โปรตีน Mip ของเชื้อ *Legionella* สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำในกระต่ายทดลอง

LEGIONELLA MIP PEPTIDE CAN INDUCE HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE EXPERIMENTAL RABBITS

พลากร เค้าแคน[1] สรศักดิ์ อินทรสูต[2] และ อมรรัตน์ อินทรสูต[3]

[1] นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, palakorn.k009@gmail.com

[2] อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, isorasak@hotmail.com

[3] อาจารย์ที่ปรึกษา สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, amornrat.in@cmu.ac.th

---

บทคัดย่อ

การศึกษาเรื่อง “โปรตีน Mip ของเชื้อ *Legionella* สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำในกระต่ายทดลอง” มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสามารถของโปรตีน Mip (macrophage infectivity potentiator) ในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำในกระต่ายทดลอง

Legionella Mip protein ที่ถูกสังเคราะห์ คือ Mip peptide 1 และ Mip peptide 2 ถูกนำมาฉีดกระตุ้นผ่านทางชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous Injection) ในกระต่ายทดลอง 2 กลุ่ม ภายในระยะเวลา 125 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันในกระต่าย โดยการใช้เทคนิค indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่ากระต่ายสามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibodies) ที่จำเพาะต่อโปรตีน Mip ได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยกระต่ายที่ฉีดกระตุ้นด้วย Mip peptide 1 สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้มากกว่า Mip peptide 2

คำสำคัญ: *Legionella pneumophila*, Macrophage infectivity potentiator

ABSTRACT

This study in the topic of “*Legionella* Mip peptide can induce humoral immune response in the experimental rabbits” aim to verify the immunogenic properties of macrophage infectivity potentiator protein in inducing of humoral immune response in experimental rabbits. The synthetic *Legionella* Mip protein including Mip peptide 1 and Mip peptide 2 were subcutaneous injected into separating rabbit group within 125 days. Different rabbit anti-Mip polyclonal antibody level were determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Rabbit immunized with Mip peptide 1 produced anti-Mip antibodies higher than the rabbit immunized with Mip peptide 2.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Macrophage infectivity potentiator

1. บทนำ

เชื้อ *Legionella* เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคปอดบวมรุนแรงขนาดใหญ่ครั้งแรกในหมู่ผู้เข้าร่วมประชุมของเหล่าทหารผ่านศึกอเมริกันในเมือง Philadelphia ประเทศอเมริกาปี ค.ศ. 1976 (Fraser DW et al. 1977) ต่อมาในเดือนมกราคมปี ค.ศ. 1977 Dr. Joseph McDade ของศูนย์ควบคุมโรคได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรค (McDade JE et al. 1977) จากการตรวจสอบพบว่าเชื้อที่ทำการแยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน ซึ่งในภายหลังได้มีการเรียกชื่อว่า *Legionella pneumophila* และได้เรียกการติดเชื้อนี้ว่า Legionnaires' disease (Brenner DJ. et al. 1979) ความสามารถของเชื้อ *L. pneumophila* ที่จะทำให้เกิดโรค Legionnaires ปัจจัยส่วนใหญ่มักขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและลักษณะของผนังเซลล์ ซึ่งส่วนของ outer membrane ของเชื้อ *L. pneumophila* ถือว่ามีความสำคัญมาก ทั้งการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวเชื้อในการบุกรุกเข้าสู่ภายในเซลล์โฮสต์และการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากโปรตีนในชั้นของ outer membrane เป็นส่วนที่สามารถจับกับ specific-receptors (B cell receptors หรือ T cell receptors) ได้ง่ายมากกว่าส่วนอื่นๆ ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้ดี โดยโปรตีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค และการรอดชีวิตของเชื้อ *L. pneumophila* เช่น โปรตีน Mip (Macrophage infectivity potentiator) ซึ่งมีบทบาทในการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์โฮสต์และการบุกรุกผ่านด่านป้องกันของ lung epithelial (Wagner C et al. 2007) จากการศึกษาพบว่าโปรตีน Mip มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอในผนังเซลล์และ cytomembrane complex แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในcytoplasm ของแบคทีเรีย (Helbig JH et al. 2001) นอกจากนี้โปรตีน Mip สามารถถูกตรวจพบได้ในเชื้อ *Legionella* ทุกสปีชีส์ โดย epitope ของโปรตีน Mip มีความ conserve และจำเพาะต่อเชื้อใน genus *Legionella* โดยไม่พบในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอตอื่นๆ (Helbig JH et al. 1995) และมีการแสดงออกของ *mip* gene ตลอดเวลาในขณะที่เชื้อ *L. pneumophila* ยังดำรงชีวิตอยู่ (Kohler R, 2000, 2000) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาความสามารถของโปรตีน Mip (macrophage infectivity potentiator) ในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำในกระต่าย เพื่อนำข้อมูลที่ได้นำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อยอดในการศึกษาเชื้อ *Legionella pneumophila* ในแง่มุมต่างๆต่อไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำในกระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White Rabbits ภายหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Mip สังเคราะห์

3. การดำเนินการวิจัย

3.1 Mip peptide สำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย

แอนติเจนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายประกอบไปด้วย เปปไทด์สังเคราะห์ 2 ชนิดที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นให้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับส่วนของโปรตีน Mip ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับเชื้อในสกุล *Legionella* จากการศึกษาโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mip โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และเลือกลำดับกรดอะมิโนในสาย polypeptide ของโปรตีน Mip มา 2 ช่วงเปปไทด์ คือ KKAD ENKVKGEAFLTENKNKPG (Mip peptide 1) มีขนาดความยาว 22 กรดอะมิโนและ KPGVVVLPSGLQYKV (Mip peptide 2) มีขนาดความยาว 15 กรดอะมิโน ซึ่งช่วงเปปไทด์ทั้งสองไม่อยู่ในลำดับ

ของ signal peptide และมีค่าเฉลี่ย antigenic propensity ที่ดี จากการประเมินผลด้วยโปรแกรม Predicting Antigenic Peptides โดยเปปไทด์ทั้ง 2 เส้นนี้เมื่อเปรียบเทียบจากโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน Mip แล้วพบว่ามีรูปแบบเป็น linear ซึ่ง Peptide ทั้ง 2 เส้นถูกผลิตโดย GenScript (USA) สำหรับนำมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย เพื่อผลิต polyclonal antibodies

3.2 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย

กระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White Rabbits เพศเมียอายุประมาณ 3 เดือน จำนวน 4 ตัวน้ำหนักตัวประมาณ 1,500 ถึง 2,000 กรัม จากศูนย์ปฏิบัติการสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดลถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆละ 2 ตัว และเมื่อมาถึงที่ห้องปฏิบัติการจะได้รับการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ในห้องควบคุมสิ่งแวดล้อม ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก Mip peptide 1 และ Mip peptide 2 จะถูกผสมร่วมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วนที่เท่ากันโดยปรับให้มีปริมาณความเข้มข้น 2 mg/ml และฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่ายแต่ละกลุ่ม สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งต่อไปจะได้รับการฉีดกระตุ้นเมื่อครบระยะเวลา 30, 45, 60 และ 92 วัน โดยจะใช้ Mip peptide แต่ละชนิดผสมร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วนที่เท่ากันปริมาณความเข้มข้น 1 mg/ml

กระต่ายแต่ละตัวจะถูกเจาะเก็บเลือดจากเส้นหลอดเลือดใบหูในวันที่ 0, 30, 45, 60, 92 ก่อนทำการฉีดกระตุ้นและจะทำการเจาะเก็บเลือดอีก 2 ครั้งในวันที่ 114 และ 125 แต่ละครั้งจะทำการเก็บเลือดกระต่ายปริมาตร 8-10 ml และทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 × g เป็นระยะเวลา 20 นาที ก่อนดูดซีรั่มของกระต่ายและนำซีรั่มกระต่ายในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกันและเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดยการศึกษาครั้งนี้ระเบียบวิธีวิจัยและจริยธรรมในการวิจัยสัตว์ทดลองได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

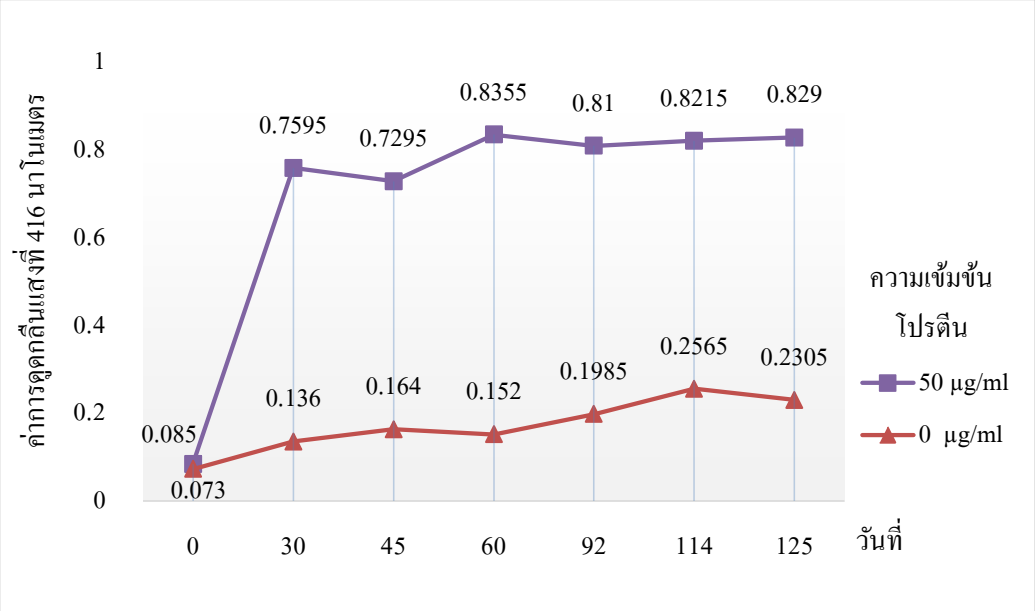
3.3 การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันในกระต่ายโดยวิธี Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการวัดระดับแอนติบอดีในกระต่ายในวันที่ 0, 30, 45, 60, 92, 114 และ 125 หลังจากเริ่มฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยวิธี indirect ELISA โดยทำการเคลือบหลุมใน microtiter plate ด้วย Mip peptide 1 หรือ Mip peptide 2 ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml ใน carbonate/bicarbonate buffer และหลังจากป้องกันการจับของโปรตีนอื่นๆที่ไม่จำเพาะด้วยการบ่มด้วย 5% (w/v) skim milk แล้ว ทำการเติมซีรั่มกระต่ายที่ทำการเจือจาง 1:100 ใน phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุมและทำการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส overnight เมื่อครบระยะเวลาทำการล้างและเติม HRP-conjugated swine anti-rabbit ที่ทำการเจือจาง 1:1000 ใน PBS ปริมาตร 50 µl ลงในหลุมและทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่งโมง จากนั้นทำการล้างและเติม ABTS (2,2'-azino-di- [3-ethyl-benzothiazoline-6 sulfonic acid] diammonium salt) substrate และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 416 นาโนเมตร โดยการทดสอบนี้ใช้ผลที่ได้จาก microtiter plate หลุมที่ไม่มีการเคลือบโปรตีนใดๆเป็นตัวควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2)

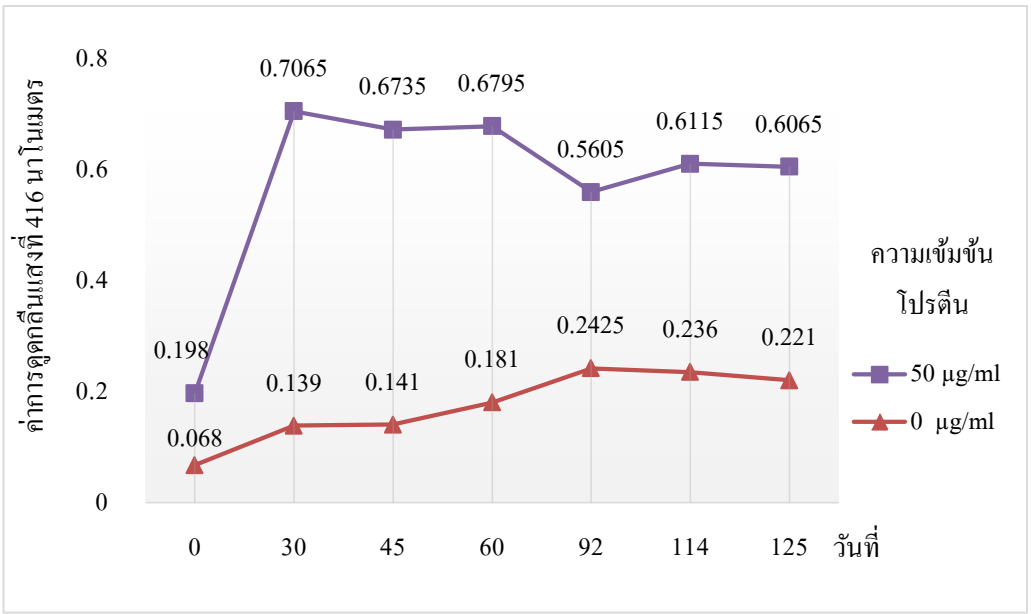
4. ผลการวิจัย

จากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในระดับภูมิคุ้มกันของกระต่ายทดลอง โดยวิธี indirect ELISA พบว่ากระต่ายที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย Mip peptide ผ่านทางชั้นใต้ผิวหนังทั้งสองกลุ่ม เป็นระยะเวลา 125 วันสามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน Mip ได้ และกระต่ายทั้งสองกลุ่มมีระดับการสร้างภูมิคุ้มกัน

ที่แตกต่างกัน โดยพบว่ากระต่ายกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Mip peptide 1 และ Mip peptide 2 มีระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Mip peptide เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 3-4 เท่า (ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 anti-Mip 1 antibodies ในกระต่ายกลุ่มที่ 1 ที่ฉีดกระตุ้นด้วย Mip peptide 1



รูปที่ 2 anti-Mip 2 antibodies ในกระต่ายกลุ่มที่ 2 ที่ฉีดกระตุ้นด้วย Mip peptide 2

5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โปรตีน Mip เป็นโปรตีนที่เชื้อ *Legionella* ทุกสปีชีส์มีการแสดงออกตลอดเวลา ในขณะที่เชื้อ *L. pneumophila* ยังดำรงชีวิตอยู่ ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน Mip และเลือกลำดับกรดอะมิโนในส่วนที่น่าจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Predicting Antigenic Peptides แล้วนำมาศึกษาต่อ

ในกระต่ายทดลอง โดยการนำโปรตีน Mip ที่ได้รับการสังเคราะห์ให้มีลำดับกรดอะมิโนตรงตามที่ต้องการนำมาฉีดกระตุ้นกระต่าย แล้วดูความสามารถในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำของกระต่ายต่อโปรตีน Mip ทั้ง 2 ชนิด พบว่า โปรตีนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีตอบสนองได้ โดยพบว่า Mip peptide 1 สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่า Mip peptide 2 เล็กน้อย ดังนั้นในการศึกษาต่อไป โปรตีน Mip 1 สามารถใช้เป็น candidate antigen เพื่อศึกษากลไกการป้องกันไม่ให้เชื้อ *Legionella* เข้าสู่ host cell มีการศึกษาพบว่าการใช้ *L. pneumophila* membranes สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ได้เช่นเดียวกันและสามารถป้องกันหนูตะเภาจากโรค Legionnaires ได้ดี (Blander SJ & Horwitz M A. 1991) ซึ่งโปรตีน Mip สามารถพบได้ใน membrane ด้วย ดังนั้น Mip peptides อาจจะสามารถนำมาใช้เป็น candidate antigen ในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการพัฒนาวัคซีนได้หรือใช้เป็นแนวทางในการผลิต monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* เพื่อมาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อต่อไปได้ในอนาคต อย่างเช่น วิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในน้ำ โดยอาจใช้ epifluorescence microscopy (Delgado-Viscogliosi P et al. 2005) หรือการใช้เทคนิค Immunogold ในการตรวจสอบโปรตีน Mip บนผิวเซลล์ของเชื้อ *Legionella* (Helbig JH et al. 2001) เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Fraser, DW., Tsai, TR., Orenstein, W., Parkin, WE., Beecham, HJ., Sharrar, RG., Harris, J., Mallison, GF., Martin, SM., McDade, JE., Shepard, CC., & Brachman, PS. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England journal of medicine*. 297:1189–1197.

McDade, JE., Shepard, CC., Fraser, DW., Tsai, TR., Redus, MA., & Dowdle, WR. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and the demonstration of its role in other respiratory diseases. *The New England journal of medicine*. 297: 1197-1203.

Brenner, DJ., Steigerwalt, AG., & McDade, JE. (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of internal medicine*. 90:656–658.

Wagner, C., Khan, AS., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., Fischer, G., Hacker, J., & Steinert, M. (2007) Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCIH292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cellular microbiology*. 9, 450–462.

Helbig, JH., Luck, PC., Steinert, M., Jacobs, E., & Witt, M. (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology*. 32(2):83-8. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00861.x

Helbig, JH., Ludwig, B., Luck, PC., Groh, A., Witzleb, W., & Hacker, J. (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2(2):160-5.

Kohler, R. (2000) Entwicklung eines GFP-Reporter systems in *Legionella* und Molekular- biologische Funktionsanalyse des *Legionella* Mip-Proteins. *Doctoral Dissertation, Department of Biology, University of Wuerzburg: Ergebnisse* (pp. 65-109). Retrieved from https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/122.

Kohler, R., Bubert, A., Goebel, W., Steinert, M., Hacker, J., & Bubert, B. (2000) Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. *Molecular and General Genetics*. 262, 1060-1069.

Blander, SJ. & Horwitz, M A. (1991) Vaccination with *Legionella pneumophila* membranes induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *The Journal of clinical investigation*. 87(3): 1054–1059. doi: 10.1172/JCI115065

Delgado-Viscogliosi, P., Simonart, T., Parent, V., Marchand, G., Dobbelaere, M., Pierlot, E., Pierzo, V., Menard-Szczebara, F., Gaudard-Ferveur, E., Delabre, K., Delattre, J.M. (2005) Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Applied and environmental microbiology*. 71:4086-4096. doi: 10.1128/AEM.71.7.4086-4096.2005