

วิจารณ์

การจัดกลุ่มยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบในเชื้อเลปโตสไปรา

จากการนำยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ทั้ง 25 ยีน มาจัดเรียงตำแหน่งแสดงให้เห็นว่า หลายยีนมีการกระจายห่างกันมากกว่า 5000 คู่เบส แต่ยังมีกลุ่มยีนที่มีตำแหน่งจัดอยู่กันเป็นกลุ่มและมีระยะห่างกันไม่มาก ซึ่งสอดคล้องกับขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทั้งจากไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 และไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 ที่แสดงให้เห็นว่า ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ทั้งสองกลุ่มมีส่วน LRR ที่อยู่ภายในยีนความยาวไม่เกิน 600 คู่เบส โดยที่ยีนที่อยู่ใกล้กันนี้อาจจะมีการถอดรหัสพร้อมกันคล้ายกับในตำแหน่งของยีน *IpaH* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบในเชื้อ *Shigella flexneri* (Hartman *et al.*, 1990)

ในการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสร้าง phylogenetic tree นั้นแสดงให้เห็นว่า มีเพียงยีนที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 3 ที่มีความเหมือนมากกว่ายีนในกลุ่มอื่น ๆ สำหรับยีนในกลุ่มที่ 5 มีความเหมือนกันน้อย เนื่องจาก LRR เป็นบริเวณ ๆ หนึ่งของโปรตีน ที่มีความสำคัญในการทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายเกือกม้า สำหรับทำให้โปรตีนสามารถเข้ามาจับกันได้ (Kobe and Deisenhofer, 1994) และมีลักษณะเป็นชุดซ้ำที่มีความเหมือนเฉพาะกรดอะมิโน leucine ในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง ดังแสดงในตารางที่ 1 และลักษณะชุดซ้ำก็มีความแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกย่อยได้หลายกลุ่ม (Kobe and Kajava, 2001) ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นข้อสันนิษฐานว่า เป็นเหตุผลที่ยีนในกลุ่มที่ 5 มีระดับความเหมือนกันในระดับต่ำ

ยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ในเชื้อซีโรวาร์ Lai ซึ่งเป็นต้นแบบในการศึกษาครั้งนี้ ยังคล้ายกับยีนที่ได้รับการทำนายในซีโรวาร์ *Copenhageni* (Nascimento *et al.*, 2004) ซึ่งมีการจัดเรียงและตำแหน่งของยีนสอดคล้องกับความเหมือนในระดับโปรตีน (มีความเหมือนมากกว่า 80 %)

ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนที่ได้รับการทำนายว่าสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR และผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิง

เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบต้องให้อยู่ในส่วนที่มีการอนุรักษ์ของ LRR ในแต่ละกลุ่มทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้เพียง 3 กลุ่ม ที่มาจากยีนในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 โดยที่ยีนในกลุ่มที่ 4 และ 5 ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ในลักษณะนี้ได้ จากการทดสอบไพรเมอร์แต่ละกลุ่มมีความจำเพาะต่อยีนในกลุ่ม โดยเฉพาะไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อยีนในกลุ่มโดยไม่สามารถจับกับยีนในกลุ่มอื่นและให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ (ข้อมูลทดสอบโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง)

จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ค่อนข้างจะมีความบริสุทธิ์น้อย แต่ก็ได้นำมาทำให้มีความบริสุทธิ์โดยผ่านชุดการสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit ทำให้จีโนมดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และได้ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ทั้ง 3 กลุ่มแล้ว แสดงให้เห็นว่า ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของจีโนมดีเอ็นเอที่ใช้ ซึ่งจะเห็นได้จากผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค capillary electrophoresis

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์และการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลด้วย capillary electrophoresis

เทคนิค capillary electrophoresis เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ถึงแม้ว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะมีปริมาณน้อยก็ตาม ดังเช่น ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นไม่สามารถตรวจพบได้ด้วย agarose gel electrophoresis ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ความเข้มข้นของ agarose สูงก็ตาม ความหลากหลายของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 แสดงให้เห็นชัดเจนว่าเชื้อกลุ่มก่อโรคมียีนผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นอาจจะมีมากหรือน้อยต่างกัน ซึ่งต่างจากเชื้อในกลุ่มไม่ก่อโรคที่ส่วนใหญ่แล้วไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น ขนาดและปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อตรวจสอบเชื้อเลปโตสไปราได้ในระดับซีโรวาร์ โดยที่ซีโรวาร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มก่อโรคมักจะมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลากหลายแตกต่างกัน แต่ผลผลิตพีซีอาร์ที่จัดเป็น common peak เท่ากับ 86, 98, 99, 170 และ 239 คู่เบส นอกจากนี้ยังมีผลผลิตพีซีอาร์ที่แสดงถึงจีโนสปีชีส์ (ภาพที่ 12) ซึ่งต่างจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ G1/G2 และ B64I/B64II ซึ่งไพรเมอร์แต่ละกลุ่มให้เครื่องหมายโมเลกุลเพียงขนาดเดียวที่ไม่สามารถบ่งบอกแน่นอนได้ว่าจัดอยู่ในสปีชีส์หรือซีโรวาร์ใด (Gravekamp *et al.*, 1993)

เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อในกลุ่มก่อโรคจำนวน 2 ซีโรวาร์ ได้แก่ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe และ *L. weilii* ซีโรวาร์ Sarmin ไม่มีผลผลิตพีซีอาร์และไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลเกิดขึ้น เลปโตสไปราในกลุ่มนี้อาจจะไม่ปรากฏยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ดังนั้น เชื้อในกลุ่มนี้อาจจะไม่ได้ใช้โปรตีนที่มีส่วน LRR มาช่วยในกระบวนการเกิดโรคโดยตรง อาจจะมียีนอื่น ๆ ในกลุ่มเชื้อเหล่านี้ที่เกี่ยวข้องและปัจจัยในการทำให้เกิดโรคง่ายเกี่ยวข้องกับยีนอื่นหรือโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังเช่น โปรตีน OmpL1, LipL31, LipL21, LigA และ LPS เป็นต้น (Cullen *et al.*, 2002; Haake and Matsunaga, 2002; Koizumi and Watanabe, 2004; Matsunaga *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2002)

การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลจากยีนที่ได้รับการทำนายว่าสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR

ในการจัดกลุ่มเชื้อเลปโตสไปราจากเครื่องหมายโมเลกุลพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น สามารถจัดกลุ่มได้แตกต่างไปจากการจัดกลุ่มทั้งในทางซีรัมวิทยา (Yasuda *et al.*, 1987) และการจัดกลุ่มโดยใช้สารพันธุกรรม (Ramadass *et al.*, 1992) โดยที่กลุ่มเชื้อที่ 1 เป็นกลุ่มเชื้อที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลากหลาย เป็นที่น่าสังเกตว่าสมาชิกส่วนใหญ่สอดคล้องกับจีโนสปีชีส์ *L. interrogans* และ *L. kirschneri* ตามการจัดกลุ่มโดยใช้สารพันธุกรรม ในขณะที่กลุ่มเชื้อที่ 2 เป็นเชื้อที่มักจะมีปัญหาในการจัดกลุ่ม ดังเช่น *L. meyeri* (Postic *et al.*, 2000) และเป็นเชื้อที่ไม่พบว่ามีรายงานการระบาดเกิดขึ้น (กรมควบคุมโรค, 2546; 2549; ดวงพร และคณะ 2544; ดุจดาว และคณะ 2544; อำนาจ, 2543) และเป็นที่สังเกตว่า ในกลุ่มเชื้อที่ 1 โดยเฉพาะซีโรวาร์ในจีโนสปีชีส์ *L. interrogans* มักจะมีรายงานการระบาดเกิดขึ้นเป็นประจำไม่ว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ดวงพร และคณะ 2544; Kusum *et al.*, 2005) ภาคเหนือตอนล่าง (ดุจดาว และคณะ 2544) และภาคใต้ (กรมควบคุมโรค, 2546) ของประเทศไทย และในต่างประเทศ เช่น อิตาลี (Ciceroni *et al.*, 2000) ในเม็กซิโก (Vado-solis *et al.*, 2002) ในอินเดีย (Bal *et al.*, 2002) และในฟาร์มวัวนมของประเทศสเปน (Guitain *et al.*, 2001)

มีการศึกษาพบโปรตีนที่มีส่วน LRR ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น โปรตีน Internalin B (InIB) ในเชื้อ *L. monocytogenes* (Lecuit *et al.*, 1997) โปรตีน IpaH ในเชื้อ *S. flexneri* (Hartman *et al.*, 1990) โปรตีน LrrA ในเชื้อ *T. denticola* และโปรตีนที่มาจากยีน *lrrG* ของกลุ่มเชื้อ Streptococci (Seepersaud *et al.*, 2005) ซึ่งโปรตีนที่มีส่วน LRR ดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบุกรุกเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการเกิดโรค โดยเป็นโปรตีนที่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถยึดติดกับเซลล์ของโฮสต์ได้ ดังนั้นการที่เชื้อเลปโตสไปราที่มีความหลากหลายของผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างกันอาจมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการบุกรุกเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์ นอกจากนี้แล้ว โปรตีนที่มีส่วน LRR บางชนิดเป็นตัวส่งเสริมให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนได้เมื่อเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ของโฮสต์ ดังเช่น โปรตีน SspH1 ที่พบในเชื้อ *S. enterica* ซีโรวาร์ Typhimurium

ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีส่วน LRR และเป็นบริเวณสำคัญที่ทำให้ SspH1 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory) (nuclear factor- κ B-dependent gene expression) โดยโปรตีน SspH1 ไปจับกับ protein kinase N1 (PKN1) และทำให้ PKN1 ไม่สามารถส่งสัญญาณต่อให้มีการแสดงออกของยีนได้ (Haraga and Miller, 2006) แต่อย่างไรก็ตามยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ที่แท้จริงได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่คาดว่ามาจากยีน LB196 มีความคล้ายกับโปรตีน InlB ของเชื้อ *L. monocytogenes* (ข้อมูล BLAST ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง) และโปรตีนที่คาดว่ามาจากยีน LA0701 มีความคล้ายคลึงโปรตีน molybdate metabolism regulator ที่พบในเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Copenhageni (ข้อมูล BLAST ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง) ในขณะที่โปรตีนที่คาดว่าสร้างมาจากยีนที่ได้รับการทำนายอื่น ๆ มีความเหมือนกับโปรตีนที่มีส่วน LRR อื่นหลายชนิด ดังเช่น โปรตีน Ras suppressor *RSU-1* (Chunduru1 *et al.*, 2002) โปรตีนที่มาจากยีน *rsp-1* (Cutler *et al.*, 1992) เป็นต้น โดยกลุ่มโปรตีนดังกล่าวนี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Ras เพื่อให้เซลล์หยุดการเจริญ

การศึกษาวิจัยทำให้ทราบว่าเชื้อเลปโตสไปรามีความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR และอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อเลปโตสไปรามีความสามารถทำให้เกิดโรคและอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด หรือเป็นสาเหตุเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปถึงหน้าที่ของโปรตีนที่มีส่วน LRR ในเชื้อเลปโตสไปราเพื่อที่จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในกระบวนการเกิดโรคอย่างแท้จริง