

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

peptidoglycan誘導肺部上皮細胞死亡之分子機轉探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2320-B-038-004-

執行期間：96年3月1日至96年7月31日

計畫主持人：許銘仁

共同主持人：林建煌

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學醫學研究所

中華民國 96 年 8 月 8 日

## 報告內容[前言及文獻探討、研究目的、研究方法、結果與討論(含結論與建議)]

### 前言及文獻探討

#### 肽聚糖(peptidoglycan, PGN)與肺部上皮細胞

一旦呼吸道受到細菌感染，位於組織表面的上皮細胞除了提供屏障阻止微生物的入侵外，上皮細胞也會受刺激活化而釋放出細胞激素和大量表現細胞附著分子，進而誘導聚集更多的免疫細胞至發炎病兆處，消滅並清除入侵的微生物，因此肺部上皮層被認為是最早受到入侵微生物傷害的組織和調控接續免疫發炎反應與組織修補的最重要場所。一旦上皮層受到破壞或失去功能時便有可能導致更嚴重的發炎反應甚至敗血症而致命(Diamond et al., 2000)。在革蘭氏陰性菌所引起的免疫發炎反應和敗血症中，許多研究指出其主要是透過位在革蘭氏陰性菌細胞壁表面的脂多糖體 (lipopolysaccharide, LPS) 所致(Rietschel et al., 1994)。另一方面，雖然在越來越多的臨床病例中發現革蘭氏陽性菌感染也會導致敗血症，但是對於革蘭氏陽性菌感染所引發之免疫發炎反應及敗血性休克的真正機轉，則未全部釐清 (Bone, 1994; Thornsberry, 1994)。有別於革蘭氏陰性菌，革蘭氏陽性菌並不具有 LPS 內毒素，革蘭氏陽性菌的細胞壁組成含有肽聚糖 (peptidoglycan, PGN) 以及脂臺口酸 (lipoteichoic acid, LTA)，LTA 已被報導可以活化免疫細胞，刺激發炎相關細胞激素的產生而誘導發炎反應並導致全身性的發炎症狀 (Bhakdi et al., 1991; Mattsson et al., 1993; Lotz et al., 2004)。而文獻也指出 PGN 感染可觀察到類似 LPS 所誘發的病理現象，如發燒、急性期發炎、嗜睡、疲累、白血球過多及敗血性休克等症狀 (Gupta et al., 1995)。PGN 同時也有活化補體，促使血小板凝集等功能 (Kessler et al., 1991)。相關研究報告指出，革蘭氏陽性菌感染所引發的敗血症中，以金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 為最常見 (Lowy, 1998; Cohen and Abraham, 1999)。有關於金黃色葡萄球菌的細胞壁組成成分，主要包含的有 PGN, 臺口酸 (teichoic acid, TA) 和脂臺口酸。按照重量百分比計算，PGN 所佔細胞壁的比例約為 50-60%，PGN 的組成為 N-acetylmuramic acid 及 N-acetylglucosamine 以 1,4- $\beta$  鍵結的方式形成雙多醣體單元，各單元再以肽相互連結便構成 PGN。

人體可經由 innate 和 adaptive 兩種不同層級的免疫系統消滅入侵的微生物，其中 innate 免疫系統負責前期且快速回應的免疫發炎反應並誘導後期 adaptive 免疫系統的活化。而 innate 免疫系統的特徵是宿主細胞利用特定的受體來辨認入侵的病原體 (Medzhitov and Janeway, 1997)。而媒介免疫反應的受體 (receptor) 會表現在包括上皮細胞等多種不同形式的細胞表面 (Janeway and Medzhitov, 2002)。這些受體可以辨認分佈在許多種病原體上廣泛且共同的構造。在辨認細菌的多種免疫受體中，toll-like receptor (TLR) 家族扮演了相當重要的角色。直到目前，至少有十種的 TLR 受體被發現，分別為 TLR1-TLR10 (Takeda et al., 2003)，TLRs 是一群鑲嵌在細胞膜上的蛋白，分別在細胞膜內外擁有兩個不同的區段 (domain)，在細胞膜外的區段為 leucine-rich repeats (LRR)，而在細胞膜內的則是 toll/IL-1 受體 (toll/IL-1 receptor, TIR)。TLRs 所媒介的訊息傳遞路徑跟介白素-1 (interleukin-1, IL-1) 受體相似，因為它們兩者具有類似的細胞內區段。在接合子 (ligand) 與 TLR 結合後，TLR 的 TIR 區段便會先聚集部分 adaptor 蛋白，如 MyD88，接著會聚集並活化 interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) 蛋白家族，當 IRAK 活化之後會進一步聚集 TNFR-associated factor 6 (TRAF6) 而使得下游 I $\kappa$ B kinase (IKK) 活化，I $\kappa$ B $\alpha$  接著就會被磷酸化和降解 (degradation) 而刺激 NF- $\kappa$ B 的活化，進而產生一連串的發炎反應 (Akira, 2003; O'Neill et al., 2003)。不同的接合子會辨認特定的 TLR 並與其結合，如 LTA 會和 TLR2 結合、TLR3 會辨認病毒的雙股 DNA、而 TLR5 則會媒介 flagellin 的反應 (Barton and Medzhitov, 2003; Takeda et al., 2003)。許多文獻指出 PGN 主要是透過和 TLR2 結合進而誘

導發炎反應 (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999)。而 PGN 是否會透過 TLR2 誘導細胞的死亡，目前仍不清楚。

## 細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡在多細胞有機體的發育過程及維持組織恆定上是一個相當重要的調控機制，例如中樞神經正常的發育中，減數分裂後的細胞(postmitotic cell)數目及突觸的接合必須在時間及空間上嚴格的控制，才会有正確的細胞數量來構成中樞神經系統(Nijhawan *et al.*, 2000)。當細胞凋亡機轉失去平衡則會導致許多疾病的發生，其中包括神經退化性疾病、癌症及中風等(Arends *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1995)。和細胞壞死相比較，當細胞進行凋亡時並不會引起發炎反應，且凋亡的細胞可以經由巨噬細胞辨識進行非發炎性的吞噬作用(Kerr *et al.*, 1972; Taylor *et al.*, 2003)。細胞凋亡又稱做程序性的細胞死亡，其特徵有細胞質縮小且有細胞小體的出現、細胞核濃染、DNA 階梯斷片的產生以及細胞膜上磷脂質的再分佈即 Phosphatidylserine 由細胞脂質雙層膜的內側外翻至細胞膜外等現象(Fadok *et al.*, 1992; Jacobson *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 1997)。這些細胞型態的變化主要是進行細胞凋亡時，因活化蛋白分解酶 caspase (cysteine aspartate-specific protease)而進一步切割細胞內的特定受質所致。細胞凋亡進行與否則取決於細胞所接受外來的訊息而影響生存或死亡間的平衡所調控(Musci *et al.*, 1997)。在哺乳類的細胞中，將死亡訊息由細胞膜傳達至細胞內可以經由許多不同的路徑，大致可分為兩種不同的訊息傳遞路徑來造成細胞的凋亡，一種是由細胞表面的死亡受體所引起的路徑(death receptor-mediated pathway)；另一種則是由粒線體所媒介的細胞凋亡路徑(mitochondria-mediated pathway)。

### 1. 死亡受體媒介的路徑：

媒介細胞凋亡的死亡受體最常見的是腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor)受體家族，其中包括 Fas。Fas 是被研究最多的死亡受體，當其活化時會促進細胞凋亡。一旦 Fas 受體與其接合子(ligand)FasL 結合後，會變成活化的狀態，並引起細胞內 FADD 及 procaspase 8 的聚合，使得 procaspase 8 經過自我催化後，變成具有活性的 caspase 8，再進一步活化其下游 caspase 3 訊息路徑或著透過 Bid 經由粒線體媒介的細胞凋亡路徑，最終造成細胞的死亡(Ashkenazi *et al.*, 1998; Budihardjo *et al.*, 1999)。

### 2. 粒線體媒介的路徑：

Cytochrome c 原本是存在於粒線體內外膜之間(intermembrane space)，為電子傳遞鏈的成份之一。當細胞進行凋亡時，因粒線體膜電位的喪失會造成粒線體的膨脹、損害及通透性增加，此時 cytochrome c 會被釋放至細胞質中，並做為活化 caspase 9 的輔助因子(Hu *et al.*, 1999)。而釋放到細胞質的 cytochrome c 會與 dATP 一起結合到 Apaf-1 上，並轉變為巨分子的 caspase 活化複合物，這個複合物會吸引 pro-caspase 9 形成 apoptosome (Newmeyer *et al.*, 2003; Tsujimoto *et al.*, 2003)，而藉由 apoptosome 產生所活化的 caspase 9 會繼續活化其下游 caspase 3 及 7，之後再一步活化 caspase 2, 6, 8 及 10 等(Acehan *et al.*, 2002; Slee *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999)。在細胞凋亡時，粒線體除了釋放出 cytochrome c 之外，也會釋放出 Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspase)來促使 caspase 的活化。在細胞處於存活狀態下，IAP (inhibitor of apoptosis proteins)會藉由 BIR (baculovirus inhibitor repeat) domain 與具有活性的 caspase 3, 7, 9 結合，並且抑制它們的活性。一旦粒線體釋放出 Smac/DIABLO 時，它會利用碳端的 AVPI 胺基酸序列，與 IAP 的 BIR domain 結合，而與 caspase 競爭 BIR domain，因此可以阻礙 IAP 抑制 caspase 活化的功能，所以可以確保細胞凋亡的進行(Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001)。

apoptosome 活化的 caspase 3 會經由蛋白降解作用而使得細胞凋亡特徵出現。caspase 3

也會經由活化核酸分解酶來使得細胞 DNA 斷裂成特定大小(Ha *et al.*, 2003; Tibbetts *et al.*, 2003)。但是 caspase 並不是細胞凋亡的唯一媒介分子，serine 蛋白分解酶也被認為參與細胞死亡反應中，只是其與活化 caspase 的相關性仍有正反兩面不同的論點(Stefanis *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2001)。此外，也有報告指出粒線體膜間存有 AIF (apoptosis-inducing factor) 蛋白質參與細胞凋亡的過程(Susin *et al.*, 1999; Joza *et al.*, 2001)。例如在 Rat-1 纖維細胞投與 staurosporine，發現 AIF 會經由細胞質轉位到細胞核中，而誘導細胞的死亡。

### ASK1 與細胞死亡

最近的研究指出 ASK1 (apoptosis signaling-regulation kinase 1) 為誘導細胞凋亡的重要蛋白激酶。是否 ASK1 參與 PGN 誘導肺部上皮細胞功能喪失及死亡目前還不清楚，是一個值得進一步研究的課題。ASK1 是 mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase 家族成員之一(Ichijo *et al.*, 1997)。它可活化 MKK4/MKK7/JNK 和 MKK3/MKK6/p38 MAPK 兩類不同的 MAPK 訊號傳遞路徑(Wang *et al.*, 1996; Ichijo *et al.*, 1997; Hoeflich *et al.*, 1999; Kanamoto *et al.*, 2000)。許多報導指出 ASK1 的過度表現(overexpression)及持續活化(constitutively active)的細胞會誘導粒線體依賴性的 caspase 活化以及細胞凋亡(Hatai *et al.*, 2000; Kanamoto *et al.*, 2000)，ASK1 也被認為參與在氧化態壓力(oxidative stress)或是內質網(ER)媒介所引起的細胞凋亡中(Tobiume *et al.*, 2001; Nishitoh *et al.*, 2002)。相對地，抑制 ASK1 的活性則會阻斷腫瘤壞死因子，細胞骨架干擾藥物，基因毒性及死亡受體 Fas 等引起的細胞凋亡(Ichijo *et al.*, 1997; Gotoh and Cooper, 1998)。經由這些研究的結果顯示，ASK1 在細胞凋亡的過程中扮演著舉足輕重的角色。另一方面，相對於 ASK1 在細胞凋亡所扮演的角色，最近一些研究也發現 ASK1 也會參與在調控細胞存活以及細胞分化(differentiation)的訊息路徑中(Takeda *et al.*, 2000; Sayama *et al.*, 2001)。這些研究顯示 ASK1 除了細胞凋亡，同時可能具有更廣泛的生理活性。因此，了解 PGN 如何調控肺部上皮細胞 ASK1 的活化進而誘導上皮細胞功能喪失及死亡，以及 ASK1 是否也會參與其他如 autophagy 形式的細胞死亡是一個值得深入研究的課題。

ASK1 的活性會受到許多不同分子機轉的嚴謹調控，其中包括蛋白的磷酸化、聚合物的形成(oligomerization)以及蛋白間的交互作用。許多的蛋白被報導會和 ASK1 結合並有調控 ASK1 活性的作用，例如 TRAF2(Nishitoh *et al.*, 1998) 和 TRAF6(Hoeflich *et al.*, 1999) 會促進 ASK1 的活化，但是 ASK1 的激酶活性卻會被許多和其結合的蛋白所抑制，這些蛋白包括 Cdc25A(Zou *et al.*, 2001)、Hsp 72(Park *et al.*, 2002)、ASK1-interacting protein 1(Zhang *et al.*, 2003) 以及 14-3-3 蛋白(Zhang *et al.*, 1999)。ASK1 的活性似乎在正常細胞生長或是增生的狀態下是被抑制的，可能是透過特定位置的磷酸化或是特定結合蛋白間的交互作用，一旦這些抑制機轉受刺激而解除，ASK1 便會活化。在這些 ASK1 調控機轉中，ASK1 和 14-3-3 蛋白間的結合較引人注意，因為它們形成複合物會被在 Ser 967 磷酸化的狀態所調節(Zhang *et al.*, 1999)。ASK1 在 Ser967 位置的磷酸化會使得 14-3-3 蛋白和 ASK1 結合而抑制 ASK1 的活性(Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001)。近來有研究指出 PGN 可經由活化 ASK1 而誘導下游 p38MAPK 的活化(Into and Shibata, 2005)。在本計畫，我們也探討 PGN 是否經由活化 ASK1-p38MAPK 訊息路徑誘導肺部上皮細胞的死亡。

### Autophagy

研究報導指出 autophagy 是哺乳類動物細胞用以降解細胞內主要蛋白質的重要機制，特別是媒介因缺乏生長因子而導致的細胞內蛋白降解作用。舉凡細胞質蛋白、胞器和細胞核內的特定蛋白都可藉由 autophagy 作用而被降解清除掉。因此細胞可藉由 autophagy 維持細胞的恆定性和清除細胞內損傷或是不再需要的蛋白產物(Klionsky, 2005)。進行 autophagy

時，位於細胞質的標的蛋白會被具有雙層膜的 autophagosome 所包覆，接著 autophagosome 的外膜會和 lysosome 融合，最後藉由 lysosome 的許多水解酵素而將 autophagosome 的內層膜及其包覆之標的蛋白水解清除掉。

在酵母菌的研究發現，autophagosome 的形成需要特定蛋白 ATG 的存在(Yoshimura et al., 1999; Yorimitsu and Klionsky, 2005)，有兩種類似 ubiquitin 的蛋白降解系統參與其中，其一是將 Atg12 以共價鍵結的方式結合至 Atg5，另一則是將 Atg8 共價鍵結在 phosphatidylethanolamine (Kirisako et al., 2000)。這兩種系統的產物 Atg12-Atg5 和 Atg8-phosphatidylethanolamine 是組成 autophagosome 的重要組成。這兩種系統在不同物種具有高度的相似性。在 Atg5 基因缺陷的幹細胞研究證實 Atg5 為 autophagosome 形成的重要蛋白，而在哺乳類動物細胞 Atg8 相似蛋白 LC3 的相關研究也發現，autophagy 的調控會隨著不同組織而有差異，此外研究也發現 autophagy 的產生也不侷限於缺乏生長因子的環境下 (Mizushima et al., 2004)。有報導指出放射線或是特定藥物如 ceramide (Scarlati et al., 2004)、rapamycin (Noda and Ohsumi, 1998) 和 tamoxifen (Bursch et al., 2000) 會誘導 autophagy 的產生，但是其詳細作用機轉及其臨床意義目前仍不清楚 (Kroemer and Jaattela, 2005)。

### 研究目的

經由我們的初步結果得知，PGN 會降低肺部上皮細胞的存活率，但是 LDH 分析排除 PGN 誘導肺部上皮細胞進行壞死型態的死亡，因此 PGN 可能是透過細胞凋亡或者是 autophagy 的方式誘導肺部上皮細胞死亡，因此在本計畫我們將討論 PGN 誘導肺部上皮細胞死亡的形式為何，而近來有研究指出 PGN 可經由 TLR2 活化 ASK1 (Takeshi et al., 2005)，但其詳細機轉並不清楚，因此我們也將進一步釐清 PGN 是否透過活化 ASK1 誘導細胞死亡及其作用機轉，希望藉由此計劃的完成可進一步瞭解 PGN 誘導肺部上皮細胞死亡的作用機轉，並且發展出治療因革蘭氏陽性菌所引起之相關疾病的治療方針。

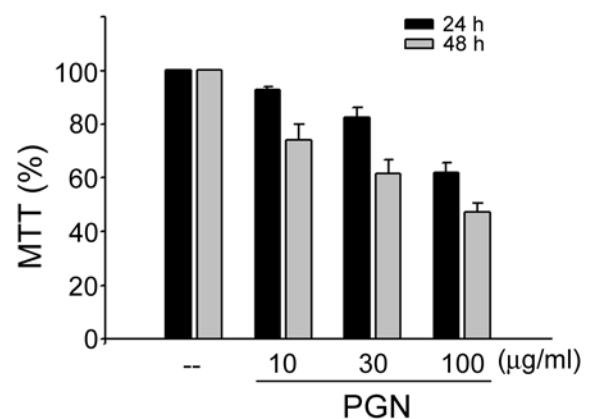
### 研究方法

1. 細胞培養: 人類肺部上皮細胞株 NCI-H292 (購自 ATCC) 使其生長在 RPMI 含有 10% 的胎牛血清的培養液中，並將其置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中，每兩天換一次新鮮的生長培養液，等到細胞長滿後即可進行細胞次培養與實驗。2. MTT 與 LDH 測定: 測定細胞存活率與細胞壞死。3. 洋菜膠電泳: 測定 DNA ladder。4. 西方點墨法: 測定蛋白的變化。5. ASK1 DN 轉染實驗。

### 結果

#### PGN 濃度和時間依賴性地降低肺部上皮細胞的存活率

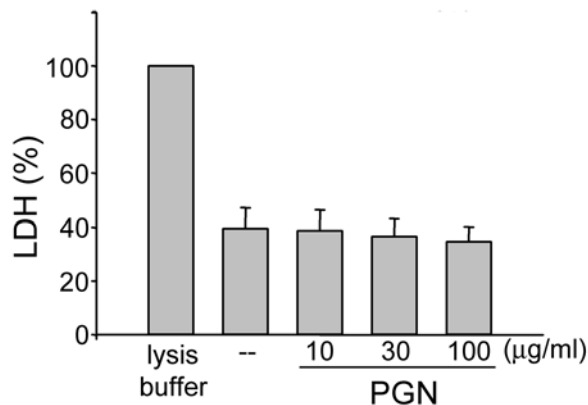
為了了解 PGN 對肺部上皮細胞存活率的影響。我們利用 MTT 的方式分析細胞存活率。如下圖顯示，在人類肺部上皮細胞株 NCI-H292 中，給予不同濃度的 PGN 刺激不同時間，實驗結果發現 PGN 可濃度和時間依賴性的降低肺部上皮細胞的存活率。在 100 µg/ml PGN 處理肺部上皮細胞 24 小時或 48 小時後，分別可降低細胞存活率至 61% 及 47% (如右圖)。



#### PGN 並不會誘導肺部上皮細胞壞死

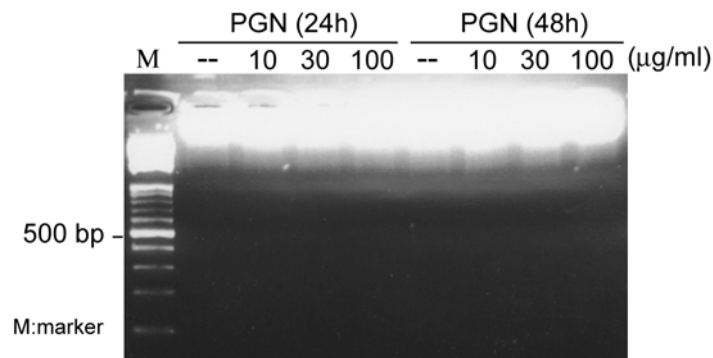
當細胞以壞死(necrosis)型態死亡時，會造成細胞膨脹而破裂，並釋放出細胞內容物，我們

進一步利用 LDH 分析法測定 PGN 是否會誘導肺部上皮細胞 LDH 的釋放，以不同濃度的 PGN(10-100  $\mu\text{g/ml}$ )刺激細胞不同時間，並以 lysis buffer 當作正向控制組(positive control) ，結果如下圖顯示，PGN 並不會增加細胞 LDH 的釋放。



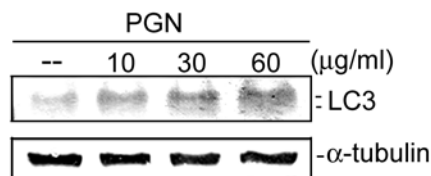
### PGN 無法誘導肺部上皮細胞 DNA ladder 現象

DNA 被切斷成固定大小比例的斷片被認為是一個細胞凋亡的特徵，且這些斷片在洋菜膠片電泳下會呈現 DNA 階梯狀(DNA ladder)的現象，給予不同濃度(10-100  $\mu\text{g/ml}$ )的 PGN 刺激肺部上皮細胞 24 或 48 小時後，抽取細胞 DNA 進行洋菜膠電泳發現 PGN 並不能誘導 DNA ladder 的產生(如下圖)。



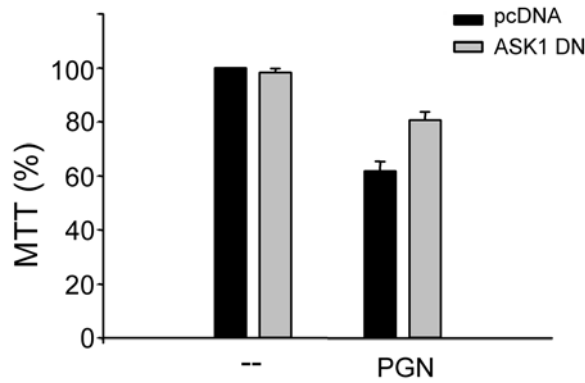
### PGN 誘導肺部上皮細胞 LC3 蛋白表現的增加

由前面實驗證實了 PGN 造成肺部上皮細胞存活率的下降可能不是經由細胞凋亡或細胞壞死的路徑，為了分析 PGN 是否會誘導細胞 autophagy，接下來我們觀察 PGN 是否可誘導 LC3(細胞進行 autophagy 時的標記蛋白)的表現。給予不同濃度(10-100  $\mu\text{g/ml}$ )PGN 刺激細胞後，觀察到 PGN 可以增加 LC3 蛋白的表現(如下圖)。



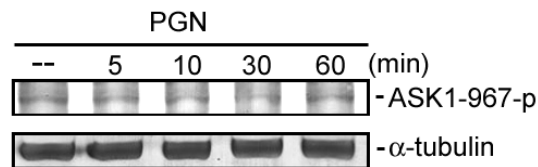
### ASK1 DN 抑制 PGN 所誘導肺部上皮細胞存活率的降低

接下來我們將觀察蛋白激酶 ASK1 是否參與 PGN 誘導細胞存活率下降的作用。將細胞轉染 ASK1DN 後，再給予 PGN(100  $\mu\text{g/ml}$ )刺激 24 h，以 MTT 測定細胞存活率發現 ASK1DN 可抑制 PGN 所誘導肺部上皮細胞存活率的降低(如下圖)。



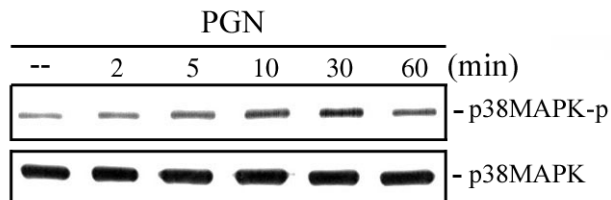
### PGN 誘導 ASK1 在胺基酸殘基 Ser 967 位置的去磷酸化

前面實驗發現 ASK1 會參與 PGN 的細胞死亡作用，因此接下來我們觀察 PGN 是否會誘導 ASK1 的活化，有研究指出 ASK1Ser967 的去磷酸化會造成 ASK1 的活化，因此我們利用特异性 ASK1 Ser967 抗體來偵測 ASK1 Ser967 磷酸化的情形。將細胞給予 PGN 刺激不同的時間(0-60 分鐘)，發現 ASK1 Ser967 磷酸化的程度會隨著處理 PGN 的時間增加而減少(如下圖)。



### PGN 誘導 p38 MAPK 的磷酸化

有研究指出 ASK1 會透過其下游 p38MAPK 訊息路徑誘導細胞的死亡，前面實驗發現 PGN 可活化 ASK1，因此我們也測定 PGN 是否也會誘導肺部上皮細胞 p38MAPK 的磷酸化也就是活化。將細胞給予 PGN 刺激不同的時間(0-60 分鐘)，發現 p38MAPK 磷酸化的程度會隨著處理 PGN 的時間增加而增加(如下圖)。



### 討論(含結論與建議)

綜合以上的實驗證明顯示，在肺部上皮細胞，PGN 可能經由誘導肺部上皮細胞以 autophagy 的方式進行細胞死亡，此外我們也發現 ASK1/p38MAPK 訊息路徑也可能參與 PGN 誘導細胞死亡的作用。不過仍待更多的研究釐清其細胞死亡是否真的為 autophagy 或是其他仍未被報導的形式以及其詳細作用分子機轉。如此，希望能夠透過本計劃的研究，能夠更清楚了解 PGN 對於提供屏障的肺部上皮細胞死亡作用的機轉，提供作為往後發展治療革蘭氏陽性菌感染引起肺部傷害的參考。

### 參考文獻

Akira S (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:5-11.  
 Barton GM, Medzhitov R (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300:1524-1525.  
 Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 59:4614-4620.

- Bone RC (1994) Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 154:26-34.
- Bursch W, Hohegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 113 ( Pt 7):1189-1198.
- Cohen J, Abraham E (1999) Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor-alpha in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180:116-121.
- Gotoh Y, Cooper JA (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* 273:17477-17482.
- Gupta D, Jin YP, Dziarski R (1995) Peptidoglycan induces transcription and secretion of TNF-alpha and activation of lyn, extracellular signal-regulated kinase, and rsk signal transduction proteins in mouse macrophages. *J Immunol* 155:2620-2630.
- Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H, Takeda K (2000) Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 275:26576-26581.
- Hoeflich KP, Yeh WC, Yao Z, Mak TW, Woodgett JR (1999) Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene* 18:5814-5820.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-94.
- Into T, Shibata K (2005) Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated sustained p38 mitogen-activated protein kinase activation regulates mycoplasmal lipoprotein- and staphylococcal peptidoglycan-triggered Toll-like receptor 2 signalling pathways. *Cell Microbiol* 7:1305-1317.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Kanamoto T, Mota M, Takeda K, Rubin LL, Miyazono K, Ichijo H, Bazenet CE (2000) Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol* 20:196-204.
- Kessler CM, Nussbaum E, Tuazon CU (1991) Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. *J Infect Dis* 164:101-107.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151:263-276.
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118:7-18.
- Kroemer G, Jaattela M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886-897.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK (2001) beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha



7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4734-4739.

- Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T (2004) Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol* 75:467-477.
- Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 339:520-532.
- Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fler A, Verhoef J, van Dijk H (1993) Peptidoglycan and teichoic acid from Staphylococcus epidermidis stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7:281-287.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15:1101-1111.
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 2:389-395.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345-1355.
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273:3963-3966.
- O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24:286-290.
- Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ (2002) Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 22:7721-7730.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8:217-225.
- Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, Hashimoto K (2001) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276:999-1004.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 279:18384-18391.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406-17409.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Takeda K, Hatai T, Hamazaki TS, Nishitoh H, Saitoh M, Ichijo H (2000) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem* 275:9805-9813.

- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
- Thornsberry C (1994) Epidemiology of staphylococcal infections--a USA perspective. *J Chemother* 6 Suppl 2:61-65.
- Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2:222-228.
- Wang XS, Diener K, Jannuzzi D, Trollinger D, Tan TH, Lichenstein H, Zukowski M, Yao Z (1996) Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J Biol Chem* 271:31607-31611.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1542-1552.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:1-5.
- Zhang L, Chen J, Fu H (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8511-8515.
- Zhang R, He X, Liu W, Lu M, Hsieh JT, Min W (2003) AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *J Clin Invest* 111:1933-1943.
- Zou X, Tsutsui T, Ray D, Blomquist JF, Ichijo H, Ucker DS, Kiyokawa H (2001) The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21:4818-4828.