

การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ในปัสสาวะของผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรค

รจนา สุษะใหญ่, วท.บ.,¹ สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, วท.ด.,² พิชรี ชันติพงษ์, พ.บ.,³

ศุภเลิศ เนตรสุวรรณ, พ.บ.,³ พิชาทธ์ เปี่ยมโรจนภักธ, วท.ด.,¹

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี,

³โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ จังหวัดเชียงราย

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจากปัสสาวะของผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรค ด้วยเทคนิคโปรตีนโอมิกส์ เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

วิธีการศึกษา ศึกษาโดยแบ่งเก็บตัวอย่างปัสสาวะเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ (2) กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อ (3) กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคนอกปอด และ (4) คนปกติ แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่างโดยวิธี SDS-PAGE ทำการย่อยเจล ตัดแบ่งเจล และย่อยโปรตีนภายในเจลด้วยเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเปปไทด์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้วระบุชนิดของโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล

ผลการศึกษา พบโปรตีนของเชื้อวัณโรคในปัสสาวะที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 193 ชนิด เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคทุกประเภทกับคนปกติ ไม่พบว่าโปรตีน 30S ribosomal protein S15 rpsO, lipoprotein 39 kDa, PE family-related protein และ predicted protein [gi|289445817] ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรค แต่เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคแยกแต่ละประเภทกับคนปกติ ไม่พบโปรตีน transcriptional regulator protein EmbR ทั้งประเภทพบเชื้อและไม่พบเชื้อ แต่แสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคนอกปอด

สรุปผลการศึกษา โปรตีนของเชื้อวัณโรคที่น่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายและอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับวินิจฉัยวัณโรคในผู้ป่วยเอชไอวีได้ คือ 30S ribosomal protein S15 rpsO และ lipoprotein 39 kDa และอาจจะใช้โปรตีน transcriptional regulator protein EmbR วินิจฉัยแยกวัณโรคในปอดและนอกปอด **เชียงใหม่ เวชสาร 2557;53(1):23-34.**

คำสำคัญ: วัณโรค เอชไอวี โปรตีนโอมิกส์ ปัสสาวะ

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis) เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในผู้ติดเชื้อเอชไอวี^[1] ผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีจะไวต่อการติดเชื้อวัณโรคมากกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี เนื่องจากการติดเชื้อเอชไอวีทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลง จึงทำให้มีโอกาสป่วยเป็นวัณโรคมากกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีสูงถึง 20-37 เท่า^[2] นอกจากนี้การวินิจฉัยวัณโรคในผู้ติดเชื้อเอชไอวียังมีความยุ่งยากและไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำ^[3] และด้วยเหตุผลที่ว่า เซลล์ภายในร่างกายมนุษย์ เช่น เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์ และบีเซลล์จะตอบสนองต่อการติดเชื้อวัณโรคด้วยการสร้างโปรตีนบางชนิดภายในเซลล์แล้วขับออกมานอกเซลล์^[4,5] ทำให้โปรตีนเหล่านี้สะสมอยู่ในสารคัดหลั่งต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ซีรัมและปัสสาวะ โดยโปรตีนในสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคน่าจะมีชนิดและปริมาณแตกต่างจากคนปกติ ดังนั้นจึงมีการศึกษาโปรตีนของเชื้อวัณโรคโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์มากขึ้น ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ๆ เกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ต่อการติดเชื้อวัณโรคในสิ่งมีชีวิต

ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาโปรตีนของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยเทคนิค 2D-PAGE^[6-10] แต่ผลการวิเคราะห์โปรตีนยังไม่เพียงพอต่อการตอบคำถามเกี่ยวกับเชื้อมัยโคแบคทีเรีย จึงมีการนำเทคนิค shotgun proteomics มาศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่ผนังเซลล์ และโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่สามารถแยกได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-PAGE^[11-13] นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่น่าจะ

เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคจากเนื้อเยื่อ เซลล์เพาะเลี้ยง เลือดและสารคัดหลั่งต่าง ๆ^[14-22] อาทิเช่น Kashino และคณะ (2008) ศึกษาโปรตีโอมิกส์ในปัสสาวะของผู้ป่วยวัณโรคปอด พบกลุ่มโปรตีน MT_1721, MT_1694, MT_2462 และ MT_3444 ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ immunoglobulin G antibodies ของผู้ป่วยวัณโรคปอดแต่ไม่จับกับ immunoglobulin G antibodies ของคนปกติ^[17] ต่อมา มีการศึกษาพบว่าโปรตีน MT_1694 คือ ornithine carbamyltransferase^[18] ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ศึกษาเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคปอดที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวีร่วม^[23] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยวัณโรคปอดที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมโดยใช้เทคนิค shotgun proteomics องค์ความรู้ที่เกิดจากงานวิจัยนี้จะทำให้เข้าใจถึงบทบาทของกลุ่มโปรตีนในปัสสาวะต่อกลไกการเกิดพยาธิสภาพของวัณโรคปอดได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ชนิดใหม่เป็นการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการให้สามารถวินิจฉัยและพยากรณ์ความรุนแรงของโรคได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วยิ่งขึ้น รวมทั้งอาจนำไปสู่การพัฒนาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะจากผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ที่ยื่นทะเบียนในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ โดยความร่วมมือของสำนักงานวิจัยวัณโรค จังหวัดเชียงราย ตามการเห็นชอบอนุญาตให้ดำเนินการวิจัยโดยคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมในการศึกษาวิจัยทางชีวเวชศาสตร์ โรงพยาบาลเชียงราย

ประชาชนเคราะห์ หนังสือเลขที่ ชร 0027.102/17055 ลงวันที่ 17 มิถุนายน 2553 และเก็บปัสสาวะจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีเป็นกลุ่มควบคุม ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1

การตกตะกอนโปรตีนจากปัสสาวะ

นำปัสสาวะตัวอย่างละ 2 มล. มาตกตะกอนโปรตีนด้วย ice-cold acetone ปริมาตร 4 มล. แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 1 คืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตรไม่เกิน 50 µL (มีโปรตีน ~1-10 µg/µL) และนำโปรตีนตัวอย่างมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry^[24]

การเตรียมโปรตีนตัวอย่างและแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

เตรียมโปรตีนแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้น

เท่ากัน คือ 30 µg ผสมกับ 5X SDS loading buffer นำไปต้มที่ 96 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปแยกใน 12.5% polyacrylamide gel ตามวิธีของ Laemmli^[25] เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (LMW-SDS marker kit, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) จากนั้นนำเจลมาย้อมโดยวิธี silver staining

การตัดเจลและการย่อยโปรตีนภายในเจล (gel excision and in-gel digestion)

แบ่งเจลแต่ละตัวอย่างออกเป็น 18 ช่วง แต่ละช่วงตัดเจลให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์ มิลลิเมตร ใส่ลงใน 96-well plate หลุมละ 8-10 ชิ้น เริ่มจากล่างเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและ 100% acetonitrile (ACN) จากนั้นทำลายพันธะไดซัลไฟด์ภายในโปรตีนด้วยสารละลาย 10 mM dithiothreitol (DTT) ใน 10 mM ammonium bicarbonate และป้องกันการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ซ้ำโดยการเติมหมู่อัลคิลด้วยสารละลาย 100 mM iodoacet-

ตารางที่ 1. ข้อมูลกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาวิจัย

No.	Patient groups	Urine samples	Collected date	AFB results	Culture results	Sex	Age (years)
1	Healthy controls (กลุ่มคนปกติ)	N001	26/10/2554	Negative	No growth	F	34
2		N002	26/10/2554	Negative	No growth	F	30
3		N003	26/10/2554	Negative	No growth	F	48
4	Pulmonary-TB/HIV with AFB positive (ผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ)	UTB1011	21/4/2554	Positive	Growth	M	28
5		UTB1012	6/6/2554	Positive	Growth	M	45
6		UTB1014	7/4/255	Positive	Growth	M	55
7	Pulmonary-TB/HIV with AFB negative (ผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อ)	UTB2004	11/11/2553	Negative	No growth	F	25
8		UTB2005	15/12/2553	Negative	No growth	M	40
9		UTB2006	30/12/2553	Negative	Growth	M	44
10	Extra-pulmonary-TB/HIV co-infected (ผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคนอกปอด)	UTB3011	29/12/2553	Negative	No growth	F	24
11		UTB3013	23/3/2554	Negative	No growth	M	30
12		UTB3014	25/5/2554	Negative	No growth	M	26

amide (IAA) ใน 10 mM ammonium bicarbonate ล้างเจลอีก 3 ครั้ง ด้วย 100% ACN ก่อนย่อยโปรตีนภายในเจลด้วย 10 ng trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, WI, USA) ที่ละลายใน 10 mM ammonium bicarbonate และ 50% ACN แล้วเติม 30% ACN เพื่อสกัดเปปไทด์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างซึ่งมีเปปไทด์ใส่ใน 96-well plate อันใหม่ แล้วสกัดเปปไทด์ที่เหลือในเจลด้วย 50% ACN ใน 0.1% formic acid (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) และ 70% ACN ใน 0.1% formic acid ทำตัวอย่างเปปไทด์ให้แห้งด้วย incubator ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 1 คืน นำตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาที่ -80 °ซ รอนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเปปไทด์โดยเครื่อง LC-MS/MS

ละลายตัวอย่างเปปไทด์ที่ได้ด้วย 0.1% formic acid แล้วฉีดเข้าเครื่อง capillary HPLC (Ultimate 3000 LC System, Dionex, USA) แยกเปปไทด์ด้วยนาโนคอลัมน์ (PepSwift Monolithic Nano Column, 100 μ m i.d. x 50 mm) ชะล้างเปปไทด์ออกจากคอลัมน์ด้วย ACN ที่มี 0.1% formic acid แล้ววิเคราะห์ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของเปปไทด์ในตัวอย่างต่างๆ ที่ถูกชะออกมาพร้อมกัน ด้วยเครื่อง tandem mass spectrometer ชนิด ESI-Ion Trap MS (HCTultra PTM Discovery System, Bruker Daltonics, Germany) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาเปปไทด์และเปรียบเทียบปริมาณเปปไทด์ที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม DeCyder™ for Mass Spectrometry (DeCyder MS 2.0, GE healthcare) โดยกำหนดค่า $p < 0.05$ ^[26]

การระบุชนิดโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล

นำข้อมูลเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรม DeCyder ไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Mascot (Matrix Science, London, UK)^[27] โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนต่าง ๆ ของเชื้อวัณโรค (Taxonomy = *M. tuberculosis* complex) ที่มีในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อระบุชนิดของโปรตีน จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Multi Experiment Viewer (MeV, version 4.8.1) เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มคนปกติ โดยใช้ Student's t test และ ANOVA กำหนดค่า $p < 0.05$ ทำให้ทราบโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ (significant proteins) และระบุหน้าที่ของโปรตีนโดยเทียบจากฐานข้อมูลของวัณโรค (Tuberculist, Institut Pasteur)

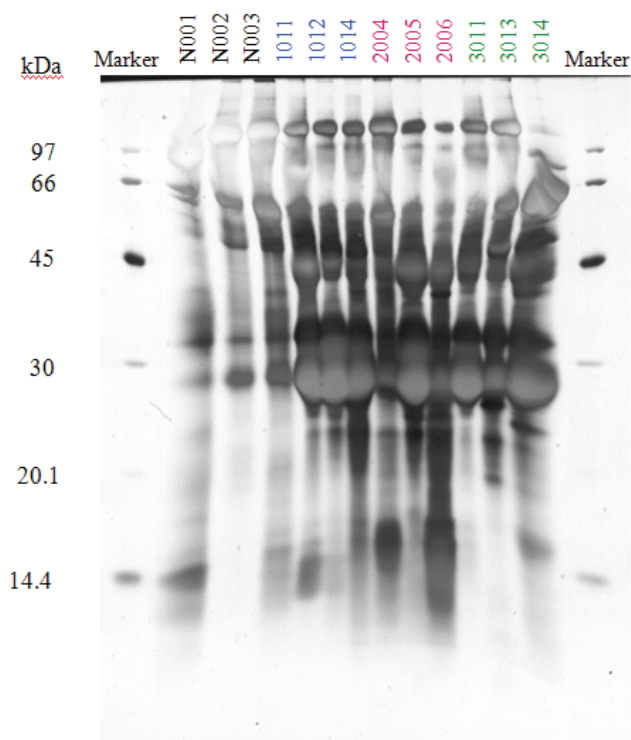
วิธีการประเมินผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ Student's t test และ ANOVA พิจารณาความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมได้จากปัสสาวะแต่ละรายไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA แล้วจึงเตรียมโปรตีนในทุกตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันคือ 30 μ g สำหรับแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining จากนั้นนำไปถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรม Quantity one-42.0 ได้ผลการแสดงออกของโปรตีนดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ (1011, 1012, 1014) กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อ (2004, 2005, 2006) และกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคนอกปอด (3011, 3013, 3014) เทียบกับกลุ่มคนปกติ (N001, N002, N003) โดยเทคนิค SDS-PAGE

การวิเคราะห์หาเปปไทด์ด้วยโปรแกรม DeCyder และระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม Mascot

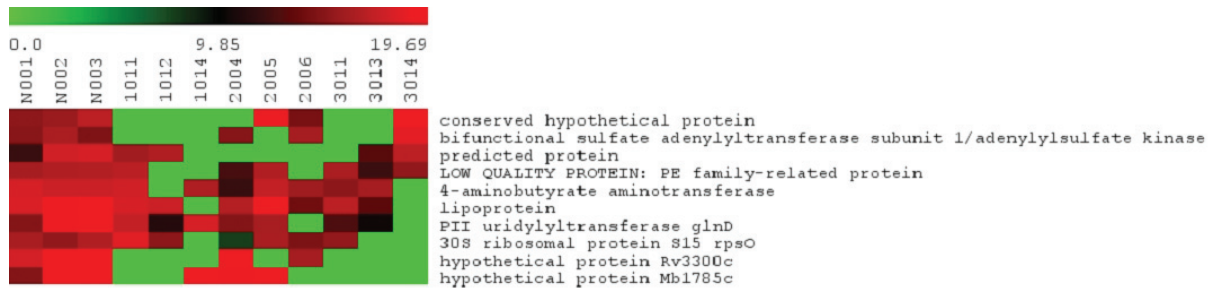
เมื่อนำเจลไปตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วย่อยโปรตีนภายในเจลให้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ (peptide fragments) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและละลายตัวอย่างเปปไทด์ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.1% formic acid แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS นำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS มาวิเคราะห์หาเปปไทด์และเปรียบเทียบปริมาณเปปไทด์ที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม DeCyder MS 2.0 ที่ $p < 0.05$ และนำข้อมูลเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้ระบุชื่อของโปรตีนด้วยโปรแกรม Mascot โดยเทียบกับโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่มีในฐานข้อมูลของ NCBI ได้ผลการวิเคราะห์พบโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่แสดงออกแตกต่างกัน (differential express proteins) ทั้งหมด 193 ชนิด

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย

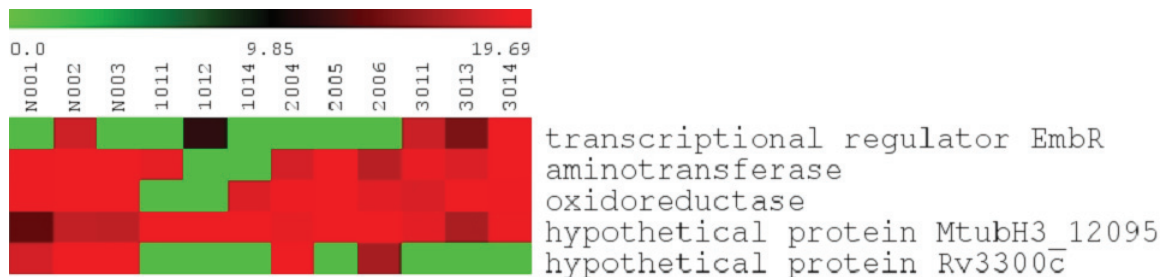
เมื่อทราบชนิดของโปรตีนแล้ว นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MeV เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (โปรตีนที่พบในผู้ป่วย 3 กลุ่ม) กับกลุ่มคนปกติ โดยใช้ Student's t test ที่ $p < 0.05$ พบโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 10 ชนิด นำไปจัดกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีนโดยอ้างอิงข้อมูลจากฐานข้อมูลของวัณโรค Tuberculist ดังแสดงในตารางที่ 2 พร้อมทั้งรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปดังรูปที่ 2 มีโปรตีน 4 ชนิด คือ 30S ribosomal protein S15 rpsO, lipoprotein, PE family-related protein และ predicted protein (gi|289445817) ไม่พบในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรค ขณะที่โปรตีนอีก 6 ชนิดมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ

ตารางที่ 2. ชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด

No.	Accession No. ¹	Gene name	Protein description	Functional category ²	MW (kDa) ³	Peptide sequence	Expression ⁴ M+, M-, EP
1	gi 308232240	rpsO	30S ribosomal protein S15 rpsO	Information pathways	11	METFRGADSR	-
2	gi 15609059		Lipoprotein	Cell wall and cell processes	39	DSTVTASIR	-
3	gi 289754208		PE family-related protein	PE/PPE	15	AWLGQQR	-
4	gi 15608426	cysN	Bifunctional sulfate adenylyl-transferase subunit 1/ adenylyl-sulfate kinase	Intermediary metabolism and respiration	68	NMVTGASTAQLVVLV DAR	+ (↓)
5	gi 15609726	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase	Intermediary metabolism and respiration	47	AIGVIDK	+ (↓)
6	gi 289751584	glnD	PII uridylyltransferase glnD	Intermediary metabolism and respiration	39	LVVGTAD	+ (↓)
7	gi 15610436		Hypothetical protein Rv3300c	Conserved hypotheticals	33	APVAPGLALPR	+ (↓)
8	gi 119611480		Hypothetical protein Mb1785c	Conserved hypotheticals	43	SLESNMIMMYK	+ (↓)
9	gi 298527209		Conserved hypothetical protein	Conserved hypotheticals	40	IPGGPIGSGATSGS- VRCVRPR	+ (↓)
10	gi 289445817		Predicted protein	Conserved hypotheticals	-	SPGEGLGGLVDR	-



รูปที่ 2. รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ (N001, N002, N003) กับกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (1011, 1012, 1014, 2004, 2005, 2006, 3011, 3013, 3014) (สีเขียว = ไม่มีการแสดงออก, สีดำ = มีการแสดงออกเล็กน้อย, สีแดง = มีการแสดงออกมาก)



รูปที่ 3. แสดงรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ (N001, N002, N003) กับกลุ่มผู้ป่วยแต่ละประเภทคือ กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ (1011, 1012, 1014) ไม่พบเชื้อ (2004, 2005, 2006) และผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดนอกปอด (3011, 3013, 3014) (สีเขียว = ไม่มีการแสดงออก, สีดำ = มีการแสดงออกเล็กน้อย, สีแดง = มีการแสดงออกมาก)

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยแยกแต่ละประเภทกับกลุ่มคนปกติ โดยใช้ ANOVA ที่ $p < 0.05$ พบโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 5 ชนิดนำไปจัดกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีนโดยอ้างอิงข้อมูลจากฐานข้อมูลของวัณโรค Tuberculist ดังแสดงในตารางที่ 3 พร้อมทั้งรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปดังรูปที่ 3 จะเห็นว่าไม่พบโปรตีน transcriptional regulator protein EmbR ในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดทั้งประเภทพบเชื้อและไม่พบเชื้อ แต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดนอกปอด ขณะที่โปรตีน hypothi-

cal protein Rv3300c ไม่พบในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อและวัณโรคปอดนอกปอด และมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อ ส่วนโปรตีน alanine rich oxidoreductase และ aminotransferase ไม่พบในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ และมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อและวัณโรคปอดนอกปอด โปรตีน hypothetical protein MtubH3_12095 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 3 ประเภทเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ

ตารางที่ 3. ชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วยแต่ละประเภท

No.	Accession No. ¹	Gene name	Protein description	Functional category	MW (kDa) ³	Peptide sequences	Expression		
							M+ ⁶	M- ⁶	EP ⁷
1	gi 15608407	embR	Transcriptional regulator protein EmbR	Regulatory proteins	42	AVLAMLVINR	-	-	+ (↑)
2	gi 15609918		Alanine rich oxidoreductase	Intermediary metabolism and respiration	35	NPEFDATLVTR	-	+	(↓)
3	gi 15610914		Aminotransferase	Intermediary metabolism and respiration	42	AYDVAR	-	+	(↓)
4	gi 15610436		Hypothetical protein Rv3300c	Conserved hypotheticals	33	APVAPGLALPR	-	+	(↓)
5	gi 167968730		Hypothetical protein MtubH3_12095	Conserved hypotheticals	-	MDGVQLR	+	(↑)	+

1Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI (gi...)

2การจำแนกโปรตีนของเชื้อวัณโรคตามหน้าที่โดยอิงตามฐานข้อมูลของวัณโรค Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TuberculList/>)

3น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (กิโลดาลตัน) จากฐานข้อมูลของ UniProt (<http://www.uniprot.org/>)

4ระดับการแสดงออกของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่มรวมกัน (กลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ ไม่พบเชื้อ และ วัณโรคนอกปอด)

5ระดับการแสดงออกของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ (smear positive; M+)

6ระดับการแสดงออกของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อ (smear negative; M-)

7ระดับการแสดงออกของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดนอกปอด (extra-pulmonary tuberculosis; EP)

เครื่องหมาย (+) หมายถึง พบการแสดงออกของโปรตีน

เครื่องหมาย (-) หมายถึง ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน

เครื่องหมาย ↑ หมายถึง การแสดงออกของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วย

เครื่องหมาย ↓ หมายถึง การแสดงออกของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติกับกลุ่มผู้ป่วย

อภิปรายผลการศึกษา

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก ปัจจุบันมีความพยายามที่จะพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยวัณโรคโดยอาศัยการตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีนของเชื้อวัณโรคจากเลือด แต่ทว่ายังมีความไวและความจำเพาะไม่มากพอที่จะนำมาใช้วินิจฉัยวัณโรคได้ นอกจากนั้นระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อวัณโรคยังมีความซับซ้อนและความรู้ที่มีอยู่ก็ยังไม่ครอบคลุมมากพอทำให้การวินิจฉัย ป้องกัน และรักษาวัณโรคยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จึงมีการนำเทคนิคโปรตีนโอมิกส์มาศึกษาโปรตีนของเชื้อวัณโรคเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการนำไปปรับใช้สำหรับพัฒนาหาวิธีตรวจวินิจฉัยวัณโรค

กลุ่มตัวอย่างปกติที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากผู้บริจาคโลหิตซึ่งไม่มีผลการทดสอบทูเบอร์คูลินต่อแอนติเจนของเชื้อวัณโรค จึงไม่สามารถเลือกเอาเฉพาะผู้ที่ไม่มีเชื้ออยู่ในร่างกายหรือผลลบต่อการทดสอบทูเบอร์คูลินได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์โปรตีนสามารถพบโปรตีนของเชื้อวัณโรคในคนปกติได้ นอกจากนี้ยังคาดกันว่า 1 ใน 3 ของคนไทยมีเชื้อวัณโรคอยู่ในร่างกายแต่ไม่แสดงอาการ

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคทุกประเภทกับกลุ่มคนปกติ ไม่พบว่ามีโปรตีน 30S ribosomal protein S15 rpsO, lipoprotein 39 kDa, PE family-related protein และ predicted protein (gi|289445817) ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วย โปรตีน 30S ribosomal protein S15 rpsO ของเชื้อวัณโรคถูกจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ information pathways ประกอบด้วยกรดอะมิโน 89 ตัว ทำหน้าที่จับกับ rRNA ทำให้เกิดการเชื่อมพันธะระหว่าง 16S rRNA ของ 30S subunit กับ 23S rRNA

ของ 50S subunit กลายเป็นไรโบโซมขนาด 70S เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อวัณโรค^[28] โปรตีน lipoprotein ที่พบในการศึกษานี้มีขนาดโมเลกุล 39 kDa เป็นโปรตีนที่พบในส่วน envelope ที่เป็น lipid bilayer ของเชื้อวัณโรค มีอยู่ 4 หน่วยย่อย ประกอบด้วยน้ำหนักโมเลกุลขนาด 19, 26, 27 และ 39 kDa โดยพบว่าขนาด 19 และ 39 kDa เป็นส่วนที่ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อวัณโรค ทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรค^[29] นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ขนส่งสารอาหารผ่านผนังเซลล์ของเชื้ออีกด้วย^[30] โดยเฉพาะ lipoprotein 19 kDa พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของแมคโครฟาจได้ โดยผ่านทั้งทาง extrinsic และ intrinsic pathways^[31] ส่วน PE family-related protein ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม PE/PPE เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีนและอะลานีนเป็นจำนวนมาก โดยมี Pro-Glu (PE) motifs อยู่ทางด้าน N-terminal แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน^[20] และ predicted protein (gi|289445817) เป็น hypothetical protein ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน ดังนั้นโปรตีนที่น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในภาวะที่ผู้ป่วยเอชไอวีมีการติดเชื้อวัณโรค คือ 30S ribosomal protein S15 rpsO และ lipoprotein 39 kDa โดยจะไม่มีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ในปัสสาวะ นอกจากนี้การขาด lipoprotein ยังยับยั้งหรือลดการตายของเซลล์แมคโครฟาจเจ้าบ้าน (host cells) อีกด้วย เพราะภาวะที่มีการติดเชื้อวัณโรค เชื้อจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์แมคโครฟาจเจ้าบ้าน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน^[32] ดังนั้นเมื่อเซลล์แมคโครฟาจของเจ้าบ้านไม่ถูกทำลาย เชื้อจึงอาจสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและทวีความรุนแรงได้มากยิ่งขึ้น

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยเปรียบเทียบ

ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคแต่ละประเภทกับกลุ่มคนปกติ พบว่าโปรตีนของเชื้อวัณโรค alanine rich oxidoreductase และ aminotransferase มีปริมาณลดลงในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทไม่พบเชื้อและวัณโรคนอกปอด แต่ไม่พบในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อ ซึ่งโปรตีน 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมและกระบวนการหายใจภายในเซลล์ของเชื้อ ทำให้เชื้อวัณโรคเจริญอยู่ได้ภายในเซลล์เจ้าบ้าน จึงน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับวินิจฉัยผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดประเภทพบเชื้อได้ ส่วนโปรตีน hypothetical protein Rv3300c ยังไม่มีการศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ ขณะที่โปรตีน transcriptional regulator protein EmbR เป็นโปรตีนควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ของ embCAB operon ที่ code สำหรับ arabinosyltransferases ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ นอกจากนี้ยังถูกควบคุมด้วยกลุ่มของเอนไซม์ Serine/threonine (Ser/Thr) protein kinases ซึ่งจะต้องมีผ่านกระบวนการ phosphorylation ของ EmbR ก่อนถึงทำงานได้ โดยโปรตีนนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอด แต่ไม่พบในปัสสาวะกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคปอดทั้งประเภทพบเชื้อและไม่พบเชื้อ จึงน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยแยกกระหว่างการติดเชื้อวัณโรคในปอดและนอกปอดได้

สรุปผลการศึกษา

โปรตีนของเชื้อวัณโรคที่น่าจะเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายและอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในผู้ป่วยเอชไอวีจากตัวอย่างปัสสาวะ คือ 30S ribosomal protein

S15 rpsO และ lipoprotein 39 kDa โดยจะไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อวัณโรคทุกประเภท และอาจวินิจฉัยแยกวัณโรคในปอดและนอกปอดได้โดยใช้ transcriptional regulator protein EmbR เป็นตัวบ่งชี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโปรตีโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

1. **Raviglione MC, Narain JP, Kochi A.** HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull World Health Organ* 1992;70(4):515-26.
2. **Bonecini-Almeida MG, Lapa e Silva JR, Kritski AL, et al.** Immune response during HIV and tuberculosis co-infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(3):399-402.
3. **Sharma SK, Mohan A, Kadiravan T.** HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management. *Indian J Med Res* 2005;121(4):550-67.
4. **Mehrotra J, Bisht D, Tiwari VD, Sinha S.** Serological distinction of integral plasma membrane proteins as a class of mycobacterial antigens and their relevance for human T cell activation. *Clin Exp Immunol* 1995;102(3):626-34.
5. **Schluger NW, Rom WN.** The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3):679-91.
6. **Sonnenberg MG, Belisle JT.** Definition of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 1997;65(11):4515-24.
7. **Urquhart BL, Cordwell SJ, Humphery-Smith I.** Comparison of predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(1):70-9.
8. **Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, et al.** Comparative proteome analysis of Mycobacterium

- tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 1999;33(6):1103-17.
9. **Betts JC, Dodson P, Quan S, et al.** Comparison of the proteome of Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiol* 2000;146:3205-16.
10. **Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P.** Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis. *Electrophoresis* 2000; 21(17):3740-56.
11. **Sinha S, Kosalai K, Arora S, et al.** Immunogenic membrane-associated proteins of Mycobacterium tuberculosis revealed by proteomics. *Microbiol* 2005;151(7):2411-9.
12. **Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG.** Identification of Mycobacterium tuberculosis H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005;4(3):855-61.
13. **Malen H, De Souza GA, Pathak S, Softeland T, Wiker HG.** Comparison of membrane proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv and H37Ra strains. *BMC Microbiol* 2011;11:18.
14. **Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al.** Antigens secreted from Mycobacterium tuberculosis: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 2004;4(11):3299-307.
15. **Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, Schorey JS.** Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics* 2010;10(17):3190-202.
16. **Berredo-Pinho M, Kalume DE, Correa PR, et al.** Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain Mycobacterium bovis BCG Moreau compared to M. bovis BCG Pasteur. *BMC Microbiol* 2011;11:80.
17. **Kashino SS, Pollock N, Napolitano DR, Rodrigues V, Campos-Neto A.** Identification and characterization of Mycobacterium tuberculosis antigens in urine of patients with active pulmonary tuberculosis: an innovative and alternative approach of antigen discovery of useful microbial molecules. *Clin Exp Immunol* 2008;153(1):56-62.
18. **Napolitano DR, Pollock N, Kashino SS, Rodrigues V, Campos-Neto A.** Identification of Mycobacterium tuberculosis ornithine carbamyltransferase in urine as a possible molecular marker of active pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(4):638-43.
19. **Tanaka T, Sakurada S, Kano K, et al.** Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* 2011;11:71.
20. **Zhang L, Wang Q, Wang W, et al.** Identification of putative biomarkers for the serodiagnosis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Proteome Sci* 2012;10:12.
21. **Zhang J, Wu X, Shi L, et al.** Diagnostic serum proteomic analysis in patients with active tuberculosis. *Clin Chim Acta* 2012;413(9-10):883-7.
22. **Fu YR, Yi ZJ, Guan SZ, Zhang SY, Li M.** Proteomic analysis of sputum in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(12):1241-7.
23. **Bell C, Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S.** Characterization of the Mycobacterium tuberculosis proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research. *J Proteome Res* 2012;11(1):119-30.
24. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
25. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
26. **Johansson C, Samskog J, Sundstrom L, Wadensten H, Bjorkesten L, Flensburg J.** Differential expression analysis of Escherichia coli proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. *Proteomics* 2006;6(16):4475-85.
27. **Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20(18):3551-67.
28. **Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore P, Steitz T.** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 2000;289(5481):920-29.
29. **Sutcliffe IC, Harrington DJ.** Lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28(5):645-59.
30. **Young DB, Garbe TR.** Lipoprotein antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Res Microbiol* 199;142(1):55-65.
31. **Sánchez A, Espinosa P, García T, Mancilla R.** The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein (LpqH) Induces Macrophage Apoptosis through Extrinsic and Intrinsic Pathways: A Role for the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. *Clinical&developmental immunol* 2012; 2012: 950503.
32. **Stehr M, Elamin AA, Singh M.** Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 2012;14:1227-37.

Proteomics analysis of urine from TB-HIV infected Patients

Rodjana Suyayai, Bs.C.,¹ Sittiruk Roytrakul, Ph.D.,² Pacharee Kantipong, M.D.,³

Supalert Nedsuwan, M.D.,³ Pichapat Piamrojanaphat, Ph.D.¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand Science Park, Pathumthani,

³Chiangrai Prachanukroh Hospital, Chiang Rai

Objectives To investigate protein profile in urines of TB/HIV patients by proteomics approach that could be used for important data to discover potential diagnostic markers.

Methods Individual urine samples of 4 groups such as (1) pulmonary-TB/HIV co-infected (AFB positive), (2) pulmonary-TB/HIV co-infected (AFB negative), (3) extra-pulmonary-TB/HIV co-infected and (4) healthy control groups were analyzed using a proteomic method based on SDS-PAGE separation. Then the gels were visualized with silver staining and excised to small pieces. The gel pieces were tryptic digested followed by the identification of peptide mixtures using LC-MS/MS analysis and searched against NCBI database using the MASCOT search engine.

Results Overall, 193 differential express-bacterial proteins were identified by this urinary proteomic study. A comparison between all TB/HIV groups with controls showed that 30S ribosomal protein S15 rpsO, lipoprotein 39 kDa, PE family-related protein and predicted protein (gi|289445817) were not expressed in the patients' urines. In addition, transcriptional regulator protein EmbR was up-regulated in extra-pulmonary-TB/HIV urines but not expressed in pulmonary-TB/HIV urines when comparing between each patient groups with controls.

Conclusions These results suggest that 30S ribosomal protein S15 rpsO and lipoprotein 39 kDa may be useful as diagnostic biomarkers of TB/HIV co-infection while transcriptional regulator protein EmbR may be a candidate marker of extra-pulmonary TB/HIV co-infection. **Chiang Mai Medical Journal 2014;53(1):23-34.**

Keywords: Tuberculosis, HIV, Proteomics, Urine