis and multiple sclerosis? *Med. Hypotheses* **55**(4), 335 (2000).
- 5) Safak, M., Gallia GL, Khalili, K. : A 23-bp sequence element from human neurotropic JC virus is responsive to NF-kappa B subunits. *Virology* **262**(1), 178 (1999).
- 6) Chowdhury, M., Kundu, M. and Khalili, K. : GA/GC-rich sequence confers Tat responsiveness to human neurotropic virus promoter, JCV<sub>L</sub>, in cells derived from central nervous system. *Oncogene* **8**, 887 (1993).
- 7) Liu, M., Kumar, K. U., Pater, M. M. and Pater, A : Identification

- and characterization of a JC virus pentanucleotide repeat element binding protein: cellular nucleic acid binding protein. *Virus Res.* **68**, 73 (1998).
- 8) Tada, H., Lashgari, M. S. and Khalili, K. : Regulation of JCV<sub>L</sub> promoter function: Evidence that a pentanucleotide silencer repeat sequence AGGGAAGGGA down-regulates transcription of the JC virus late promoter. *Virology* **180**, 327 (1991).
- 9) Boyes, J. and Bird, A. : Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* **11**, 327 (1992).
- 10) Kim, H. S., Hong, S. J., Ledoux, M. S. and Kim, K. S. : Regulation of the tyrosine and dopamine  $\beta$ -hydroxylase genes by the transcription factor AP-2. *J. Neurochem.* **76**, 280 (2000).
- 11) Henson, J. W. : Regulation of the glial-specific JC virus early promoter by the transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.* **269**, 1046 (1994).
- 12) Kim, H. S., Goncalves, N. M., and Henson, J. W. : Glial cell-specific regulation of the JC virus early promoter by large T antigen. *J. Virol.* **74**, 755 (2000).
- 13) Luckow, B. and Schutz, G. : CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5490 (1987).
- 14) Henson, J. W., Schnitker, B. L., Lee, T.-S. and McAllister, J. : Cell-specific activation of the glial-specific JC virus early promoter by large T antigen. *J. Biol. Chem.* **270**, 13240 (1995).
- 15) Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. : Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475 (1983).
- 16) El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. : Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* **1**, 45 (1992).
- 17) Staib, C., Pesch, J., Gerwig, R., Gerber, J.-K., Brehn, U., Stangl, A. and Grummt, F. : p53 inhibits JC virus DNA replication in vivo and interacts with JC virus large T-antigen. *Virology* **219**, 237 (1996).
- 18) Winter, E. and Varshavsky, A. : A DNA binding protein that recognizes oligo(dA)-oligo(dT) tracts, *EMBO J.* **8**, 1867 (1989).