

• 計畫中文名稱	探討 Peptidoglycan 誘導 TLR2 所媒介的發炎反應機制---Autophagy 在 Peptidoglycan 誘導發炎反應之角色		
• 計畫英文名稱	Autophagy in Peptidoglycan-Induced Inflammatory Responses		
• 系統編號	PC9609-4081	• 研究性質	基礎研究
• 計畫編號	NSC96-2320-B038-031-MY3	• 研究方式	學術補助
• 主管機關	--	• 研究期間	9608 ~ 9707
• 執行機構	臺北醫學大學生藥學研究所		
• 年度	96 年	• 研究經費	800 千元
• 研究領域	基礎醫學類		
• 研究人員	陳彥州		
• 中文關鍵字	--		
• 英文關鍵字	--		
• 中文摘要	Gram-positive 細菌感染為造成敗血症(sepsis)之主因之一，在 Lancet (2005)一文中指出 30-50 % 敗血症感染源為 Gram-positive bacteria，因此探討 Gram-positive bacteria 誘發發炎反應之機轉為一重要之研究主題。Peptidoglycan (PGN) 為 Gram-positive 細胞壁之主成分之一，PGN 由 N-acetylmuramyl 與 N-acetylglucosaminyl glycan 組成，一些研究指出 PGN 能誘發類似臨床敗血症之症狀如發炎、發熱與低血壓等，PGN 結合至 TLR2 進一步活化 NF-kB 為其作用機轉之一，本整合計畫總計劃主持人 Dr. Lin 發現活化 TLR2/c-Src/NADPH oxidase/COX-2 路徑在 PGN 處理之巨噬細胞。誘導巨噬細胞(macrophage)死亡在發炎過程中扮演重要角色，一些研究指出細菌感染會經由誘導巨噬細胞死亡而來逃避被吞噬之命運。Autophagy 為一種細胞死亡之形式，目前關於 autophagy 之機轉仍尚未明白，一些研究指出 autophagy 與活化細胞內之 Akt/Beclin/LC3 有關，Xu et al (2006)發現在抑制 Apoptosis 情形下 LPS 有能力誘導巨噬細胞 autophagy，然而關於 PGN 在誘導巨噬細胞 autophagy 之能力與機轉，以及 autophagy 在 PGN 誘導發炎之角色目前仍未明白。我們前序實驗發現 PGN 能誘導巨噬細胞 RAW264.7 產生 iNOS、COX-2 蛋白、MMP-9 enzyme activity、Beclin 蛋白質表現與造成 LC3 蛋白質被 lipidation，在 autophagy 抑制劑 bafilomycin 處理下，PGN 會造成細胞走向 apoptosis 伴隨著 DNA ladders 之出現(附件)，這些結果顯示 PGN 有能力誘導巨噬細胞走向 autophagy。因此本計劃中我們將進一步探討 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 之分子機轉，並釐清 autophagy 在 PGN 誘發發炎反應之角色。第一年目標: 偵測 MyD88 與 p85α 在 PGN 誘導 autophagy 之角色假說 1: MyD88 與 p85α 參與 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 1.1.偵測 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy。一些 autophagy 特徵如 acid particles release、lysosomal formation、LC-3 aggregation in macrophages by EM、GFP-LC3 aggregation by fluorescent microscope 等。 1.2.偵測 PGN 誘導 autophagy 在 MyD88 與 p85α knockout 巨噬細胞中之差異 1.3.以 MyD88 與 p85α siRNA 來		

knockdown 其基因表現，分析此二基因在 PGN 誘導 autophagy 之角色
 第二年目標:探討 p85 α /c-Src/NADPH oxidase 路徑在 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 之角色
 假說 2:活化 p85 α /c-Src/NADH oxidase 參與 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy
 2.1. 以 p85 α 、c-Src、NADH oxidase siRNA 來探討其在 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 之角色
 2.2. 以突變之 p85 α 、c-Src、NADH oxidase 探討 p85 α /c-Src/NADPH oxidase 路徑在 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 之重要性(與子計畫一合作)
 2.3. 探討活化 NADH oxidase 所產生之 ROS 在 PGN 誘導巨噬細胞 autophagy 之影響
 第三年目標:探討 autophagy 在 PGN 誘導發炎反應如 COX-2/PGE2、iNOS/NO、TNF- α 、MMP9 產生之角色
 假說 2: Autophagy 參與 PGN 誘導發炎反應
 3.1. 以 autophagy 化學抑制劑如 bafilomycin、3-MA 來探討 autophagy 在 PGN 誘導 COX-2/PGE2、iNOS/NO、TNF- α 、adhesion molecules 產生之角色。
 3.2. 以 Beclin or LC-3 siRNA 來探討 autophagy 對 PGN 誘導發炎反應之角色
 3.3. 探討 autophagy 對 PGN 作用於免疫調節之影響 (與子計畫二合作)。
 3.4. 證實 p85 α /c-Src/NADH oxidase 在 PGN 誘導發炎反應與 autophagy 之相關性 (與子計畫一合作)。

Autophagic cell death is characterized by autophagosome formation, and expression of autophagy genes such as Atg (Beclin) and LC3 genes have been demonstrated. Recent evidences indicate that autophagy is an important event in regulating cell mass. A possible role of autophagy in inflammation was recently proposed by Xu et al. (2006) based on LPS-induced caspase-independent macrophage death. Whether PGN exerts a similar role like LPS has not been previously studied. Preliminary results from our laboratory raise the possibility of PGN-induced autophagy in accordance with increasing iNOS and COX-2 protein expression. Inhibition of autophagy via bafilomycin or 3-MA induces apoptosis in PGN-treated macrophages (Attachement). The possible significance of PGN-induced autophagy is derived from the notion that induction of autophagy may prevent phagocytosis of virulent bacteria. This Sub-project aims to explore the molecular mechanism of PGN-induced autophagy in macrophage and to study how autophagy affects host immune defense in the settings of Gram-positive infection. c-Src activation has been shown in integrin-induced autophagy. The Central Hypothesis is that PGN-induced autophagy is mediated by the PGN-TLR2-c-Src pathway. Specific aim 1 (1st year): To examine the role of MyD88 and p85 α in PGN-induced autophagy. Hypothesis 1: MyD88 and p85 α participate in PGN-induced autophagy
 1.1. To examine if PGN induces autophagic characteristics including acid particles release, lysosomal formation, and LC-3 aggregation in macrophages by EM, fluorescent microscope and flow cytometry analysis.
 1.2. To investigate the autophagy in MyD88 or p85 α knockout macrophages treated by PGN.
 1.3. To analyze the role of MyD88 and p85 α in PGN-treated macrophages via transfection of MyD88 and p85 α siRNA.
 Specific aim 2 (2nd year): To establish the pivotal role of the p85 α /c-Src/NADPH oxidase pathway in PGN-induced autophagy. Hypothesis 2: PGN induces autophagy via activation of the p85 α /c-Src/NADPH oxidase cascade in macrophages.
 2.1. To knockdown the expression of p85 α 、c-Src、NADH oxidase via transfection of respective siRNAs in macrophages, and determine the autophagy in each clone of macrophages induced by PGN.
 2.2. To analyze the role of p85 α /c-Src/NADPH oxidase in PGN-induced autophagy via overexpression of both wild-type or mutant p85 α 、c-Src、NADPH oxidase protein (in collaboration with sub-project 1).
 2.3. To examine if NADPH oxidase-catalyzed ROS production is causally related to PGN-induced autophagy
 Specific aim 3 (3rd year): To investigate the role of autophagy in PGN-induced inflammatory responses
 Hypothesis 3: Induction of autophagy indeed participates in PGN-induced inflammatory responses.
 3.1. Suppression of autophagy by adding autophagic inhibitor bafilomycin or 3-MA to evaluate the expression of inflammatory events such COX-2/PGE2、iNOS/NO、TNF- α 、MMP9 production.
 3.2. To investigate whether inhibition of autophagy by transfection of Beclin、LC-3、or Atgs siRNAs affects PGN-induced

• 英文摘要

	COX-2/PGE2、iNOS/NO、TNF- α 、MMP9 production. 3.3. To investigate the role of autophagy in PGN-mediated immunomodulation (In collaboration with sub-project II) 3.4. To examine the role of p85a/c-Src/NADH oxidase in PGN-induced inflammatory events in related to autophagy induction. (in collaboration with sub-project 1)
--	--