

Human Immunodeficiency Virus-1 Tat 단백질에 의한 인간 CD99 유전자의 조절기전에 대한 연구

이유진 · 김예리 · 이미경 · 이임순*

건국대학교 이과대학 생명과학과

HIV에 감염된 환자의 경우 다양한 종류의 암이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 암종의 높은 발생률의 원인으로, 감염에 의한 면역세포의 감소 및 결핍과 같은 간접적인 이유 뿐 아니라, HIV 바이러스 단백질의 발현이 직접적으로 병의 발생에 관여한다는 보고가 있다. 본 연구에서는 HIV 환자에서 높게 나타나는 암의 발생에 대한 기전을 이해하기 위하여 HIV-1 Tat 유전자와, 다수의 암 발생과 관련이 있는 세포막단백 CD99와의 관계를 규명하였다. 먼저 CD99의 발현에 미치는 Tat의 영향을 알아보기 위하여 HIV-1 Tat 발현 안정화 세포주를 확립하고 Tat 단백질에 의한 CD99 유전자의 발현 양상 변화를 분석하였다. 실험결과 Tat의 발현에 의하여 CD99 유전자의 발현이 활성화되는 것이 관찰되었으며 이와 반대로 STAT3의 발현은 낮아졌다. CD99 프로모터는 CpG 함량이 높기 때문에 Tat 단백질이 DNA 메틸화를 통해서 CD99 유전자의 발현을 조절하는지 확인하기 위하여 methylation specific PCR을 수행하였고 Tat의 발현이 높은 곳에서 특이적으로 CD99 프로모터 부위가 탈메틸화되는 것을 발견하였다. Tat 발현 세포에서만 특이적인 발현 차이를 보이는 유전자 분석을 위한 Differentially Expressed Gene 시스템을 수행한 결과, 변화를 보이는 세 개의 유전자를 발견했으며, Tat에 의하여 fibrillarlin은 억제되는 반면 keratin 17과 collagen, type IV는 증가됨이 확인되었다. 위의 결과는 HIV Tat 단백질이 직접 세포 단백들을 조절하여 암을 발생시킬 수 있다는 보고를 뒷받침한다.

Key words □ CD99 promoter, CpG island, HIV-1-Tat, methylation

Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)은 후천적 면역 결핍증, 곧 에이즈(Acquired immunodeficiency syndrome; AIDS)의 원인 바이러스이다. HIV에 감염된 환자는 다양한 종류의 암이 발생하기 쉬운데, 호지킨림프종 및 비호지킨림프종과 카포시육종과 함께 고환, 항문, 자궁경부에 암이 많이 발생한다(1, 9, 11, 17). 에이즈 환자에서 이러한 암들의 발생률이 높은 원인으로 HIV가 CD4 T 세포와 단핵구세포에 감염하기 때문에 이들 면역세포의 감소를 초래하여 면역결핍상태를 유발시키고 그 결과 여러 가지 감염 및 암이 발생한다는 설명이 우세하다. 특히 에이즈 환자의 카포시육종의 피부 병변에서 이전에 볼 수 없었던 인간 헤르페스 바이러스인 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)의 DNA 분절이 확인되면서 에이즈 환자에 있어 기회감염을 하는 바이러스들에 의한 발암기전이 다수 보고되었다. 그러나 실제 면역세포 감소에 의한 환자의 임상적 변이에 상관없이 사이토카인과 HIV Tat 단백질이 병의 발생에 관여한다는 보고도 다수 발표되었다.

HIV는 T세포의 CD4 수용체를 통하여 감염된 후 역전사를 통해 숙주세포의 핵 안으로 들어가고 숙주세포의 DNA에 삽입된 뒤에 바이러스성 단백질을 만들어내는데, Tat은 Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu 등과 같이, 다른 단순한 레트로바이러스에서는 발견되

지 않고 HIV에서 특이적으로 나타나는 조절 단백질 중의 하나이다(4, 8). Tat은 HIV-1의 LTR에 위치한 Tat-Responsive Element (TAR)와의 상호작용을 통해서 바이러스 유전자들의 전사 및 바이러스 유전체의 복제를 활성화하는 작용을 하는데(19), 이러한 HIV-1의 복제에 필수적인 역할 뿐 아니라 또한 여러 세포의 기능을 변화시키고 감염된 세포로부터 분비되어 주변세포에 이동하여 영향을 끼칠 수 있는 등의 다양한 기능이 점차 밝혀지고 있다(4, 5, 6, 8). Tat 단백질은 bcl-2 유전자의 발현을 유도하여 세포의 사멸을 방해하고 혈관생성 및 암의 생성을 촉진시키며, 또한 피부암과 혈액암의 빈도를 높이는 역할을 하는 것으로 형질전환 마우스에서 보고되었다(3). 1995년에 시작된 일종의 카테일 요법인 고효능 항바이러스 치료법(Highly Active Anti Retroviral Therapy)의 개발로 HIV 환자들은 진단 후 평균 10년 이상을 살 수 있게 되었지만, 이렇게 면역적으로 이상이 없는 장기 에이즈 생존자들에서도 여전히 기회감염 바이러스들에 의한 암 발생률이 높게 유지되고 또한 여타 바이러스 감염이 확인되지 않는 결장 및 직장암의 경우에도 3-4배 증가함을 보이기 때문에, 이러한 장기 생존자의 높은 암발생률은 바이러스 감염 자체에 의한 면역계 세포들의 이상 보다는 HIV Tat 단백질이 원인일 수 있다는 추측이 보고되고 있다(10).

CD99는 인간의 pseudoautosomal MIC2 좌위에 부호화된 32 kDa의 세포표면 단백질로, 미성숙 흉선세포에서 다량으로 표현되는 항원이지만 그 기능에 관해서는 잘 알려지지 않았다. 그러

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-450-4213, Fax: 82-2-3436-5432
E-mail: islee@konkuk.ac.kr

나 최근에 이 단백질이 세포간 유착 현상에 관여할 뿐 아니라 흥선세포의 예정세포사에도 관여한다는 것이 제시되면서 조혈세포의 분화 등 발달 과정에 중요한 단백질로 여겨지고 있다. 특히 CD99항원은 원시신경외배엽종양 및 유잉육종, 위암, 유방암에서 강하게 표현되며 특히 유잉육종의 경우 종양 마커로 사용되고 있어 이들 암종에 있어 발암기전과 밀접한 연관관계가 있을 것이라 추측되고 있다(18).

진핵세포의 유전체에서는 다량의 CpG 섬들이 발견되고 있으며 이 부분의 기능은 메틸화를 통한 유전자 발현의 조절이라고 알려져 있다. 여러 연구에서 유전자 발현에서의 프로모터 서열에 CpG 섬이 존재할 경우 cytosine 메틸화에 의하여 해당 유전자의 발현이 억제되는 현상이 일어나며 이러한 침묵 효과는 다시 프로모터 탈메틸화에 의하여 회복될 수 있음이 보고되었고, 많은 암 관련 유전자들의 프로모터가 메틸화 및 탈메틸화에 의하여 그 발현이 조절이 되고 또한 암의 발생에 영향을 미치고 있음이 알려져 있다(6, 7, 16). CD99의 프로모터에도 CpG이 나타나며 또한 메틸화에 의한 발현이 조절됨이 최근에 보고되었다(12). 그러나 어떤 외부의 조건 변화에 따라 CD99의 발현정도가 조절되는지는 아직 많은 부분 알려지지 않았다.

본 연구에서는 HIV 환자에서 높게 나타나는 암의 발생에 대한 기전을 이해하기 위하여 HIV-1의 Tat 유전자와, 세포막단백으로 다수의 암발생과 관련이 있는 CD99와의 관계를 규명하기 위하여 실험하였고, 그 결과 HeLa 세포주에서 HIV Tat 단백질에 의하여 CD99 단백질의 발현이 증가하였으며 이 과정은 CD99 유전자 프로모터의 탈메틸화와 관련 있음을 관찰하였다.

재료 및 방법

일시적 유전자 도입 및 Dual Luciferase Assay

유전자의 일시적인 발현을 보기 위하여 Calcium Phosphate 유전자 도입 방법을 사용하였다. 6 well 접시의 한 well 당 총 DNA 2 µg과 보정벡터 pRL-SV40 (Promega, Madison, USA)을 200 ng 섞어서 세포에 처리한 후, 유전자 도입 48~72시간 이후에 세포용해액을 만들고 Luminometer (TD-20/20, Turner Designs, Promega)에서 Luciferase 활성을 측정하였다.

Tat 발현 안정화 세포주 확립

안정화 세포주 확립을 위하여 인간 자궁경부 세포인 HeLa 세포에 HIV-1의 Tat을 도입시켰다. pBC12-CMV-Tat DNA를 4.5 µg, G418에 저항성을 갖는 벡터인 pcDNA3.1 (Invitrogen, USA) 0.5 µg, 보정벡터 pRL-SV40 (Promega) 0.1 µg을 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)과 함께 복합체를 만든 후 60 mm 접시 처리하고 45시간 이후 유전자 도입의 확인을 위한 Luciferase 측정을 한 뒤, 각 well을 100 mm 배양용기에 모두 옮기면서 선택항생제인 G418을 0.5 mg/ml로 처리하였다.

면역 항체 반응법(Immunoblotting)

세포 획득 후 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-

Aldrich, USA)로 씻어준 다음, RIPA buffer (Santa Cruz, USA)에 10 mg/ml PMSF, 100 mM Sodium orthovanadate, Protease Inhibitor를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리로 추출물을 얻었다. 단백질은 Bradford법을 이용하여 단백질 정량을 한 후 웨스턴 분석에 사용하였다. CD99, STAT3와 베타 액틴 항원은 각각 DN16 (DiNonA Inc.), sc8019 (Santa Cruz)와 AC40 (Adcam)으로 측정하였다.

Bisulfite modification과 Methylation Specific PCR (MSP)

Genomic DNA 1 µg을 1 N의 NaOH (총 농도 0.2 M)에 넣어 총 50 µl을 만들어 37°C에서 5분 동안 denaturation시켰다. 10 mM hydroquinone (Sigma) (pH 5.0)를 30 µg과 3.5 M sodium bisulfite (Sigma)의 520 µl를 같이 준비하고, 천천히 섞어준 후 16시간 동안 50°C 어두운 곳에서 배양하였다. Modified DNA는 GENCLEAN II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, USA)을 이용하여 분리하고 추출하였다. Modification과 desulfonation을 위하여 상온에서 10분간 NaOH (총 농도 0.3 M)을 처리하고 에탄올 침전법으로 회수하였다. DNA는 TE buffer에 녹여 -20°C에 보관하고, CD99 프로모터 MSP에 50 ng씩 사용하였다. CD99 프로모터 MSP를 위한 primer 제작은 이 외의 논문(12)을 참고하였다.

Genefishing DEG screening

비교 대상 시료간의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자를 알아보는 기술인 Genefishing DEG (Differentially Expressed Gene) program [(주) SeeGene, Korea]을 이용하여 HIV-1 Tat에 의한 유전자 발현차이를 보았다. 안정적 Tat 유전자 발현세포주인 HeLa-Tat과 대조군인 HeLa-LTR을 1×10⁷씩을 각각 배양한 뒤 RNA Kit (QIAGEN)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 이 RNA를 이용하여 역전사를 통한 first-strand cDNA 합성을 하였다. GeneFishing PCR을 하기 위해 cDNA 3 µl, 5 µM ACP primer 2 µl, 10 µM dT-ACP2 1 µl, DW 4 µl, 2× mastermix 10 µl을 처리하여 총 20 µl로 94°C 40초, 65°C 40초, 72°C 40초, 40 cycle로 실행하였다. PCR 확인 결과 발현 차이가 나는 밴드를 확인한 후 direct sequencing을 하기 위하여 differentially expressed bands를 다시 한번 증폭시켜서 젤 상에서 GENCLEAN II Kit (Q-BIO gene)을 이용하여 DNA를 추출하였고, universal primer (5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3')를 사용하여 ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

Tat 발현 안정화 세포주의 확립

CD99의 발현에 미치는 Tat의 영향을 알아보기 위하여, HeLa 세포에 Tat 유전자의 안정화 도입을 통해 14개의 HeLa-Tat 세포주 클론과 대조군인 HeLa-LTR 세포주를 확립하였다. HeLa-LTR은 HIV-1-LTR 부위만을 가지고 있는 세포주로서 Tat 단백질은 합성하지 못한다. 기능을 나타내는 Tat 단백질이 HeLa-Tat 안정화 세

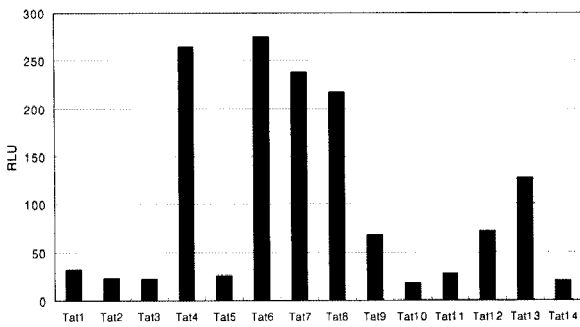


Fig. 1. Establishment of HeLa clones (HeLa-Tat) that are stably expressing HIV-1 Tat. Clones established from single colonies were transiently transfected with a HIV-LTR Luciferase reporter construct. HeLa-Tat4, HeLa-Tat6, HeLa-Tat7, HeLa-Tat8 clones showed high-transactivating Tat activity with the transiently transfected LTR reporter construct. The shown values are the averages of two independent experiments after normalization with the internal control plasmid, pRL-SV40, to avoid clone-to-clone variation in transfection efficiency.

포주들에서 합성되는지 확인하기 위하여 일시적 유전자 도입 방법을 이용하여 HIV-1-LTR-luciferase를 각 안정화 클론 세포주에 처리하고 luciferase 활성도로 분석한 결과 HeLa-Tat4, HeLa-Tat6, HeLa-Tat7, HeLa-Tat8에서 Tat에 의한 HIV-1 LTR의 활성화 정도가 높았으며 HeLa-Tat2, HeLa-Tat3, HeLa-Tat14 등에서는 낮게 관찰되어 HeLa-Tat4, HeLa-Tat6, HeLa-Tat7, HeLa-Tat8에서는 LTR을 활성화 시킬 수 있는 Tat이 다량 합성되는 반면 HeLa-Tat2, HeLa-Tat3, HeLa-Tat14 등에서는 다소 적게 합성됨을 추측할 수 있었다(Fig. 1). 이때 모든 도입효율은 동시 도입한 Ranilla luciferase로 보정하였다.

Tat의 안정된 발현에 의한 CD99 유전자의 활성화

일시적 도입된 HIV-1 LTR을 활성화정도로 안정세포주에서 정상적인 Tat 유전자의 발현을 확인하였으므로 세포내 HIV-1 Tat 단백질에 의한 CD99의 발현 변화를 관찰하기 위하여 Tat이 가장 높게 발현되는 HeLa-Tat4, HeLa-Tat6과 가장 낮게 발현된 HeLa-Tat3, 그리고 대조군들을 이용하여 웨스턴방법으로 Tat의 활성도와 CD99의 발현량의 상관관계를 분석하였다. 그 결과 Tat 유전자가 가장 높게 발현되는 HeLa-Tat4와 HeLa-Tat6에서 CD99가 가장 높게 검출된 반면 낮은 Tat 단백질의 발현을 보인 HeLa-Tat3와 대조군 및 HeLa 세포주는 CD99의 발현량에 변화가 없어 세포내에서 발현된 Tat은 CD99의 발현을 높여 주는데 기여하는 것으로 나타났다(Fig. 2 중간). CD99의 발현량이 암의 발생에 중요한 역할을 하는 호치킨씨 병의 경우 STAT3와 CD99의 발현량은 서로 반비례하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 상관관계는 IM9 등의 세포주들에서도 확인가능하다 (unpublished data, 박 외). Tat의 존재에 의하여 발현이 촉진된 CD99의 과발현에 의하여 STAT3와의 상관관계가 유지되는지 확인하기 위하여 STAT3 단백질의 발현정도를 분석하였다. 이 결과 CD99가 높게 나왔던 HeLa-Tat6에서 STAT3가 낮게 발현되는 것을 발견하였다(Fig. 2 위). 이 결과로 세포 내에서 발현되는 Tat 유전자는 STAT3의 발

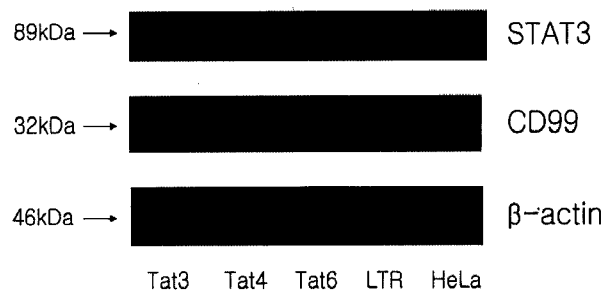


Fig. 2. CD99 is up regulated, but STAT3 is down regulated by endogenous Tat. Cell extracts of stable cell line were analysed by immunoblotting, using antibodies against CD99 and STAT3. β -actin was used as an internal control.

현을 낮추고, CD99의 발현을 높인다고 추측할 수 있다. 대부분 단백질 인산화를 통하여 조절 기능을 하는 STAT3에 있어 발현량이 변화되어 조절되는 현상은 그 중요성에 대하여 연구가 더 필요하다고 사료된다.

Tat에 의한 CD99 유전자 활성 메커니즘

진핵세포에서 CpG의 높은 함유량은 유전체 메틸화를 통해서 유전자 발현을 조절할 수 있기 때문에 매우 중요하다. CpG 메틸화는 DNA Methyltransferase에 의하여 이루어지며(16), 이미 여러 연구에 의해 프로모터 염기서열의 메틸화된 CpG 점들은 유전자 발현을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다(7, 13). CD99 프로모터는 정상 진핵세포 프로모터보다 평균 CpG가 높게 나타난다(Fig. 3A). 이러한 CD99의 높은 CpG 함유량을 고려할 때, HeLa 세포주의 경우 외부에서 도입된 Tat이 CD99 프로모터의 탈메틸화를 유도함으로써 CD99 유전자가 활성화되는지의 여부를 알아보는 것은 흥미롭다. 그러므로 다음 실험에서는, HeLa-Tat에서 관찰된 CD99 고발현이 Tat에 의한 CD99 프로모터의 탈메틸화에 의한 것인지를 확인하기 위해, Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP)을 수행하였다. CD99의 메틸화와 탈메틸화에 특이적인 두 가지의 primer를 사용하였으며 각 클론 세포주의 genomic DNA의 질도 PCR로 확인하였다. 실험 결과, 대조군인 HeLa-LTR 세포주와 Tat이 낮게 발현되는 세포주인 HeLa-Tat3 클론 세포주에서는 메틸화 정도가 높은 것으로 나타난 반면, Tat이 높게 발현되는 HeLa-Tat6에서는 CD99 프로모터가 거의 모두 탈메틸화되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 이 결과는 Tat 유전자에 의하여 CD99가 높게 발현되는 것은 CD99 프로모터 부위의 탈메틸화가 원인임을 부분적으로 암시한다.

Tat 발현 안정화 세포주에서 특이적인 발현 차이를 보이는 유전자들의 분석

위의 실험결과들로 세포내 Tat의 존재가 CD99와 STAT3의 발현을 변화시킨다는 것을 알 수 있었지만 정확한 조절 기전을 알기 위하여 조절의 upstream 혹은 downstream에 존재하는 유전자군에는 어떤 것들이 있는지 분석이 필요하다. 다음 실험에서는

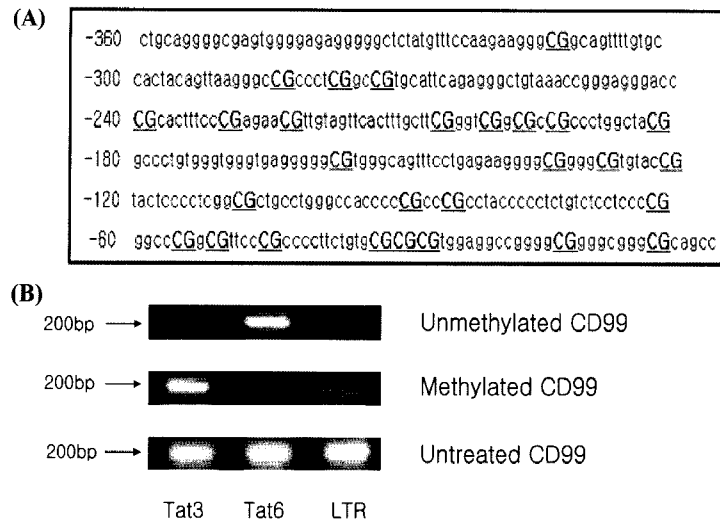


Fig. 3. MSP analysis of stably Tat expressing cell lines. (A) The sense strand sequence of the CD99 promoter is shown, and CpG dinucleotides are denoted as bold and underlined letters. (B) The results of MSP are shown with either unmethyl- or methyl-specific primers. The fragment of 198 bp was detected in the unmethylated CD99 promoter lane of HeLa-Tat6 (the upper panel). The amplified fragment of 205 bp was detected in the HeLa-Tat3 and HeLa-LTR (the middle panel). In all cell lines, the quality of DNA was comparable (the lower panel).

이러한 유전자들을 발굴하기 위하여 세포주 사이에서 특이적인 발현 차이를 보이는 유전자들을 발굴하기 위한 DEG (Differentially Expressed Gene) 시스템을 이용하여 비교 대상 시료간의 mRNA에서 발현차이를 보이는 유전자를 찾아보았다. Tat과 LTR 간의 발현차이를 보기 위해서 HeLa-Tat과 대조군인 HeLa-LTR에서 각각 RNA를 추출하여 사용한 결과, Tat 발현 세포주와 대조군 사이에서 발현 차이를 보이는 밴드가 총 20개의 primer set 중 세 개의 primer set에서 나타났다(Fig. 4). 이 세 밴드가 어떤 유전자의 발현 차이 때문에 생겼는지 확인하기 위해서 밝기에 차이가 나는 DNA를 gel 상에서 추출하여 염기서열 분석을 하고 유사성을 가진 유전자들을 검색하였다. 그 결과 Tat에 의하여 발현이 저하된 것으로 관찰된 GP8 (1번 화살표) 밴드의 경우 Homo sapiens Fibrillarlin (FBL)과 매우 높은 유사성을 보였으며, Tat에 의하여 고발현이 유도된 GP11 (2번 화살표)과 GP14 (3번 화살표)의 밴드들은 각각 Homo sapiens keratin 17

(KRT17)과 Homo sapiens collagen, type IV, alpha 2 (COL4A2)으로 확인되었다. 이미 다른 논문들에서 Tat 단백질의 발현이 콜라겐 유형 IV 등 다수의 세포외기질 단백질 종류의 발현을 유도한다고 발표하였고(14) 이는 본 실험의 결과를 뒷받침한다. 이 연구의 결과로는 Tat 단백질이 먼저 STAT3 유전자를 조절하여 CD99의 발현을 유도하는지 혹은 그 반대로 작용을 하는지는 알 수 없지만 악성 T-림프구세포에서 STAT3의 발현이 DNA methyltransferase 1의 전사를 유도한다는 보고는 전자를 뒷받침하는 결과라 할 수 있다(15, 20). DEG에서 Tat 단백질에 의하여 발현이 저하되는 것으로 발견된 Fibrillarlin의 경우 주로 핵 내에서 발견되며 히스톤을 메틸화하여 전사조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 어쩌면 Tat의 발현으로 히스톤 modification에 변화가 오고 뒤이은 global epigenetic 변화 때문에 CD99 프로모터도 같이 영향을 받아 이로 인하여 STAT3 유전자의 발현이 감소했을 수도 있다. 본 실험에서는 Tat이 발현되는 세포주에서 일어나는 현상을 관찰하였으므로 차후 구체적인 기작을 알기 위해서는 또한 HIV-1 감염세포 및 주변세포에서 일어나는 현상을 세심하게 분석하는 것이 필요할 것이다.

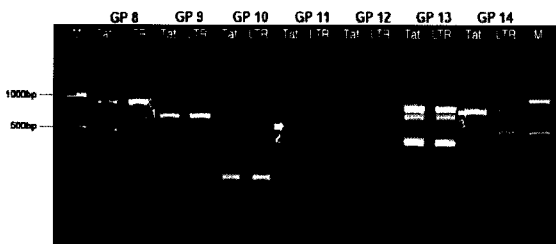


Fig. 4. Analysis of Gene Fishing DEG screening on the agarose gel to detect genes differentially expressed between HeLa-Tat (denoted as Tat) and the control cell line, HIV-LTR (denoted as LTR). Among 20 primer sets, the results of 7 primer sets are shown. There are 2 genes, which display the induced expressions (the right headed arrows, 2 and 3), compared to only 1 gene showing reduced expression (the left headed arrow, 1) in the presence of Tat.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목격기초연구(과제번호 RO4-2003-000-10009-0) 지원으로 수행되었음.

참고 문헌

- Aboulafia, D.M., M. Meneses, S. Ginsberg, M.S. Siegel, W.W. Howard, and B.J. Dezube. 2000. Acute myeloid leukemia in patients infected with HIV-1. *AIDS* 16, 865-876.
- Blazquez, M.V., A. Macho, C. Ortiz, C. Lucena, M. Lopez-

- Cabrera, F. Sanchez-Madrid, and E. Munoz. 1999. Extracellular HIV type 1 Tat protein induces CD69 expression through NF-kB activation : Possible correlation with cell surface Tat-binding proteins. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 15, 1209-1218.
3. Corallini, A., R. Sampaolesi, L. Possati, M. Merlin, P. Bagnarelli, C. Piola, M. Fabris, M.A. Menegatti, S. Talevi, D. Gibellini, R. Rocchetti, A. Caputo, and G. Barbanti-Brodano. 2002. Inhibition of HIV-1 Tat activity correlates with down-regulation of bcl-2 and results in reduction of angiogenesis and oncogenicity. *Virology* 299, 1-7.
 4. Emerman, M., H. Micheal, and M. Malim. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes : Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280, 1880-1884.
 5. Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R.A. Morgan, P. Wingfield, and R.C. Gallo. 1993. Release, uptake, and effects of extracellular Human Immunodeficiency Virus type I Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 67, 277-287.
 6. Evans, T.J., M.G. Jacquemin, and P.J. Farrell. 1995. Efficient EBV superinfection of group 1 Burkitt's lymphoma cells distinguishes requirements for expression of the Cp viral promoter and can activate the EBV productive cycle. *Virology* 206, 866-877.
 7. Farrell, P.J., I. Cludts, and A. Stuhler. 1997. Epstein-Barr virus genes and cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 51, 58-67.
 8. Fittipaldi, A. and M. Giacca. 2005. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57, 597-608.
 9. Goedert, J.J., T.R. Cote, P. Virgo, S.M. Scoppa, D.W. Kingma, M.H. Gail, E.S. Jaffe, and R.J. Biggar. 1998. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 351, 1833-1839.
 10. Huynh, D., E. Vincan, T. Mantamadiotis, D. Purcell, C.K. Chan, and R. Ramsay. 2007. Oncogenic properties of HIV-Tat in colorectal cancer cells. *Curr. HIV Res.* 5, 403-409.
 11. Kadin, M.E. 1994. Pathology of Hodgkin's disease. *Curr. Opin. Oncol.* 6, 456-463.
 12. Lee, M.K., S.H. Park, and I.S. Lee. 2008. DNA methylation dependent regulation of human CD99 expression in HRS cells of Hodgkin's lymphoma. *Korean J. Genetic* 30, 73-82.
 13. Marlo, A. and J.G. Herman. 1995. CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1, 686-692.
 14. McArthur, C.P., Y. Wang, D. Heruth, and S. Gustafson. 2001. Amplification of extracellular matrix and oncogenes in tat-transfected human salivary gland cell lines with expression of laminin, fibronectin, collagens I, III, IV, c-myc and p53. *Arch. Oral Biol.* 46, 545-555.
 15. Brierley, M.M., N. Eleanor, and A. Fish. 2005. STATs : Multifaceted regulators of transcription. *J. Interf. Cytok. Res.* 25, 733-744.
 16. Robert, M.F., S. Morin, N. Beaulieu, F. Gauthier, I.C. Chute, A. Barsalou, and A.R. MacLeod. 2002. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* 33, 61-65.
 17. Serraino, D., P. Pezzotti, M. Dorrucchi, M.B. Alliegro, A. Sinicco, and G. Rezza. 1997. Cancer incidence in a cohort of HIV seroconverters. HIV Italian Seroconversion Study Group. *Cancer* 79, 1004-1008.
 18. Sohn, H.W., E.Y. Choi, S.H. Kim, I.S. Lee, D.H. Chung, U.A. Sung, D.H. Hwang, S.S. Cho, B.H. Jun, J.J. Jang, J.G. Chi, and S.H. Park. 2001. CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the golgi complex to the cell surface. *J. Immunol.* 166, 787-794.
 19. Verhoef, K., M. Tijms, and B. Berkhout. 1997. Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res.* 25, 496-502.
 20. Zhang, Q., H.Y. Wang, A. Woetmann, P.N. Raghunath, N. Odum, and M.A. Wasik. 2006. STAT3 induces transcription of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) gene in malignant T-lymphocytes. *Blood* 108, 1058-1064.

(Received October 20, 2008/Accepted October 28, 2008)

ABSTRACT : Human Immunodeficiency Virus-1 Tat Positively Regulates the Human CD99 Gene via DNA Demethylation

Eugene Lee, Ye Ri Kim, Mi-Kyung Lee, and Im-Soon Lee* (Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea)

HIV affects many organ systems. Patients with HIV infection have substantially increased risk of developing various cancers, primarily by opportunistic infection with oncogenic viruses due to their immunocompromised status. However, extensive evidence also indicates that the viral protein, Tat itself, may play as a major factor in the development of AIDS-related neoplasms. The molecular mechanism underlying Tat's oncogenic activity may include deregulation of cellular genes. Therefore, in this study, we examined the effect of HIV-1 Tat on CD99 as one of the target cellular genes, which is a well-known tumor marker in several cancers. By using established HeLa clones that are stably expressing Tat, we found that CD99 is upregulated by endogenous Tat, whereas STAT3 is down regulated. Upon the screening of genes differentially expressed between Tat-stable cells and the control cells by using the gene fishing technique, DEG, we detected 3 genes which expression is affected by the presence of Tat. Furthermore, the methylation specific PCR analysis of the stably Tat expressing cell lines revealed that the CD99 promoter is demethylated in the presence of Tat. Taken together, these results open a potential role of CD99 in AIDS-related oncogenesis via epigenetic regulation by HIV-1 Tat.