

의학 석사학위 논문

인체중이점막상피세포의 IL-1에 의한
hBD-2 발현증가 유전자조절부위 연구

아주대학교 대학원

의학과

배준호

인체중이점막상피세포의 IL-1에 의한
hBD-2 발현증가 유전자조절부위 연구

지도교수 문 성 균

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아주대학교 대학원

의학과

배준호

배준호의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 기 현 인

심사위원 문 성 균 문

심사위원 정 연 훈 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

인체중이점막상피세포의 IL-1 에 의한 hBD-2 발현증가 유전자조절부위 연구

연구목적: 디펜신(Defensin)은 항균펩타이드의 하나로, 특히 베타 디펜신-2(β defensin-2)는 병원균이나 cytokine 과 같은 염증 자극에 의하여 그 발현이 크게 증가한다. 인체 중이점막 상피세포주 (HMEEC)에서 인터루킨-1 알파 (interleukin-1 α)에 의하여 인체 베타 디펜신-2 (hBD-2)의 발현이 증가되는 것과 이 현상에 Src-dependent Raf MEK1/2 ERK 신호전달경로가 관여하는 것은 보고되어있으므로, 신호전달경로 하위의 전사인자나 그 결합부위가 있는 유전자 조절부위(gene regulatory region)를 조사하여 향후 상위 신호전달물질과의 연계를 연구하는데 발판을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법: Human papilloma virus type16 의 oncogene 인 E6/E7 gene 을 포함하여 만든 정상 인체 중이점막 상피세포주(HMEEC-1)를 이용하였다. hBD-2 유전자의 발현이 염증물질에 의하여 증가하는 것을 알아보기 위해 HMEEC-1 이 70% confluent 일 때 IL-1 α 를 처리하고 total RNA 를 추출하여 c-DNA 로 전환한 뒤 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 시행하였다. 단방향 유전자 절단을 이용하여(unidirectional DNA deletion) vector construct 를 만든 뒤, 전기영동과 염기서열분석을 통해 5' flanking 부위의 크기를 알아내었고 필요한 vector construct 를 충분히 확보하였으며, 각각을 transfection 시킨 뒤, luminometer 를 이용, luciferase 의 활성도를 측정하여 5' flanking 부위의 유전자 조절 기능을 분석하였다.

결과: HMEEC-1 에 IL-1 α 를 처치하였을 때 hBD-2 의 mRNA 발현이 현저히 증가한 반면, 대조 유전자인 β actin 의 발현은 변화가 없었다. IL-1 α 를 처치할 경우 2.7kbp 크기의 hBD-2 5' flanking 부위와 1.1 kb, 0.5 kbp 크기의 hBD-2 5' flanking 부위의 luciferase 발현을 증가시켜 hBD-2 5' flanking 의 크기 별로 유전자 조절 활성화도 비교가 가능하였다. 이와 같은 결과는 hBD-2 의 translation 시작부위보다 상위 2.7kbp 와 1.1kbp 사이 및 상위 0.5kbp 이내 두 곳에 중요한 유전자 조절 부위가 존재함을 의미하였다.

결론: 인체 중이점막 상피세포에서 IL-1 α 에 의한 hBD-2 의 발현증가에 관여하는 유전자 조절부위가 5' flanking 부위에 두 곳이 존재하는 것을 알 수 있었다.

핵심어: 베타 디펜신-2, 유전자 조절 영역, 인터루킨-1, 중이, 면역계

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
A. 세포 배양	3
B. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 IL-1 α 의 효과 측정	3
C. Exonuclease III 를 이용한 단방향 유전자 절단법	4
D. Transfection and luciferase assay	5
III. 결과	6
A. IL-1 α 에 의한 인체 β defensin-2 의 발현증가	6
B. β defensin-2 의 발현증가에 관여하는 유전자 조절 부위	6
IV. 고찰	7
V. 결론	9
참고문헌	15
영문요약	19

그림 차례

Fig. 1. Vector map expressing luciferase with hBD-2 5' flanking region.	10
Fig. 2. A. Schematic diagram of the steps for the progressive unidirectional deletion using exonuclease III.	11
B. Gel electrophoresis demonstrates diverse lengths of the hBD-2 5' flanking region made by the progressive unidirectional deletion.	11
Fig. 3. RT-PCR result showing the effect of IL-1 α on the expression of hBD-2 gene in the HMEEC.	12
Fig. 4. The comparison of the promoter activities in those 2.7kbp, 1.1kbp and 500bp sized 5' flanking regions of hBD-2.	13
Fig. 5. The schematic diagram showing possible enhancers and signal pathways involved in hBD-2 up-regulation by IL-1 α	14

I. 서 론

7 세 이전의 소아 대부분이 1 회 이상의 병력을 갖게 되는(Teele 등, 1989) 급성 중이염은 가장 흔한 어린이 감염 질환 중 하나로서 이관을 통해 비인강의 병원체가 중이강내로 침입하여 숙주의 방어 시스템을 극복하고 염증을 유발시켜 발생한다.(Berman, 1995) 중이강은 다른 기관과 달리 면역세포가 많이 분포하지 않기 때문에 병원체가 침입한 초기 단계에는 적응 면역계(adaptive immunity)보다는 자연 면역계(innate immunity)가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.(Lim DJ 등, 2000) 점막섬모계와 같은 물리적 요소(physical element)와 대식세포와 같은 세포 요소(cellular element) 및 보체(complement)나 항균펩타이드와 같은 작용 요소(effector element)로 구성되어 있는 자연 면역계는 적응면역계가 활성화되기 전 감염의 초기단계에서 병원균을 억제하고 제거하는 기능을 한다. 특히, 작용 요소에는 능동적으로 병원균을 인지하고 항균펩타이드의 생산을 증가시키는 시스템이 있다.(Medzhitov 와 Janeway, 2000)

디펜신(defensin)은 항균펩타이드의 하나로서 특유의 양전위로 병원균의 세포막을 파괴하여 항균효과를 나타낸다. α -defensin 은 주로 호중구 (neutrophil)에서 분비되는 반면, β -defensin 은 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며 특히, β defensin-2 는 병원균이나 cytokine 과 같은 염증 자극에 의하여 그 발현이 크게 증가한다.(Harder 등, 2000) 최근, 인체 중이점막상피세포주(Human Middle Ear Epithelial Cell Line, HMEEC)에서 Interleukin-1 α 에 의하여 인체 β -defensin-2(hBD-2)의 발현이 증가되는 것과 이 현상에 Src-dependent Raf MEK1/2 ERK 신호전달경로가 관여하는 것을 보고한 연구가 있었다.(Moon SK 등, 2002) 그러나, 신호전달경로 하위의 전사인자나 그

결합부위가 있는 유전자 조절부위 (gene regulatory region)에 대한 연구는 아직 부족한 상태이다.

이에 인체 중이점막상피세포주에서 IL-1 α 에 의하여 hBD-2의 발현이 증가할 때 관여하는 유전자 조절부위를 조사하여 향후 상위 신호전달물질과의 연계를 연구하는데 발판을 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 세포 배양

본 실험에는 human papilloma virus type16 의 oncogene 인 E6/E7 gene 을 포함하는 retrovirus 를 이용하여 만든 정상 인체 중이점막 상피세포주(HMEEC-1)를 이용하였다.(Chun YM 등, 2002) HMEEC-1 은 Bronchial Tracheal Epithelial Growth Medium (BEGM, Clonetics, Walkersville, MD, USA)과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)을 1:1 로 혼합하고 bovine pituitary extract ($52 \mu\text{g/ml}$), hydrocortisone ($0.5 \mu\text{g/ml}$), hEGF (0.5ng/ml), epinephrine ($0.5 \mu\text{g/ml}$), transferrin ($10 \mu\text{g/ml}$), insulin ($5 \mu\text{g/ml}$), triiodothyronine ($6.5 \mu\text{g/ml}$), retinoic acid ($0.1 \mu\text{g/ml}$), gentamicin ($50 \mu\text{g/ml}$), amphotericin-B ($50 \mu\text{g/ml}$)를 첨가한 무혈장 배지에서 배양하였다. 일주일에 2 회 배양액을 교환하였고, 37°C 5% CO_2 chamber 에서 배양하였다.

B. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 IL-1 α 의 효과 측정

hBD-2 유전자의 발현이 염증물질에 의하여 증가하는 것을 알아보기 위해 HMEEC-1 이 70% confluent 일 때 IL-1 α (10 ng/ml , Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 3 시간 후에 RNA 분리 kit (RNeasyTM, Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA 를 추출하였다. 추출된 $2 \mu\text{g}$ 의 total RNA 를 Omniscript Reverse Transcriptase kit(Qiagen)의 반응혼합물(dNTP Mix, Oligo-dT primer, RNase inhibitor, Omniscript Reverse Transcriptase)에 첨가하고 Minicycler[®] Peltier Thermal Cycler(MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 37°C 에서 60 분, 94°C 에서 5 분간 역전사해 cDNA 를 합성하였다.

합성된 cDNA 는 Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA) 1unit 과 hBD-2 특정 시발체(forward: 5-ATTCCTGATG CCTCTTCCAG-3'; reverse: 5'-TTGTTCCAGGGAGACCACA-3')를 이용하여 유전자의 특정부위를 증폭하였다. 대조 유전자로 β actin(forward:5'-TACAATGAGCTGCGTGTGG-3';reverse:5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTCG -3')을 이용하였으며 음성 대조군을 위해서 reverse transcriptase 을 처리하지 않았다. 중합효소연쇄반응 과정은 Minicycler® (MJ Research Inc.)를 사용하였고, 초기 변성을 96°C에서 3 분간 실시한 후, 96°C에서 30 초, 55°C에서 30 초, 72°C에서 30 초간을 총 30 cycles 을 실시하고 신전(elongation)은 72°C에서 5 분간 시행하였다. 중합효소연쇄반응 시행 후 결과물을 50 ng/mL ethidium bromide 가 첨가된 1.2% TAE agarose gel 에서 전기영동하여 자외선 하에 관찰하였다.

C. Exonuclease III 를 이용한 단방향 유전자 절단법

hBD-2 유전자의 5' flanking 부위(2,626 bp from -2,625 to +1)를 분리하고 그 양쪽 끝에 specific primer (KpnI tail:5'-GAGGTACCTCCATCCTTTACTGTGATGATGCC-3'; HindIII tail:5'-GAAAGCTTTGGCTGATGGCTGGGAGCTTCACCA-3')를 이용한 PCR tailing 법으로 Hind III 와 Kpn I 의 제한효소 작용부위를 첨가하였다. 중합효소반응 산물을 제한 효소와 ligase 반응을 통하여 pGL3 luciferase reporter plasmid (Promega, Madison, Wisconsin, USA)의 multiple cloning sites 에 삽입하고 염기서열을 확인하였다(Fig. 1). 단방향 유전자 절단법 (unidirectional DNA deletion)을 간단히 기술하면, hBD-2 5' flanking 부위가 subcloning 된 luciferase expressing chimeric

construct 에 Kpn I 과 BstZ1/7I 를 처치하여 luciferase 유전자 쪽은 3' overhang 이, hBD-2 의 5' flanking 쪽은 5' overhang 이 각각 생기도록 한 후, exonuclease III 를 30 초 간격으로 순차적 처치하여 5' overhang 끝 쪽부터 잘려나간 여러 크기의 5' flanking 부위를 갖는 vector construct 를 만든 뒤, S1 nuclease 를 이용하여 남아 있는 단일 가닥의 tail 을 제거하고 ligation 하였다(Fig. 2A). 전기영동과 염기서열분석을 통해 5' flanking 부위의 크기를 알아내었고(Fig. 2B) 필요한 vector construct 를 충분히 확보하였다.

D. Transfection and luciferase assay

HMEEC 세포를 1.5×10^5 개씩 6-well plate 에 각각 배양하여 약 50% confluence 를 이루었을 때 cationic lipid(LT1, PanVera, Madison, WI, USA)를 이용하여 다양한 크기의 vector construct 를 각각 transfection 시켰고, 24 시간 기초 배양액으로 starvation 시킨 뒤 IL-1 α 10 ng/mL 을 처치하였다. 8 시간 incubation 후에 세포를 glycerol 이 포함된 용해완충액으로 용해시킨 후, 세포용해물을 luciferase substrate (Promega)와 혼합한 후 luminometer (PharMingen, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 luciferase 의 활성도를 측정하여 5' flanking 부위의 유전자 조절 기능을 분석하였다.

III. 결 과

A. IL-1 α 에 의한 인체 β defensin-2 의 발현증가

인체 중이 점막 세포주(HMEEC-1)에서 IL-1 에 의한 β defensin-2 발현변화를 알아보기 위하여 세포주가 70% confluent 를 이루었을 때 IL-1 α 10 ng/ml 를 처치하고 3 시간 후에 total RNA 를 추출하여 RT-PCR 를 시행하였다. IL-1 α 를 처치하였을 때 hBD-2 의 mRNA 발현이 현저히 증가한 반면, 대조 유전자인 β actin 의 발현은 변화가 없었다(Fig. 3).

B. β defensin-2 의 발현증가에 관여하는 유전자 조절 부위

다양한 크기로 얻어진 hBD-2 5' flanking 부위를 인체 중이점막 상피세포주에 형질 전환시키고 24 시간의 starvation 후에 IL-1 α 10 ng/ml 를 처치하였다. 8 시간 후에 세포를 용해시키고 luciferase substrate 를 첨가한 후 luciferase 활성도를 측정하였다. 2.7 kbp 크기의 hBD-2 5' flanking 부위는 IL-1 α 를 처치할 경우 luciferase 의 발현을 평균 7.60 ± 1.45 (평균 \pm 표준편차)배 증가시킨 반면, 1.1 kbp 와 0.5 kbp 크기의 hBD-2 5' flanking 부위는 각각 3.81 ± 0.78 및 4.00 ± 0.73 배 증가시켜 hBD-2 5' flanking 의 크기 별로 유전자 조절 활성도를 비교할 수 있었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 hBD-2 의 translation 시작부위보다 상위 2.7 kbp 와 1.1 kbp 사이 및 상위 0.5 kbp 이내 두 곳에 중요한 유전자 조절 부위가 존재함을 의미하였다.

IV. 고 찰

급성 중이염은 이관을 통하여 병원균이 역류하여 중이강에 침입한 후 숙주의 방어막을 극복하고 증식할 때 발생한다. 중이강은 상대적으로 면역세포가 적게 분포하기 때문에 병원균의 침입 초기에는 적응면역계 보다 자연면역계가 중요한 역할을 한다.(Lim 등, 2000) 자연 면역계에는 점막과 같은 물리적 방어막과 대식세포와 같은 세포 및 보체나 디펜신처럼 직접 세균을 공격하는 단백질로 구성되어 있다. 디펜신은 대표적 항균 단백질의 하나로서 강한 양전위를 갖는 10kDa 이하의 작은 펩타이드로 특유의 양전위로 인하여 병원균 세포막의 투과성을 증가시킴으로써 항균 작용을 하며 단백질 구조의 차이에 의해 알파(α)와 베타(β) 디펜신으로 구분된다. 알파 디펜신은 호중구와 소장 및 paneth 세포에서, 베타 디펜신은 피부나 호흡기관의 상피세포에서 분비된다. 이비인후과 영역에서는 고막과 외이도(Boe 등, 1999), 중이(Moon 등, 2002), 비점막(Lee 등, 2002; Kim 등, 2000) 등의 상피세포에서 디펜신의 발현이 보고되었다. 특히 베타 디펜신-2는 베타 디펜신-1보다 수십 배 강력하며 그람 음성균에 보다 선택적으로 작용한다.(Schroder와 Harder, 1999) 또한 베타 디펜신-1은 염증성 자극에 별 영향을 받지 않고 일정하게 발현되는 반면, 베타 디펜신-2는 평소에 최소량이 분비되다가 염증성 자극에 의하여 발현이 크게 증가하여 효과적으로 병원균의 침입에 대처할 수 있다.(O'Neil 등, 2000; Krisanaprakornkit 등, 2000; Becker 등, 2000) 즉, 디펜신을 생성하는 세포의 세포막에는 병원균 특유의 물질(pathogen associated molecular pattern)을 인식하는 수용체(pathogen pattern recognition receptor)가 존재하기 때문에 병원균이 수용체에 결합하면 그 하위의 신호전달시스템이 활성화되어 디펜신 유전자의 발현을 증가시킨다.(Janeway와 Medzhitov 등,

2002) 본 연구를 통하여 인체 중이점막 상피세포에서 IL-1 α 에 의한 베타 디펜신-2의 발현증가에 관여하는 유전자 조절부위가 두 곳에 존재하며 그 중 한 부위는 translation 시작부위의 상위 2.7kbp와 1.1kbp 사이에 위치하며 다른 한 부위는 translation 시작부위의 상위 0.5kbp 이내에 위치하는 것을 알 수 있었다. 상위 0.5kbp 이내에 위치한 유전자 조절 부위는 기존의 연구와 유사한 결과이다. (Diamond 등, 2000) Translation 시작부위 상위 324bp와 294bp 사이에 bovine 베타 디펜신 (TAP: tracheal antimicrobial peptide)의 유전자 조절부위가 위치하며 이 부위에 nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) 전사인자가 결합하는 염기서열이 존재하며 이 부위를 제거할 경우 lipopolysaccharide에 의한 베타 디펜신의 발현증가 현상이 사라진다. hBD 유전자의 경우 TAP 유전자 보다 70bp 하위 (downstream)에 NF-IL6 결합부위가 동일하게 존재하기 때문에 TAP 유전자의 경우처럼 유전자 조절기전에 기여할 것으로 생각된다.

인체 중이점막 상피세포주에서 IL-1 α 에 의하여 베타 디펜신-2의 발현증가에 translation 시작부위의 상위 500bp 이내 이외에 상위 1.1kbp 이상 멀리 떨어진 부위에 강력한 유전자 조절부위가 존재한다는 것은 흥미로운 결과이다. IL-1 α 가 세포의 수용체에 결합하면 src-dependent Raf-MEK1/2-ERK 신호전달경로 단독으로 혹은 다른 신호전달경로와 함께 translation 시작부위의 상위 2.7kbp와 1.1kbp 사이 및 상위 500bp에 존재하는 유전자 조절부위를 각각 또는 동시에 활성화시켜 β defensin-2의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다 (Fig. 5). 향후 src-dependent Raf-MEK1/2-ERK 신호전달경로와 연계된 전사인자의 규명과 전사인자가 결합되는 염기서열의 동정을 통하여 디펜신의 생성을 촉진하여 감염성 질환을 치료하는 약제개발의 기초를 마련할 수 있을 것으로 기대한다.

V. 결 론

인체 중이점막 상피세포에서 IL-1 α 에 의한 hBD-2 의 발현증가에 관여하는 유전자 조절부위가 5' flanking 부위에 두 곳이 존재하는 것을 알 수 있었다. 향후 보다 세밀한 분석을 통하여 정확한 유전자 조절 부위의 규명과 유전자 결합 단백질의 동정을 통하여 hBD-2 의 합성을 증가시키는 약제 개발과 나아가 감염성 질환 치료법의 새로운 방법을 고안할 수 있을 것으로 기대한다.

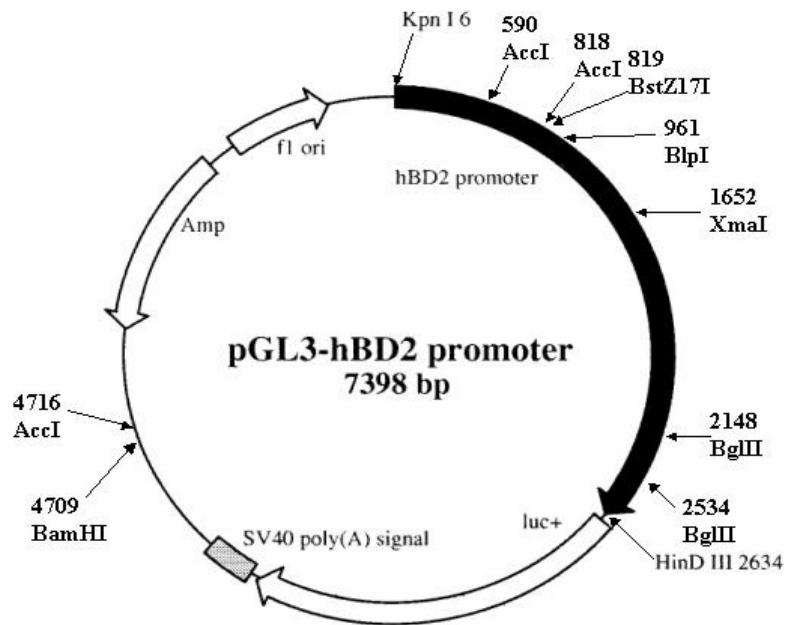


Fig. 1. Vector map expressing luciferase with hBD-2 5' flanking region.

The 5' flanking region (from -2625 to +1) of the hBD-2 gene was isolated and subcloned into the multiple cloning site of the pGL3 luciferase reporter plasmid.

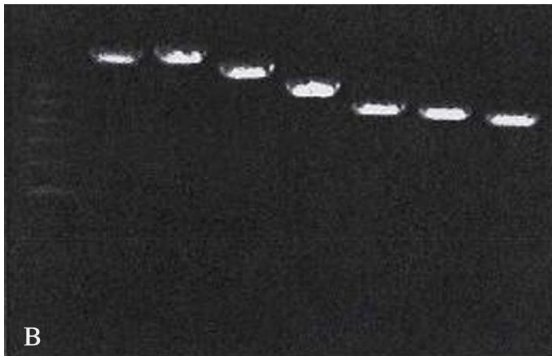
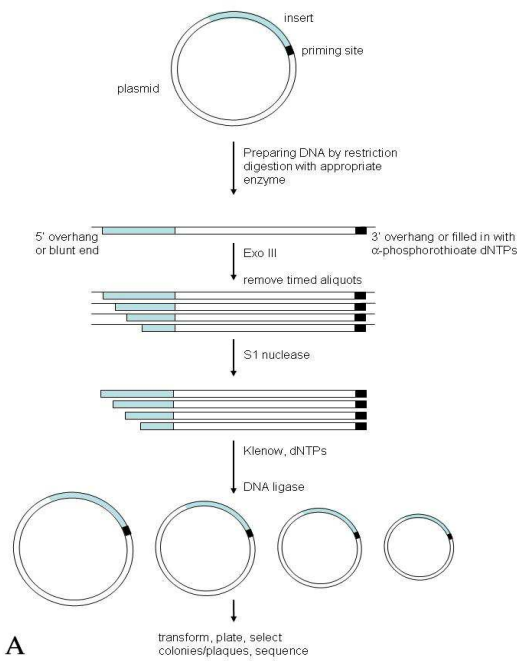


Fig. 2.

A. Schematic diagram of the steps for the progressive unidirectional deletion using exonuclease III.

Exonuclease III digests DNA from a 5' overhang or blunt end, not from a 3' overhang.

B. Gel electrophoresis demonstrates diverse lengths of the hBD-2 5' flanking region made by the progressive unidirectional deletion.

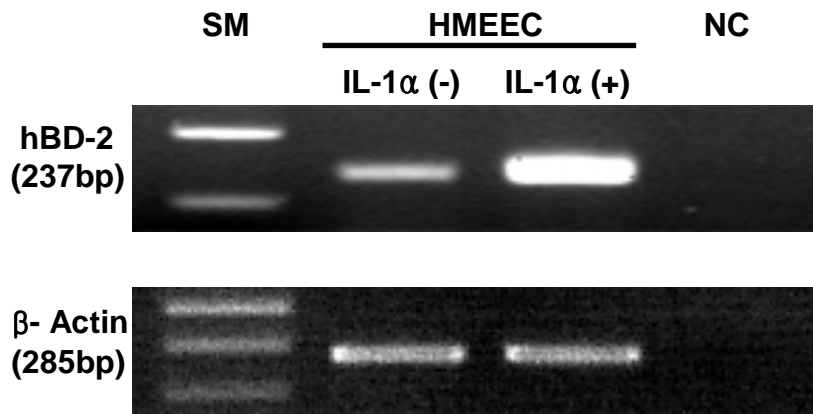


Fig. 3. RT-PCR result showing the effect of IL-1 α on the expression of hBD-2 gene in the HMEEC.

The treatment of IL-1 α (10 ng/ml) up-regulates hBD-2 mRNA expression, not β actin (a house keeping gene). SM : size marker, NC : negative control.

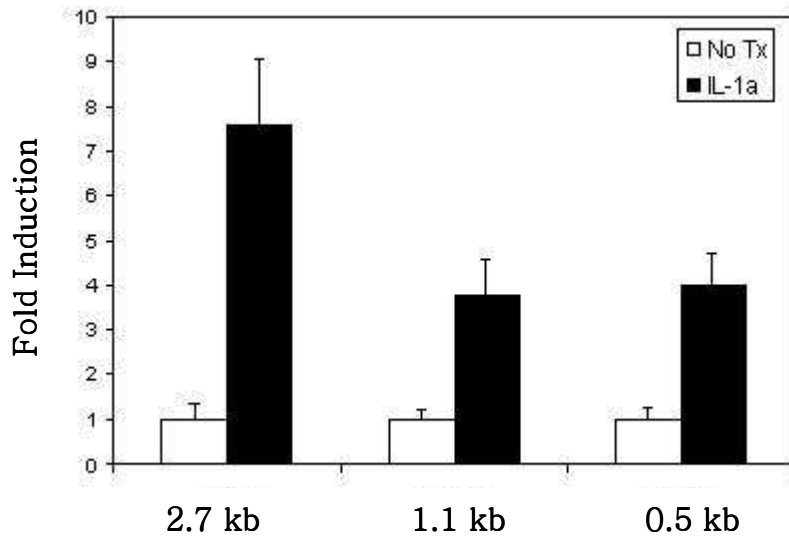


Fig. 4. The comparison of the promoter activities in those 2.7kbp, 1.1kbp and 500bp sized 5' flanking regions of hBD-2.

The treatment of IL-1 α up-regulates the activity of promoter 7.60 ± 1.45 (average \pm standard deviation) folded in 2.7 kpb sized 5' flanking region, 3.81 ± 0.78 folded in 1.1 kbp, and 4.00 ± 0.73 folded in 500 bp, respectively. These results indicate there are two effective gene regulatory regions between 2.7 kbp and 1.1 kbp, and 500 bp upstream of the translation starting point of hBD-2.

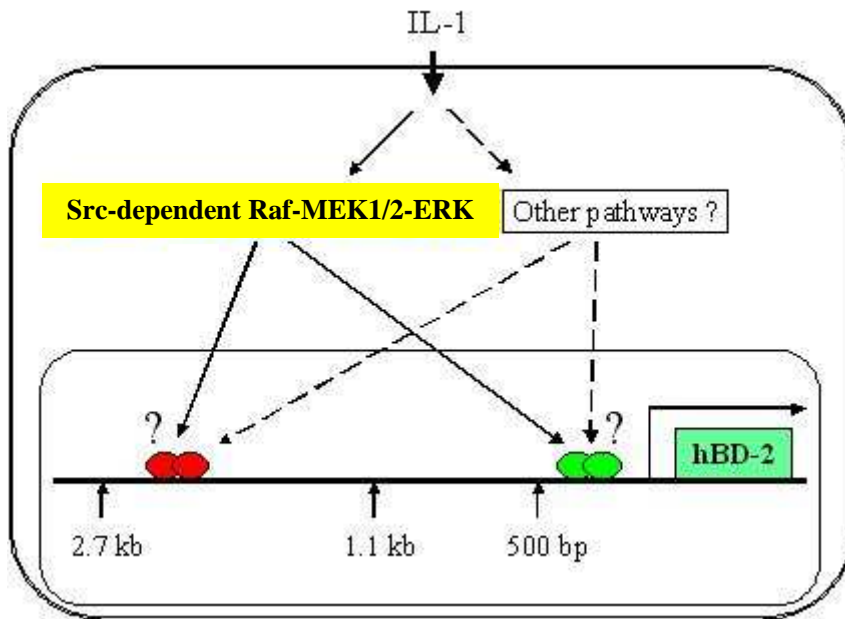


Fig. 5.

The schematic diagram showing possible enhancers and signal pathways involved in hBD-2 up-regulation by IL-1 α .

참 고 문 헌

1. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH: CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 275:29731-29736, 2000
2. Berman S: Otitis media in children. *N Engl J Med* 332:1560-1565, 1995
3. Boe R, Silvola J, Yang J, Moens U, McCray PB Jr, Stenfors LE, Seljfelid R: Human beta-defensin-1 mRNA is transcribed in tympanic membrane and adjacent auditory canal epithelium. *Infect Immun* 67:4843-4846, 1999
4. Chun YM, Moon SK, Lee HY, Webster P, Brackmann DE, Rhim JS, Lim DJ: immortalization of normal adult human middle ear epithelial cells using a retrovirus containing the E6/E7 genes of human papillomavirus type 16 *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 507-517, 2002
5. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL: Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68:113-119, 2000

6. Harder J, Meyer–Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM: Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF–alpha, and IL–1beta, but not IL–6, induce human beta–defensin–2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:714–721, 2000
7. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216, 2002
8. Kim JE, Jeong YJ, Kim JJ, Yoo CK, Lee HM, Lee SH: Expression of antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. *Korean J Otolaryngol* 43:1202–1207, 2000
9. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA: Inducible expression of human beta–defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68:2907–2915, 2000
10. Lee SH, Kim JE, Lim HH, Lee HM, Choi JO: Antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111:135–141, 2002

11. Lim DJ, Chun YM, Lee HY, Moon SK, Chang KH, Li JD, Andalibi A: Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media – a review. *Vaccine* 19 (suppl 1):17–25, 2000
12. Medzhitov R, Janeway C Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338–344, 2000
13. Moon SK, Lee HY, Li JD, Nagura M, Kang SH, Chun YM, Linthicum RF, Ganz T, Andalibi A, Lim DJ: Activation of a Src–dependent Raf–MEK1/2–ERK signaling pathway is required for IL–1alpha–induced upregulation of beta–defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1590:41–51, 2002
14. O'Neil DA, Cole SP, Martin–Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, Kagnoff MF: Regulation of human beta–defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin–1. *Infect Immun* 68:5412–5415, 2000
15. Schroder JM, Harder, J: Human beta–defensin–2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:645–651, 1999

16. Teele DW, Klein JO, Rosner B: Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis* 160: 83–94, 1989

-ABSTRACT-

Gene Regulatory Regions required for β -Defensin-2 Up-regulation by Interleukin-1 α in the Human Middle Ear Epithelial Cell Line

Joon Ho Bae

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Assistant Professor Sung Kyun Moon)

Background and Objectives: In the middle ear, the innate immunity is important because of less immune cell. Among the innate immunities beta-defensin-2 is known to play an important role in the immune function of middle ear. But, it is unclear about signal transduction pathway and gene regulatory region of human beta-defensin-2 (hBD-2).

Materials and Method: The expression of hBD-2 by IL-1 α in HMEEC (Human Middle Ear Epithelial Cell) was detected by RT-PCR. The luciferase-expressing vector containing diverse lengths of the hBD-2 5' flanking region made by the progressive unidirectional deletion was transferred to HMEEC. We analyzed the function of 5' flanking region by luciferase activity measured using luminometer after corresponding substrate was supplemented to the cell lysate.

Results: hBD-2 was upregulated by IL-1 α in HMEEC-1. The treatment of IL-1 α up-regulates the activity of promoter 7.60 ± 1.45 (average \pm standard deviation) folded in 2.7kpb sized 5' flanking region, 3.81 ± 0.78 folded in 1.1kbp, and 4.00 ± 0.73 folded in 500bp, respectively.

Conclusion: These results indicate there are two effective gene regions that regulate hBD-2 expression by IL-1 α between 2.7kbp and 1.1kbp, and 500bp upstream of the translation starting point of hBD-2 in HMEEC-1.

Key words: Beta-defensin-2, Gene regulatory region, Interleukin-1, Middle ear, Immunity