

재조합 단백질 생산에 이용되는 *Pseudomonas fluorescens*의 인체 폐포 상피세포의 염증성 인자들의 발현에 미치는 영향

양현[†] · 류정민^{1†} · 박성환[†] · 최혜진 · 김나연¹ · 조형훈¹ · 안정훈¹ · 문유석^{*}

부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실, ¹한국과학영재학교

Received March 26, 2008 / Accepted March 31, 2008

Effects of *Pseudomonas fluorescens* on Production of Several Inflammatory Mediators in the Human Alveolar Epithelial Cells. Hyun Yang[†], Jung Min Ryoo^{1†}, Seung-Hwan Park[†], Hye-Jin Choi, Na Yeon Kim¹, Hyung Hoon Cho¹, Jung Hoon Ahn¹ and Yuseok Moon^{*}. Department of Microbiology and Immunology, Medical Research Institute, 1-10 Ami-dong, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea, ¹Korea science academy, Busan, Korea - To investigate the molecular mechanism of the airway inflammation by *Pseudomonas fluorescens*, effects on the inflammatory mediators such as interleukin-8 (IL-8), cyclooxygenase-2 (COX-2), macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) were assessed in the human alveolar epithelial cells. Exposure to *P. fluorescens* and its recombinant bacteria suppressed cellular viability in the A549 epithelial cells and pro-inflammatory cytokine interleukin-8 production. However, pro-inflammatory prostaglandin-producing COX-2 protein was not altered by *P. fluorescens* although its mRNA was slightly elevated. As the inhibitory cytokine for the pro-inflammatory mediators, MIC-1 expression was monitored in A549 cells. MIC-1 gene induction was not significantly enhanced but the protein processing was changed by exposure to *P. fluorescens*. Pro-protein form of MIC-1 (~40 kD) was cleaved into active form mature MIC-1 (~15 kD) and propeptide (~28 kD) by the bacteria exposure. MIC-1 activation can contribute to the suppression of cellular viability by *P. fluorescens* and can retard IL-8-induced monocyte recruitment. However, sustained activation of MIC-1 can mediate the tissue injury by *P. fluorescens* exposure.

Key words : *Pseudomonas fluorescens*, airway inflammation, macrophage inhibitory cytokine 1, interleukin-8, cyclooxygenase-2

서 론

슈도모나스(*Pseudomonas*)는 자연계에 널리 존재하는 미생물로서 인체에 감염을 일으키며 음식을 부패 시키고 식물을 감염시키는 병원성 균이지만 단백질 생산능력이 뛰어나 유용 단백질을 생산하는 단백질 생산 공장(protein production factory)으로 각광을 받고 있는 미생물이다. 재조합 단백질의 생산에 있어 가장 많이 이용되는 원핵세포로서 대장균 외에 *P. fluorescens*를 이용되고 있고 생물학적 오염 생물복원(bioremediation)이나 생물센서 등의 여러 생물공학 응용분야에서 사용되어 있으며 수산양식분야에서는 본 미생물이 어류의 장내 정상균 무리에 있어서의 Probiotic 작용에 의하여 어류병리에서는 긍정적인 역할을 한다는 보고도 있다[11,14]. 광범위한 본 균의 이용과는 상반적으로 *P. fluorescens*는 공기 중에 존재하며 폐렴과 같은 호흡기 질환을 일으킬 수 있는 기회감염 균(opportunistic pathogen)으로 분류된다 [20,21]. 또한 초항원(superantigen)으로 작용하여 기회

감염적인 크론병과 같은 염증성 장 질환(Inflammatory bowel disease, IBD)을 유발할 수 있다[6,24]. 최근 미국립 환경보건과학연구소(NIEHS) 보고에 따르면 실내 대기 환경에서 존재하는 본 세균에 대한 평가 결과 인체의 단핵구에서 염증 작용을 유발 할 수 있는 가능성을 제시하였다[13,15]. 본 연구는 재조합 미생물로서의 이용에 앞서 우선적으로 공기 중 세균 노출에 대한 최전선으로서의 인체 상피세포에 대한 선천면역적인 인자들을 분석하고자 한다.

상피세포의 대표적 염증성 인자로서의 chemokine 중 일반적 마커로서 모니터링 되는 인터루킨 8(interleukin-8, IL-8)은 초기 염증작용에서 중성구의 recruitment, 케양조직에서의 상피세포의 증식 항진 등의 다양한 기능을 수행한다. 특히 상피조직의 정상균 무리 및 다양한 외부 독성물질에 의해 유도되며, 특히 세균에 대해서는 주로 패턴인식 수용체인 toll like receptor (TLR) 및 NOD에 의한 NF- κ B 전사인자를 통한 조절이 주경로로 알려져 있다. 이외에도 최근에는 C/EBP homologous protein (CHOP), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-g) 등의 다양한 전사인자에 의한 NF- κ B 독립적인 경로들이 알려지고 있다 [5,19,23]. 또한, 염증성 지질 인자로서 프로스타글란딘의 생성에 핵심적인 역할을 하는 cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7711, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : moon@pusan.ac.kr

[†]세 저자는 본 논문에 동일하게 기여하였음.

자 발현 또한 상피조직의 정상군 무리 및 다양한 외부 독성 물질에 유도되며[18, 26], 특히 세균에 대해서는 주로 패턴인식 수용체를 통한 NF- κ B 조절이 주 경로로 알려져 있다.

세포의 사멸 및 세포증식에 관련된 억제성 및 항염증성 사이토카인으로서 macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1)은 분비형 사이토카인의 형태로서 일반적으로 tumor growth factor beta (TGF- β) superfamily의 일종으로서 placental transforming growth factor-beta, prostate-derived factor, NSAID-activated gene 1, placental bone morphogenetic factor로도 불리어진다. MIC-1의 발현은 특히 상피조직 세포에서의 세포사멸 및 세포주기의 억제를 매개하며 특히 Sp1, Sp3, COUP-TF1, p53에 의하여 전사가 촉진되어 진다. 특히 p53에 대하여 의존적 또는 비 의존적으로 유도되며 세포증식 억제 인자로서 작용하며 몇 가지 암조직과 종양세포에서 down-regulation되어 있다[1,25]. 특이적으로 염증 및 상피성 케양손상에서 분비되는 염증성 사이토카인에 대해서는 억제성 인자로서 작용하여 염증의 resolution에서 핵심적인 역할을 수행하지만 조직에서의 정상 구성세포에 대한 손상을 가하기도 한다[16,27].

본 연구는 재조합 단백질 생산에 흔히 사용되는 *P. fluorescens*에 대한 공기 중 노출 시 염증작용이 의심되는 기전을 분석하기 위하여 인체 폐포 상피세포에서의 염증성 인자들 특히 IL-8, COX-2, MIC-1의 발현을 분석하고자 한다. 즉, 항진성 염증인자로서 IL-8 및 COX-2를 분석하며, 염증 억제성 및 세포증식 억제 인자로서 MIC-1의 조절을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양, 유전자 및 시약

A549 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구매하여 RPMI 1640 media (10% FBS, 50 unit/ml penicillin (Sigma, St. Louis, MO)), 50 mg/ml streptomycin (Sigma)에 5% CO₂ humidified incubator 37°C에서 배양하였다. 세포수와 생존활성(viability)은 trypan blue (Sigma) dye exclusion을 이용해서 hemacytometer 상에서 측정하였다. 화합물 노출 실험 중에는 혈청이 없는 배지를 이용하였다. 저해제 등은 Calbiochem (EMD biosciences, Inc. La Jolla, CA)에서 구매하였다.

Western Immunoblot Analysis

Cell lysate는 RIPA buffer (1× PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 mg/ml PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma))로 준비하고 2-3초 정도의 sonication 후 lysate protein은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용해서 정량하였다. 각각 50 mg 단백질을 소형 전기 영동기를 이용해

서 분리한 후 단백질을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 이동하였다. 블롯은 1시간 동안 5% skim milk Tris-buffered saline plus Tween 0.05% (TBST)로 blocking 후 각각의 일차항체로 2시간 상온에서 반응 후 3회 TBST로 세척 후 horseradish-conjugated secondary antibody로 1시간 상온 반응 후 3회 세척 후 ECL Chemiluminescent substrate (Amersham Pharmacia Biotech)로 발색 현상하였다. 각 일차항체는 rabbit polyclonal anti-human Actin antibody (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 토끼 polyclonal anti-p-MAPKs, anti-Egr-1 항체 (Cell signaling technology, Beverly, MA)를 사용하였다.

Transient / stable transfection

세포는 Trans-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI)를 이용해서 제조자 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. Luciferase reporter gene의 transfection을 위해서 각 well 당 1.5 mg firefly luciferase reporter plasmid와 0.15 mg renilla luciferase, pRL-null vector (Promega, Madison, WI)를 4.5 ml Trans-LT1 reagent에 혼합하여 6 well culture plate에 처리하였다. Transfection 후 24시간 뒤 세포는 화합물에 24시간 노출하였다. Firefly 와 대조구인 renilla luciferase를 동시에 transfection 하는 Dual-luciferase reporter assay system (Promega)을 이용해서 정량하였다. 모든 transfection 효율은 50내지 60%정도를 유지하였고 이 효율은 pMX enhanced GFP vector를 이용해서 transfection 후 동시에 확인하였다. Stable cell lines을 추가로 만들기 위하여 48시간 뒤 1,000 mg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로서 선별을 가하였다. 선별은 monolayer colonies가 형성 될 때까지 하며 안정된 transfectants는 500 mg/ml G418의 일반 배양액에서 유지한다.

Luciferase Assay

세포는 차가운 PBS로 세척 후 수동 분해 버퍼(Promega)로 분해물을 준비하였다. 12,000× g에서 4분간 원심분리 후 상층 효소액을 assay에 이용하였다. 상층액은 이후 실험을 위해서 -80°C에 보관하였다. Luciferase activity는 dual-mode luminometer (Model TD-20/20, Turner Designs Co., Sunnyvale, CA)를 이용해서 측정하였다. Firefly luciferase activity은 renilla luciferase activity에 대해서 일반화하였고 활성은 다음의 상대치로 표시하였다(firefly luciferase activity/renilla luciferase activity).

세포활성 측정(MTS assay)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)을 이용하여 발색반응을 분석 하였다. 세포주 (2×10^4 /well)를 96-well

plat에서 화합물을 처리 하였고 처리 시간이 경과한 후 각 well 당 50 ml MTS를 투입하여 2시간 반응 시킨 후 배지를 버려내고 각 well에 DMSO 100 ml을 넣고 20분간 반응 시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA는 RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA)를 통해서 분리하였다. 추출된 RNA (100 ng)을 역전사효소를 이용해서 cDNA로 전환하였다. BD Sprint PowerScript (Clontech, Mountain View, CA). 유전자 증폭은 Takara HS ExTaq DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 이용하여 Mycycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)에서 아래의 조건에서 시행하였다. 즉, 94°C, 2분 및 denaturation (98°C, 10 sec), annealing (59°C, 30 sec), elongation (72°C, 45 sec)에서 25회를 실시하였다. PCR product는 1.2% (w/v) agarose gel에서 확인하였다.

통계처리

데이터는 SigmaStat for windows (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA)를 이용해서 분석하였다. 두 그룹의 데이터 비교는 Student's *t* test를 하였고, multiple groups 비교는 ANOVA를 실시한다.

결과 및 고찰

P. fluorescens (PF)에 의한 인체 폐포 상피세포 A549에서의 세포 생존률(viability)에 대한 영향

균주 *P. fluorescens* 및 식품공정에서 사용되는 lipase 재조합 *P. fluorescens* (PF-lipase)에 대한 세포증식억제효과를 MTS assay를 이용하여 분석하였다. A549 세포의 개수에 대해 10배에서 100배의 PF 및 재조합 PF-lipase를 처리 시 세포의 증식이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1). 하지만, 원균주 PF와 재조합형 PF-lipase 사이에는 세포 생존율의 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 실제 예비 실험상에서 비병원성 대장균 DH5a를 높은 농도로 인체세포에 처리 시에도 viability가 소량 감소되는 것으로 보아(데이터 제시 없음), 세포 생존율에 대한 감소효과는 세균에 대해 병원성과는 상관없는 비 특이적인 작용의 가능성도 있음을 다양한 연구들에서도 이미 밝혀지고 있다[3,12,17]. 이후 상피세포의 생존율 외에 염증성 인자에 대한 발현 분석을 요구되어 아래에서 진행하게 되었다.

P. fluorescens (PF)에 의한 인체 폐포 상피세포의 인터루킨 8에 대한 영향

일반적으로 점막상피세포의 염증성 사이토카인으로서 대

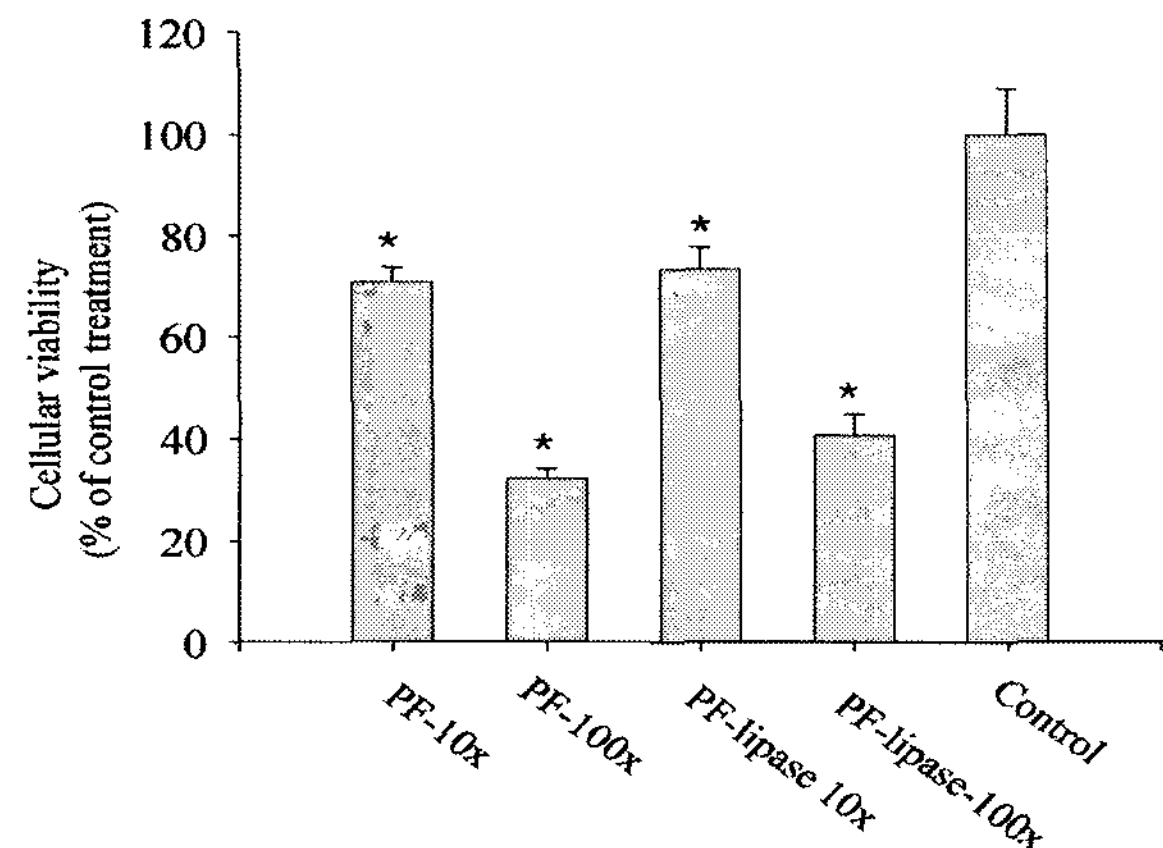


Fig. 1. Effects of PF and recombinant PF on cellular viability of A549 cells. Each number of bacteria per that of A549 (0, 10, or 100 times) was co-cultured for 4 hr and then replaced with complete media for 20 hr to run the MTS assay. "*" means the significant difference from the control group ($p < 0.05$). The present data was the representative of three independent experiments.

표적인 인터루킨 8의 발현에 대해서 평가 하였다. 균주 *P. fluorescens* 및 식품공정에서 사용되는 lipase 재조합 균주 PF-lipase 및 lipase 분비를 원활하게 하기 위하여 ABC transporter 유전자를 함께 발현하는 PF-lipase-ABC 균주를 모두 폐포 상피세포에 처리하여 IL-8의 분비를 분석하였을 때, 모든 균주에서 진핵세포 대비 세균세포숫자 의존적으로 생성량이 증대되었다(Fig. 2A). 유전자의 발현이 전사활성의 증대로 인하여 기인되었는지를 판별하기 위해서 인체 IL-8 promoter 유전자를 가진 luciferase 리포터 발현세포를 분석하였지만 표준균주 *P. fluorescens*에 의하여 IL-8의 유의성 있는 변화가 없는 것으로 보아, 균주에 의한 직접적인 IL-8 유전자의 전사 조절 이외의 기전으로 사료된다. Post-transcription 기전으로서 IL-8 mRNA의 안정성이 향진 될 수 있다고 알려지고 있으며[22], 많은 보고에서 슈도모나스 균주의 염증 향진 작용이 nitric oxide, 균주 DNA, Quorum sensing 관련물질 등 이차적인 물질에 의한 간접적인 작용의 가능성을 예상 하고 있기에 향후 본 연구에서 심도 있는 기전 연구가 요구 된다[7,8,22].

P. fluorescens (PF)에 의한 인체 폐포 상피세포의 COX-2에 대한 영향

일반적으로 점막상피세포의 염증성 프로스타글란딘 생성에서 핵심적인 역할을 하는 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 조절에 대해 평가하였다. 특히 폐 상피에서의 프로스타글란딘 대사체의 다양한 염증관련 작용과 COX-2발현이 병리기전을 설명하는데 매우 중요함을 말해준다. 균주 *P. fluorescens*에 의하여 COX-2의 mRNA 발현이 소량 증진되었으나 실제 단백질의 양 및 전사의 변화는 없었다(Fig. 3). 결국, mRNA의

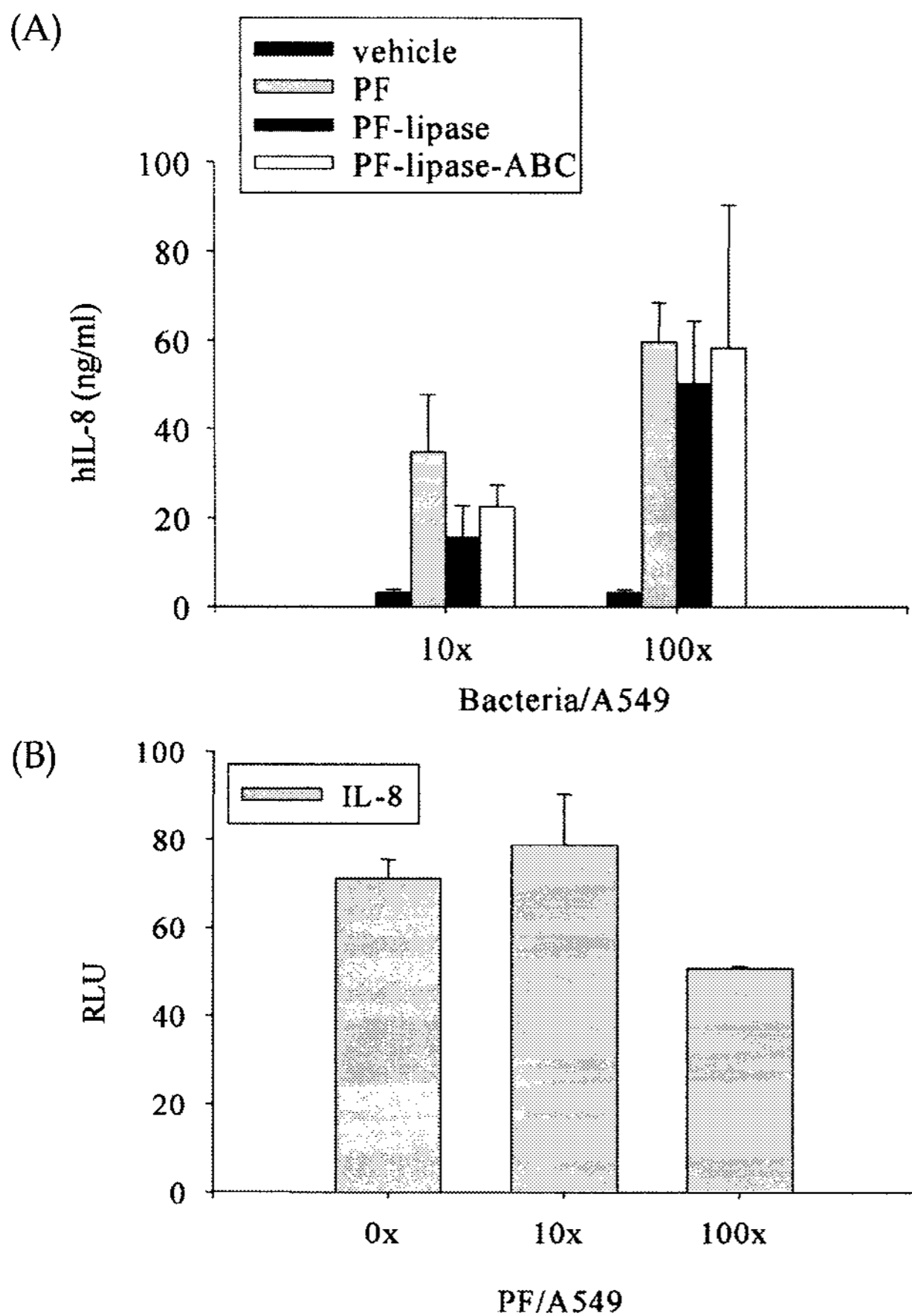


Fig. 2. Analysis of IL-8 secretion and expression by PF. (A) Each of PF, PF-lipase, or PF-lipase-ABC bacteria was co-cultured with A549 for 4 hr at the ratio of 0, 10, or 100 times of human cells and the culture media was analyzed for human IL-8. (B) A549 cells were transfected with human IL-8 promoter luciferase vector and then at the next day, PF was applied at the ratio per human cells (0, 10, or 100 times) for 4 hr to measure luciferase activity. The present data was the representative of three independent experiments.

증가는 안정성(stability)의 증가나 간접적인 요인에 의하여 소량 증대 되었으나 단백질의 양적 변화는 대조구와 차이가 없었다. 따라서 많은 종류의 병원성 슈도모나스에서 보이는 COX-2 발현의 증대와 염증성 프로스타글란딘 E2의 생성이 본 균주에 의해서는 연관성이 적은 것으로 보이며[7,8,22], 본 실험에서 사용된 균주 *P. fluorescens* 에 의한 염증 작용은 IL-8이 분비가 촉진됨에도 불구하고 프로스타글란딘과 관련이 적은 비교적 미약한 초기 염증반응과 관련될 것으로 사료된다.

***P. fluorescens* (PF)에 의한 인체 폐포 상피세포의 MIC-1에 대한 영향**

일반적으로 단핵구의 염증성 사이토카인 생성에 대하여

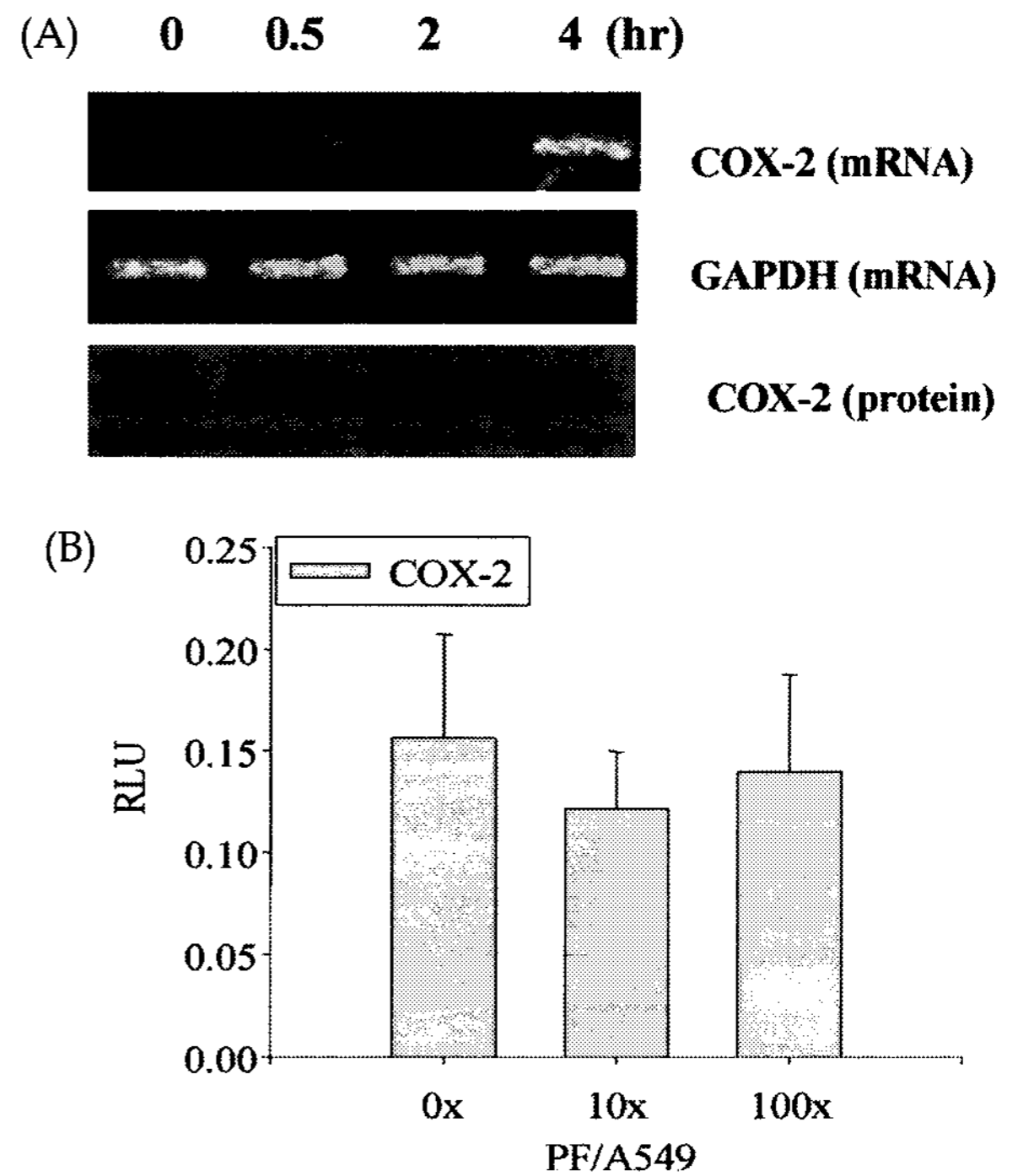


Fig. 3. Analysis of COX-2 expression by PF. (A) Each of PF, PF-lipase, or PF-lipase-ABC bacteria was co-cultured with A549 for 4 hr at the ratio of 100 times of human cells and the cellular lysate was analyzed for human COX-2protein and mRNA. (B) A549 cells were transfected with human COX-2 promoter luciferase vector and then at the next day, PF was applied at the ratio per human cells (0, 10, or 100 times) for 4 hr to measure luciferase activity. The present data was the representative of three independent experiments.

조직은 염증의 resolution 측면에서 macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1)을 분비하여 염증을 억제한다. 본 연구에서 MIC-1의 발현에 대해서 측정결과 유전자의 발현이 증대되는 효과는 미비하였다. 인체 MIC-1 promoter의 luciferase 리포터를 이용하여 관찰결과 PF에 의한 전사능의 유의성 있는 변화는 없었고(Fig. 4C), RNA의 변화양도 거의 없었다(Fig. 4B). 균주에 의한 상피세포 내 MIC-1 유전자의 발현은 미비하였으나, MIC-1 단백질의 processing에서 큰 변화가 보였다. 일반적으로 proform의 MIC-1 (proMIC-1, ~40 kD)으로 생성되나, 생체내의 pro-protein convertase 등에 의하여 propeptide (~28 kD) 및 mature MIC-1 (~15 kD)로 분해되어 활성화 된다[4,10]. 본 연구에서는 균주 *P. fluorescens*에 의하여 MIC-1의 단백질활성화가 증대되었다(Fig. 4A). 즉 전사 등의 유전자 발현은 크게 증대되지 않았으나, 단백질의 활성화가 증대되었다. 특히 상피세포에서의 MIC-1의 증대는 세포주기 S phase를 arrest 시키거나 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있다[1,2,9]. 본 연구에서 보이는 *P. fluorescens*에 의한 세포주기 억제나 apoptosis에 의하여 세포

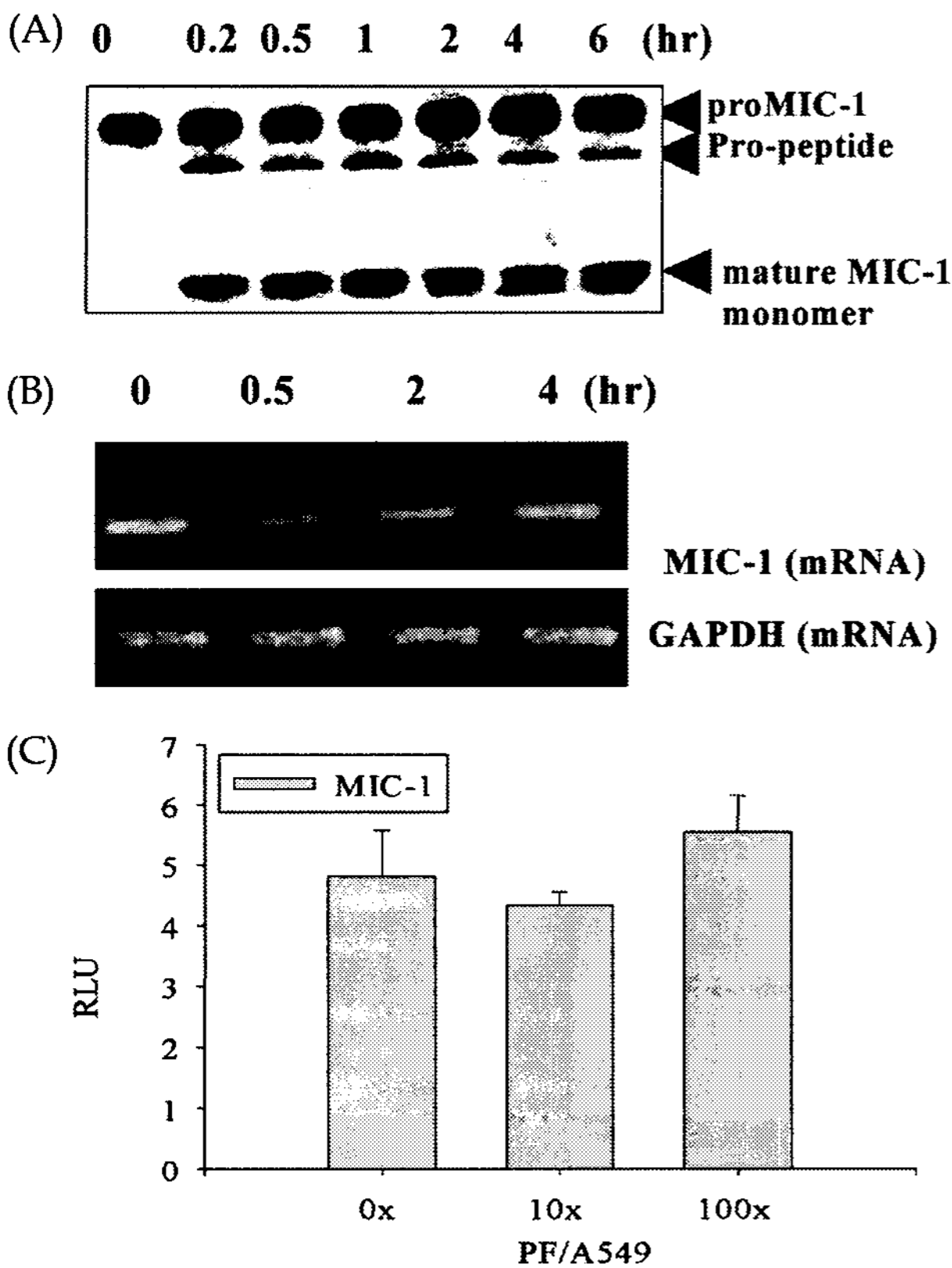


Fig. 4. Analysis of MIC-1 expression by PF. (A, B) Each of PF, PF-lipase, or PF-lipase-ABC bacteria was co-cultured with A549 for 4 hr at the ratio of 100 times of human cells and the cellular lysate was analyzed for human MIC-1 protein and mRNA. (C) A549 cells were transfected with human MIC-1 promoter luciferase vector and then at the next day, PF was applied at the ratio per human cells (0, 10, or 100 times) for 4 hr to measure MIC-1 luciferase activity. The present data was the representative of three independent experiments.

생존을 억제작용에도 기여할 것으로 예측 된다(Fig. 5 예상 작용 모식도 참조). 이와 함께 MIC-1의 염증구의 recruitment 억제작용은 초기 chemokine IL-8에 의한 기능을 억제할 수 있어 염증의 억제 및 조직의 항상성을 유지할 수 있다. 하지만 MIC-1의 활성이 과도하고 지속적으로 나타날 경우 조직의 손상도 가능할 수가 있다. 따라서 본 연구는 향후 동물 실험 등을 통하여 실제 lung inflammation 모델을 통하여 위의 IL-8, MIC-1의 기능 및 균형 상호작용을 명확하게 밝힐 수가 있다. 본 연구를 통하여 실제 재조합 단백질 생산에 흔히 이용되는 *P. fluorescens* 균주에 대하여 호흡기 상피세포를 이용한 기내 독성기전의 모델로서 설명하고자 하였다. 본 연구를 통하여 염증 및 세포증식 억제 등의 측면에서 분명하게 영향을 미치고 있었기에 본 균주의 안전성에 대한 다양한 연구적인 접근을 통하여 위해성 평가가 향후 요구되어 진다.

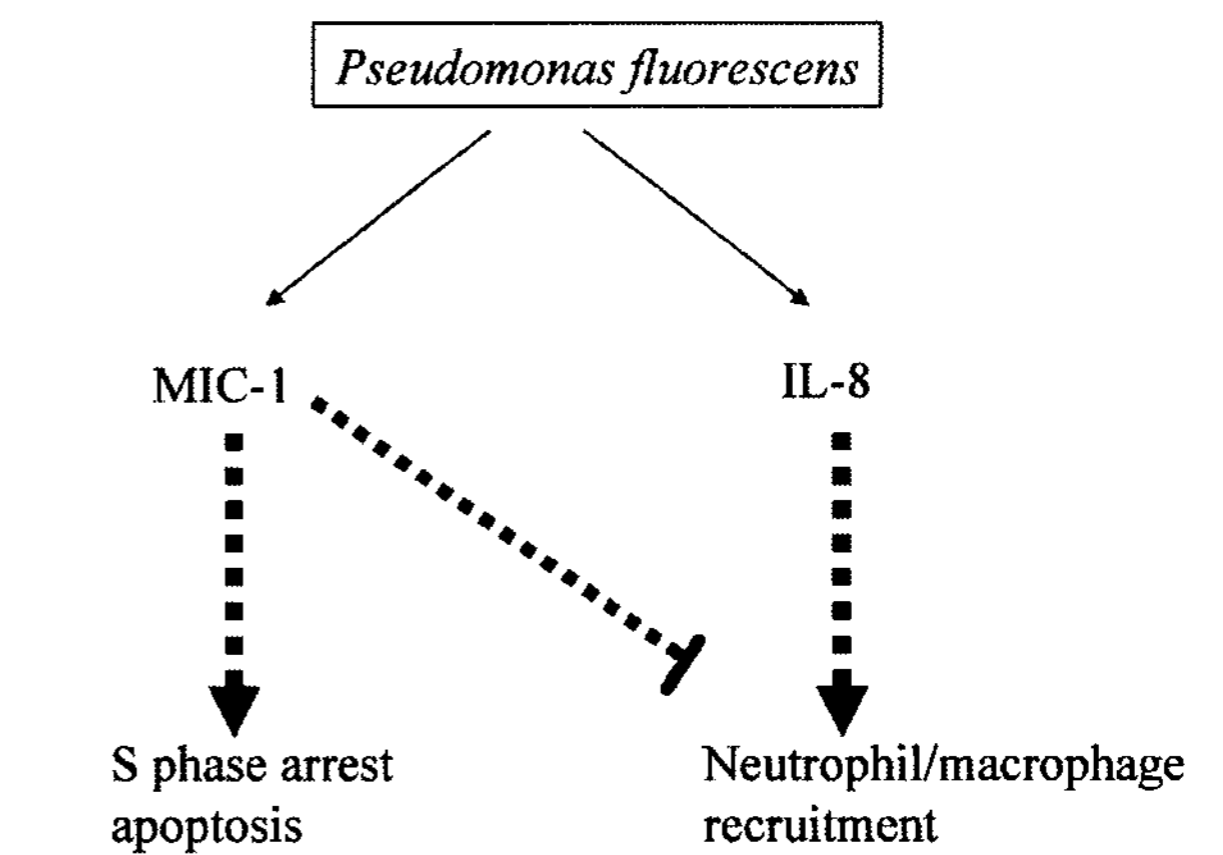


Fig. 5. Schematic diagram for functionality of PF-mediated MIC-1 and IL-8 expression in the human alveolar epithelial cells. PF activated MIC-1 and induced IL-8 production. Activated MIC-1 can contribute to the PF-suppressed cellular viability, especially by regulating S phase arrest or cellular apoptosis which can mediate the tissue injury. Moreover, enhanced IL-8 production can trigger the neutrophil recruitment in the injured sites and MIC-1 can retard the cellular recruitment. The real system may be maintained by the interaction and balance between IL-8 and MIC-1.

요 약

본 연구는 재조합 단백질 생산에 흔히 사용되는 *P. fluorescens*에 대한 공기 중 노출 시 염증작용이 의심되는 기전을 분석하기 위하여 인체 폐포 상피세포에서의 염증성 인자들 특히 IL-8, COX-2, MIC-1의 발현을 분석하고자 하였다. 균주 *P. fluorescens*에 대한 인체 폐포 상피세포 A549에서의 세포 증식 억제효과를 밝혔고, 상피세포의 염증성 사이토카인으로서 대표적인 인터루킨 8의 발현에 대해서 분석결과, 균주 *P. fluorescens* 및 재조합 균주에 의해 IL-8의 분비가 진행세포 대비 세균세포숫자 의존적으로 생성량이 증대되었다. 또한 점막 상피세포의 염증성 프로스타글란딘 생성에서 핵심적인 역할을 하는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 대해서 *P. fluorescens*는 COX-2의 mRNA 발현이 소량 증진되었으나 실제 단백질의 양 및 전사의 변화는 없었다. 일반적으로 단백질의 염증성 사이토카인 생성에 대하여 억제성 작용을 하는 macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1)의 발현에 대해서 측정결과 유전자의 발현이 증대되는 효과는 미비하였으나, MIC-1 단백질의 processing에서 propeptide (~28 kD) 및 mature MIC-1 (~15 kD)로 분해 되어 MIC-1의 단백질 활성화가 증대되었다. 본 연구에서 보이는 MIC-1은 *P. fluorescens*에 의한 세포 생존을 억제작용에도 기여할 것으로 예측되며, IL-8에 의한 염증구의 recruitment에 대한 억제작용이 예상되나, MIC-1의 활성이 과도하고 지속적으로 나타날 경우 조

직의 손상도 가능성도 있다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 부산대학교 교내 학술연구비(신임교수 연구정착금)에 의한 연구임.

References

1. Agarwal, M. K., K. Hastak, M. W. Jackson, S. N. Breit, G. R. Stark and M. L. Agarwal. 2006. Macrophage inhibitory cytokine 1 mediates a p53-dependent protective arrest in S phase in response to starvation for DNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6278-6283.
2. Baek, S. J., K. S. Kim, J. B. Nixon, L. C. Wilson and T. E. Eling. 2001. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol. Pharmacol.* **59**, 901-908.
3. Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-Bensussan and V. Gaboriau-Routhiau. 2004. *In vitro* and *ex vivo* activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.* **279**, 42984-42992.
4. Bauskin, A. R., H. P. Zhang, W. D. Fairlie, X. Y. He, P. K. Russell, A. G. Moore, D. A. Brown, K. K. Stanley and S. N. Breit. 2000. The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J.* **19**, 2212-2220.
5. Caristi, S., G. Piraino, M. Cucinotta, A. Valenti, S. Loddo and D. Teti. 2005. Prostaglandin E2 induces interleukin-8 gene transcription by activating C/EBP homologous protein in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 14433-14442.
6. Dalwadi, H., B. Wei, M. Kronenberg, C. L. Sutton and J. Braun. 2001. The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric t cell superantigen. *Immunity* **15**, 149-158.
7. Delgado, M. A., J. F. Poschet and V. Deretic. 2006. Nonclassical pathway of *Pseudomonas aeruginosa* DNA-induced interleukin-8 secretion in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Infect Immun.* **74**, 2975-2984.
8. Denning, G. M., L. A. Wollenweber, M. A. Railsback, C. D. Cox, L. L. Stoll and B. E. Britigan. 1998. *Pseudomonas pyocyanin* increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun.* **66**, 5777-5784.
9. Eling, T. E., S. J. Baek, M. Shim and C. H. Lee. 2006. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 649-655.
10. Fairlie, W. D., H. P. Zhang, W. M. Wu, S. L. Pankhurst, A. R. Bauskin, P. K. Russell, P. K. Brown and S. N. Breit. 2001. The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J. Biol. Chem.* **276**, 16911-16918.
11. Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of vibrio anguillarum by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 969-973.
12. Hasegawa, Y., J. J. Mans, S. Mao, M. C. Lopez, H. V. Baker, M. Handfield and R. J. Lamont. 2007. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun.* **75**, 2540-2547.
13. Hirvonen, M. R., K. Huttunen and M. Roponen. 2005. Bacterial strains from moldy buildings are highly potent inducers of inflammatory and cytotoxic effects. *Indoor Air.* **15**, 65-70.
14. Holmstrom, K. and L. Gram. 2003. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. *J. Bacteriol.* **185**, 831-842.
15. Huttunen, K., A. Hyvarinen, A. Nevalainen, H. Komulainen and M. R. Hirvonen. 2003. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ. Health Perspect* **111**, 85-92.
16. Koniaris, L. G. 2003. Induction of MIC-1/growth differentiation factor-15 following bile duct injury. *J. Gastrointest Surg.* **7**, 901-905.
17. Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, A. Weinberg, R. P. Darveau, B. W. Bainbridge and B. A. Dale. 2000. 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.
18. Moon, Y., R. Uzarski and J. J. Pestka. 2003. Relationship of trichothecene structure to COX-2 induction in the macrophage: selective action of type B (8-keto) trichothecenes. *J. Toxicol. Environ. Health A* **66**, 1967-1983.
19. Ohama, Y., T. Harada, T. Iwabe, F. Taniguchi, Y. Takenaka and N. Terakawa. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduced tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. *Fertil. Steril.* **89**, 311-317.
20. Picot, L., S. M. Abdelmoula, A. Merieau, P. Leroux, L. Cazin, N. Orange and M. G. Feuilloley. 2001. *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect* **3**, 985-995.
21. Picot, L., S. Mezghani-Abdelmoula, S. Chevalier, A. Merieau, O. Lesouhaitier, J. Guerillon, L. Cazin, N. Orange and M. G. Feuilloley. 2004. Regulation of the cytotoxic effects of *Pseudomonas fluorescens* by growth temperature. *Res. Microbiol.* **155**, 39-46.
22. Sparkman, L. and V. Boggaram. 2004. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to en-

- hance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L764-L773.
23. Vij, N., M. O. Amoako, S. Mazur and P. L. Zeitlin. 2008. CHOP transcription factor mediates IL-8 signaling in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**, 176-184.
24. Wei, B., T. Huang, H. Dalwadi, C. L. Sutton, D. Bruckner and J. Braun. 2002. *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun.* **70**, 6567-6575.
25. Yang, H., Z. Filipovic, D. Brown, S. N. Breit and L. T. Vassilev. 2003. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 1023-1029.
26. Zhang, Z., W. Reenstra, D. J. Weiner, J. P. Louboutin and J. M. Wilson. 2007. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway is coupled to Toll-like receptor 5 to mediate gene regulation in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in human airway epithelial cells. *Infect Immun.* **75**, 5985-5992.
27. Zimmers, T. A., X. Jin, E. C. Hsiao, S. A. McGrath, A. F. Esquela and L. G. Koniaris. 2005. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock* **23**, 543-548.