

## 대식세포에서 Pneumococcal Teichoic Fragment에 의한 분비성 및 세포성 활성화의 유도

곽장동 · 박숙영 · 신재용 · 손은하 · 이용화 · 인용희 · 이동권 · 표석능\*  
성균관대학교 약학대학

### Induction of Secretory and Cellular Activities by Pneumococcal Teichoicated Fragments in Macrophages

Jang Dong KWAK, Suk Young PARK, Jae Yong SHIN, Eun Hwa SON, Yong Hwa LEE, Yong Hee IN,  
Dong Kwan LEE and Suhkneung PYO\*

College of Pharmacy, Sungkyungwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received September 8, 2000; accepted September 23, 2000)

**Abstract** – Bacterial components and their derivatives have been reported to mediate various immunomodulating activities and to activate immune cells including macrophage. In this study, the secretory and cellular macrophage response to teichoic fragments (TFs) from pneumococcal cell wall subcomponent were examined. Tumoricidal activity was measured by MTT assay and secretory molecules were assessed by biological assay. After stimulation of macrophages with various doses of TFs for 18hrs, secretion of TNF- $\alpha$ , nitrite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were significantly increased as compared to medium-treated control. In addition, tumoricidal activity of TFs-treated macrophages was enhanced, whereas production of IL-1 and IL-6, and phagocytic activity were not induced. These data suggest that TFs is a potent inducer of macrophage secretory and cellular activities.

**Key words** □ pneumococcal TFs, macrophage, cytokine, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

대식세포는 세균감염에 대한 숙주의 비특이적 면역에 중요한 역할을 하는 세포로서 그람음성 세균의 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극물질에 노출되면 활성화되어 기능상 변화를 나타낸다(Adams *et al.*, 1984). LPS에 의해 활성화된 대식세포는 pro-inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$  (Carswell 등, 1975), interleukin-1(hazuda 등, 1988), Interleukin-6(Tosato 등, 1988) 및 NO(Stuehr 등, 1987)등을 분비하며, 이를 통해 암세포에 대한 세포독성(tumoricidal effect)을 나타내는 것으로 보고되었다(Doe 등, 1987). LPS를 함유하지 않은 그람양성 세균의 경우 세포벽 성분인 peptidoglycan이 대식세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Gold, M.R. 등, 1985). 그람양성 세균인 폐렴균은 세포벽 성분으로 peptidoglycan이외에 이들과 공유결합을 하고 있는 teichoic acids (TAs), polysaccharides (PSs), lipoteichoic acids(LTAs)등을 함유하고 있다. teichoic acids(TAs)와 lipoteichoic acids(LTAs)들은 폐렴균 세포벽의 강력한 pro-inflammatory 구성성분으로서 phosphocholine에 공유결합을 하고 있는 반복적인 oligosaccharide 단위를 이루고 있는

것으로 밝혀졌다(Behr, T 등, 1992). 특히 LTAs는 소수성인 tri-hexosyl-diacylglycerol기를 가지고 있다. 임상적으로 이러한 구조는 폐렴, 뇌막염, 이염, 및 폐혈증관련 혈관염 등을 일으키는 폐렴균의 병원성과 깊은 관련이 있는 것으로 생각된다(Tuomanen, E 등, 1985; Tuomannen, E 등, 1987). 특히 TAs, LTAs들은 지주막하에 주사하면 심각한 뇌막염을 일으키는 것으로 보고되었으며(Tuomanen, E 등, 1985), 최근에는 TAs, LTAs들이 ceftriaxone, rifampicin, trovafloxacin 등의 항생제 투여 시 세포벽에서 유리되면서 폐렴균의 병원성을 증가시키는 것이 알려졌다(Heer C 등, 2000).

이와 같은 병원성은 감염 시 대식세포등에서 유도 분비되는 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO 등에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 폐렴균 세포벽의 teichoicated fragments는 여러 cytokine의 생성 유도에 선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Riesenfeld-om, I 등 1989). 사람 monocyte의 분비성 활성화에 광범위한 영향을 미치는 LPS와는 달리 이 분획은 IL-1을 매우 선택적으로 강력하게 유도 시키는 것으로 보고되었다(Riesenfeld-om, I 등 1989). 그러나, 폐렴균 TFs가 대식세포에 미치는 영

\*To whom correspondence should be addressed.

향에 대해서는 많이 알려지지 않았다. 본 연구에서는 TFs의 대식세포에 대한 분비성 및 세포성 활성화에 끼치는 영향에 대하여 조사하였다.

## 실험방법

### 실험동물과 시약

일본 Charles River Breeding Laboratories 사의 CD-1 생쥐(6주~8주)를 중앙동물로부터 공급 받아 사용하였다. 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한 미국은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. RPMI1640는 미국 GIBCO(Grand Island, NY)사에서 Fetal bovine serum(FBS)는 미국 Hyclone(Logan, Utah)사에서 각각 구입하여 사용하였다.

### TFs의 분리 및 정제

배양된 폐렴균을 lysate시킨 후 Garcia-Bustos 등(1987)이 수행하였던 affinity chromatography법으로 teichoic acids-linked peptidoglycan(TFs) 및 teichoic acids-free peptidoglycan(peptidoglycan monomer)으로 분리하였다. 분리된 TFs는 크기에 따라 분리하였으며 세포벽 teichoic acid의 약 70%를 점유하는 일반적인 크기들을 실험에 사용하였다. 분리된 분획은 Orcinol-Sulphuric acid Assay(Sennerholm, L., 1956)를 통해 94%의 순도를 나타내는 것으로 측정되었으며, 흡광도 측정 및 Bradford 반응을 통해 DNA 및 단백질에 오염되지 않았음을 확인하였다.

### 복강대식세포의 분리 및 배양

Thioglycollate(Difco Labs, Detroit, MI) 1 ml를 흰쥐의 복강에 투여하고 3~4일 후 각각 ether로 안락사시킨 후 복강세포 중의 대식세포의 분리를 위하여 5 ml의 RPMI1640 배지를 복강에 주사하고 잘 흔든 다음 다시 주사기를 사용하여 유출하여서 1000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다(Adams, D.O. 등, 1988). 침전된 세포를 10% FBS 함유 RPMI1640배지에 현탁시킨 후 세포 현탁액을 Teflon-coated petridish에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 배양하고 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거한 후 0.1M EDTA 300 µl와 1.5% FBS 함유 D-PBS 용액 15 ml로 plate에 부착된 세포를 분리시킨 다음 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 희석 시켜서 실험에 사용하였다.

### 암세포 사멸능력 측정

B16흑색종암세포에 대한 대식세포의 항암효과를 측정하기 위해 96 well에 대식세포를 1×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 넣고 TFs 및 LPS+IFN-γ(양성대조군)등으로 처리한 후 B16을 1×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 가하고 18시간동안 배양하였다. MTT(2 mg/ml) 25 µl를 가하고 4시간 더 배양한

후 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 Microplate reader로 540 nm에서 측정하여 암세포 사멸능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ of control} = 100 - \left[ \frac{\text{OD}_{\text{macrophage+tumor target}} - \text{OD}_{\text{macrophage}}}{\text{OD}_{\text{tumor target}}} \right] \times 100$$

### TNF-α의 생성 측정

TNF-α에 sensitive한 L929섬유아세포를 이용하여 Flick 등의 방법(Flick 등, 1984)에 따라 TNF-α를 측정하기 위해 대식세포를(1×10<sup>5</sup> cells/well)를 TFs로 활성화 시킨 후 배양상등액 100 µl를 취하였다. 하루 전에 미리 96 well에 monolayer로 만든 L929 세포(4×10<sup>4</sup> cells/well)에 actinomycinD(2 µg/ml) 50 µl와 취한 배양 상등액 100 µl를 가하고 전체량을 200 µl로 한 후 18시간동안 배양하고 MTT(2 mg/ml) 25 µl를 가하고 4시간동안 더 배양하였다. 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 Microplate reader로 540 nm에서 측정하였다. 상등액 중 TNF-α의 양은 다양한 농도의 TNF-α를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### NO의 생성도 측정

대식세포를 TFs와 함께 18시간동안 배양한 후 상등액 중의 NO 생성농도를 Ding 등(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 100 µl 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 µl의 Greiss 시약을 가하여 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 NaNO<sub>2</sub>를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Greiss 시약은 중류수에 녹인 0.1% naphthylethyl-enediamine dihydrochloride,와 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

### 탐식능력의 측정

대식세포의 탐식능력은 Okimura 등(1986)의 zymosan particle 도입방법과 Stossel(1973)에 의해 변형된 NBT(nitro blue tetrazolium) reduction 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 well당 1×10<sup>5</sup> cells을 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 배양하여 부착시킨 후 5×10<sup>5</sup> particles/ml의 zymosan과 0.6 mg/ml NBT를 가하여 zymosan과 함께 NBT 시약이 uptake되도록 1시간 더 배양하였다. 차가운 생리식염수로 수세한 후 NBT 환원물질인 청보라색의 불용성 formazan의 생성정도를 알아보기 위하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였는데 이때 formazan이 바닥에 균일하게 퍼져있기 때문에 녹일 필요가 없었다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분비는 지시약인 phenol red의 색이 horse-radish peroxidase의 촉매하에 산화되어 변하는 정도로 측정하는 Natan and Root(1977)의 방법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 well당 1×10<sup>5</sup> cells을 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 배양하여 부착시킨 후 1 mg/ml의 zymosan 용액 50 µl를 넣고 1시간 uptake 시킨 후, fresh한 배양액 100 µl와 50 µl의 phenol red를 가하고 1시간 더 배양시킨 후 ELISA reader로 600 nm에서 흡광도를 측정한다. 주어진 실험조건하에서 흡광도의 감소는 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양과 비례한다. 이를 대조군의 흡광도와 비교하여 % of control로 나타내었다.

### IL-1, IL-6 생성 측정

IL-1, IL-6은 ELISA방법을 이용하여 측정하였다. Coating Ab를 2-4 µg/ml로 D-PBS에 희석하여 배양한 후 coating 용액을 비우고 4% BSA를 함유한 PBS(pH 7.2-7.4)를 200 µg씩 well에 가하여 상온에서 1시간동안 blocking한 다음 PBS-Tween20으로 3회 수세한다. 여기에 준비된 대식세포 배양 상층액 및 standard를 50 µl씩 가하고 1시간 상온에서 방치한 후, PBS-Tween20으로 3회 수세하고, biotin-labeled detecting Ab를 0.2-0.6 µg/ml로 4% BSA 함유 PBS로 희석한 후 50 µl씩 가한 다음 상온에서 1시간 방치 후, PBS-Tween20으로 3회 수세한다. Alkaline phosphatase-avidin을 4% BSA를 함유한 PBS(pH 7.2-7.4)에 5000배 희석하여 각 well에 100µl씩 가하여 30분 방치 후 PBS-Tween20으로 3회 수세하여 diethanolamine buffer (pH 9.8)에 1 mg/ml로 녹인 nitrophenyl phosphate 용액을 100 µl씩 가하고 차광 하에서 30분 동안 상온 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다

### 통계 처리

대조군과 실험군의 실험결과에 대한 통계학적 분석은 student-T-test를 이용하여 p값이 0.05 이하인 것을 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

### 실험결과

#### 폐렴균 TFs에 의한 대식세포의 cytotoxicity 증강효과

폐렴균 TFs에 의해 대식세포가 활성화되어 항암효과를 나타내는지를 알아보기 위해 다양한 농도(0.1 µg/ml~100 µg/ml)로 대식세포를 처리한 후 암세포와 함께 배양하여 대식세포의 cytotoxicity를 측정하였다. 실험결과 모든 농도에서 유의성있는 항암효과를 나타내었다(Fig. 1).

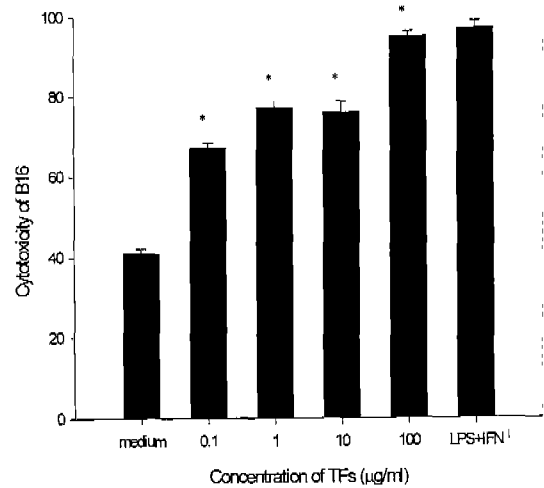


Fig. 1. Cytotoxicity of TFs-stimulated macrophages against B16 melanoma cells. Macrophages were pretreated with TFs for 18 hrs and co-cultured with target cells for 16 hrs in medium. MTT assay was performed as described in materials and methods. The results are the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. \* $p$ <0.05 ; significantly different from control (no treatment)

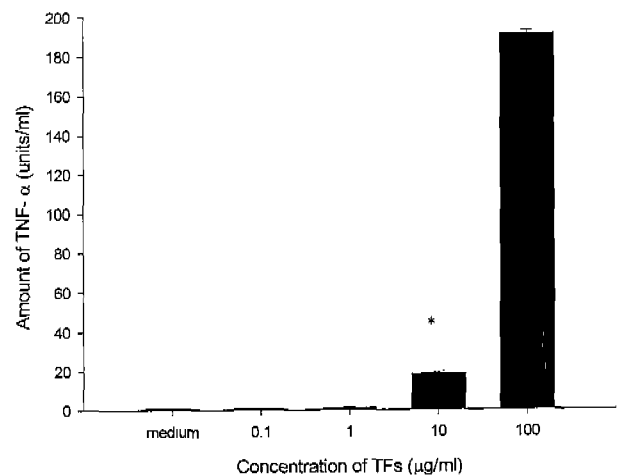


Fig. 2. The effect of TFs on TNF- $\alpha$  production by macrophages. Macrophages were treated with TFs for 18 hrs and replenished with fresh medium and cultured for additional 24 hrs. Supernatants of macrophage cultures were added to L929 and incubated for 18 hrs. Cytotoxicity to L929 was determined by MTT assay. The data shown are the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. \* $p$ <0.05; significantly different from control (no treatment)

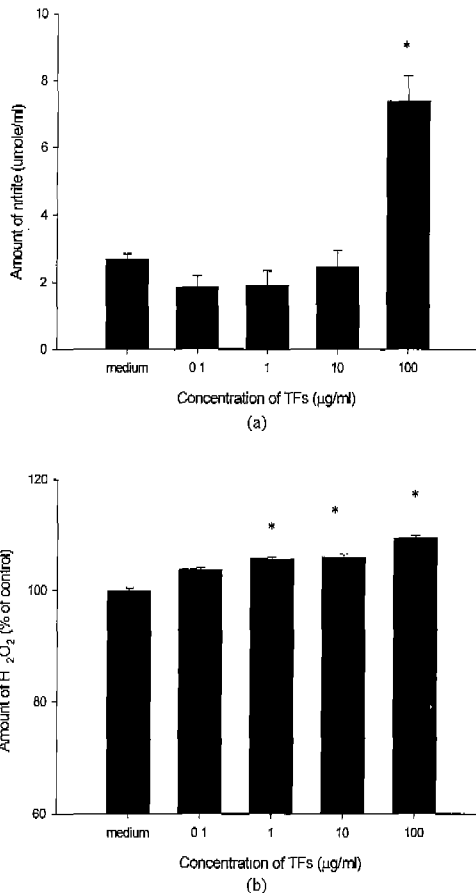
#### 폐렴균 TFs에 의한 대식세포의 TNF- $\alpha$ 생성효과

폐렴균 TFs가 대식세포를 자극하여 TNF- $\alpha$  생성을 유도할 수 있는지를 알아보기 위해 다양한 농도(0.1 µg/ml~100 µg/ml)로 세포를 처리하였다. 고농도인 10 µg/ml과

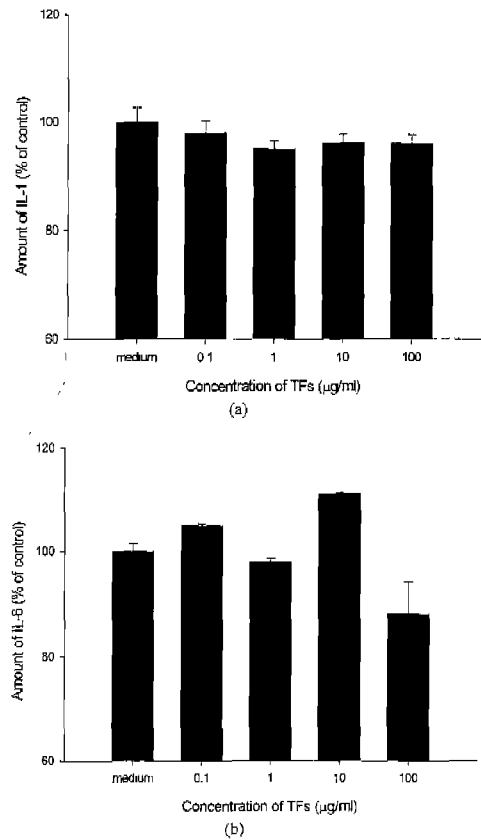
100 µg/ml에서 대조군에 비해 TNF-α의 생성이 현저하게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 이러한 증가는 농도 의존적인 경향을 보였다. 그러나, 1 µg/ml 이하의 농도에서는 TNF-α의 생성을 유도하지 못했다(Fig. 2).

**폐렴균 TFs에 의한 대식세포의 NO 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성효과**

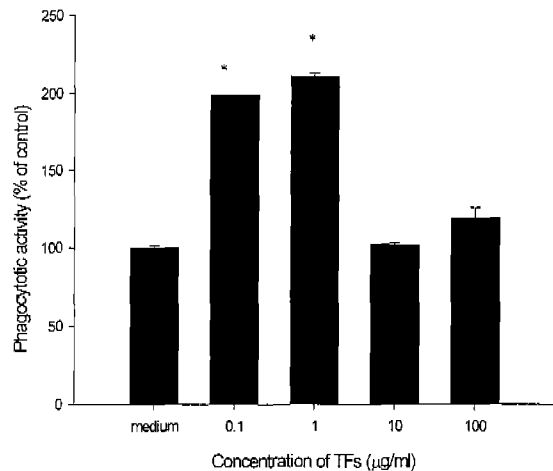
Nitrite의 농도가 유도된 NO의 생성농도를 반영함으로 NaNO<sub>2</sub>를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 nitrite의 농도를 측정하였다. 폐렴균 TFs를 다양한 농도(0.1 µg/ml~100 µg/ml)로 처리하였다. 100 µg/ml의 농도에서 NO의 유도가 현저하게 나타났으나 10 µg/ml 이하의 농도에서는 영향을 미치지 못했다(Fig. 3a). NO와 함께 respiratory burst를 통해 유도되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 폐렴균 TFs가 미치는 영향을 측정하였다. 1 µg/ml 이상의 처리군에서 통계학적 유의성을 갖는 것으로 관찰되었다(Fig. 3b).



**Fig. 3.** The effect of TFs on production of nitrite (a) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) by macrophages. Macrophages were treated with TFs for 18 hrs. Culture supernatants were collected and the levels of nitrite (a) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) were measured as described in materials and methods. The results are the mean ± SEM of two independent experiments. \*p<0.05; significantly different from control (no treatment)



**Fig. 4.** The effect of TFs on IL-1(a) & IL-6(b) production by macrophages. Macrophages were treated with TFs for 18 hrs. Culture supernatants were collected, and the levels of IL-1 and IL-6 were measured by ELISA. The results are the mean ± SEM of two independent experiments. \*p<0.05 ; significantly different from control (no treatment)



**Fig. 5.** The effect of TFs on the phagocytosis of macrophages. Macrophages were treated with TFs for 18 hrs. Macrophages were then incubated with 5 × 10<sup>6</sup> particles of zymosan and 600 µg/ml of NBT. Phagocytosis was measured as OD 540 nm. The results are the mean ± SEM of two independent experiments. \*p<0.05; significantly different from control (no treatment)

### 폐렴균 TFs에 의한 대식세포의 IL-1, IL-6 생성효과

폐렴균 TFs가 proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6를 유도시키는지 알아보기 위하여 ELISA 방법을 사용하여 측정하였다. Fig. 4a, 4b에서 제시한 바처럼 대조군에 비해 약간의 저해효과가 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다. 따라서 폐렴균 TFs는 대식세포의 proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6의 유도에 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

### 폐렴균 TFs에 의한 대식세포의 phagocytosis 증강효과

대식세포의 비특이적 기능인 phagocytosis 능력은 phagocytotic cell의 초기단계에서 생성되는  $O_2^-$ 에 의해 NBT가 환원된 formazan의 양을 측정하여 대조군과 비교하였다. 저농도의 TFs(0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)에서 탐식능력의 증가가 관찰되었으며, 고농도에서는 점차적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5).

## 고 찰

체내에서 폐렴균의 협막다당류, C substance, F 항원, M 단백질 등은 항원항체 반응이나 보체활성화 및 탐식작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 여러가지 성분은 항원성을 나타내며 폐렴균의 생체내 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Muscher 등 1986).

본 연구에서는 그람양성세균인 폐렴균 세포벽의 TFs를 이용하여 생쥐 대식세포의 분비성 및 세포성 활성을 측정하였다. Riesenfeld-orn 등 (1989)의 보고에 의하면, 저농도에서 폐렴균 세포벽의 TFs는 사람 monocyte로부터 IL-1을 선택적으로 유도시키는 강력한 물질로 알려져 있다. LPS에 비해 약 104배 이상의 IL-1을 유도하지만, TNF- $\alpha$ 는 직접적으로 유도시키지 못하는 것으로 보고되었다(Riesenfeld-orn 등, 1989). 또한 이러한 제한적인 영향으로 인해 대식세포의 암세포에 대한 세포독성이 유도하지는 못하는 것으로 보고되었다. 주로 그람양성세균에서는 세포벽 성분인 peptidoglycan이 그람음성세균의 LPS처럼 대식세포의 암세포에 대한 세포독성 유도를 증강시키는 것으로 보고되었는데(Keller 등, 1992a), 이는 폐렴균의 병원성을 나타낸다고 알려진 lipoteichoic acid(LTA)를 이용한 실험에서도 유사하게 나타났다(Bhakdi, S. 등 1991). 따라서 이와 같은 결과는 폐렴균을 포함한 그람양성세균 협막다당류의 일반적인 특징인 것으로 보인다(Keller, R. 등, 1992b). 이는 LPS와는 다른 신호전달계를 통해 대식세포를 활성화시킬 가능성을 제시한다. 하지만, 본 실험에서는 이미 발표된 위의 결과들과 비교하여 대식세포의 분비성 활성 및 세포성 활성에 있어 상이한 결과가 관찰되었다. Fig 4a, 4b에서 나타나는 바처럼 폐렴균 세포벽의 TFs는 IL-1, IL-6등의

proinflammatory cytokine의 유도에 대해서는 유의성 있는 결과를 관찰할 수 없었으나, TNF- $\alpha$ 의 경우 고농도에서 현저한 증가가 관찰되었다(Fig. 2). 또한 폐렴균 TFs에 의해 대식세포의 암세포에 대한 세포독성이 유도되는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1), Respiratory burst system을 통해 유도되는 NO와  $H_2O_2$ 생성 또한 보고된 결과처럼 동일하였다(Fig. 3a, 3b). 위의 결과들을 종합해 볼 때 TFs는 대식세포의 활성화에 영향을 미치며, 대식세포에서 나타난 암세포에 대한 세포독성효과는 TNF- $\alpha$ 와 NO에 의해 주로 이루어지며,  $H_2O_2$ 도 그 역할을 담당한다고 생각되어진다.

이미 발표된 결과와 다른 이유는 실험에 사용된 혼합물인 TFs의 정제방법 및 실험조건의 차이에 의한 것으로 보인다. Riesenfeld-orn 등은 choline함유배지에서 배양하여 ethanolamine을 치환시킨 세포의 세포벽을 affinity chromatography를 사용하여 teichoic acid-linked peptidoglycan(teichoic acid fragment)과 teichoic acid-free peptidoglycan(peptidoglycan monomers)으로 분리하는 방법을 이용하여 TFs를 정제하였다(Riesenfeld-orn 등, 1989). 그러나, 본 실험에서는 choline함유배지를 사용하지 않아 TFs의 화학적 구성성분의 차이가 있는 것으로 보인다. 또한 사람 monocyte에 의한 Riesenfeld-orn 등의 실험과는 달리 본 실험은 생쥐의 대식세포에서 수행되어 TFs가 세포활성에 미치는 영향은 세포에 따라 다른 것을 관찰할 수 있었다.

자연면역반응에 관여하는 중요한 면역세포인 대식세포는 암세포에 대한 세포독성을 가지고 있는데, 이러한 암세포에 대한 세포독성은 여러 단계의 활성화 과정을 거쳐 그 기능이 변화되면서 획득되는 것으로 알려져 있다. 이러한 항암작용은 대식세포가 활성화 단계를 거쳐 여러 가지 기능이 변화되면서 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 상태로 전환되어 나타난다. 대략 대식세포가 활성화되어 암세포를 죽이게 되기까지의 성장변화를 4단계로 나누며, resident, responsive, primed, fully activated macrophage로 명명한다. 각 단계는 암세포를 죽일 수 있는 능력을 획득해 가는 과정으로 구분한다(Meltzer 등, 1981). 대식세포는 활성화되면 proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 및 respiratory burst system의 활성화에 의해 NO,  $H_2O_2$  등이 생성되며 암세포에 대한 세포독성이 증가하고 탐식작용은 감소하는 것으로 알려져 있다(Morahan 등, 1984). 본 연구에서 TFs는 IL-1, IL-6 등의 생성을 일으키는 않았으나 대식세포를 자극하여 TNF- $\alpha$ , NO,  $H_2O_2$ , 생성이 증가하고 탐식능력이 감소되는 결과를 나타내었다. 따라서 TFs는 대식세포를 활성화하는 단계에서 암세포를 죽일 수 있는 단계로 활성화시키는 것으로 생각되며 이러한 결과는 암세포사멸능력 측정실험에서 확인되었다. 그러나 이러한 결과를 도출하기까지는 대식세포가 활성화되어 분비하는 더 다양한 세포분비물을 확인하는 과

정이 필요하며, 다양한 측면에서의 항암효과를 확인해볼 필요가 있다.

위의 결과들을 종합해 볼 때 TFs는 대식세포를 활성화시킬 수 있는 효과적인 면역조절물질로서, 새로운 면역조절물질 개발에 이용될 수 있을 것이며, 더 나아가 본 연구 결과는 대식세포의 항암작용기전을 연구하는데 기초자료로도 이용될 수 있으리라 사료된다.

### 참고문헌

- Adams, D. O., and Hamilton, T. A. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283-318.
- Adams, D. O., Lewis J. G., Dean, J. H. (1988) Activation of mononuclear phagocytes by xenobiotics of environmental concern: Analysis and host effects. In Gardner DE, Crapo JD, massaro EJ (eds): Toxicology of the lung. New York: Raven Press, pp 351-373.
- Behr, T., Fischer, W., Peter-Katalinic, J., and Egge, H. (1992) The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. *Eur. J. Biochem.* **207**, 1063-1075.
- Bhkdi, S., Klonisch, T., Nuber, P., and Fischer, W. (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* **59**, 4614-4620.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3666-3670.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., and Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407-2412.
- Doe, W. F., and Henson, P. M. (1978) Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* **148**, 544-556
- Flick D.A., and Grifford G.E. (1984) Comparison of in vitro cell cytotoxicity assay for tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **68**, 167-175.
- Garcia-Bustos, J. F., and Tomasz, A. (1987) Teichoic acid-containing mucopeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrators the pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **169**, 447-453.
- Gold, M. R., Miller, C. L., and Mishell, R. I. (1985) Soluble non-cross-linked peptidoglycan polymers stimulate monocyte-macrophage inflammatory functions. *Infect. Immun.* **49**, 731-741.
- Hazuda, D. J., Taintor, R. R., and Young, P. R. (1988) The kinetics of interleukin 1 secretion by activated monocyte. *J. Biol. Chem.* **263**, 8473-8479.
- Heer, C., Stuert, K., reinert, R. R., Mader, M., and nau, R. (2000) Release of teichoic and lipoteichoic acids from 30 different strains of *Streptococcus pneumoniae* during exposure to ceftriaxone, meropenem, quinupristin/dalfopristin, rifampicin and trovafloxacin. *Infection* **28**, 13-20.
- Keller, R., Gustafson, J.E., and Keist, R. (1992a) The macrophages response to bacteria: Modulation of macrophage functional activity by peptidoglycan from *Moraxella catarrhalis*. *Clin Exp Immunol*, **89**, 384-389.
- Keller, R., Fischer, W., Keist, R., and Bassetti, S. (1992b) Macrophage response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* **60**, 3664-3672.
- Meltzer, D. M. (1981) Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Characterization of priming and triggering signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* **27**, 179-188.
- Morahan, P. S. (1984) Immunobiology of Herpes Simplex Virus Infection, CRC Press, Boca Raton, 71-89.
- Muscher, D. M., Chapman, A. J., Goree, A., Josson, S., Briels, D., and Baughn, R. E. (1986) Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **154**, 245-256.
- Nathan, C. F., and Root, R. K. (1977) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from mouse peritoneal macrophages; Dependence on sequential activation and triggering *J. Exp. Med.* **146**, 1648-1662
- Okkimura, T., Ogawa, M., and Yamauchi, T. (1986) Stress and immune responses III; Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity (DTH) response, natural killer(NK) activity and phagocytosis in mice. *Japen. J. Pharmacol.* **41**, 229-235.
- Riesenfeldom, I., Wolpe, S., Garcia-bustos, J., Hoffmann, M.K., and Tuomanen, E. (1989) Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* **57**, 1890-1893.
- Stosel, T. P. (1973) Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood.* **42**, 121-130
- Svennerholm, L. (1956) *J. Neurochem.* **1**:42.
- Stuehr, D. J., and Marletta, M. A. (1987) Synthesis of nitrite and nitrate in macrophage cell lines. *Cancer Res.* **47**, 5590-5594.
- Tosato, G., Seamon, K. B., Goldmann, N. D., Seghal, P. B., May, L. T., Washington, G. C., Jones, K. D., and Pike, S. E. (1988) Monocyte-derived human B-cell growth factor indentified as interferon-beta2(BSF-2, IL-6) *Science*, **239**, 502-504.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., and Zak, O. (1987) Induction of pulmonary inflammation by components of pneumococcal cell surfaces, *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**, 869-874.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, H., Ak, O., and Tomasz, A. (1985) The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* **151**, 859-868.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and 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.