บทคัดย่อ

การกระตุ้นแมโครฝาจมีการควบคุมโดยโมเลกุลสัญญาณปลายน้ำของ pattern recognition receptor (PRRs) เช่น TLR และ RLR ทรานสคริปชันเฟคเตอร์และการควบคุมเชิงอิพิเจเนติก ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยศึกษาแมโครฝาจที่ถูกกระตุ้นกลุ่มหนึ่ง ซึ่งมีการกระตุ้นโดยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) ภายใต้การมีสารประกอบอิมมูน (immune complex; IC) ที่เรียกว่า M(IC) แมโครฝาจที่กระตุ้นโดย LPS (M(LPS)) ผลิตไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบในปริมาณสูง เช่น IL-12 และผลิตไซโตไคน์ต้านการอับเสบ IL-10 ต่ำ M(IC) ผลิต IL-10 สูงและ IL-12 ต่ำ วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือ การพิสูจน์กลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับฟีโนไทป์ของ M(IC) ความยืดหยุ่นและผลกระทบเชิงรวมของ M(IC) ใน *in vivo* คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความเกี่ยวข้องของวิถีสัญญาณ Notch ต่อการกระตุ้นของ M(IC) M(IC) เพิ่มระดับของ Notch1 ที่ถูกตัด ในขณะที่การกระตุ้นเพียง IC ไม่ทำให้เกิดขึ้น การกระตุ้นวิถีสัญญาณ Notch ใน M(IC) ขึ้นกับการกระตุ้นวิถี NF-κB และ MEK/Erk M(IC) ที่เตรียมได้จากแมโครฝาจของหนูเม้าส์ที่ตัดยีน *Rbpj* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนจับดีเอ็นเอที่เป็นศูนย์กลางของสัญญาณ Notch ผลิต IL-10 ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ Wild type การลดต่ำลงของปริมาณ IL-10 ที่ผลิตพบได้เช่นกันเมื่อวิถีสัญญาณ Notch ถูกกดโดยสารกดเอนไซม์ gamma-secretase (GSI) ที่ทำหน้าที่ในการตัดโปรตีน Notch โดยพบว่ามีความผิดปกติของการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-κB p50 ใน M(IC) ที่ได้รับ GSI หรือ *Rbpj*$^{-/-}$ M(IC) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการครอสทอล์คระหว่างสัญญาณทั้งสองใน M(IC) การวิเคราะห์เชิงทรานสคริปโตมพบว่าสัญญาณ Notch ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับวัฏจักรของเซลล์ การกระตุ้นแมโครฝาจ การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและการผลิตไซโตไคน์ใน M(IC) การแบ่งขั้วย้อนกลับจาก M(LPS) ไปเป็น M(IC) จำเป็นต้องมีระยะเวลาพัก 3 วันระหว่าง LPS และ LPS/IC ซึ่งแสดงว่าความยืดหยุ่นของแมโครฝาจถูกควบคุมด้วยกลไกควบคุมที่มีผลระยะยาว คล้ายกับที่พบในภาวะ LPS tolerance เมื่อศึกษาเครื่องหมายฮิสโตนที่มีความสัมพันธ์กับการมีแอกทิวิตีเชิงทรานสคริปชัน คือ ฮิสโตน H3 ที่มีการเติมหมู่ไตรเมทิลที่ไลซีนลำดับที่ 4 (H3K4me3) โดยวิธี chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing (ChIP-seq) พบว่า M(IC) และ M(LPS) มีรูปแบบของ H3K4me3 ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในโปรโมเตอร์และ cis-regulatory element ของยีนที่เป็นเครื่องหมายของ M(IC) มีการเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะโปรโมเตอร์ของยีน *Il10* ใน M(IC) มีการเพิ่มระดับของ H3K4me3 สูงกว่าของ M(LPS) ซึ่งบ่งชี้ว่าอย่างน้อย H3K4me3 ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ IL-10 ใน M(IC) เมื่อทำการโอนถ่าย M(IC) เข้าสู่หนูเม้าส์ที่เป็นแบบจำลองภาวะ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ก่อนการให้ LPS และวิเคราะห์ผลกระทบเชิงระบบของ M(IC) ใน *in vivo* พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ IL-12 และ IL-1β ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ M(IC) โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงในไซโตไคน์อื่น ๆ ผลทั้งหมดข้างต้นทำให้รู้ถึงกลไกควบคุมที่กำหนดการแสดงออกของ IL-10 ใน M(IC) และบ่งชี้ว่าวิถีสัญญาณ Notch ร่วมกับการดัดแปลงฮีสโตนทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานและความยืดหยุ่นของ M(IC) ตามลำดับ

คำสำคัญ: แมคโครฟาจ; สารประกอบอิมมูน; วิถีสัญญาณ Notch; ความยืดหยุ่น; อิพิเจเนติกส์; IL-10; ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

Abstract

Activation of macrophages is regulated by immediate signaling molecules downstream of pattern recognition receptors (PRRs) such as TLRs and RLRs, specific transcription factors and epigenetic regulation. In this study, we investigated one subset of activated macrophages that are stimulated with lipopolysaccharide (LPS), in the presence of immune complex (IC) referred to as M(IC). While LPS-stimulated macrophages (M(LPS)) produce high level of inflammatory cytokines such as IL-12 and low level of anti-inflammatory IL-10, M(IC) produces high IL-10 and low IL-12. The aims of this study are to dissect the molecular mechanisms involved in specific phenotypes of M(IC), the plasticity of M(IC) and the global effect of M(IC) *in vivo*. We investigated the involvement of Notch signaling in activation of M(IC). M(IC) exhibited increased the level of cleaved Notch1, while IC stimulation alone did not. The activation of Notch signaling in M(IC) depended upon NF-κB and MEK/Erk pathway activation. M(IC) from mice the targeted deletion of *Rbpj*, which encodes a DNA-binding protein central to canonical Notch signaling, produced significantly less IL-10 when compared with wild type. A similar impact on IL-10 production was observed when Notch signaling was inhibited with a gamma-secretase inhibitor (GSI) which inhibits Notch receptor cleavage. Defects in NF-κB p50 nuclear localization were observed in GSI-treated M(IC) and in *Rbpj*$^{-/-}$ M(IC), suggesting cross-regulation between the Notch and NF-κB pathways in M(IC). Transcriptomic analysis revealed that Notch signaling regulates the transcription of genes involved in the cell cycle, macrophage activation, leukocyte migration and cytokine production in M(IC). Reversing polarization from M(LPS) to M(IC) required long resting of 3 days between LPS and LPS/IC, suggesting that plasticity of macrophages is regulated by durable regulatory mechanisms, similar to that in LPS tolerance. When one of the active histone marks, trimethylated lysine 4 on histone H3 (H3K4me3), was investigated by chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing (ChIP-seq) approach, M(IC) and M(LPS) exhibited clear distinct H3K4me3 global profiles. Promoter and cis-regulatory elements of M(IC) signature genes were found to be highly enriched. In particular, the promoter of *Il10* in M(IC) exhibited higher level of H3K4me3 than that of M(LPS), indicating that at least H3K4me3 plays a role in regulating IL-10 expression in M(IC). Finally, an adoptive transfer of M(IC) in endotoxemia mouse model before LPS administration were performed to examine the systemic impact of M(IC) *in vivo*. The cytokine profiles showed decreased systemic level of IL-12 and IL-1β while no effect was observed with other cytokines. Taken together, these results reveal the regulatory mechanism governing IL-10 expression in M(IC) and suggest that the Notch signaling pathway together with histone modification plays an important role in regulating the functions and plasticity of M(IC), respectively.

Keywords: macrophage; immune complex; Notch signaling; plasticity; epigenetics; IL-10; sepsis