

บทคัดย่อ

สัญญาณ Notch เป็นวิถีสัญญาณที่มีการอนุรักษ์ไว้สูง ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การตัดสินใจชะตาของเซลล์และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์หลากหลายชนิด ในระหว่างพัฒนาการของระบบสร้างเลือด สัญญาณ Notch ควบคุมการตัดสินใจ lineage ในหลายระดับ รวมทั้งพัฒนาการของเซลล์เม็ดเลือดและลิมโฟไซต์ แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ Notch receptor และ ligand ในระหว่างระยะพัฒนาการต่างๆ ซึ่งหน้าที่ของวิถีสัญญาณ Notch ในแมคโครฟาจที่มีพัฒนาการสมบูรณ์แล้ว ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียด งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความเกี่ยวข้องของสัญญาณ Notch ในการควบคุมการทำงานของแมคโครฟาจและความเกี่ยวข้องในระหว่างที่มีการติดเชื้อไมโคแบคทีเรียในแมคโครฟาจ แมคโครฟาจปฐมภูมิที่พัฒนาการมาจากไขกระดูกและในเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีการแสดงออกของ Notch1, 2 และ 4 เมื่อทำการกระตุ้นแมคโครฟาจโดยใช้ lipopolysaccharide พร้อมด้วย interferon-gamma พบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของเฉพาะ Notch1, 2 อีกทั้งสามารถตรวจหาโปรตีน Notch1 ที่ถูกตัด และการแสดงออกของ *Hes1* และ *Deltex* ซึ่งเป็นเงินเป้าหมายของสัญญาณ Notch ก็มีการเหนี่ยวนำขึ้น แสดงว่าเกิดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ Notch เมื่อนำอะกอนิสต์แต่ละชนิดของ Toll-like receptor (TLR) (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9) มากระตุ้นแมคโครฟาจ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มของ Notch1 เพื่อศึกษาหน้าที่ของสัญญาณ Notch ระหว่างการหน้าที่ของแมคโครฟาจ จึงใช้วิธีทางเภสัชวิทยาและพันธุศาสตร์ เมื่อทำการกีดการตัดด้วย Notch ด้วยเอนไซม์แกมมาซีรีเทส โดยใช้ยาแกมมาซีรีเทส (GSI) พบว่ามีการลดลงของการผลิตไนโตรออกไซด์ $\text{TNF}\alpha$ และการแสดงออกของ IL-6 mRNA ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 mRNA และ MHC Class II ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการแสดงออกเกินของ Notch ที่มีแอคติวิตี พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของไนโตรออกไซด์ และ $\text{TNF}\alpha$ ที่ผลิต เพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องของหน้าที่ของสัญญาณ Notch ในระหว่างที่มีการติดเชื้อในแมคโครฟาจ จึงได้ทำการติดเชื้อแมคโครฟาจด้วย *Mycobacterium bovis* สายพันธุ์กลายที่ไม่ก่อให้เกิดโรค BCG หลังจากติดเชื้อพบว่าการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของการแสดงออกของ Notch1 ในแมคโครฟาจปฐมภูมิ เมื่อทำการกีดวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้ GSI ส่งผลให้มีการลดลงของแบคทีเรีย CFU และการอยู่รอดของแมคโครฟาจ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของเงินด้านการตายแบบ apoptosis *Mc1* อีกทั้งพบว่ามีมีการแสดงออกเกินของ Notch แมคโครฟาจที่ติดเชื้อมีการตายลดลง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ที่ซับซ้อนของวิถีสัญญาณ Notch ในการควบคุมการทำงานของแมคโครฟาจ และการตายแบบ apoptosis ที่เหนี่ยวนำด้วยการติดเชื้อไมโคแบคทีเรีย ซึ่งจากผลที่ได้นี้ วิถีสัญญาณ Notch อาจจะเป็นเป้าหมายใหม่ในการนำไปใช้บำบัด โดยการเปลี่ยนแปลงการทำงานของแมคโครฟาจให้เหมาะสมและพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป

Abstract

Notch signaling is a well conserved signaling pathway which is involved in regulating cell proliferation, cell fate decision and apoptosis in various cell types. During hematopoiesis, Notch signaling regulates multiple lineage choices, including development of myeloid and lymphoid cells. Macrophages express Notch receptors and ligands at various stages during development. The functions Notch signaling plays in developmentally matured macrophages are largely unexplored. This study aimed at elucidating the involvement of Notch signaling in regulating effector functions of macrophages and its relevance during infection of macrophages with mycobacteria. Notch1, 2 and 4, were expressed in resting primary bone marrow derived macrophages and RAW264.7 macrophage like cell line. Upon activation with lipopolysaccharide together with interferon-gamma, only Notch1 and 2 were upregulated. In addition, cleaved Notch1 was detected and expression of the target genes of Notch signaling, *Hes1* and *Deltex*, were induced, suggesting that Notch signaling is activated. When each Toll-like receptor (TLR) agonist (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9) was used to stimulate macrophages, Notch1 was upregulated in all cases. To address the roles Notch signaling plays during effector phase of macrophages, pharmacological and genetic approaches were used. Suppression of Notch processing by gamma-secretase using gamma-secretase inhibitor (GSI) resulted in decreased nitric oxide, TNF α production and IL-6 mRNA expression, while increased IL-10 mRNA expression and MHC class II expression were detected. In contrast, overexpression of activated form of Notch resulted in increased nitric oxide and TNF α production. To test the roles of Notch signaling in relevance to infection, macrophages were infected with attenuated strains of *Mycobacterium bovis*, BCG. Upon infection, sustaining upregulation of Notch1 was detected in primary macrophages. Inhibition of Notch signaling using GSI resulted in significant decrease in bacterial CFU and viability of macrophages, correlating with decreased expression of anti-apoptotic gene, *Mcl1*. In addition, overexpression of Notch protected macrophages from undergoing apoptosis as a result of BCG infection. Taken together, this study reveals for the first time the complicated roles Notch signaling plays in regulating effector functions and apoptosis induced by mycobacterium infection. Thus, Notch signaling pathway may provide a novel therapeutic target in manipulating macrophage functions and development of more effective vaccines.