ว.วิทย. มข. 42(1) 1-12 (2557) KKU Sci. J. 42(1) 1-12 (2014)

ระบบควอรัมเซนซิง การสื่อสารของแบคทีเรีย: กลไกการควบคุมการก่อโรคในเชื้อ *Pseudomanas aeruginosa*

Quorum Sensing, A Communication of Bacteria: Control Mechanism of Pathogenesis in *Pseudomanas aeruginosa*

มณฑล เลิศวรปรีชา[1*] *และ ญฏารัตน์ สุวรรณมณี*[2]

บทคัดย่อ

การควบคุมการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์และสัตว์ เกิดขึ้นจากการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ กลไกการติดต่อสื่อสารเกิดขึ้นได้ในสองรูปแบบคือ การสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์ (direct cell contact) และการสื่อสารผ่านตัวกลาง (mediators) เช่น โปรตีนหรือฮอร์โมนที่ไปมีผลกระตุ้นหรือควบคุมการทำงานของเซลล์อื่นผ่านการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (cell signaling) ในกรณีของแบคทีเรียแต่ละชนิดก็มีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์เช่นกัน เรียกว่า “quorum sensing system” ซึ่งเป็นการสื่อสารที่เกิดจากการสร้างสารที่เรียกว่า autoinducer ทำหน้าที่เปรียบเสมือนสื่อกลางในการสื่อสาร การสื่อสารที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์แบคทีเรียเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรค (virulence gene) ด้วย ในบทความนี้จะได้อธิบายถึงความรู้และกลไกการควบคุมพื้นฐานของระบบ quorum sensing พร้อมทั้งตัวอย่างของการตอบสนองต่อระบบ quorum sensing ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ก่อโรครุนแรงในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

[1]หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ (วิทยาเขตพัทลุง) ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

[2]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

*Corresponding Author, E-mail: worapreecha@gmail.com

ABSTRACT

Controlling the work of human and animal cells are associated with cell to cell communication. The mechanism can be divided into two types, first is direct cell to cell contact and second is mediate by mediator molecules which release and bind on to the cell surface molecules, and activate cell functions via signaling pathway. Similarly to mammalian cells, bacterial cells also have a communication system which named as a “quorum sensing system”. Each different bacterial species are able to produce different molecules called autoinducer, which act as a mediator to communication. This quorum sensing system plays an important role for bacteria in respond to environmental condition and control expression of several virulence genes. In this review, the basic knowledge and mechanism of the quorum sensing and the role of quorum sensing which involved to virulence genes expression in *P. aeruginosa* will be discussed.

คำสำคัญ: ระบบควอรัมเซนซิง ปัจจัยก่อโรค *Pseudomonas aeruginosa*

Keywords: Quorum sensing system, Virulence factors, *Pseudomonas aeruginosa*

บทนำ

แบคทีเรียมีกลไกการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกิดจากการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียด้วยกัน ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาเรื่องนี้มาเป็นเวลานานแล้ว และพบว่าแบคทีเรียแต่ละเซลล์นั้นมีภาษาของตัวเองสำหรับใช้ติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ กลไกการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์แบคทีเรียนี้เรียกว่า “quorum sensing” (QS) ซึ่งเป็นกระบวนการสื่อสารที่เกิดจากแบคทีเรียสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็กเรียกว่า autoinducer ที่แตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด การสื่อสารที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม และควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรค (virulence gene) ในแบคทีเรียก่อโรค ในบทความนี้จะได้อธิบายถึงความรู้ในเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกการควบคุมของระบบ QS พร้อมทั้งตัวอย่างของการตอบสนองต่อระบบ QS ในการควบคุมการแสดงออกของปัจจัยก่อโรคโดยเฉพาะในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

การค้นพบ quorum sensing

ระบบ quorum sensing นั้นมีรายงานครั้งแรกในเชื้อ *Vibrio fischeri* (Hastings and Nealson, 1977; Nealson and Hastings, 1979) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบพบได้ในทะเล สามารถดำรงชีวิตแบบ symbiosis ในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่นในหมึกที่ชื่อ Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*) (Nyholm and McFall-Ngai, 2004) หมึกชนิดนี้มีคุณสมบัติพิเศษสามารถเรืองแสงในตัวเองได้ นักวิทยาศาสตร์พบว่าการเรืองแสงนั้นเป็นผลมาจากเชื้อ *V. fischeri* ที่อาศัยภายในตัวของหมึก เชื้อ *V. fischeri* ในตัวของหมึกจะสร้างสารที่เรียกว่า autoinducer ออกมาเพื่อใช้ในการสื่อสารกับแบคทีเรียเซลล์อื่น ๆ เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนและหนาแน่นมากขึ้น

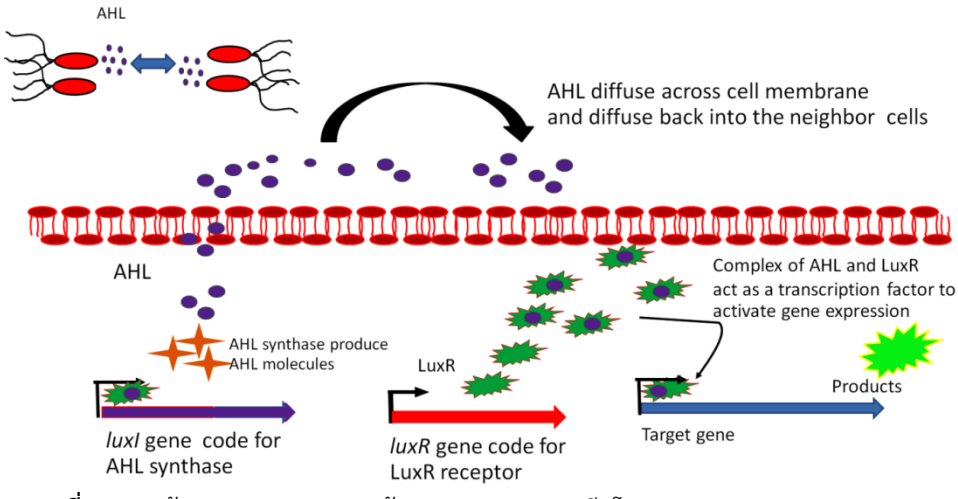
(ประมาณ 10^{11} cells/ml) ปริมาณของ autoinducer ที่เพิ่มมากขึ้นจะกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการแสดงออกของยีน luficerase และยีนอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเรืองแสง (bioluminescence) ในหมึก โดยหมึกอาศัยประโยชน์จากการเรืองแสงที่เกิดขึ้นล่อให้เหยื่อเข้ามาใกล้ และยังเกี่ยวข้องกับการจับคู่ของหมึกด้วย ในขณะที่เชื้อ *V. fischeri* ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในทะเลไม่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้ เนื่องจากปริมาณของ autoinducer ที่สร้างนั้นไม่มากพอที่จะไปกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการแสดงออกของยีนได้และ autoinducer นั้นจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วเมื่อถูกส่งออกภายนอกเซลล์ (Nealson and Hastings, 1979) ระบบการสื่อสารนี้ต่อมาจึงเรียกว่า quorum sensing เนื่องจากการค้นพบว่ามันเกี่ยวข้องกับการตรวจเช็คหรือนับจำนวนว่ามีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนถึงระดับที่มากพอ (threshold) หรือยัง

Autoinducer คืออะไร?

ในขณะที่กำลังศึกษาถึงกลไกในการควบคุมการสร้างสารเรืองแสง นักวิทยาศาสตร์ก็พบสารบางอย่างที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมา โดยพบว่าส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant) จาก *V. fischeri* ที่เลี้ยงจนเซลล์เจริญอย่างหนาแน่น เมื่อนำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *V. fischeri* ที่เจริญอยู่อย่างไม่หนาแน่นนั้นสามารถทำให้เชื้อนั้นเกิดการเรืองแสงขึ้นมาได้ แม้ว่าจะมีปริมาณของเซลล์ที่เลี้ยงนั้นยังมีจำนวนไม่มากก็ตาม ภายหลังจึงสามารถจำแนกได้ว่าสารที่แบคทีเรียสร้างออกมาและอยู่ในส่วนน้ำใสนั้นคือ 3-oxo-N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl) hexanamide หรือ N-3-(oxohexanoyl) homoserine lactone (OHHL) (Hastings and Nealson, 1977; Nealson and Hastings, 1979; Engebrecht et al., 1983; Engebrecht and Silverman, 1984; Schauder and Bassler, 2001) ซึ่งสารที่พบดังกล่าวจัดเป็น “autoinducer”

ความหมายของ autoinducer คือสารสัญญาณ (signaling molecule) ที่แบคทีเรียสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุ่มเพิ่มมากขึ้น สารสัญญาณที่สร้างก็จะมีปริมาณมากขึ้น และจะแพร่กลับเข้าไปจับกับตัวรับที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย และจะไปมีผลกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียชนิดเดียวกันที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงรวมทั้งตัวเอง ให้ตอบสนองโดยการแสดงออกของยีนต่าง ๆ หลายชนิด ปัจจุบันพบสารในกลุ่มนี้หลายชนิดในแบคทีเรียแกรมลบ เรียกชื่อรวม ๆ ว่า Acyl Homoserine Lactones (AHLs) โมเลกุลของสารพวก AHL จะถูกสร้างจากภายในเซลล์ โดยเอนไซม์ AHL synthase ที่ควบคุมการสร้างโดยยีนชื่อว่า *luxI* AHL ที่สร้างจะถูกส่งออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อมีการสะสมในปริมาณที่มากขึ้นจะแพร่กลับเข้าสู่เซลล์ไปกระตุ้นเซลล์ โดยจะจับกับโปรตีนที่เรียกว่า LuxR โปรตีนคอมเพล็กซ์ระหว่าง AHL และ LuxR ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็น transcription factor ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่าง ๆ รวมทั้ง *luxI* ให้สร้าง AHL เพิ่มมากขึ้นด้วย (รูปที่ 1)

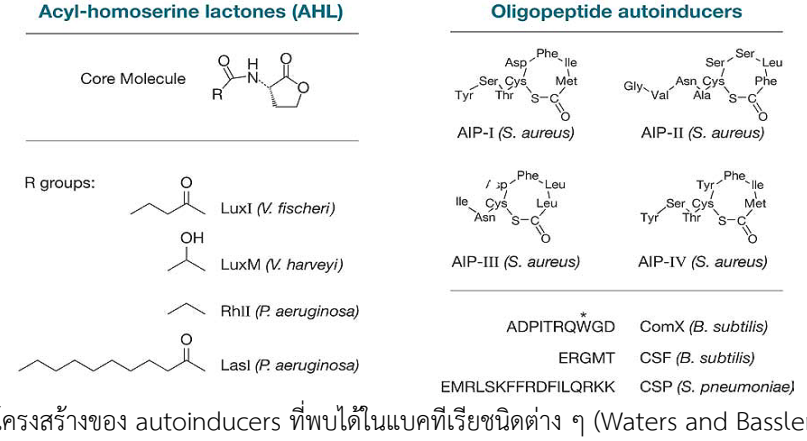
Autoinducers ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นั้นแตกต่างกัน โดยในแบคทีเรียแกรมลบนั้นพบว่าเป็นโมเลกุลพวก AHLs ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ (Schauder and Bassler, 2001) (รูปที่ 2) นอกจากนี้ระบบ QS ที่พบในแบคทีเรียแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกันไปได้หลายชนิด



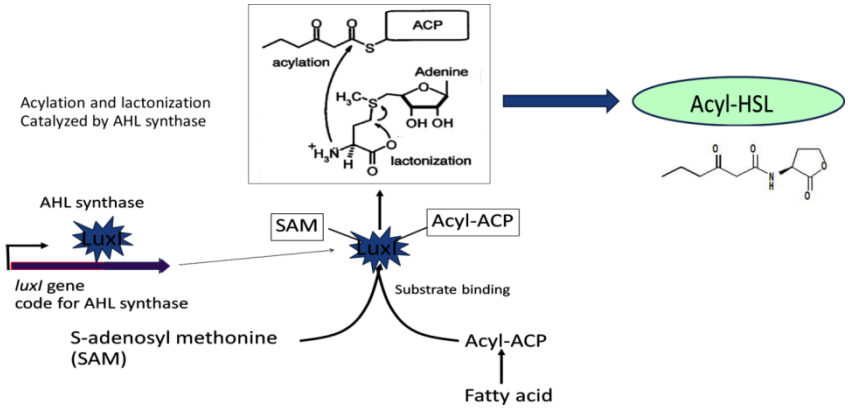
รูปที่ 1 การสร้าง AHL และการกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดย AHL และ LuxR complex

การสังเคราะห์ AHL

AHL สังเคราะห์โดย AHL synthase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *luxI* ที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ เรียกยีนในกลุ่มนี้รวม ๆ ว่า *luxI* homologs โดย *luxI* ที่พบในแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นสร้าง AHLs ที่แตกต่างกัน (Parsek and Greenberg, 2000) (ตารางที่ 1) กระบวนการสังเคราะห์ AHL นั้นอาศัยสารตั้งต้นสองส่วน (รูปที่ 3) ส่วนแรกคือส่วนของ acyl ในสายของ homoserinelactone ซึ่งสังเคราะห์มาจากกรดไขมันที่จับอยู่กับ acyl-carrier protein (acy-ACP) ส่วนที่สองคือบริเวณของ homoserinelactone นั้นสังเคราะห์มาจาก S-adenosylmethonine (SAM) โดย substrate ทั้งสองส่วนจะถูกจับด้วย AHL synthase (LuxI) และจะเกิดกระบวนการที่สำคัญสองอย่างคือ lactonization โดยส่วน side chain ของ SAM จะจับกันเป็นวงแหวน lactone จากนั้นจะถูกตัดและไปเชื่อมต่อกับสาย acyl จาก acyl-ACP ได้เป็น Acyl-Hormoserinelactone (acyl-HSL หรือ AHL) (Watson et al., 2002) พบว่า AHLs ที่สร้างจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันที่บริเวณของ R-group side chain ซึ่งเป็นสายคาร์บอนที่มีขนาดยาวแตกต่างกัน 4-18 อะตอม (Fuqua and Greenberg, 2002)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ autoinducers ที่พบได้ในแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (Waters and Bassler, 2005)



รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ Acyl-HSL จากสารตั้งต้นสองชนิดคือ Acyl-ACP และ SAM

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ AHLs และโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์และควบคุมในเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ดัดแปลงข้อมูลจาก de Kievit and Iglewski (2000)

Bacterial strain	Type of AHL	Regulatory proteins (LuxI/LuxR homologs)	Phenotype
Vibrio fischeri	3-Oxo-C6-HSL	LuxI/LuxR	bioluminescence
Vibrio harveyi	3-Hydroxy-C4-HSL	LuxLM/LuxN	bioluminescence
Pseudomonas aeruginosa	3-Oxo-C12-HSL	LasI/LasR	multiple extracellular enzymes, biofilm formation
	C4-HSL	RhlI/RhlR	multiple extracellular enzymes, rhamnolipid, rpos, secondary metabolites
Pseudomonas aureofaciens	C6-HSL	PhzI/PhzR	phenazine antibiotics
Agrobacterium tumefaciens	3-Oxo-C8-HSL	TraI/TraR	ti plasmid conjugation
Erwinia stewartii	3-Oxo-C6-HSL	EsaI/EsaR	exopolysaccharide, virulence factors
Burkholderia cepacia	C8-HSL	CepI/R	protease, siderophores
Aeromonas hydrophila	C4-HSL	AhyI/AhyR	exoprotease production
Escherichia coli	?	?/SdiA	cell division, attachment and effacing lesion formation
Yersinia enterocholitica	C6-HSL	YenI/YenR	?
Yersinia pseudotuberculosis	C8-HSL	YesI/YesR	?

Quorum sensing ในแบคทีเรียแกรมลบ

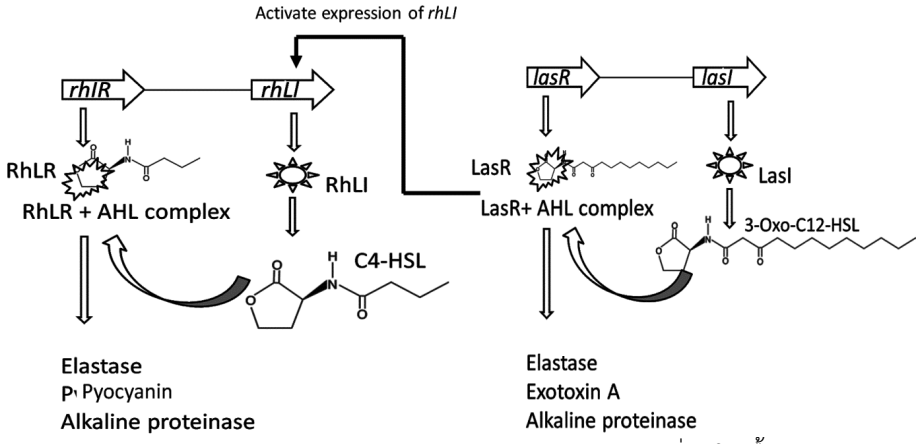
ระบบ QS ที่พบได้มากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบคือ LuxI/LuxR ซึ่งใช้ autoinducer ที่เป็นโมเลกุลกลุ่ม AHLs นอกจากนี้ยังพบระบบอื่น ๆ ที่มีความคล้ายกับ LuxI/LuxR เรียกว่า “LuxI/LuxR homologs” เช่น LuxLM/LuxN ในเชื้อ *V. harveyi* ระบบ LasI/LasR พบในเชื้อ *P. aeruginosa* (de Kievit and Iglewski, 2000; Reading and

Sperandio, 2006; Rutherford and Bassler, 2012) (ตารางที่ 1) ปัจจุบันระบบ LuxI/LuxR homologs พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า 100 สปีชีส์ (Case et al., 2008) นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกของปัจจัยก่อโรค (virulence factors) หลายชนิดในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบถูกควบคุมด้วยระบบของ LuxI/LuxR homologs

Quorum sensing ในเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีการศึกษาระบบ QS มาก คือเชื้อ *P. aeruginosa* เชื้อแบคทีเรียนี้มี QS 3 ระบบ โดยมี 2 ระบบที่จัดเป็น LuxI/LuxR homolog คือระบบ Las และ Rhl และอีกหนึ่งระบบที่ไม่จัดอยู่ใน LuxI/LuxR homolog เรียกว่า *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) system ทั้งสามระบบมี autoinducer ที่แตกต่างกัน ในระบบ Las ใช้ N-(3-Oxo-dodecanoyl) homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) ระบบ Rhl ใช้ N-butyrul-L-Homoserine lactone (C4-HSL) และระบบ PQS ใช้ 2-heptyl-3-hydroxi-4-quinolone เป็น autoinducer (Bjarnsholt et al., 2010; Rutherford and Bassler, 2012) การทำงานของ LasI/LasR มีกลไกคือ LasI ซึ่งเป็น acyl-homoserine-lactone synthase จะทำหน้าที่สร้าง autoinducer คือ 3-oxo-C12-HSL และจะปล่อยออกไปภายนอกเซลล์เมื่อปริมาณของเซลล์เพิ่มจำนวนหนาแน่นมากขึ้น 3-oxo-C12-HSL ที่มากขึ้นจะสามารถแพร่สู่เซลล์ได้มากขึ้นและจะจับกับโปรตีน LasR ซึ่งคอมเพล็กซ์ระหว่าง 3-oxo-C12-HSL และ LasR จะทำหน้าที่เป็นเสมือน transcription factor ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการก่อโรคหลายชนิด (รูปที่ 4) เช่นเอนไซม์ elastase, protease และสารพิษ exotoxin A (Rutherford and Bassler, 2012) คอมเพล็กซ์ระหว่าง 3-oxo-C12-HSL และ LasR ยังทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ RhlI ซึ่งควบคุมการสร้าง C4HSL ที่เป็น autoinducer อีกชนิดหนึ่งของ QS ในระบบ RhlI/RhlR (Pesci et al., 1997; Smith and Iglewski, 2003; P. Jiménez-Gómez et al., 2007) กลไกการทำงานคล้ายกับใน LasI/LasR โดยเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนมีระดับของ C4HSL สูงมากขึ้น C4HSL จะจับกับ RhlR และไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมปัจจัยการก่อโรค เช่น protease, pyocyanin, elastase และ siderophores (Stintzi et al., 1998; Parsek and Greenberg, 2000)

กรณีของระบบ PQS การสร้าง autoinducer คือ 2-heptyl-3-hydroxi-4-quinolone นั้นจะถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายยีน ได้แก่ยีน *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* และ *pqsH* รูปแบบการทำงานของระบ PQS นั้นคล้ายกับระบบอื่น ๆ โดย autoinducer ที่สร้างขึ้นมาจะแพร่ผ่านเมมเบรนของเซลล์เช่นเดียวกับระบบอื่น ๆ และเมื่อ 2-heptyl-3-hydroxi-4-uinolone นั้นแพร่กลับเข้าสู่เซลล์จะจับกับตัวรับคือ PqsR คอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นก็จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่าง ๆ นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกของตัวรับ PqsR นั้นจะถูกควบคุมด้วย LasR-3-oxo-C12-HSL คอมเพล็กซ์ในระบบ LasI/LasR (Rutherford and Bassler, 2012)



รูปที่ 4 การทำงานของ quorum sensing ระบบ LasI/LasR และ RhLI/RhLR ที่พบในเชื้อ *P. aeruginosa*

โรคและการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ในจำนวนผู้ป่วยโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 2,000 คนต่อปี พบว่าร้อยละ 10 มีสาเหตุมาจาก *P. aeruginosa* และเป็นสาเหตุอันดับสองในการทำให้เกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล (nosocomial pneumonia) (Fujitani et al., 2011) นอกจากนี้ยังจัดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่ติดเชื้อในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised) เชื้อนี้มีความสามารถก่อโรคได้ในเกือบทุกอวัยวะ ที่สำคัญคือการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะกรณีของผู้ป่วยโรคทางพันธุกรรม cystic fibrosis (CF) เนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง biofilm ที่ช่วยให้เชื้อนั้นอยู่ภายในร่างกายได้นานก่อให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง (chronic infection) และ biofilm ยังทำให้เชื้อทนต่อการทำลายด้วยยาต้านจุลชีพ รวมถึงยากต่อการทำลายจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้กันของร่างกาย เชื้อนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ผิวหนังโดยเฉพาะกรณีแผลไฟไหม้ และมักจะลุกลามไปเป็นการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ผู้ติดเชื้อมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงขึ้น

ระบบ Quorum sensing และการควบคุมการแสดงออกของปัจจัยก่อโรครุนแรง

ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาพบว่าร้อยละ 21 ของผู้ป่วยที่เป็นปอดอักเสบจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* (Rello and Diaz, 2003) และพบว่าผู้ป่วยปอดอักเสบจากการติดเชื้อนี้มีอัตราการเสียชีวิตที่สูง (Fujitani, Sun et al., 2011) รายงานการศึกษาในโมเดลหนูทดลอง โดยทำให้หนูติดเชื้อที่ปอดจากเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *lasI* และ *rhlI* ซึ่งควบคุมการสร้าง autoinducer (3-oxo-C12-HSL และ C4-HSL) ผลการศึกษานั้นแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อหนูที่ติดเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองนั้น จะดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อสายพันธุ์ปกติ (wild type) ไม่ว่าจะเป็นระดับของแอนติบอดี ระดับของอินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon-γ) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มของ polymorphonuclear (PMN) ที่มากกว่าและพบว่าหนูกลุ่มที่ติดเชื้อที่กลายพันธุ์แสดงอาการที่รุนแรงน้อยกว่าในหนูที่ติดเชื้อสายพันธุ์ปกติ นอกจากนี้พบว่าหนูที่ติดเชื้อสายพันธุ์ปกตินั้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นช้ากว่า

(Wu et al., 2001) ผลการศึกษาอีกรายงานที่สอดคล้องกันคือการศึกษาในหนูทดลองเช่นกันและใช้เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *lasI* และ *rhlI* เช่นเดียวกันแต่เป็นคนละสายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่าพยาธิสภาพของการติดเชื้อที่มีการกลายพันธุ์จะรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์ปกติ และพบว่าในน้ำที่ได้จากปอด (bronchus lavage) จากหนูที่ติดเชื้อที่กลายพันธุ์มีระดับของเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติด้วย (Imamura et al., 2005) การศึกษาในทั้งสองรายงานได้สันนิษฐานว่าระบบ QS ทั้ง LasI และ RhLI นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกในการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในหนูที่ทำการศึกษา นอกจากนี้มีรายงานว่า 3-oxo-C12-HSL สามารถกระตุ้นการแสดงออกต่อยีนของเจ้าบ้าน (host) ได้โดยตรง พบว่า 3-oxo-C12-HSL สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (Cox-2) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน arachidonic ไปเป็นสารพวก prostaglandins ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ และยังพบว่า 3-oxo-C12-HSL กระตุ้น T-cell ให้หลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น อินเตอร์เฟียรอน-แกมมา เพิ่มมากขึ้นด้วย (Smith et al., 2002) ในกรณีการศึกษาในมนุษย์ มีการศึกษาในผู้ป่วยโรค CF ซึ่งอาการของโรคปอดเรื้อรังจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าในเสมหะของผู้ป่วยจะตรวจพบสาร autoinducer คือ 3-oxo-C12-HSL และ C4-HSL โดยพบระดับของ 3-oxo-C12-HSL มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการพบการแสดงออกของยีน *lasI* จากตัวอย่างเสมหะที่ได้จากปอดของผู้ป่วยด้วย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอย่างน้อยยีน *lasI* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดและการควบคุมการแสดงออกของปัจจัยก่อโรคในผู้ป่วย CF (Erickson et al., 2002) บทบาทของยีน *lasR* เองก็มีการศึกษาเช่นกัน ยีน *lasR* นั้นควบคุมการสร้าง transcription activator protein ที่จับกับ 3-oxo-C12-HSL พบว่าโปรตีน LasR มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ elastase ที่เป็นปัจจัยก่อโรคของเชื้ออีกชนิดหนึ่ง elatase จะย่อยสลายเนื้อเยื่อพวก elastin laminin และ collagen types III and IV (Gambello and Iglewski, 1991) นอกจากนี้มีรายงานพบว่าโปรตีน LasR จำเป็นสำหรับการสร้างเอนไซม์ alkaline protease และ exotoxin A ด้วย (Gambello et al., 1993)

ในขณะที่ QS ในระบบ RhlI/RhlR นั้นเกี่ยวข้องกับการสร้าง rhamnolipid เป็นปัจจัยก่อโรคทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolytic) ทำลายเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด polymorphonuclear cell (PMN) และมาโครฟาจ (macrophage) และยังมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวตามธรรมชาติ (biosurfactant) (Johnson and Boese-Marrazzo, 1980; Koch et al., 1991; Jensen et al., 2007) พบว่าระบบ RhlI/RhlR ควบคุมการแสดงออกของยีน *rhlAB* ซึ่งเป็นยีนสำหรับควบคุมการสร้างเอนไซม์ rhamnosyltransferase เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทำให้กลายพันธุ์ของยีน *rhlI* จะพบการสร้างเอนไซม์ rhamnosyltransferase และ rhamnolipid ลดลง (Pearson et al., 1997)

ระบบ QS มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ *P. aeruginosa* ในแผลที่ถูกไฟไหม้ (burned skin) พบว่าประมาณ 10% ของผู้ป่วยแผลไฟไหม้จะมีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* และประมาณ 80% ของผู้ติดเชื้อนั้น มีโอกาสเสียชีวิตเนื่องจากภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) (Richard et al., 1994) การศึกษาในหนูทดลอง โดยใช้เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน *lasI* และ *rhlI* ที่กลายพันธุ์ จะพบมีความรุนแรงลดลง และภาวะการติดเชื้อในกระแสโลหิตลดลงด้วยเมื่อเปรียบเทียกับเชื้อปกติ นอกจากนี้การทดลองยืนยัน

โดยการใส่พลาสมิดที่มียีน *lasI* และ *rhlI* ปกติกลับเข้าไปในเชื้อที่กลายพันธุ์ก็พบว่าเชื้อนั้นกลับมาก่อโรคที่รุนแรงได้ดังเดิม (Rumbaugh et al., 1999)

ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของเชื้อ *P. aeruginosa* คือการสร้าง biofilm ซึ่งเป็นสารจำพวกโพลิเมอร์ (polymers) ไกลโคคัลลิกซ์ (glycocalyx) และเมือก (slime) ที่กลุ่มแบคทีเรียสร้างออกมาและใช้เป็นที่อยู่อาศัย เพื่อให้เชื้อรวมกลุ่มกันเจริญเติบโต เชื้อ *P. aeruginosa* อาศัย biofilm ซึ่งจะพบได้มากบริเวณตำแหน่งของเข็มให้น้ำเกลือ (catheters) ในผู้ป่วยที่ต้องได้รับสารน้ำเป็นเวลานาน biofilm ช่วยให้เชื้อเจริญและหลบหลีกการเข้าถึงของยาต้านจุลชีพและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ biofilm ที่พบในกรณีผู้ป่วย CF ช่วยให้เชื้อสามารถรวมกลุ่มกัน (colonization) ในร่างกายโดยเฉพาะที่ปอดของผู้ป่วยได้เป็นเวลานาน มีการศึกษาพบว่า LasI/LasR มีบทบาทสำคัญในการสร้าง biofilm ของเชื้อ โดยเชื้อที่กลายพันธุ์ไม่สามารถสร้าง 3-oxo-C12-HSL ได้ จะมีการสร้าง biofilm ที่ผิดปกติไป และสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งผลการทดลองนี้ได้รับการพิสูจน์ด้วยการเติมสาร 3-oxo-C12-HSL เข้าไปในขณะที่เลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่กลายพันธุ์ พบว่าการสร้าง biofilm เกิดขึ้นอย่างเป็นปกติ (Davies et al., 1998) การศึกษาในหนูทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่กลายพันธุ์ของระบบ QS บนแผ่น silicone แล้วนำไปปลูกถ่ายลงในช่องท้องหนู พบว่าเชื้อที่กลายพันธุ์ของระบบ QS นั้นจะถูกกำจัดไปอย่างรวดเร็วโดยระบบภูมิคุ้มกันของหนู ในขณะที่สายพันธุ์ปกติ สร้าง biofilm และทนทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า (Christensen et al., 2007)

Quorum sensing เป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาต้านจุลชีพ

ความสามารถของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นสัมพันธ์กับความสามารถในการแสดงออกของปัจจัยก่อโรคที่ถูกควบคุมด้วยยีน อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยก่อโรคนั้นมักไม่มีผลต่อการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์และไม่สามารถแสดงออกของปัจจัยก่อโรค ยังคงสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและรวมกลุ่มกันภายในเจ้าบ้านได้อย่างเป็นปกติ เพียงแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค การศึกษาที่ผ่านมาทำให้นักวิทยาศาสตร์ทราบว่าปัจจัยก่อโรคหลายชนิดนั้นถูกควบคุมด้วยระบบ QS รวมทั้งในกรณีของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากจึงมีแนวความคิดใหม่ในการพัฒนายาต้านจุลชีพ ด้วยแนวคิดการยับยั้งไม่ให้เชื้อแบคทีเรียนั้นก่อโรคได้ในร่างกายของเจ้าบ้าน โดยยับยั้งการทำงานของระบบ QS เป้าหมายใหม่นี้แตกต่างไปจากยาต้านจุลชีพแบบเดิมที่มุ่งฆ่าหรือยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียพยายามปรับตัวและเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพนั้น ในขณะที่แนวทางใหม่โดยการยับยั้งระบบ QS จะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการพัฒนาและดื้อต่อยา เพราะไม่ได้มีเป้าหมายในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ปัจจุบันเริ่มมีการวิจัยเพื่อหาสารเคมีทั้งที่เป็นสารสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติหลายชนิดนำมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งระบบ QS สารดังกล่าวเรียกรวม ๆ ว่า quorum quenching หรือ quorum sensing inhibitor (QSI) เป้าหมายหลักสำหรับการยับยั้งระบบ QS คือการยังยั้งหรือทำลาย autoinducer และโปรตีนตัวรับของ autoinducer ซึ่งหากสัญญาณดังกล่าวถูกทำลายหรือยับยั้งแล้ว แบคทีเรียก็จะไม่สามารถสื่อสารและส่งสัญญาณเพื่อไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่ควบคุมปัจจัยก่อโรคได้

กรณีของเชื้อ *P. aeruginosa* ก็มีการศึกษาเพื่อหาสารเคมีที่เป็น QSI จำนวนมาก เช่นสารประกอบจำพวก halogenated furanone ซึ่งเป็น secondary metabolites จากสาหร่ายทะเล *Delisea pulchra* พบว่าสามารถรบกวนการทำงานของ AHL ของเชื้อ *P. aeruginasa* ได้ พบว่าเกี่ยวข้องกับระบบ LasI/LasR นอกจากนี้พบว่าสารกลุ่ม halogenated furanone ทำให้การสร้าง biofilm ผิดปกติไป แบคทีเรียจะหลุดออกมาจากสิ่งแวดล้อมใน biofilm ได้ง่าย (Hentzer et al., 2002) มีการศึกษาโดยสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ AHL เพื่อใช้เป็นยาในกลุ่ม AHL analogs เช่นสาร *N*-Octanoyl cyclopentylamide (C8-CPA) ซึ่งก็พบว่าแนวทางนี้สามารถนำมาใช้เป็นยาที่ยับยั้งระบบ QS ทั้ง Las และ Rhl ได้เช่นกัน

บทสรุป

ปัจจุบันการศึกษาในเรื่อง QS ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกของเชื้อแบคทีเรียในการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ รวมทั้งในตัวเจ้าบ้าน ความเข้าใจเรื่องการควบคุมกลไกการก่อโรค เป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์มีความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้เป้าหมายสำคัญอีกประการ คือการพัฒนายาต้านจุลชีพแนวทางใหม่ ด้วยการยับยั้งการแสดงออกของปัจจัยก่อโรค ที่คาดว่าจะช่วยลดปัญหาการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งงานวิจัยในด้านนี้ยังคงเปิดกว้างเพื่อรอให้นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาค้นคว้าต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Hoiby, N. and Ciofu, O. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. PLoS One 5(4): e10115.

Case, R. J., Labbate, M. and Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. ISME J. 2(4): 345-349.

Christensen, L.D., Moser, C., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Kjelleberg, S., Kumar, N., Hoiby, N., Givskov, M. and Bjarnsholt, T. (2007). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. Microbiology 153(Pt 7): 2312-2320.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280(5361): 295-298.

de Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun. 68(9): 4839-4849.

Engebrecht, J., Nealson, K. and Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell 32(3): 773-781.

Engebrecht, J. and Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(13): 4154-4158.

Erickson, D.L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D. D., Rabin, H. R., Mitchell, I. and Storey, D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the

lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun. 70(4): 1783-1790.

Fujitani, S., Sun, H.Y., Yu, V.L. and Weingarten, J.A. (2011). Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. Chest. 139(4): 909-919.

Fuqua, C. and Greenberg, E.P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 3(9): 685-695.

Gambello, M.J. and Iglewski, B.H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. J Bacteriol. 173(9): 3000-3009.

Gambello, M.J., Kaye, S. and Iglewski, B.H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect Immun. 61(4): 1180-1184.

Hastings, J.W. and Nealson, K.H. (1977). Bacterial bioluminescence. Annu Rev Microbiol. 31: 549-595.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology 148(Pt 1): 87-102.

Imamura, Y., Yanagihara, K., Tomono, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Tsukamoto, K. and Kohno, S. (2005). Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronic respiratory infection. J Med Microbiol. 54(Pt 6): 515-518.

Jensen, P.O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M. and Hoiby, N. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153(Pt 5): 1329-1338.

Johnson, M.K. and Boese-Marrazzo, D. (1980). Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 29(3): 1028-1033.

Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A. and Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol. 173(13): 4212-4219.

Nealson, K.H. and Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol Rev. 43(4): 496-518.

Nyholm, S.V. and McFall-Ngai, M.J. (2004). The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. Nat Rev Microbiol. 2(8): 632-642.

P. Jiménez-Gómez, M.J. Pozuelo de Felipe, F. Llinares Pinell and Ríos, J. E. G. d. l. (2007). Quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and Salmonella: Active natural compounds as antagonists. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology: 41-51.

Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc Natl Acad Sci USA. 97(16): 8789-8793.

Pearson, J.P., Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl

quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol. 179(18): 5756-5767.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C. and Iglewski, B.H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 179(10): 3127-3132.

Reading, N.C. and Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol Lett. 254(1): 1-11.

Rello, J. and Diaz, E. (2003). Pneumonia in the intensive care unit. Crit Care Med. 31(10): 2544-2551.

Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E. and Richet, H. (1994). *Pseudomonas aerugin*osa outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. J Infect Dis. 170(2): 377-383.

Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H. and Hamood, A.N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infect Immun. 67(11): 5854-5862.

Rutherford, S.T. and Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb Perspect Med. 2(11).

Schauder, S. and Bassler, B.L. (2001). The languages of bacteria. Genes Dev. 15(12): 1468-1480.

Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R. and Iglewski, B. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. J Bacteriol. 184(4): 1132-1139.

Smith, R.S. and Iglewski, B.H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J Clin Invest. 112(10): 1460-1465.

Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J.M. and Poole, K. (1998). Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett. 166(2): 341-345.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 21: 319-346.

Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B. and Churchill, M.E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. Mol Cell. 9(3): 685-694.

Wu, H., Song, Z., Givskov, M., Doring, G., Worlitzsch, D., Mathee, K., Rygaard, J. and Hoiby, N. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. Microbiol. 147(Pt 5): 1105-1113.

❑❑❑❑❑