

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (Herpes simplex virus, HSV-2) เป็นสาเหตุหลักของโรคเริมบริเวณอวัยวะเพศ (Genital Herpes) ซึ่งมีการแพร่ระบาดทั่วโลก และเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย การติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมจะเพิ่มความเสี่ยงของการรับเชื้อเอชไอวี (Human immunodeficiency virus หรือ HIV) สูงขึ้น นอกจากนั้นเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สามารถถ่ายทอดจากมารดาไปสู่ทารกในระหว่างการตั้งครรภ์ ทารกอาจมีการติดเชื้อและแพร่กระจายเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางหรือเข้าสู่กระแสเลือด และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ (Augenbraun *et al.*, 1995; Black, 2011) จากการศึกษาทั่วโลกการก่อโรคของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จะพบเชื้อไวรัสที่บริเวณผิวหนังของผู้ป่วย แม้ไม่มีแผลของโรคเริมปรากฏ ทำให้ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่ทราบว่ามีการติดเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกาย และถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่บุคคลอื่นได้โดยไม่รู้ตัว (Black, 2011) ในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานในภาคเหนือของประเทศไทยถึงสถิติการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ถึงประมาณร้อยละ 70-80 ของประชากร (Looker *et al.*, 2008; Nahmias *et al.*, 1990)

ในการได้ศึกษาข้อมูลเชิงลึกของกระบวนการทางชีวภาพของไวรัสก่อโรคเริม อาทิ การแสดงออกของยีน การจำลองตนเองของดีเอ็นเอ กระบวนการถอดรหัส การส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และกระบวนการตัดต่อสายเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง หน้าที่ และการจับกันระหว่างโปรตีนของไวรัสก่อโรคเริม (Antrobus *et al.*, 2009; Taylor and Knipe, 2004) จากรายงานวิจัยพบว่ากระบวนการจำลองตนเองของไวรัสก่อโรคเริมจะเกิดขึ้นได้ขึ้นอยู่กับความควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านในระยะแรกเริ่มของการติดเชื้อไวรัส ดังนั้นการศึกษาด้านพยาธิวิทยาของไวรัสก่อโรคเริมจึงไม่สามารถอธิบายกลไกของการก่อโรคได้ทั้งหมด เนื่องจากยังขาดข้อมูลกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านเมื่อได้รับเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ดังนั้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านขณะติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการรักษาการติดเชื้อดังกล่าว

โปรตีนโอมิกส์เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ หรือในเนื้อเยื่อได้พร้อมๆ กัน และเพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตในสภาวะการทดลองหนึ่งๆ ได้ ดังนั้น โปรตีนโอมิกส์จึงเป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ศึกษาการทำงานของโปรตีนทั้งหมด ที่เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนทั้งระบบ (Westermeier *et al.*, 2002) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิคทางโปรตีนโอมิกส์ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้านที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม โดยเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนระหว่างเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 กับเซลล์เจ้าบ้านปกติ พร้อมทั้งวิเคราะห์หาชนิดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม ซึ่งจากการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์นี้จะเป็ข้อมูลที่มีประโยชน์ในการศึกษาโปรตีนโอมของเซลล์เจ้าบ้าน และนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ของกลไกการป้องกันตัวเองและการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านระหว่างการติดเชื้อไวรัส และทราบแนวทางในการยับยั้งโปรตีนที่สำคัญในการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้านขณะติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2
- 1.2.2 เพื่อตรวจสอบและระบุชนิดโปรตีนที่อาจมีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกับการควบคุมกลไกภายในเซลล์ (cellular pathway) ที่ใช้ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 และเพิ่มองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการติดเชื้อภายในเซลล์เจ้าบ้าน

ลิขสิทธิ์ © โดย Chiang Mai University  
All rights reserved

### 1.3 ไวรัสก่อโรคเริม

ไวรัสก่อโรคเริมเป็นเชื้อไวรัสในวงศ์ (Family) *Herpesviridae* วงศ์ย่อย (Subfamily) *Alphaherpesvirinae* และสกุล (Genus) *Simplexvirus* สามารถจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมตามลักษณะการติดเชื้อเฉพาะที่ (localized infection) ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณปาก (herpes labialis) และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณอวัยวะเพศ (herpes genitalia) การติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมสามารถเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อของร่างกายเมื่อร่างกายมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ อาทิ ดวงตา (herpes keratitis) หรือนิ้วมือ (herpetic whitlow) และในรายที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำอาจพบการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมแบบแพร่กระจาย (systemic infection) ซึ่งเป็นการติดเชื้อหลายอวัยวะของผู้ติดเชื้อ โดยเชื้อชนิดเดียวกันในคราวเดียว จะพบตั้งแต่ไม่แสดงอาการของโรคจนถึงแสดงอาการของโรครุนแรงจนถึงเสียชีวิต (Drew, 2004)

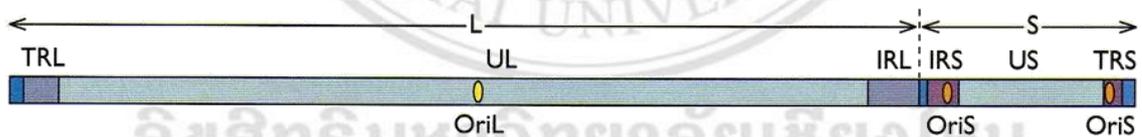
#### 1.3.1 ประวัติความเป็นมาของไวรัสก่อโรคเริม

ไวรัสก่อโรคเริมมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานและเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่เก่าแก่ที่สุดตั้งแต่สมัยกรีกโบราณ คำว่า “Herpes” มาจากคำว่า “Herpein” เป็นภาษากรีกมีความหมายว่า คืบคลาน ซึ่งเป็นลักษณะจากการแพร่กระจายของแผลบนผิวหนังที่ติดเชื้อไวรัส (Rawls and Gardner, 1972) ในสมัยสงครามโลกระหว่างปี ค.ศ. 1917-1975 ไวรัสก่อโรคเริมอาจได้รับการรักษาและป้องกันการแพร่กระจายของโรคน้อยกว่าโรคซิฟิลิส (syphilis) และโรคหนองใน (gonorrhoea) เนื่องจากโรคเริมมีลักษณะของโรคที่ไม่ร้ายแรง ที่อาจเกิดขึ้นบริเวณปากและผิวหนังบริเวณอวัยวะเพศเท่านั้น (Scott, 2011) จึงเป็นสาเหตุให้ไวรัสก่อโรคเริมมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว และขยายเป็นวงกว้างทั่วโลก นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา (Time magazine, 1980) และในปี ค.ศ. 1923 Ernest Goodpasture ได้ศึกษาการแพร่กระจายของไวรัสก่อโรคเริม (viral transmission) ในกระต่าย จากการศึกษาค้นพบว่าไวรัสก่อโรคเริมสามารถแพร่กระจายผ่านระบบประสาท และสามารถติดเชื้อได้ในระบบประสาทส่วนกลาง (Goodpasture, 1925) ซึ่งไวรัสก่อโรคเริมสามารถแฝงตัวในปมประสาทต่างๆ โดยไม่แสดงอาการของโรค แต่สามารถกลับมาก่อโรคอีกครั้งเมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม และในสภาวะที่ร่างกายมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (Kennedy, 1984; Stevens and Cook, 1971) ทำให้เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมแล้วจะไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ในปัจจุบันยาด้านไวรัสในกลุ่ม “อะไซโคลเวียร์” (Acyclovir) เป็นตัวยาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกระบวนการจำลองตนเองของเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (Eliou, 1989) แต่ยาด้านทานไวรัสไม่สามารถรักษาโรคเริมให้หายขาดได้ เพียงลดความรุนแรงและความถี่ของการเกิดโรคซ้ำเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงมุ่งเน้นการวิจัยถึงความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสก่อโรคเริม รวมถึงการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส

### 1.3.2 โครงสร้างของไวรัสก่อโรครีม

ไวรัสก่อโรครีมมีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150-200 nm ประกอบขึ้นจากโครงสร้างแบบง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน 4 ส่วน (Spear and Roizman, 1972) ได้แก่ คอร์ แคปซิด เอ็นเวโลปและโปรตีนเมทริกซ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) คอร์ (core) คือ ส่วนแกนกลางที่บรรจุสารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิกของไวรัสก่อโรครีมทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) สายคู่ เส้นตรง ที่มีขนาดความยาวต่างกันเล็กน้อยคือ 152 และ 155 kbp ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ภายในสายมีความเหมือนประมาณร้อยละ 50 และสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนทั้งหมดจำนวน 74 ชนิดเท่ากัน โดยโครงสร้างจีโนมของไวรัสประกอบด้วยบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาดแตกต่างกัน 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่มีขนาดยาวเรียกว่า unique long region (UL) และบริเวณที่มีขนาดสั้นเรียกว่า unique short region (US) ขนาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน (repeated sequence) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และเรียงตัวในทิศตรงข้าม โดยเรียกบริเวณปลายของจีโนมว่า Long terminal repeat (TRL) และ Short terminal repeat (TRS) และบริเวณที่อยู่ตรงกลางเรียกว่า Long internal repeat (IRL) และ Short internal repeat (IRS) (Dolan *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2002) ภายในโครงสร้างจีโนมประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองตนเองของดีเอ็นเอ (origin of DNA replication) หรือ *Ori* อยู่ 2 บริเวณ คือ *OriS* และ *OriL* โดย *OriS* มีอยู่ 2 ตำแหน่งในบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ขณะที่ *OriL* มีเพียงตำแหน่งเดียว และอยู่ในบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ UL (รูปที่ 1.1) ซึ่งเมื่อมีการกระตุ้นการแสดงของ *OriL* และ *OriS* จะเป็นการเริ่มต้นกระบวนการจำลองตนเองของดีเอ็นเอไวรัส (Flint *et al.*, 2003)

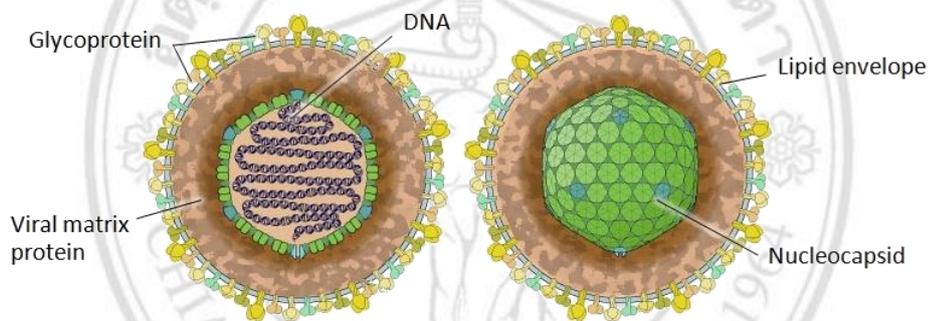


รูปที่ 1.1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสก่อโรครีม (herpes simplex virus) (Flint *et al.*, 2003)

2) แคปซิด (capsid) คือ โครงสร้างโปรตีนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัสไว้ภายใน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 nm ประกอบขึ้นจากโปรตีนหน่วยย่อยที่เรียกว่า แคปโซเมอร์ (capsomer) จำนวน 162 หน่วย แบ่งเป็น โปรตีนเพนตอน (penton) 12 หน่วย และ โปรตีนเฮกซอน (hexon) จำนวน 150 หน่วย โปรตีนเพนตอนและเฮกซอนจะเชื่อมติดกันด้วยโปรตีนไตรเพลิกซ์ (triple) จำนวน 320 หน่วย ทำให้แคปซิดมีรูปร่างเป็นทรงลูกบาศก์หลายเหลี่ยมจำนวน 12 มุม 20 หน้า (Icosahedral structure) มีหน้าที่ในการช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น เอนไซม์ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง รวมทั้งช่วยในการขนส่งกรดนิวคลีอิกของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียส ของเซลล์เจ้าบ้าน (Davison, 2010; Spear, 2004)

3) เอ็นเวโลป (envelope) คือ ชั้น โครงสร้างไขมันส่วนนอกสุดที่ห่อหุ้มองค์ประกอบทั้งหมดของไวรัส มีลักษณะการเรียงตัวของชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) บริเวณผิวมีไกลโคโปรตีนมากกว่า 11 ชนิด แทรกตัวอยู่ในชั้นของเอ็นเวโลปจึงมีลักษณะคล้ายปุ่มยื่นออกมาจำนวน 600-750 หน่วย ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการยึดจับกับรีเซปเตอร์ (receptor) บนผิวเซลล์ เพื่อช่วยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นหากชั้นของเอ็นเวโลปถูกทำลาย อนุภาคไวรัสจะสูญเสียความสามารถในก่อโรคทันที (Riley, 1998; Sarmiento and Spear, 1979)

4) โปรตีนเมทริกซ์ (matrix protein) คือ ชั้นของกลุ่มโปรตีนทีกูเมนต์ (tegument) ที่อยู่ชั้นกลางระหว่างชั้นเอ็นเวโลปและแคปซิดประกอบด้วยชนิดโปรตีนมากกว่า 15 ชนิด เมื่อเข้าสู่เซลล์ โปรตีนเหล่านี้จะมีส่วนสำคัญในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส และควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงหลีกเลี่ยงการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (Carter and Saunders, 2007)



รูปที่ 1.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัสก่อโรคเริม (Acheson, 2011)

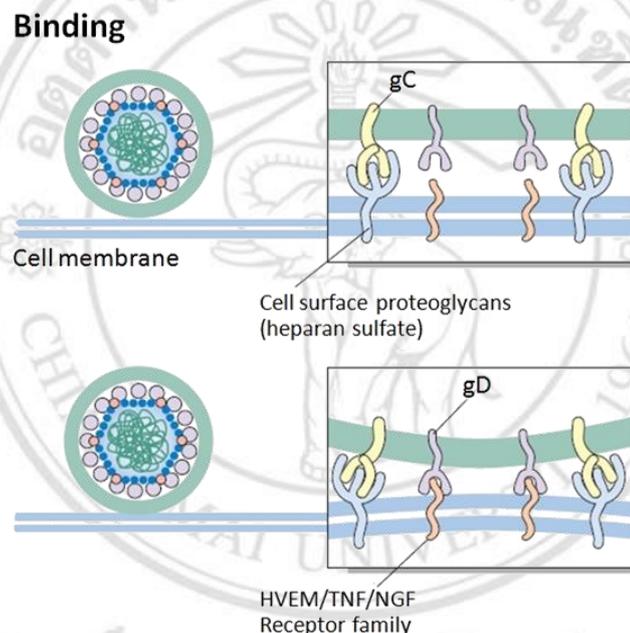
โครงสร้างของไวรัสก่อโรคเริมประกอบขึ้นจากโปรตีนและไขมัน ทำให้ไวรัสไม่ทนทานต่อสภาพสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความร้อน รังสี ความเป็นกรด และยังถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารจำพวกแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ หรือสารดีเทอร์เจนต์ (detergent) ซึ่งในธรรมชาติไวรัสก่อโรคเริมไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นอกเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจึงมักเป็นแบบเซลล์สู่เซลล์เท่านั้น (Carter and Saunders, 2007)

### 1.3.3 การเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อโรคเริม

ตามธรรมชาติของไวรัสก่อโรคเริมจะเข้าไปเจริญและแพร่พันธุ์เฉพาะในเซลล์ของมนุษย์เท่านั้น แต่จากรายงานการศึกษาพบว่าไวรัสสามารถติดเชื้อในสัตว์ได้หลายชนิด ด้วยเหตุนี้จึงศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค โดยเฉพาะกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสทั้งในเซลล์สัตว์หรือเซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เช่น เซลล์หนู เซลล์กระต่าย เซลล์ลิง รวมไปถึงเซลล์ของมนุษย์ ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นตั้งแต่ไวรัสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจนกระทั่งออกมาจากเซลล์จะประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (Conn, 2013)

## 1) การเกาะติด (binding)

การบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของไวรัสก่อโรคเริมอาศัยการทำงานของไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ บนชั้นเอ็นเวโลปกับรีเซปเตอร์บนผิวเซลล์ ชนิดเซลล์เยื่อเมือก เซลล์เยื่อปิว และเซลล์ประสาท โดยเริ่มแรกไวรัสจะใช้ไกลโคโปรตีนชนิด B (gB) หรือ C (gC) ที่อยู่ส่วนนอกสุดของอนุภาคไวรัสเป็นส่วนยึดเกาะ (attachment site) เข้ากับ heparan sulphate บนผิวเซลล์เป็นตำแหน่งแรก ต่อมาไวรัสจะนำไกลโคโปรตีนชนิด D (gD) เข้าจับอย่างน้อย 1 ใน 3 ของรีเซปเตอร์หลัก (main receptor) ซึ่งประกอบด้วย herpesvirus entry mediator (HVEM) nerve growth factors (NGFs) และ tumor necrosis factor (TNF) กระบวนการที่เกิดขึ้นทำให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านอย่างแน่นหนา และง่ายต่อการเข้าจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยไกลโคโปรตีนชนิดอื่นๆ (Subramanian and Geraghty, 2007)

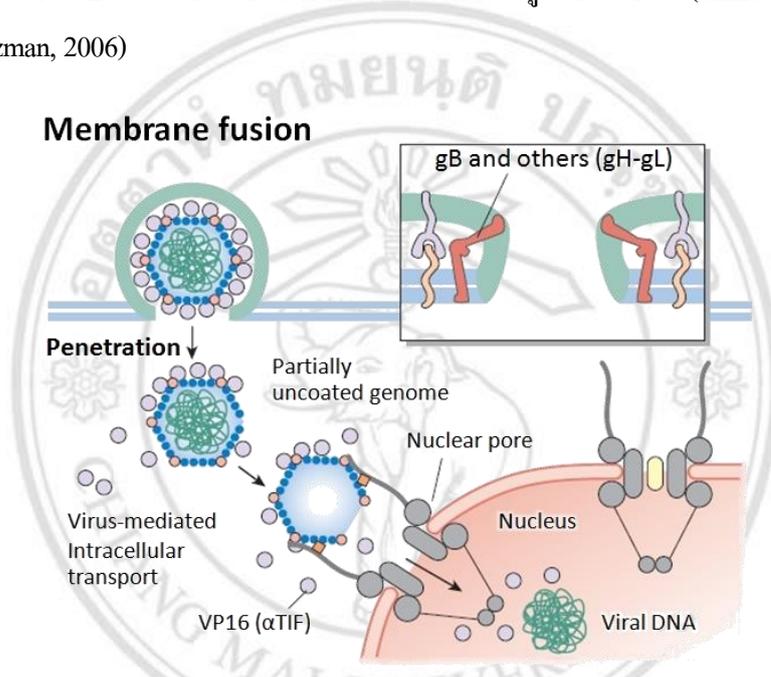


รูปที่ 1.3 การเข้าเกาะติดเซลล์เจ้าบ้านของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมโดยอาศัยการทำงานของไกลโคโปรตีนบนชั้นเอ็นเวโลป (Wagner *et al.*, 2007)

## 2) เข้าสู่เซลล์ (penetration)

หลังจาก gD เข้าจับ HVEM จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไกลโคโปรตีนเพื่อรองรับการเข้าจับของไกลโคโปรตีน H (gH) และ L (gL) ที่อยู่ในรูป gH-gL heterodimer สำหรับ gB จะเข้าจับกับ paired immunoglobulin-like type 2 receptor- $\alpha$  (PILR $\alpha$ ) บนผิวเซลล์ การทำงานร่วมกันของไกลโคโปรตีนทั้ง 4 ชนิด จะเหนี่ยวนำการหลอมรวม (fusion) ระหว่างชั้นเอ็นเวโลปกับเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อนำส่วนแคปซิดและโปรตีนที่เกาะกับเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน (Sedý *et al.*, 2008) ภายในระยะเวลา 30 นาที อนุภาคไวรัสสามารถ penetrate เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้สำเร็จ จากนั้น

โครงสร้างแคปซิดที่บรรจุดีเอ็นเอของไวรัสไว้ภายใน รวมถึงโปรตีนที่กูเมนท์ VP16 หรือ  $\alpha$ TIF จะอาศัยท่อลำเลียงของไมโครทิวบูลในเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเคลื่อนที่ไปยังบริเวณนิวเคลียร์พอร์ (nuclear pore) แล้วปลดปล่อยดีเอ็นเอและโปรตีนที่กูเมนท์เข้าสู่นิวเคลียส (Sodeik *et al.*, 1997) ขณะที่โปรตีนที่กูเมนท์บางชนิดยังคงอยู่ในไซโทพลาสซึม เช่น โปรตีน UL41 หรือ virion host shut-off protein (vhs) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เอ็นโดไรโบนิวคลีเอส (endoribonuclease) ทำหน้าที่ทำลายสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยจะตัดที่ตำแหน่งเริ่มต้นของการแปลรหัส ดังนั้นไวรัสก่อโรคเริมจึงควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์เจ้าบ้าน ได้ตั้งแต่เข้าสู่ภายในเซลล์ (Shiflett and Read, 2013; Taddeo and Roizman, 2006)



รูปที่ 1.4 การหลอมรวมระหว่างส่วนเอ็นเวโลปกับเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อนำเชื้อไวรัสก่อโรคเริมเข้าสู่เซลล์ (Wagner *et al.*, 2007)

### 3) การแสดงออกของยีนในไวรัสก่อโรคเริม

เมื่อดีเอ็นเอของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้านแล้ว จะเปลี่ยนรูปร่างจากสายตรง (linear double strand) เป็น วงกลมปลายปิด (covalently closed circular molecule) เพื่อเริ่มกระบวนการถอดรหัสจากจีโนมเป็นสายเอ็มอาร์เอ็นเอภายในนิวเคลียส และแปลรหัสเป็นโปรตีนของไวรัสในไซโทพลาสซึม โดยสามารถแบ่งยีนที่มีการแสดงออกได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ immediate early gene (IE) early gene (E) และ late gene (L) (Carter and Saunders, 2007)

#### 3.1 Immediate early gene (IE gene หรือ $\alpha$ gene)

การแสดงออกของ IE gene จะเกิดขึ้นในช่วงแรกเริ่มระหว่าง 2-4 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัส โดยเริ่มจากโปรตีนที่กูเมนท์ VP16 ( $\alpha$ TIF) จะทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชัน

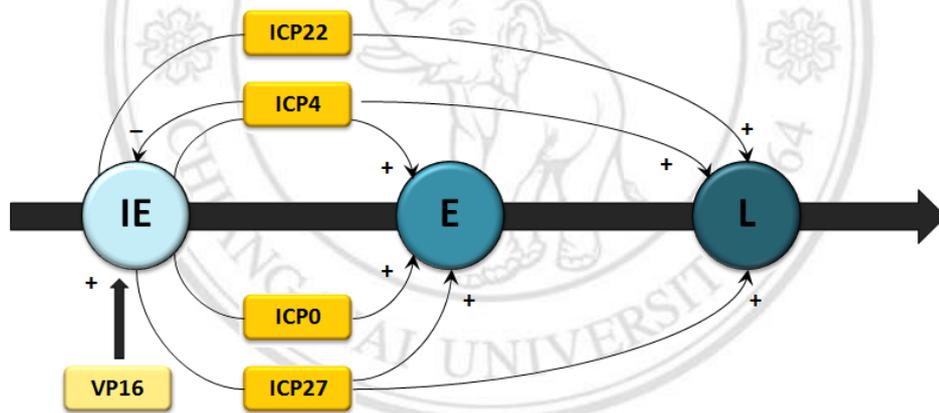
แฟกเตอร์ (transcription factor) เข้าไปรวมตัวเป็น โมเลกุลเชิงซ้อนกับ โปรตีนของเซลล์ คือ octamer-binding protein (Oct-1) และ cell-proliferation factor HCF เพื่อเข้าจับกับ โปรโมเตอร์ (promoter) บริเวณ TATA box ของ IE genes เพื่อเหนี่ยวนำกระบวนการถอดรหัสเป็นสายเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยการ ทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II (RNA polymerase II) เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะได้ โปรตีน IE (immediate early protein) ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ infected cell polypeptide 4 (ICP4) ICP0 ICP22 ICP27 และ ICP47 ซึ่งกลุ่มโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและกระตุ้นการ แสดงออกของชุดยีนทั้งหมดของไวรัส โดยโปรตีนหนึ่งชนิดอาจมีหน้าที่สำคัญมากกว่า 1 หน้าที่ (Flint *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2007) หน้าที่และความสำคัญของโปรตีนแต่ละชนิด มีดังนี้

โปรตีน ICP4 เป็นโปรตีนเชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่มีบทบาทในการควบคุมการ แสดงออกของชุดยีนทั้งหมดในขั้นตอนการถอดรหัส โดยโปรตีน ICP4 จะเข้าไปจับกับทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ (transcription factors) ภายในเซลล์เจ้าบ้าน ได้หลายชนิด ได้แก่ TATA box-binding protein (TBP) TFIIB TFIID และ TBP-associated factor 1 (TAF1) ก่อนเข้าจับอย่างแน่นที่ตำแหน่ง TATA box ของ โปรโมเตอร์บน E gene และ L gene โครงสร้างโปรตีนเชิงซ้อนนี้ (protein-DNA complex) สามารถ กระตุ้นกระบวนการถอดรหัสเป็นสายอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสภายในเซลล์ (Lester and DeLuca, 2011; Sampath and DeLuca 2008) ซึ่งโปรตีน ICP 4 จะทำหน้าที่ควบคุมการ แสดงออกของ IE gene ให้ลดลง โดยการจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์เข้าจับตำแหน่ง downstream ของ TATA box บน IE gene แล้วเกิดการเรียงตัวเป็นโครงสร้างโปรตีนเชิงซ้อนที่ยับยั้งกระบวนการ ถอดรหัส (Kuddus *et al.*, 1995) ดังนั้นโปรตีน ICP4 จึงเป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการ ควบคุมระดับโปรตีนของไวรัสทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน ในขณะที่โปรตีน ICP0 ไม่เข้าจับกับสาย ดีเอ็นเอ แต่มีส่วนร่วมในการควบคุมกลไกการแสดงออกของยีนโดยโครงสร้างของโปรตีน ICP0 จะมี ส่วนโดเมน (domain) ของ zinc-stabilized RING finger เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็น E3 ubiquitin ligase ซึ่งช่วยกระตุ้นการย่อยสลายโปรตีนหลายชนิดของเซลล์เจ้าบ้านผ่าน ubiquitin-proteasome pathway จึงทำให้ ICP0 สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน และ เพิ่มเสถียรภาพของวงจรกิจิตไวรัส เช่น ช่วยป้องกันผลกระทบจาก nuclear bodies โดยการย่อยสลาย โปรตีน Promyelocytic leukemia (PML) และ Sp100 nuclear antigen ของเซลล์เจ้าบ้าน ช่วยยับยั้งการ ส่งสัญญาณผลิตอินเทอร์เฟอรอน (interferon) ของ Interferon regulatory factor 3 (IRF3) โดยการเข้าย่อย สลาย interferon-inducible protein 16 (IFI16) ภายในเซลล์ (Boutell and Everett 2013; Everett, *et al.*, 2010)

กระบวนการถอดรหัสสายเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัสก่อโรคริม ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสภายในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งโปรตีน ICP22 เป็นโปรตีนที่สามารถควบคุมการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส เพื่อลดการแสดงออกโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงกระตุ้นการแสดงออกของ L gene ในกระบวนการถอดรหัส โดยเริ่มแรกโปรตีน ICP22 จะเข้าไปจับกับ Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) ซึ่งเป็นส่วน catalytic subunit ของ positive transcription elongation factor (P-TEFb) ทำให้ P-TEFb ไม่สามารถเข้าจับและเติมหมู่ฟอสเฟส (phosphorylation) ให้แก่ DRB sensitivity inducing factor (DSIF) negative elongation factor (NELF) และกรดอะมิโนเซอร์ีนตำแหน่งที่ 2 ของ C-terminal domain ภายในเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II ส่งผลให้เอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สายเอ็มอาร์เอ็นเอ และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน (Guo *et al.*, 2012; Zaborowska *et al.*, 2014) จากนั้น โปรตีน ICP22 จะทำงานร่วมกับโปรตีน UL13 และ US3 (serine-threonine protein kinase) เข้าไปย่อยสลายโปรตีนไซคลิน (cyclin) ที่ติดอยู่กับ cell division cycle protein 2 หรือโปรตีน cdc2 ทำให้โปรตีน cdc2 ไม่สามารถทำงานและส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งต่อมาโปรตีน cdc2 จะเข้าจับกับโปรตีน UL 42 (DNA polymerase processivity factor) และเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส (topoisomerase) เกิดเป็นโครงสร้างโปรตีนเชิงซ้อน ที่มีความสำคัญในกระบวนการถอดรหัส L gene บางส่วน ได้แก่ UL38 UL41 และ US11 โดยโปรตีน ICP22 และโปรตีน UL13 จะเข้าจับกับเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II เพื่อเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ C-terminal domain ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถสังเคราะห์สายเอ็มอาร์เอ็นเอให้กับไวรัส (Smith-Donald and Roizman 2008)

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในระยะเริ่มต้นคือ โปรตีน ICP27 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหลายหน้าที่ที่สุดในบรรดาโปรตีน IE ด้วยกัน ได้แก่ (1) ควบคุมกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอ (RNA processing) ภายในเซลล์เจ้าบ้าน โดยสามารถเข้าจับกับ cleavage stimulation factor (Cst64) เพื่อกระตุ้นการตัด (cleavage) แล้วเติมลำดับเบสอะดีนีนที่ปลาย 3' - OH (polyadenylation) ในสายเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัส ซึ่งมีความสำคัญในการแสดงออกของชุดยีนทั้งหมด (Hann *et al.*, 1998; McGregor *et al.*, 1996) และยังทำหน้าที่คล้ายสไปลิ่งไซเลนเซอร์ (splicing silencer) ที่สามารถเข้าไปจับกับสายเอ็มอาร์เอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านที่ตำแหน่ง 3' - OH ของอินทรอน (intron) เพื่อรบกวนการตัดสายอินทรอน หรือเข้าจับกับสไปลิ่งแฟคเตอร์ (splicing factor) บางชนิด ได้แก่ serine/arginine-rich splicing factor (SR) serine/arginine protein kinase 1 (SRPK1) และ spliceosome-associated protein 145 (SAP145) เพื่อหยุดการทำงานของสไปลิ่งไซโสม (spliceosome) ส่งผลให้กระบวนการตัดต่อสายอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) ถูกยับยั้ง เกิดการสะสมสายเอ็มอาร์เอ็นเอภายในนิวเคลียส โดยไม่ถูกขนส่งไปยังไซโทพลาสซึมเพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำให้การแสดงออก

โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านลดลงได้ (Bryant *et al.*, 2001; Nojima *et al.*, 2009; Sciabica *et al.*, 2003) (2) ขนส่งเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยโปรตีน ICP27 จะทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวกลางที่เข้าไปจับระหว่างสายเอ็มอาร์เอ็นเอกับ mRNA export receptor คือ nuclear RNA export factor 1 (NXF1) เพื่อนำเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัสออกจากนิวเคลียสผ่าน TAP/NXF1 pathway และยับยั้ง nucleocytoplasmic transport pathway ของเซลล์เจ้าบ้าน (Malik *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2013) (3) กระตุ้นกระบวนการถอดรหัส E gene และ L gene โดยสามารถเข้าจับกับ C-terminal domain ของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II แล้วช่วยนำเอนไซม์เข้าจับตำแหน่งการถอดรหัสของยีน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัส (Dai-Ju *et al.*, 2006) (4) กระตุ้นกระบวนการแปลรหัสสายเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยพบว่าโปรตีน ICP0 สามารถเข้าจับกับ translation initiation factors ของเซลล์เจ้าบ้าน ได้หลายชนิด ได้แก่ poly A binding protein (PABP) eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) และ eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) ซึ่งจะช่วยให้ไรโบโซมเข้าจับกับสายเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัส เพื่อสังเคราะห์โปรตีนของไวรัสขึ้น (Fontaine-Rodriguez *et al.*, 2004)

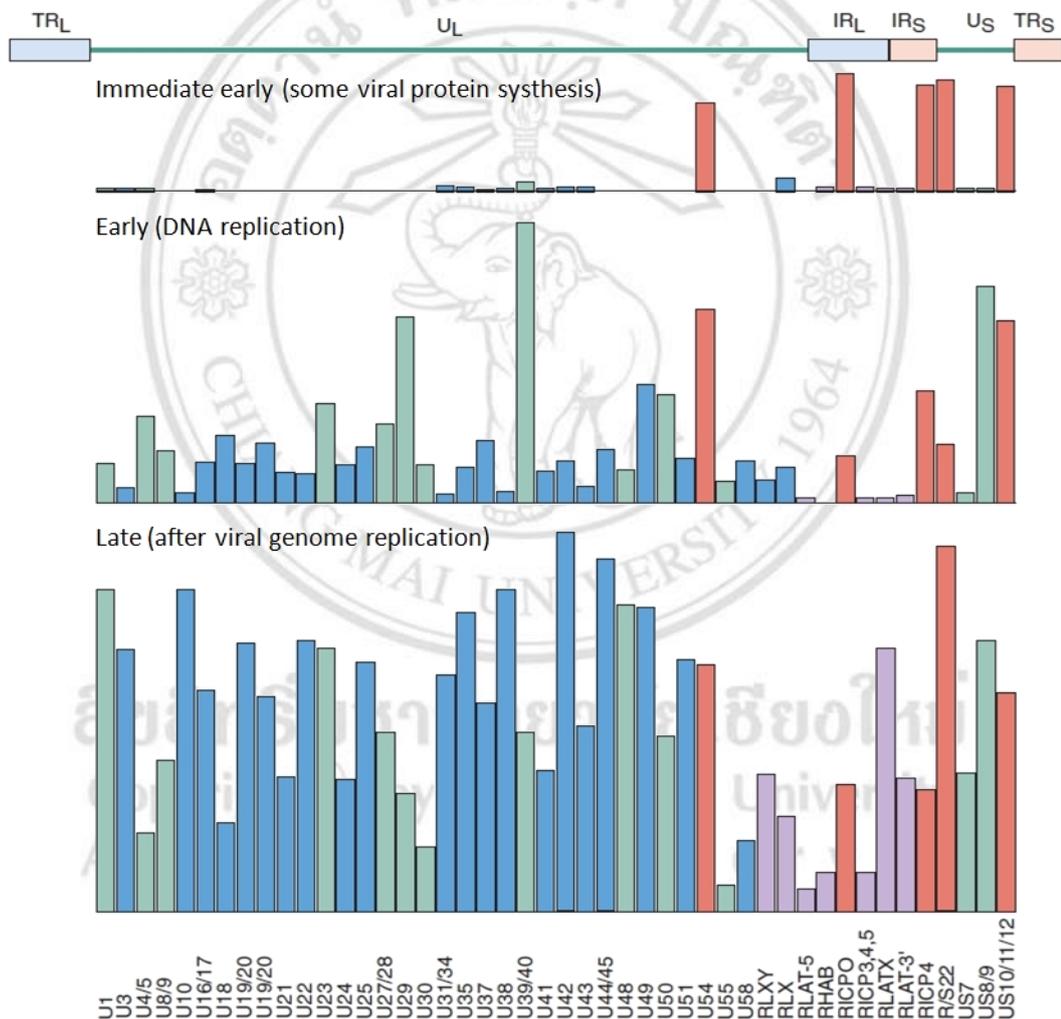


รูปที่ 1.5 การควบคุมการแสดงออกชุดยีน (IE gene E gene L gene) โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน VP16 ICP0 ICP4 ICP22 และ ICP27 (ที่มา: ดัดแปลงจาก Simonato *et al.*, 2000)

โปรตีนตัวสุดท้ายเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์เจ้าบ้าน คือ โปรตีน ICP47 ซึ่งจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโมเลกุล major histocompatibility complex class I (MHC class I) โดยการเข้าจับกับโปรตีนขนส่งแอนติเจน (transporters associated with antigen presentation) หรือโปรตีน TAP ที่แทรกตัวอยู่บนผิวของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เพื่อยับยั้งการขนส่งแอนติเจนหรือสายเปปไทด์ของไวรัส ให้กับโมเลกุล MHC ภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม จึงส่งผลให้โมเลกุล MHC ไม่สามารถจับกับแอนติเจน เพื่อนำแอนติเจนไปนำเสนออยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ที-ลิมโฟไซต์ (T-cell) ไม่สามารถตรวจจับเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อนี้ได้ (Früh *et al.*, 1995)

### 3.2 Early gene (E gene หรือ $\beta$ gene)

ภายใน 4-8 ชั่วโมงหลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัส ยีนของไวรัสที่มีหน้าที่หลักในการแสดงออก คือ E genes ซึ่งจะมีการแสดงออกเป็นโปรตีน E (Early protein) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส (DNA replication) ทั้งหมด 7 ชนิด คือ UL30 (DNA polymerase) UL42 (DNA polymerase processivity factor) UL29 หรือ ICP8 (DNA binding proteins) UL9 (ORI binding protein) UL5 UL8 และ UL52 (helicase/primase complex) ส่วนที่เหลือของโปรตีน E นั้นจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมนิวคลีโอไทด์ของไวรัส และซ่อมแซมจีโนมของไวรัสที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ เช่น UL23 (thymidine kinase) UL39 และ UL 40 (ribonucleotide reductase) (Flint *et al.*, 2008)



รูปที่ 1.6 ลำดับชั้นการแสดงออกของชุดยีนในวงจรชีวิตของไวรัสก่อโรคเริม โดย (สีแดง) แทนการแสดงออกของ IE gene (สีฟ้า) แทนการแสดงออกของ E gene (สีน้ำเงิน) แทนการแสดงออกของ L gene และ (สีม่วง) แทนการแสดงออกของ latency gene (Wagner *et al.*, 2007)

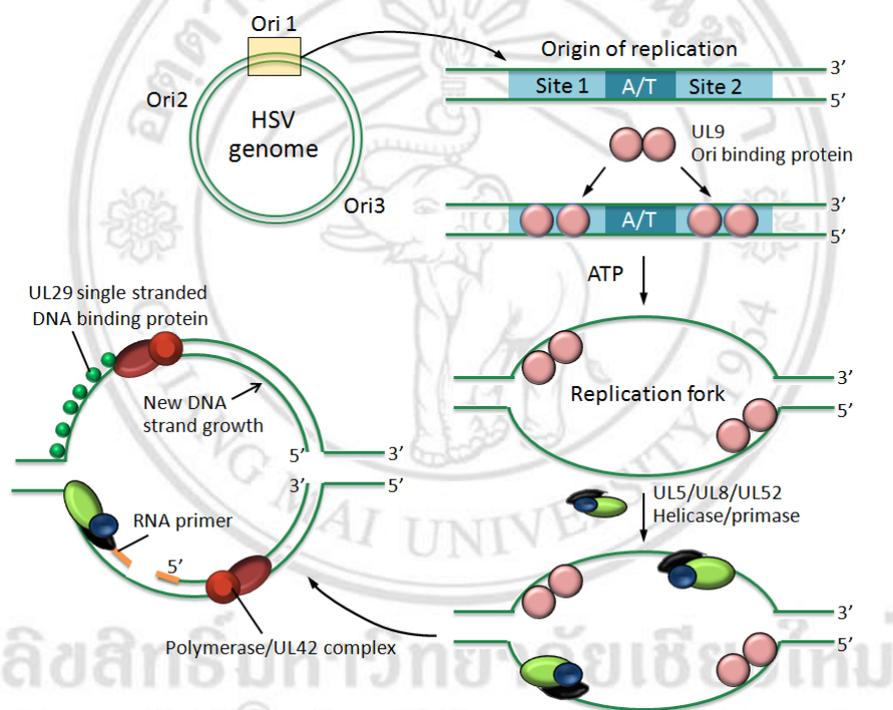
### 3.3 Late gene (L gene หรือ $\gamma$ gene)

L gene จะถูกสังเคราะห์เป็นโปรตีน L (Late protein) หลังการติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของไวรัส ประกอบกันเป็นส่วนของแคปซิดชั้นโปรตีนเมทริกซ์ และองค์ประกอบโปรตีนในชั้นเอ็นเวโลปโดยส่วนแคปซิดประกอบด้วยโปรตีน 7 ชนิด คือ UL6 UL18 (VP23) UL19 (VP5) UL26/UL26.5 (VP21/VP24) UL35 (VP26) และ UL38 (VP19C) ซึ่งล้อมรอบด้วยชั้นโปรตีนเมทริกซ์ 20 ชนิด คือ UL4 UL11 UL13 UL14 UL16 UL17 UL21 UL36 UL37 UL41(vhs) UL46 (VP11/12) UL47 (VP13/14) UL48 (VP16) UL49 (VP22) UL51 UL56 US2 US3 US10 และ US11 ส่วนของชั้นเอ็นเวโลปจะประกอบด้วยโปรตีนภายใน 5 ชนิด คือ UL20 UL43 UL45 UL49A และ US9 โดยที่ผิวของชั้นเอ็นเวโลปประกอบด้วยไกลโคโปรตีนอีก 11 ชนิด คือ UL1 (gL) UL10 (gM) UL22(gH) UL27 (gB) UL44 (gC) UL53 (gK) US4 (gG) US5 (gI) US6 (gD) US7 (gI) และ US8 (gE) (Mettenleiter, 2004)

#### 4) การจำลองดีเอ็นเอของไวรัส

กระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส จะอาศัยการทำงานของโปรตีน E ทั้งหมด 7 ชนิด คือ UL5 UL8 UL9 UL29 UL30 UL42 และ UL52 ซึ่งเมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนเหล่านี้ภายในเซลล์เข้าบ้านอย่างสมบูรณ์ กระบวนการจำลองดีเอ็นเอไวรัสจึงเกิดขึ้น โดยเริ่มต้นจากโปรตีน UL9 (ORI binding protein) เข้าจับกับตำแหน่ง Ori อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง ด้านข้างบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ A-T rich เพื่อกระตุ้นให้ดีเอ็นเอที่จุดเริ่มต้นนี้เปิดปลาย 3'-OH และ 5'-PO<sub>4</sub> (Boehmer *et al.*, 1994) โดยจะส่งสัญญาณให้โปรตีนเชิงซ้อนของ UL5 UL8 และ UL52 ให้เข้าจับสายดีเอ็นเอ โปรตีนเชิงซ้อนนี้จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เฮลิคาส (helicase) เข้าทำลายพันธะไฮโดรเจนในสายของดีเอ็นเอ เพื่อคลายเกลียวของดีเอ็นเอ เปลี่ยนจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเกิดเป็นรอยแยกที่เรียกว่า เรพลิคชัน ฟอว์ค (replication fork) (Olivo *et al.*, 1989) ต่อมาโปรตีน UL29 หรือ ICP8 ที่ทำหน้าที่เป็น single strand binding protein จะเข้ามาจับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก เพื่อป้องกันไม่ให้สายของดีเอ็นเอกลับมาสร้างพันธะไฮโดรเจนขึ้นในระหว่างขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอ เมื่อดีเอ็นเอทั้งสองสายแยกออกจากกัน (Boehmer *et al.*, 1994; Taylor and Knipe 2004) โปรตีนเชิงซ้อนที่จับอยู่จะเปลี่ยนหน้าที่เป็นเอนไซม์ไพรมเอส (primase) เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ เรียกว่า อาร์เอ็นเอไพรมเมอร์ (RNA primer) (Klinedinst and Challberg, 1994; Marsden *et al.*, 1997) ต่อจากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ที่กำหนดการสร้างจากยีน UL30 จะประกอบเข้ากับโปรตีน UL 42 หรือ DNA polymerase processivity factor กลายเป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ตำแหน่งปลาย 3'-OH ของอาร์เอ็นเอไพรมเมอร์เป็นจุดเริ่มต้น (Burrela *et al.*, 2012; Crute and Lehman, 1989) การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในทิศทาง 5' → 3' โดยการดึงนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบเข้ามาเกาะ เชื่อมเบสคู่สมเข้าด้วยกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และเชื่อมหมู่ฟอสเฟตของแต่ละ

นิวคลีโอไทด์ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ขณะที่การสังเคราะห์ที่ปลาย 3'-OH เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนสายดีเอ็นเอแม่แบบด้านปลาย 5'-PO<sub>4</sub> จะคลายตัวออกไปเป็นทางยาว โดยกลไกการจำลองดีเอ็นเอของไวรัสนี้จะเกิดแบบ Rolling circle replication คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายหนึ่งจะทำหน้าที่เป็นสายแม่แบบยังคงอยู่ในสภาพวงกลม และวนหมุนไปอย่างต่อเนื่องเพื่อสร้างเส้นดีเอ็นเอสายใหม่ การหมุนในแต่ละรอบสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนสายดีเอ็นเอแม่แบบหนึ่งเส้น (Carter and Saunders, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 1.7 ซึ่งดีเอ็นเอสายใหม่เหล่านี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถเข้าจับกับ โปรตีน UL32 (cleavage/packing protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอและเข้าจับที่ปลายของดีเอ็นเอทั้งสองเพื่อส่งสัญญาณนำสายดีเอ็นเอสายใหม่บรรจุในโครงสร้างแคปซิดเพื่อประกอบเป็นอนุภาคไวรัสและออกสู่เซลล์ต่อไป (Lamberti and Weller, 1998)

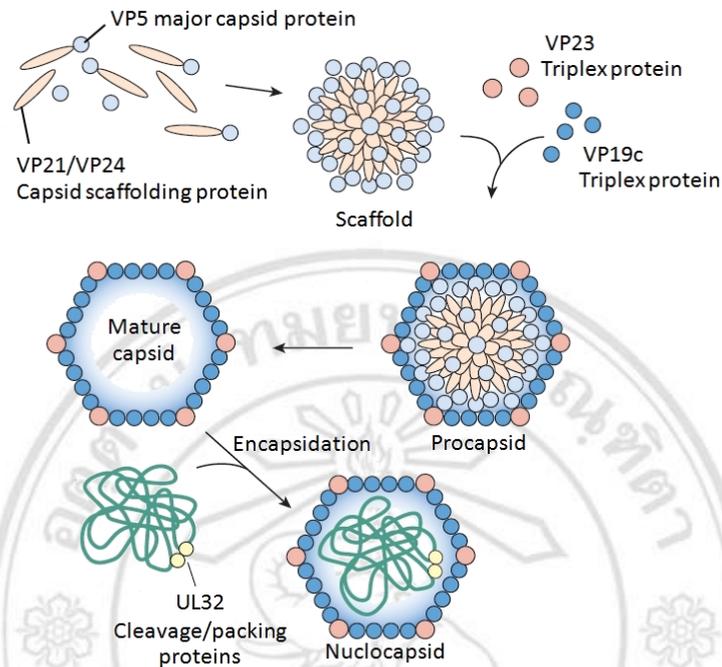


รูปที่ 1.7 การจำลองดีเอ็นเอของไวรัสก่อโรคเริมแบบ Rolling circle replication (ที่มา: ดัดแปลงจาก Wagner *et al.*, 2007)

### 5) การประกอบอนุภาคไวรัสและการออกสู่ภายนอกเซลล์

หลังจากกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส ชุด L gene จะถูกกระตุ้นเพื่อผลิตโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกขนส่งไปยังส่วนต่างๆ ภายในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อรอคอยการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสอย่างเป็นลำดับขั้น เช่น โปรตีนที่กัมนั้นที่บางชนิดจะถูกผลิตขึ้นและรอการประกอบตัวอยู่ภายในไซโทพลาสซึม โปรตีนบางชนิดถูกส่งเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เหนี่ยวนำการส่งออกนอกเซลล์ ตลอดจนไกลโคโปรตีนที่ผิวของไวรัสจะผ่านการดัดแปลงโดย

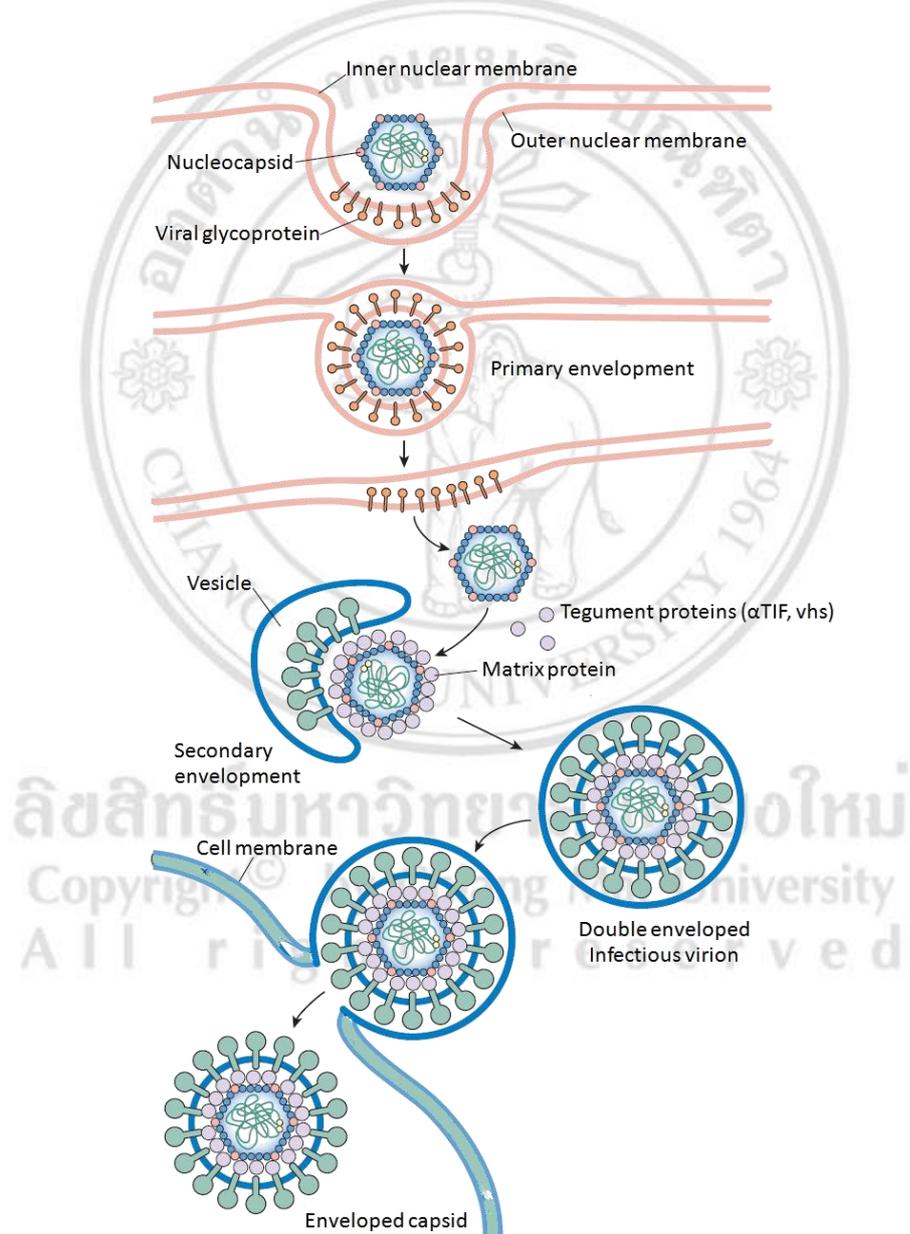
การเติมสายน้ำตาลแมนโนส (high-mannose sugar chains) ที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม แล้วขนส่งมาเตรียมรอไว้ที่ผิวของกอลจิบอดี



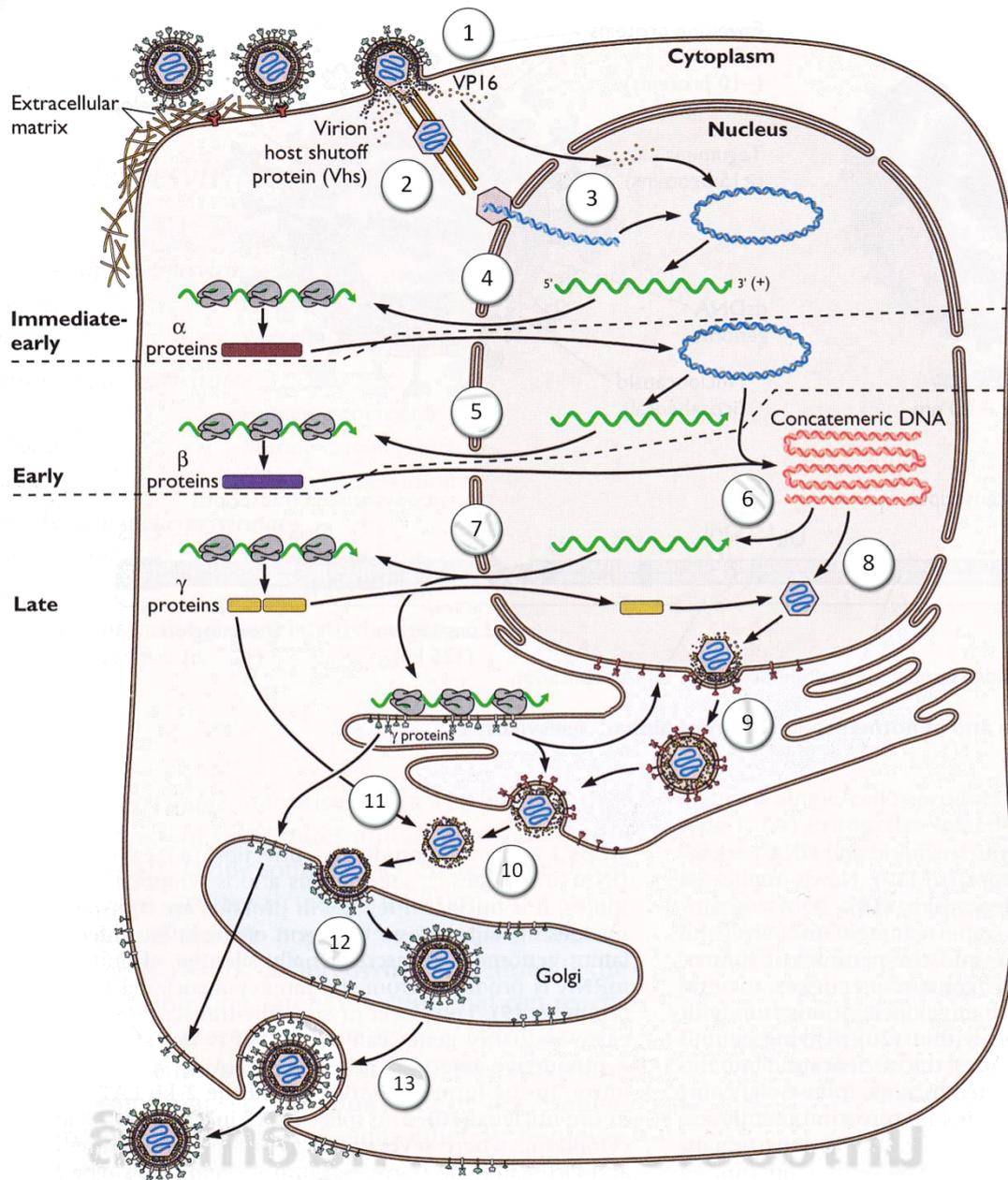
รูปที่ 1.8 การประกอบโครงสร้างนิวคลีโอแคปซิดของไวรัส (Wagner *et al.*, 2007)

การประกอบอนุภาคของไวรัสตั้งต้นจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างแคปซิดเคลื่อนที่จากไซโทพลาสซึมเข้ามาขังนิวเคลียส เริ่มแรกโปรตีน VP21/VP24 จะเข้าจับรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเพื่อเกิดเป็นโครงสร้างทรงกลมของโปรตีนสคาฟโฟลด์ (scaffold protein) โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างพื้นฐานสำหรับให้โปรตีนชนิดอื่นๆ เข้าจับได้แก่ โปรตีน VP5 (major capsid protein) VP19c/VP23 (triplex protein) VP26 (capsomer tip) การเข้าประกอบของโปรตีนเหล่านี้จะเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่าโปรแคปซิด (procapsid) ซึ่งต่อมาโครงสร้างโปรแคปซิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อกำจัดส่วนโปรตีนสคาฟโฟลด์ออก (รูปที่ 1.8) จึงเกิดเป็นช่องว่างภายในโครงสร้าง ที่ใช้สำหรับบรรจุสายดีเอ็นเอของไวรัส (DNA encapsidation) กลายเป็นนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ซึ่งขั้นตอนการบรรจุสายดีเอ็นเอนี้ต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ UL6 UL15 UL25 UL28 UL32 UL33 UL36 และ UL37 (Taylor *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2007; Whitley *et al.*, 1998) จากนั้น โปรตีน UL47 และ โปรตีนเชิงซ้อนของ UL31/UL34 ภายในนิวเคลียสจะเข้าล้อมรอบโครงสร้างของนิวคลีโอแคปซิด เพื่อทำหน้าที่เหนี่ยวนำการส่งออกนอกนิวเคลียสของนิวคลีโอแคปซิด (Liu *et al.*, 2014) นิวคลีโอแคปซิดจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นใน (inner nuclear membrane) โดยอาศัยการแตกหน่อ (budding) นำส่วนของเยื่อหุ้มนิวเคลียสเข้าห่อหุ้มโครงสร้าง (primary envelopment) เพื่อผ่านเข้าสู่ช่องว่างระหว่างชั้นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (perinuclear space) แล้วนำชั้นเอ็นเวโลปที่ได้มารวมกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก (outer nuclear membrane)

เพื่อปลดปล่อยนิวคลีโอแคปซิดออกจากไซโทพลาสซึม ต่อจากนั้นชั้นโปรตีนเมทริกซ์ภายในไซโทพลาสซึม จะเข้าห่อหุ้มโครงสร้างนิวคลีโอแคปซิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่จำเพาะชนิดต่างๆ หนึ่งในนั้นคือโปรตีน VP16 ( $\alpha$ -TIF) และ UL41 (vhs) มีหน้าที่เหนี่ยวนำให้นิวคลีโอแคปซิดเคลื่อนที่เข้าสู่กอลจิบอดีโดยอาศัยการแตกหน่อ ส่งผลให้โครงสร้างนิวคลีโอแคปซิดที่ล้อมรอบด้วยชั้นโปรตีนเมทริกซ์ได้รับส่วนของชั้นเอ็นเวโลป (secondary envelopment) (รูปที่ 1.9) และไกลโคโปรตีนทั้ง 11 ชนิด จากผิวของกอลจิบอดี เกิดเป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสก่อโรคเรื้อรังที่สมบูรณ์ภายในกอลจิบอดี ในที่สุดอนุภาคไวรัสจะถูกขนส่งผ่านเอกโซไซโซโทติกเวสิเคิล (exocytotic vesicle) เพื่อออกจากเซลล์เข้าบ้าน (Wagner *et al.*, 2007) (รูปที่ 1.10)



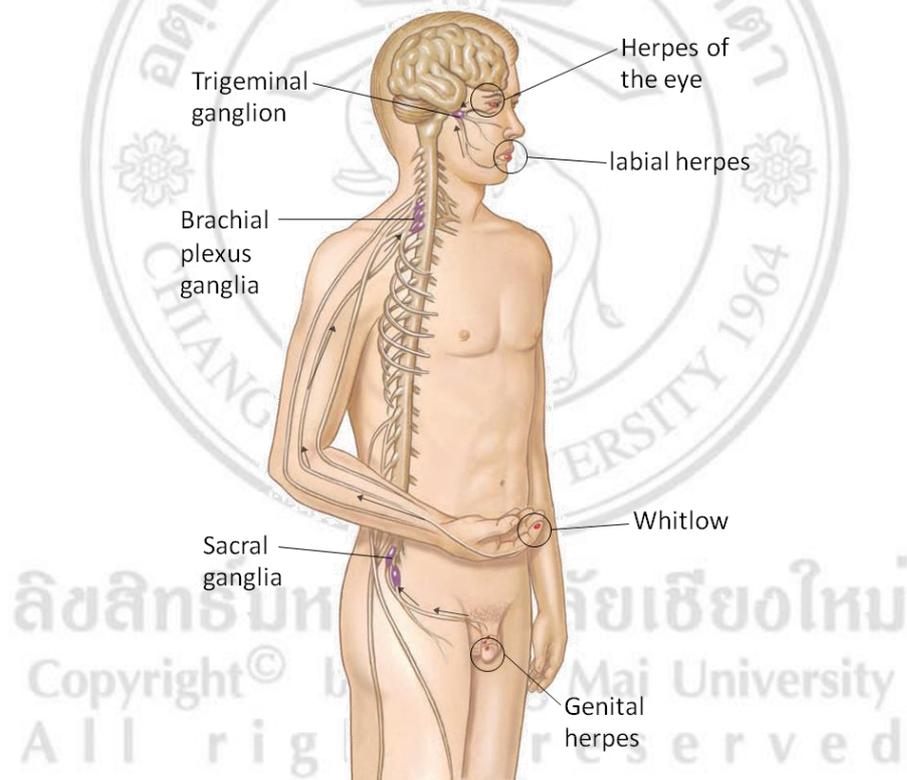
รูปที่ 1.9 การประกอบเป็นอนุภาคไวรัสก่อโรคเรื้อรังที่สมบูรณ์และเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Wagner *et al.*, 2007)



รูปที่ 1.10 วงจรชีวิตของไวรัสก่อโรคริมในเซลล์เจ้าบ้าน: (1) อนุภาคไวรัสเข้าจับกับรีเซปเตอร์บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน และหลอมรวมชั้นเอ็นเวโลปกับเยื่อหุ้มเซลล์ (2) นิวคลีโอแคพซิดและโปรตีนของไวรัสผ่านเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (3) นิวคลีโอแคพซิดปล่อยสายดีเอ็นเอเข้าสู่นิวเคลียส (4) เกิดกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของ IE gene (5) เกิดกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของ E gene (6) เกิดกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส (7) เกิดกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของ L gene (8) สายดีเอ็นเอถูกบรรจุในโครงสร้างแคพซิด (9) เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสและได้รับชั้นของเอ็นเวโลปครั้งแรก (10) สูญเสียส่วนเอ็นเวโลปเพื่อออกสู่ไซโทพลาสซึม (11) ประกอบเข้ากับชั้นโปรตีนเมทริกซ์ (12) ได้รับส่วนของเอ็นเวโลปครั้งที่สองและกลายเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (13) ปลดปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Flint *et al.*, 2008)

### 1.3.4 การติดต่อและอาการทางคลินิก

ไวรัสก่อโรคเริมสามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการสัมผัสทางผิวหนัง เยื่อบุผิว เยื่อเมือก หรือผ่านทางเพศสัมพันธ์ หลังจากติดเชื้อไวรัสครั้งแรก (primary infection) ไวรัสจะเข้าไปเจริญอยู่ในเซลล์เยื่อบุผิวชั้นผิวหนัง แล้วเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนไวรัสอย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลา 4-10 วัน บริเวณผิวหนังที่ติดเชื้อจะพัฒนาเป็นตุ่มน้ำใส (vesicle) ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ของเหลวในตุ่มนี้จะเต็มไปด้วยไวรัส เศษซากเซลล์ และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ที่ก่อให้เกิดการอักเสบและความเจ็บปวด ต่อมาตุ่มน้ำใสจะพัฒนาเป็นสะเก็ดและแตกในที่สุด ไม่นานแผลจะตกสะเก็ดและหายไปเองภายใน 2-3 สัปดาห์ หากมีการติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำซ้อนจะทำให้อาการของโรครุนแรง และใช้เวลาในการรักษานานขึ้น ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น เป็นไข้ ปวดกล้ามเนื้อ หรือมีอาการต่อมน้ำเหลืองโต (Kimberlin, 2004)



รูปที่ 1.11 การแฝงตัวในปมประสาทของเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (Black, 2011)

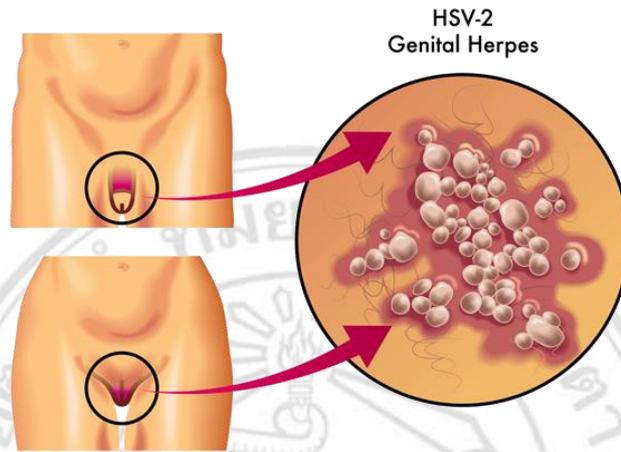
การกำจัดไวรัสออกจากร่างกายไม่สามารถทำได้อย่างเด็ดขาด เพราะไวรัสมีระยะแฝงตัว (latency) ที่ใช้ในการหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยภายใน 2 สัปดาห์หลังติดเชื้อไวรัสครั้งแรก ไวรัสจะเดินทางผ่านเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory neurons) เข้าไปพักตัวในปมประสาท (ganglia) เรียกกระบวนการขนส่งเหล่านี้ว่า “retrograde transport” ในกรณีของการติดเชื้อที่เยื่อบุบริเวณปาก ไวรัสจะเดินทางไปพักตัวที่ปมประสาท trigeminal ส่วนการติดเชื้อที่เยื่อบุบริเวณอวัยวะเพศ ไวรัสจะ

เดินทางไปที่ปมประสาท sacral ดังแสดงในรูปที่ 1.11 ในระยะแฝงนี้สามารถตรวจพบดีเอ็นเอและเอ็มอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ แต่จะไม่พบการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส ทำให้ไม่เกิดกระบวนการจำลองตนเองของไวรัสและผลิตอนุภาคไวรัสออกมาทำลายเซลล์เนื้อเยื่อ (Taylor *et al.*, 2002) หากร่างกายได้รับการกระตุ้นซ้ำ (reactivation) จากปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเครียด รังสีอัลตราไวโอเล็ต ความร้อน หรือในช่วงมีประจำเดือน ทำให้ไวรัสเคลื่อนที่ผ่านเส้นประสาทแอกซอน (axon) กลับมาที่เซลล์เยื่อหุ้มบริเวณที่ได้รับเชื้อ และเกิดกระบวนการจำลองตนเองอีกครั้ง รอยโรคจึงมักเกิดซ้ำที่ตำแหน่งเดิม ซึ่งเรียกว่าการติดเชื้อซ้ำ (recurrent infection) แต่อาการที่ปรากฏขึ้นจะมีความรุนแรงน้อยกว่า และหายได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับติดเชื้อครั้งแรก เนื่องจากร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสครั้งแรกแล้วโดยความถี่ของการเกิดโรคซ้ำอยู่ที่ประมาณ 5 ครั้งต่อปี และจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป (Benedetti *et al.*, 1999; Black, 2011)

ในการติดเชื้อไวรัสก่อโรคครั้งแรกหรือการติดเชื้อซ้ำ ผู้ติดเชื้อที่มีภูมิคุ้มกันปกติมักไม่แสดงอาการของโรค มีเพียงร้อยละ 10-15 ของผู้ติดเชื้อเท่านั้นที่มีประสบการณ์แสดงอาการของโรคเริ่ม โดยทำให้เกิดลักษณะอาการทางคลินิกต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้ (Black, 2011)

- 1) การติดเชื้อเริ่มที่ช่องปากและลำคอ (oropharyngeal herpes simplex) มีสาเหตุหลักจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 1 โดยทั่วไปจะทำให้เกิดตุ่มแผลที่บริเวณริมฝีปาก เรียกว่า cold sore หรือ fever blister ในเด็กอายุ 1-3 ปี อาจมีการติดเชื้อที่บริเวณเหงือก (herpetic gingivostomatitis) ที่ทำให้เกิดอาการเหงือกบวมและเหงือกอักเสบ ส่วนในผู้ใหญ่มักพบการติดเชื้อในลำคอร่วมกับการติดเชื้อปกติ ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบภายในลำคอ (pharyngitis) และต่อมทอนซิล (tonsillitis)
- 2) การติดเชื้อเริ่มที่ดวงตา (dendritic keratitis) มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 สามารถพบผู้ติดเชื้อได้ตั้งแต่วัยทารกจนถึงผู้ใหญ่ การติดเชื้อจะทำให้เกิดแผลและการอักเสบที่เยื่อหุ้มกระจกตา หากมีการอักเสบลึกเข้าไปในชั้นตาอาจทำให้ตาบอดได้
- 3) การติดเชื้อที่นิ้วมือ (herpetic whitlow) มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 1 เกิดจากการนำนิ้วมือไปสัมผัสบริเวณช่องปากที่ติดเชื้อ เช่น เด็กที่ชอบดูดนิ้วมือตัวเอง ทำให้เชื้อไวรัสแพร่กระจายสู่นิ้วมือ เกิดเป็นแผลและตุ่มน้ำอักเสบ
- 4) การติดเชื้อเริ่มที่บริเวณอวัยวะเพศ (genital herpes) มักเกิดขึ้นหลังมีกิจกรรมทางเพศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นติดการเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 2 แต่ปัจจุบันสามารถพบไวรัสก่อโรคชนิดที่ 1 ในแผลบริเวณอวัยวะเพศได้ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเพศสัมพันธ์ทางปาก (oral sex) การติดเชื้อจะทำให้เกิดแผลพุพองที่อวัยวะเพศ ทวารหนัก และบริเวณต้นขา ซึ่งจะทำให้เกิดอาการคันรวมทั้งความเจ็บปวดรุนแรงที่บริเวณแผล (รูปที่ 1.12)

5) การติดเชื้อเริมที่ระบบประสาทส่วนกลาง (herpes simplex encephalitis) มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มักเกิดขึ้นในระยะการติดเชื้อซ้ำ เมื่อไวรัสที่บริเวณผิวหนังเดินทางย้อนกลับไปที่ยมประสาทบริเวณสมองหรือ trigeminal ganglia แต่กลับย้อนไปติดเชื้อที่สมองแทน ทำให้ผู้ติดเชื้อแสดงอาการสมองอักเสบ และอาจเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิต



รูปที่ 1.12 การติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่บริเวณอวัยวะเพศ

โดยทั่วไปการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมในผู้ติดเชื้อที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติมักจะไม่มีอาการโรคที่รุนแรงและสามารถหายได้เอง แต่การติดเชื้อจะทวีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยโรคเอดส์ หรือทารกแรกเกิด กลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้มักมีโอกาที่จะปรากฏอาการของโรคเริมซ้ำได้หลายครั้งโดยมีความถี่กว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ พบระยะเวลาของโรคที่จะยาวนานกว่า บางครั้งการติดเชื้อซ้ำจะก่อให้เกิดอาการโรคที่รุนแรง และอาจพบการกระจายเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ไวรัสแพร่ไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ ไต สมอง และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต (พิไลพันธ์ และ สมศักดิ์, 2540).

### 1.3.5 ระบาดวิทยา

โรคเริมบริเวณอวัยวะเพศจัดเป็นหนึ่งในโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จากการศึกษากลไกการก่อโรคพบว่า 1 ใน 200 ของผู้ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สามารถหลังเชื้อไวรัส (HSV shedders) ที่บริเวณผิวหนัง แม้ไม่มีแผลของโรคเริมปรากฏ ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จึงไม่ทราบว่ามีการติดเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกาย และถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่คู่นอนโดยไม่รู้ตัว (Black, 2011) ด้วยเหตุปัจจัยดังกล่าวทำให้ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สามารถแพร่ระบาดได้รวดเร็ว การสำรวจทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ใช้การตรวจสอบแอนติบอดีของเชื้อไวรัสในกลุ่มประชากร เพื่อทราบถึงอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 รวมทั้งติดตามพฤติกรรมทางเพศของประชาชน (Cowan *et al.*, 1994) พบว่าการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

มีอยู่สูงเกือบทุกมุมโลก ทั้งในประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนา โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ (ร้อยละ 1.4 อยู่ในกลุ่มอายุ 14-19 ปี และร้อยละ 26 อยู่ในกลุ่มอายุ 40-49 ปี) และจำนวนคู่นอนในช่วงชีวิต ส่วนมากการติดเชื้อมักเกิดในเพศหญิง ซึ่งมีอัตราส่วนมากกว่าเพศชายถึง 2 เท่าตัว ในแถบทวีปแอฟริกามีการติดเชื้อไวรัสเริมชนิดที่ 2 สูงที่สุดประมาณร้อยละ 30-80 รองลงมาคือ แถบทวีปอเมริกาใต้ (ร้อยละ 30-50) และน้อยที่สุดอยู่ในทวีปเอเชีย (ร้อยละ 10-40) ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออก ประเทศไทยมีสถิติการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สูงที่สุด โดยมีสถิติการติดเชื้อประมาณร้อยละ 37 ในขณะที่ประเทศฟิลิปปินส์มีสถิติของการติดเชื้อต่ำที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 9 (Patnaik *et al.*, 2007; Schiffer and Corey, 2013) เมื่อคิดจำนวนผู้ติดเชื้อทั่วโลกพบว่าในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2003-2008 มีจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ถึง 536 ล้านคน หรือประมาณร้อยละ 16 ของประชากรทั่วโลก ซึ่งยังคงมีอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นถึงปีละ 23.6 ล้านคน (Locker, 2008) จนถึงปัจจุบันไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก มีแนวโน้มของผู้ติดเชื้อสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

โดยทั่วไปการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ไม่มีอันตรายแก่ผู้ติดเชื้อถึงขั้นเสียชีวิต แต่ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ยังคงเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตได้ จากรายงานการเสียชีวิตเกิดขึ้นครั้งแรกในช่วงกลางปี ค.ศ. 1930 ผู้ป่วยเป็นทารกวัยเพียง 7 เดือน ซึ่งได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จากมารดาขณะตั้งครรภ์ ไวรัสได้แพร่กระจายเข้าสู่ตับและต่อมหมวกไตจนทารกเสียชีวิต (Hass, 1935) การติดเชื้อเริมในทารก (neonatal herpes) ดังกล่าวสร้างความกังวลให้แก่กลุ่มมารดาที่กำลังตั้งครรภ์เป็นอย่างมาก จากรายงานการสำรวจอัตราการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในทารกต่อประชากรทารกแรกเกิด 100,000 คน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ซึ่งคาดการณ์ว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา มีอัตราการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในทารกอยู่ที่ 9.6 ราย ต่อประชากรทารกแรกเกิด 100,000 คน (Flagg and Weinstock, 2011) ในประเทศแคนาดาอยู่ที่ 5.9 รายต่อประชากรทารกแรกเกิด 100,000 คน (Kropp *et al.*, 2006) และในประเทศออสเตรเลียอยู่ที่ 3.27 รายต่อประชากรทารกแรกเกิด 100,000 คน (Jones *et al.*, 2014) ซึ่งแม้ว่าจะเกิดขึ้นค่อนข้างยากเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนของทารกแรกเกิดปกติ แต่ในกรณีของมารดาที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ครั้งแรก ความเสี่ยงของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสู่ทารกสามารถเกิดขึ้นได้ค่อนข้างสูง ในช่วงไตรมาสสุดท้ายของการตั้งครรภ์จะมีความเสี่ยงของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสู่ทารกสูงถึงร้อยละ 30-50 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการคลอดทารกผ่านทางช่องคลอดจะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 85 (Singhal *et al.*, 2009) เนื่องจากทารกแรกคลอดมีระบบภูมิคุ้มกันที่ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นหากมีการติดเชื้อไวรัส นอกจากอาการทางผิวหนัง ดวงตา และช่องปากที่ปรากฏรุนแรงแล้ว มักจะมีการติดเชื้อแบบแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ รวมไปถึงระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้อัตราการตายในทารกแรกคลอดสูงถึงร้อยละ 50-80 ในกรณีของทารกที่รอดชีวิตจะมีความเสี่ยงสูงที่จะแสดงอาการพิการทางสมอง (Brown, 2004)

ความก้าวหน้าของเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เพื่อหาสาเหตุหลักของโรคแผลที่บริเวณอวัยวะเพศ (genital ulcer disease) จากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยตัวอย่างที่เป็นโรคซิฟิลิส โรคแผลริมอ่อน (Chancroid) และโรคริมบริเวณอวัยวะเพศ ในประเทศอินเดีย แอฟริกาใต้ แทนซาเนีย อเมริกา และประเทศไทย พบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของผู้ป่วยเป็นโรคแผลที่บริเวณอวัยวะเพศมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเอดส์ชนิดที่ 2 (Beyrer *et al.*, 1998; Corey, 2004) จึงทำให้ไวรัสก่อโรคเอดส์ชนิดที่ 2 เป็นสาเหตุอันดับต้นๆ ของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเอชไอวี (Human immunodeficiency virus) ซึ่งกลไกที่เพิ่มความเสี่ยงนี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในแผลโรคเอดส์ก่อนการรับเชื้อเอชไอวี แผลที่บริเวณอวัยวะเพศนี้จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อทำการรักษาตัวเอง ทำให้มีเซลล์ภูมิคุ้มกันจำนวนมากมากระจุกรวมกัน หนึ่งในนั้นคือ CD4+ ที-ลิมโฟไซต์ หรือ helper T cell ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายหลักในการโจมตีของเชื้อเอชไอวี ดังนั้นเมื่อสารคัดหลั่งของผู้ป่วยโรคเอดส์สัมผัสถูกบริเวณแผลโรคเอดส์ จึงทำให้การส่งผ่านของเชื้อเอชไอวีเข้าสู่ร่างกายง่ายขึ้น 2-3 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าการรักษาแผลของโรคเอดส์จนหายสนิทไม่ได้ช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อเอชไอวี เนื่องจากบริเวณแผลที่ได้รับการรักษา ยังคงมีปริมาณ CD4+ ที-ลิมโฟไซต์ที่อยู่จำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณผิวหนังปกติ ไม่เพียงเท่านั้นบริเวณผิวของ CD4+ ที-ลิมโฟไซต์ ก็ยังมีระดับการแสดงออกของโปรตีนรีเซปเตอร์ชนิด C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) และ C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) สูง ซึ่งเชื้อไวรัสเอชไอวีใช้ประโยชน์เป็นโครีเซปเตอร์ (coreceptor) ในการเข้าสู่ที-ลิมโฟไซต์ (Corey *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009) จากเหตุผลที่กล่าวมาทำให้ไวรัสก่อโรคเอดส์ชนิดที่ 2 ไม่เพียงเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเอชไอวี แต่ยังเป็นปัจจัยส่งเสริมการแพร่เชื้อเอชไอวีในร่างกายได้เร็วขึ้น

#### 1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ก่อนการนำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกและวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโปรตีนโอมิกส์นั้น จำเป็นต้องทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอน เพื่อหลีกเลี่ยงการนำโปรตีนปริมาณมากหรือน้อยเกินไปในการวิเคราะห์ ซึ่งส่งผลต่อรูปแบบและการแสดงออกของโปรตีนที่ปรากฏ เมื่อมีการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนจากตัวอย่างต่างสถานะกัน การวัดปริมาณโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm หรือการวัดความเข้มของสี (colorimetry) ที่เกิดจากทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารเคมี อาทิเช่น วิธี Bradford ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว ราคาไม่แพง และมีความไวสูง



มีมวลโมเลกุลต่ำ จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีในสีข้อม จึงต้องเลือกวิธีการวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีอื่นแทน นอกจากนี้ โปรตีนที่จับกับสีข้อมอาจจับกับภาชนะใส่สารละลายที่ทำจากควอทซ์ (quartz cuvette) ทำให้เกิดการการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ผิดพลาด จึงควรใช้ภาชนะที่ทำด้วยพลาสติกหรือแก้ว และหมั่นทำความสะอาดบ่อยๆ ระหว่างใช้งาน (Krohn, 2002)

## 1.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์

เพื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงเป็นที่มาของการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ในชื่อ “โปรตีโอมิกส์” (proteomics) ที่มีรากศัพท์มาจากคำว่า “โปรตีโอม” (proteome) หมายถึงโปรตีนทั้งหมดที่สร้างจากรหัสพันธุกรรมในเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Wilkins *et al.*, 1996) โปรตีโอมิกส์จึงหมายถึงการศึกษารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกโดยจีโนมของสิ่งมีชีวิต ณ เวลาหนึ่งๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด โครงสร้าง คุณสมบัติ และหน้าที่ของโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อศึกษาว่าภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีการสร้างหรือเปลี่ยนแปลงโปรตีนชนิดใดในสภาวะทดลอง และโปรตีนเหล่านั้นมีกลไกการทำงานร่วมกันอย่างไร

การศึกษาโปรตีโอมิกส์มีความยุ่งยากกว่าการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์มาก ตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ศึกษาจำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมหลายขั้นตอน และต้องใช้เทคนิคขั้นสูงในการแยกหรือจำแนกโปรตีนออกมา ซึ่งมักส่งผลให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญหายไป ทำให้การแปลผลมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นการเรียนรู้และเข้าใจถึงหลักการพื้นฐานของเทคนิคดังกล่าวนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปการศึกษาโปรตีโอมิกส์ประกอบด้วยขั้นตอน การสกัด โปรตีน การแยกโมเลกุลของโปรตีน การวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์ (peptide) และการระบุชนิดโปรตีน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (อภิญา, 2551)

### 1.5.1 การสกัดโปรตีน

ขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่มีผลต่อการแยกโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีน โดยโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ต้องปราศจากการปนเปื้อนจากสารอื่นไม่เกิดการสูญเสียหรือถูกตัดแปลงจากสารเคมี ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดโปรตีนจึงต้องทำที่อุณหภูมิต่ำ ใช้สารเคมีน้อย และมีการกำจัดสิ่งเจือปนออก โดยการสกัดโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เซลล์แตกและปลดปล่อยโปรตีนในรูปสารละลายออกสู่ภายนอกเซลล์ เช่น การใช้แรงดันออสโมซิส (osmosis pressure) ซึ่งเหมาะสำหรับตัวอย่างเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง วิธีการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) เหมาะกับตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่แขวนลอยในสารละลาย การใช้คลื่นเสียง (sonication) และการย่อยด้วยเอนไซม์ในกรณีของเซลล์ที่มีผนัง

เซลล์แข็งแรง เช่น เซลล์พืชหรือเชื้อรา นอกจากนี้อาจใช้ดีเทอร์เจนท์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งนิยมใช้ในการสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture cell) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนยังขึ้นกับสารละลายที่ใช้สกัดโปรตีนเป็นสำคัญ ซึ่งมีองค์ประกอบและหน้าที่ดังนี้ (Scopes, 1993)

1) **สารแปลงสภาพ (denaturant)** นิยมใช้ urea เข้มข้นร่วมกับ thiourea ซึ่งสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสายพอลิเพปไทด์ และระหว่างตัวทำลายที่เป็นน้ำกับโปรตีน ทำให้โมเลกุลโปรตีนอยู่ในรูปโครงสร้างพื้นฐานหรือโครงสร้างลำดับที่ 1 (primary conformation) รวมทั้งช่วยละลายส่วนของโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic protein) ให้ละลายในสารละลาย

2) **สารดีเทอร์เจน (detergent)** เป็นสารที่มีคุณสมบัติแอมฟิพาติก (amphiphatic) สามารถเข้าไปแทรกตัวเพื่อลดแรงพันธะไฮโดรฟอบิก (hydrophobic interaction) ที่จับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับสารอื่น แล้วจึงเข้าล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ช่วยให้โปรตีนละลายในสารละลาย และป้องกันการจับกันระหว่างโปรตีนเนื่องจากสภาพความมีขั้วต่ำ โดยดีเทอร์เจนที่นิยมใช้มักเป็นประเภทดีเทอร์เจนที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (zwitterionic detergent) เช่น 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) หรืออาจเป็นดีเทอร์เจนชนิดไร้ประจุ (nonionic detergent) เช่น octyl phenoxy polyethoxy ethanol (NP-40) Tween 80 และ Triton X-100 หากในกรณีที่โปรตีนในตัวอย่างละลายได้ยาก อาจเติมดีเทอร์เจนที่มีประจุลบ (anionic detergent) เช่น SDS ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการละลายโปรตีนได้ดีมากขึ้น อย่างไรก็ตามไม่สามารถใช้ SDS เป็นองค์ประกอบหลักของสารละลายได้ เนื่องจาก SDS มีประจุลบและสามารถจับรวมกับโปรตีนกลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน ซึ่งสามารถรบกวนระบบอเล็กโตรโฟรีซิสในขั้นตอนการแยกชนิดโปรตีนได้ จึงควรใช้ SDS ร่วมกับดีเทอร์เจนชนิดหลักในอัตราส่วน 1:8 เป็นอย่างน้อย หรือเพิ่มขึ้นตอนการแยก SDS ออกก่อนนำไปแยกโมเลกุลของโปรตีน

3) **ตัวรีดิวซ์ (reducing agent)** ทำหน้าที่ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ของโปรตีนแล้วคงสภาพของโปรตีนทั้งหมดให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ เพื่อป้องกันการพับงอตัวของโปรตีนและป้องกันการหมู่ไทโอลของโปรตีนจากการถูกออกซิไดส์ โดยตัวรีดิวซ์ที่นิยมใช้ได้แก่  $\beta$ -mercaptoethanol dithiothreitol (DTT) และ 1,4-dithioerythanol (DTE)

4) **บัฟเฟอร์ (buffer)** ทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของพีเอชในสารละลายให้คงที่ เพื่อป้องกันผลกระทบของโปรตีนจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน นิยมใช้บัฟเฟอร์ชนิด phosphate หรือ Tris ซึ่งมีข้อดีที่สามารถแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต และมีราคาไม่สูง

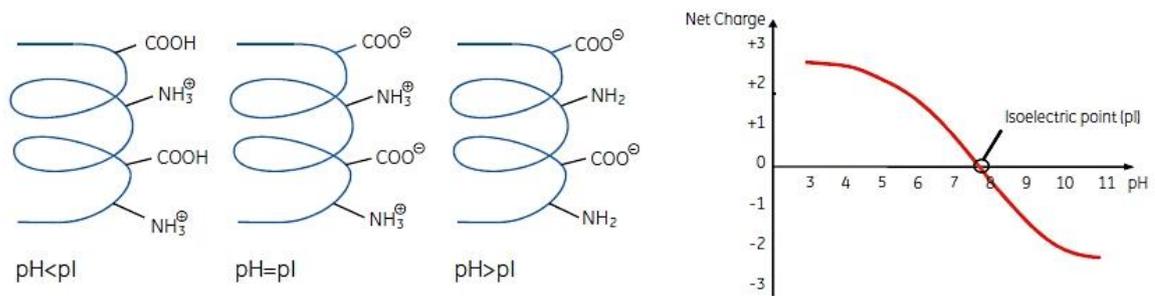
5) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (protease inhibitor) ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการโปรตีโอไลซิส (proteolysis) ของเอนไซม์โปรติเอส เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ โดยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่นิยมใช้มีหลายชนิด แต่ละชนิดยับยั้งการทำงานประเภทเอนไซม์โปรติเอสได้แตกต่างกัน ได้แก่ (1) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซอรัรินโปรติเอส (serine protease) เช่น phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) benzamide และ aprotinin (2) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิสเทอีนโปรติเอส (cysteine protease) เช่น antipain และ leupeptin (3) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสปาทิกโปรติเอส (aspartic protease) ได้แก่ pepstatin และ diazoacetylornithine methyl ester (DAN) (4) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) ได้แก่ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) แต่เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสตามธรรมชาติมีหลายประเภท จึงมักนิยมใช้โปรติเอสอินฮิบิเตอร์แบบผสมเพื่อสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสได้หลายประเภทพร้อมกัน เช่น cocktail protease inhibitor

### 1.5.2 การแยกโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติ

ภายในเซลล์หรือตัวอย่างเนื้อเยื่อนำมาศึกษาอาจประกอบด้วยจำนวนโปรตีนมากกว่าพันชนิด การแยกโปรตีนเหล่านั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคที่มีความละเอียดสูง เทคนิคการแยกโปรตีนทางโปรตีโอมิกส์ที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis) หรือ 2-DE ซึ่งเป็นการรวมเทคนิคระหว่างไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing, IEF) เข้ากับ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ดังนั้น โปรตีนที่อยู่รวมกันจึงถูกแยกตามจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ตามลำดับ ทำให้เทคนิคนี้สามารถแยกโปรตีนได้ครั้งละจำนวนมากจากตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อในคราวเดียวกัน (Westermeier and Naven, 2002; Görg, 2004)

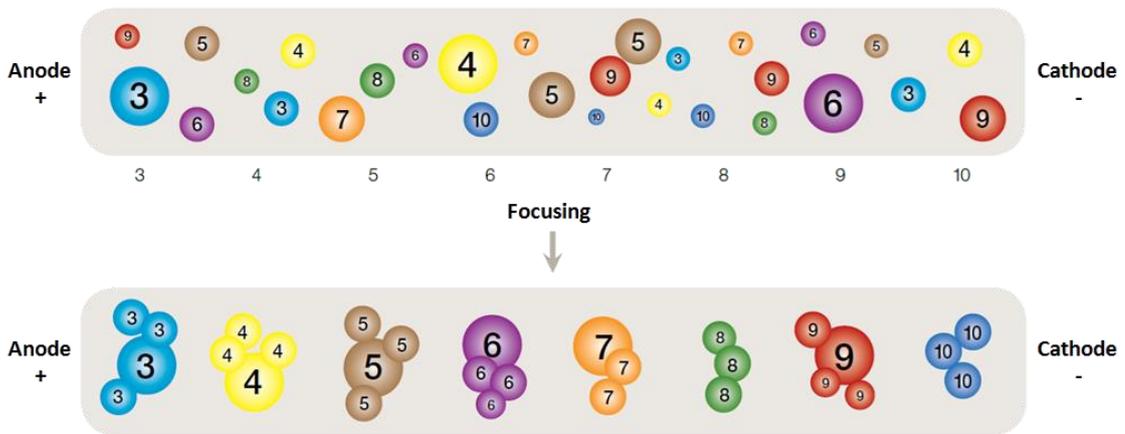
#### 1) ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง หรือ IEF เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็กทริก หรือ pI ซึ่งหมายถึงค่า pH ที่ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิ (net charge) เป็นศูนย์ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีทั้งประจุบวกและลบ (amphoteric) ซึ่งเกิดจากการแตกตัวในหมู่แขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโน ได้แก่ หมู่อะมิโน ( $\text{NH}_3^+$ ) และหมู่คาร์บอกซิล ( $\text{COO}^-$ ) โดยการแตกตัวของหมู่ดังกล่าวจะขึ้นกับ pH ของสภาพแวดล้อมที่โปรตีนชนิดนั้นละลายอยู่ดังแสดงในรูปที่ 1.14



**รูปที่ 1.14** การเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีน ตามค่า pH ของสภาพแวดล้อมที่โปรตีนละลาย และกราฟแสดงประจรวมของโปรตีนที่ค่า pH ต่างๆ (Görg, 2004)

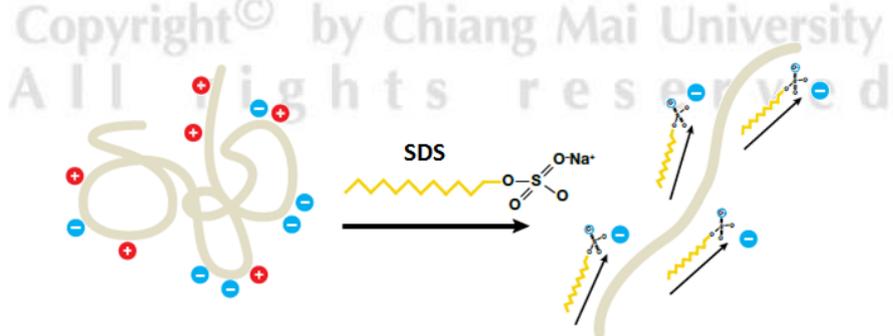
เมื่อนำโปรตีนมาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มี pH ต่างกันเป็นลำดับขั้น (pH gradient) ภายใต้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (ที่  $\text{pH} > \text{pI}$ ) จะเกิดการเคลื่อนที่บนสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกตามความแรงของประจุบนโมเลกุล โดยระหว่างเคลื่อนที่โปรตีนจะได้รับโปรตอน (protonate) จนกระทั่งประจุสุทธิกลายเป็นศูนย์ หรือมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า โปรตีนก็จะหยุดการเคลื่อนที่ที่ตำแหน่ง pH เท่ากับ pI ของตัวเอง ในทางกลับกันเมื่อโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นบวก (ที่  $\text{pH} < \text{pI}$ ) ก็จะเกิดการเคลื่อนที่บนสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเข้าหาขั้วลบ และค่อยๆ สูญเสียโปรตอน (deprotonate) ระหว่างทางที่เคลื่อนที่ จนกระทั่งประจุสุทธิเป็นศูนย์ ก็จะหยุดการเคลื่อนที่ลง ณ ตำแหน่ง pH เท่ากับ pI ของตัวเองเช่นกัน (รูปที่ 1.15) ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีค่า pI แตกต่างกันได้แม้มีค่าใกล้เคียงกันเพียง 0.01 หน่วยพีเอช โดยการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งในปัจจุบันนิยมทำบนแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ตามแนวอนที่ผิวกว้างบนแผ่นพลาสติก ที่เรียกว่า Immobiline DryStrip gels (IPG strips) โดยภายในเนื้อเจลจะมีอนุพันธ์ immobiline ที่มีหมู่บัพเฟอร์กรดและเบสตรึงอยู่กับพอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารแอมโฟไลต์ (ampholyte) ที่มีคุณสมบัตินำไฟฟ้าได้ดี ทำให้ภายในเนื้อเจลเกิดเป็นสภาวะ pH gradient สำหรับใช้แยกโปรตีนตามประจุ ซึ่งข้อดีคือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ภายในเจลระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง ใช้ปริมาณตัวอย่างโปรตีนสำหรับวิเคราะห์เพียงไม่กี่ไมโครกรัม สะดวกต่อการเตรียมและใช้งาน (Görg, 2004)



รูปที่ 1.15 การแยกโปรตีนด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง โดยนำตัวอย่างโปรตีนมาแยกภายใน pH gradient และอิทธิพลของสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้โปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านแต่ละค่า pH จนถึงค่า pI ของตัวเอง (BioRadiations, 2013)

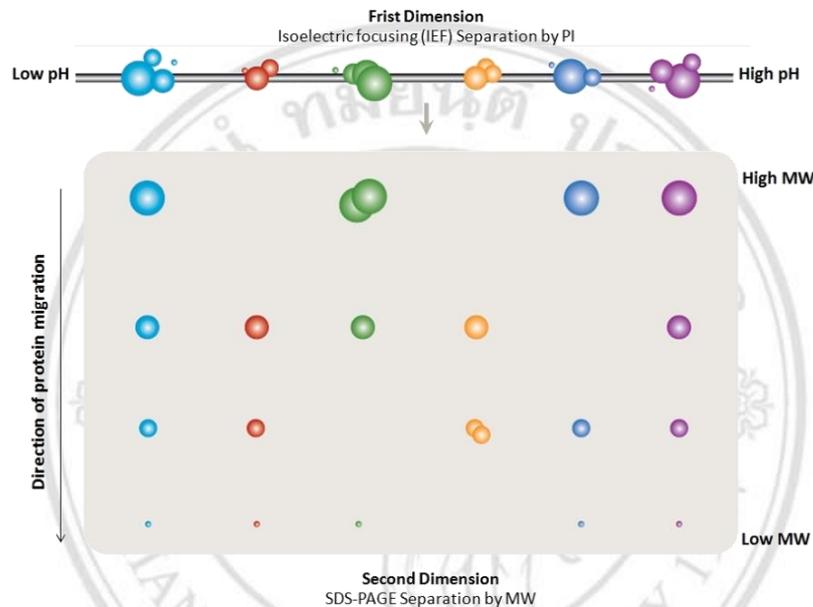
2) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส หรือ SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้าตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight: MW) ของโปรตีน โดยตัวกลางที่ใช้ในการแยกโปรตีนคือ เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ที่มีส่วนผสมของ SDS เป็นองค์ประกอบ หลักการคือ SDS ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนที่มีประจุลบนี้จะเข้าจับโมเลกุลโปรตีนอย่างหนาแน่นในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อพอลิเพปไทด์ 1 กรัม) ทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนรูปร่างจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในรูปเหยียดตรง โปรตีนที่เกาะรวมกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย เกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลเชิงซ้อน (SDS-protein complex) ที่มีประจุลบล้อมรอบและมีค่าประจุสุทธิต่อมวลคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 1.16



รูปที่ 1.16 การเข้าจับของ SDS กับโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนมีรูปร่างเหยียดตรงและมีประจุลบ (BioRadiations, 2013)

ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้ จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเท่านั้น และไม่มีมีความเกี่ยวข้องกับจำนวนประจุบนโปรตีน โดยระยะทางในการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกของโปรตีนจะแปรผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล หมายความว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (รูปที่ 1.17) ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (สายทิพย์, 2555

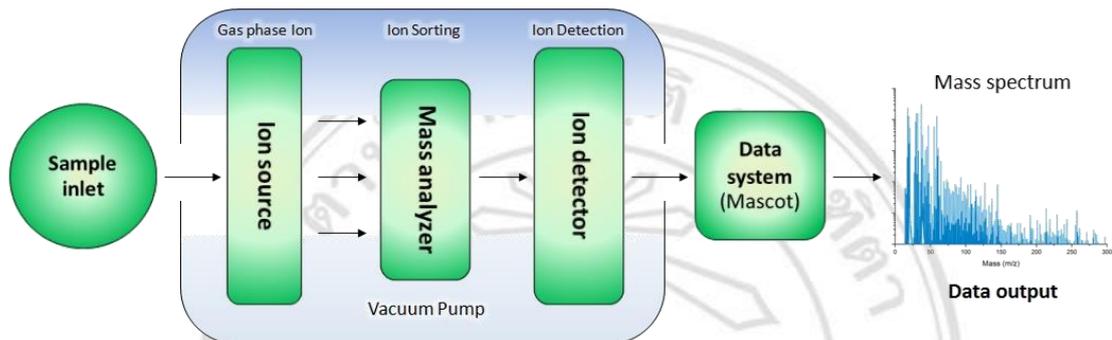


**รูปที่ 1.17** การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองมิติ โดยมิติที่หนึ่งโปรตีนถูกแยกใน IPG strips ตามค่า pI ด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง ต่อมานำ IPG strips มาวางบนเจลพอลิอะคริลาไมด์เพื่อแยกต่อในมิติที่ 2 ตามค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคโซเดียม โดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (ที่มา: คัดแปลงจาก BioRadiations, 2013)

### 1.5.3 การวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี

แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) หรือ MS เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เช่น ใช้ระบุชนิดและขนาดโปรตีน การทำนายลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยเทคนิคนี้อาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ (mass to charge ratio,  $m/z$ ) ที่จำเพาะของตัวอย่างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกทำให้เกิดประจุ โดยสารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าช่องเดิมสารตัวอย่าง (sample inlet) แล้วทำให้แตกตัวเป็นประจุในส่วนผลิตไอออน (ion source) ประจุที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนเครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) เพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัด (ion detector) แล้วส่งสัญญาณใน

รูปมวลต่อประจุ ไปยังส่วนประมวลผล (data system) ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 1.18 โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีที่นิยมใช้ในงานวิจัยปัจจุบันมี 2 เทคนิค คือ ลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) และ เมทริกซ์แอสซิสต์เลเซอร์ดีซอร์ชันไออนไนเซชัน ไซม์ออฟฟลายด์ แมสสเปกโตรเมทรี (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) (ศิริพร และคณะ, 2012)



รูปที่ 1.18 องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (ที่มา: คัดแปลงจาก Aebersold and Mann, 2003)

### 1) เทคนิคลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี

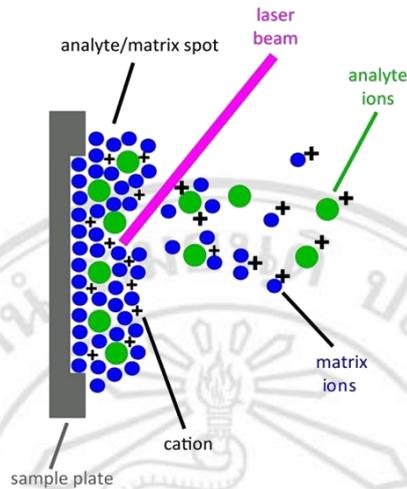
ลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี หรือ LC-MS คือ การแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และมีการเกิด ion source แบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี โดยมวลสารจะถูกตรวจวัดในส่วนเครื่องวิเคราะห์มวล นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถเปรียบเทียบในเชิงปริมาณได้ จึงมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในสถานะที่แตกต่างกัน โดย LC-MS เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะเจาะจงสูง ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาโปรตีนได้ใน 2 รูปแบบคือ label technique และ label free technique (Becker and Bern, 2011)

#### ก) Label (isotope) LC-MS

การติดฉลากด้วย stable isotope กับ โปรตีน ซึ่งทำให้ง่ายต่อการระบุชนิดของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันใน 2 ตัวอย่างขึ้นไป โดยนำตัวอย่างควบคุมมาติดฉลากด้วย stable isotope ชนิดเบา (light) ส่วนตัวอย่างศึกษา (test sample) ติดฉลากกับ isotope ชนิดหนัก (heavy) แล้วนำตัวอย่างทั้งสองมาผสมกัน ทำการย่อยตัวอย่างผสมด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองชนิดถูกติดฉลากด้วย isotope ต่างชนิดกัน จึงสามารถเปรียบเทียบผลการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละสถานะได้ (รูปที่ 1.19 ก) แต่มีข้อจำกัดคือ ราคาแพงและการติดฉลากดังกล่าวอาจไม่ครอบคลุมถึงตัวอย่างโปรตีนทั้งหมด



ขนาดมวลสารได้ (Aebersold and Mann, 2003) (รูปที่ 1.20) เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค LC-MS สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งได้ เช่น โคลนิจของเชื้อหรือชิ้นเนื้อ ซึ่งทำให้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้หลากหลาย



รูปที่ 1.20 การแตกตัวของสารตัวอย่างเป็นไอออน เมื่อใช้ MALDI เป็นส่วนผลิตไอออน (Gates, 2004)

#### 1.5.4 การระบุชนิดโปรตีน

การระบุชนิดและขนาดโปรตีน (protein identification) แบ่งเป็น 2 วิธีหลัก ดังนี้

##### 1) Peptide mass fingerprints (PMF)

ตัวอย่างโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยโปรตีนจะถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิด เรียกลักษณะนี้ว่า peptide mass fingerprint (PMF) ดังนั้นขนาดเปปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีจึงมีความจำเพาะในโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อนำข้อมูลที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) จึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ (Thiede *et al.*, 2005)

##### 2) MS/MS ion search

การระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกสามารถบอกขนาดมวลของสายเปปไทด์ทั้งหมด และทำการแตกตัวเปปไทด์แต่ละสายด้วยการวิเคราะห์ครั้งที่สอง ซึ่งจะทำให้ทราบขนาดมวลของเปปไทด์แต่ละสายแล้วนำข้อมูลทั้งหมดเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถูกต้องและจำเพาะมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธี PMF (ศิริพร และคณะ, 2012)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำแมสสเปกโตรเมตรีมาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ที่เชื่อมต่อกับฐานข้อมูลโปรตีน (ตารางที่ 1.1) จึงทำให้สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ ซึ่งข้อมูลในฐานข้อมูลอาจประกอบด้วยข้อมูลของโปรตีนที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษา เช่น หน้าที่ โครงสร้าง กลไกการทำงานของโปรตีน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยกันหรือโปรตีนกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ รวมถึง pathway ต่างๆ ที่โปรตีนมีความเกี่ยวข้อง

**ตารางที่ 1.1** ซอฟต์แวร์สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูล (Newton *et al.*, 2004)

ซอฟต์แวร์สืบค้น	การใช้ประโยชน์	ที่อยู่เว็บไซต์
Protein prospector	Search databases with PMF and MS/MS data.	<a href="http://prospector.ucsf.edu">http://prospector.ucsf.edu</a>
PROWL	theoretical data for a known peptide sequence	<a href="http://prowl.rockefeller.edu">http://prowl.rockefeller.edu</a> <a href="http://PROWL/prowl.html">/PROWL/prowl.html</a>
ExPASy	Search databases with PMF and MS/MS data. Provide theoretical data and useful protocols	<a href="http://us.expasy.org">http://us.expasy.org</a>
PeptideSearch	PMF database searches, theoretical tools and links to many other sites	<a href="http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages">http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages</a>
Mascot	Search PMF data or a sequence tag	<a href="http://www.matrixscience.com">http://www.matrixscience.com</a>
PepMAPPER	Search databases with PMF and MS/MS data and sequence tags	<a href="http://wolf.bms.umist.ac.uk">http://wolf.bms.umist.ac.uk</a> <a href="http://mapper/">/mapper/</a>
MOWSE	Search databases with PMF data	<a href="http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse">http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse</a>
PredictProtein	Gives theoretical fragments and data on a protein amino acid sequence	<a href="http://www.ebi.ac.uk/~rost/predictprotein/">http://www.ebi.ac.uk/~rost/predictprotein/</a>
BLAST	Search sequence tags	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>

โปรตีโอมิกส์จึงเป็นศาสตร์ที่มีคุณค่าอย่างยิ่งในงานวิจัยหลายด้าน อาทิ การระบุชนิดและขนาดโปรตีน การค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ หรือโปรตีนบ่งชี้โรค (biomarkers) โปรตีนเป้าหมายในการรักษาชนิดใหม่ (new therapeutic targets) การระบุชนิดและสายพันธุ์จุลชีพ รวมทั้งการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคในผู้ป่วย ซึ่งนำมาสู่องค์ความรู้ใหม่ ก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในโรคต่างๆ ของมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้น