

บันทึก

Ku protein

ปริยานาถ วงศ์จันทร์*

บทนำ

Ku protein เป็น Heterodimeric protein complex ประกอบด้วย p70 ซึ่งกำหนดการสร้างโดย Hdf1p gene และ p86 ซึ่งกำหนดการสร้างโดย Yku70p gene จัดเป็น Non-histone DNA binding protein สามารถตรวจพบได้ในนิวเคลียสของ Eukaryotic cells ทุกชนิด ในคนมีการตรวจพบครั้งแรกในซีรัมผู้ป่วยโรค Autoimmune คือ Scleroderma, Rheumatoid arthritis และ Systemic lupus erythematosus (SLE) มีความเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับ DNA replication, DNA double strand break repair, End-to-end joining เช่นใน Immunoglobulin gene rearrangement (V(D)J recombination) และ Teromeric regulation มีบทบาทในการส่งเสริมกระบวนการ Non-homologous end-to-end joining ของ DNA มีส่วนร่วมในการสร้าง DNA สายใหม่ระหว่างกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ และช่วยควบคุมการแบ่งเซลล์ในระยะ Teromere

ลักษณะโครงสร้างทางชีวเคมี

Ku protein เป็น Heterodimer ระหว่าง P70 และ 86 จับกันแบบ Non-covalent linkage และมีรายละเอียดในแต่ละหน่วยย่อยดังนี้

p70 Ku protein

ลักษณะเป็น Ku(p70)-related polypeptides

กำหนดการสร้างโดยหลายยีน p70 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 609 ลำดับ และแบ่งเป็น 2 Acidic domains ขนาด 61 residues (31% Glu+Asp) และขนาด 19 Residues (53% Glu+Asp)¹ ขนาดและจำนวนประจุใกล้เคียงกับ Transactivator protein อื่นๆ ที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว จากการศึกษาพบว่าใน Domain แรกมีลักษณะเป็น Serine rich สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นบริเวณที่มีการเกิดปฏิกิริยา Phosphorylation นอกจากนี้ยังพบลักษณะของ Leucine repeated หรือเป็น Leucine สลับกับ Serine ในทุกๆ 7 residues ซึ่งเป็น Leucine Zipper motif ที่พบได้ใน c-myc, v-myc oncogene products

บริเวณที่ออกโดแอนติบอดีในผู้ป่วยโรค SLE, Scleroderma และ Rheumatoid arthritis สามารถจับกับ Ku protein ได้แก่บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 190 ใกล้เคียงกับ Leucine zipper motif ทางปลาย C-terminal นอกจากนี้ยังพบด้วยว่า p70 เท่านั้นที่เป็นบริเวณ DNA-binding site ไม่ใช่ส่วน p86

p86 Ku protein

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 732 ลำดับ จาก 1 Origin of replication (ORF) มี Repeating leucine residues และมีลักษณะของ Leucine zipper เช่นเดียวกับ p70² และที่พบใน c-myc, v-myc และ c-fos oncogene products โดยที่ Ku80-6 cDNA ซึ่ง

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กำหนดการสร้าง p80 มีจำนวนทั้งหมด 3,304 nucleotides และมี Poly(A) tail ในการศึกษาด้วย Genomic DNA Blot เมื่อใช้ Probe ที่เตรียมจาก Ku80-6 cDNA ซึ่งเป็นบริเวณปลายอีกด้านหนึ่ง และทำ Hybridization กับ Human leukocyte DNA พบว่า Probe ดังกล่าวสามารถจับได้กับ Non overlapping restriction fragment หลายบริเวณ แสดงให้เห็นว่ายีนที่กำหนดการสร้าง p80 ku polypeptide ประกอบด้วยหลาย Exon และหลาย Intervening sequences

ความสำคัญและกลไกการทำงาน

Ku protein เป็น Nuclear DNA binding protein เรียกอีกอย่างว่า Factor IV ซึ่งจำเพาะต่อเฉพาะส่วนปลายของ DNA เท่านั้น และสามารถจับได้หลายบริเวณ การทำงานไม่ต้องการพลังงาน การศึกษาในระดับ *in vivo* ยังไม่ทราบรายละเอียดแน่ชัด แต่ทราบว่ามีส่วนร่วมใน DNA replication, DNA repair และ Transcription control เมื่อจับกับ DNA แล้วไม่มี Translocation จากการศึกษา Anti-Ku antibody ที่พบในซีรัมผู้ป่วย Autoimmune disease พบว่าแอนติบอดีจับเฉพาะกับส่วนของ p70 polypeptide เท่านั้น p70 Ku protein มีความจำเพาะในการจับ DNA โดยมีความสามารถในการจับกับ dsDNA มากกว่า ssDNA และเฉพาะบริเวณตอนปลาย จากการศึกษาด้วย Foot print analysis พบว่าสามารถจับได้ ทั้งปลายด้าน 3' และ 5' และเมื่อจับแล้วสามารถป้องกัน DNA จากการทำลายด้วย DNase-I นอกจากนี้ยังสามารถจับได้กับบริเวณที่มี Nicked ด้วย การจับกับ DNA ขึ้นกับ Ionic strength แต่ไม่ขึ้นกับลำดับ DNA และไม่ต้องอาศัยพลังงาน³

การจับกันระหว่าง Ku protein กับ DNA โดยเฉพาะบริเวณที่มี Recombination-based repair ช่วยป้องกัน DNA จากสารรังสี นอกจากนี้ยังพบว่า Ku protein มีบทบาทในกระบวนการ Rearrangement

ของยีนที่สร้างอิมมูโนโกลบูลิน

ในช่วง 4-5 ปีหลังมีนักวิจัยหลายท่านศึกษา กลไกการทำงานและบทบาทของ Ku protein พอสรุปได้ดังนี้

Zhang และคณะ⁴ ในปี 1993 ศึกษาการทำงานของ Ku protein ในการจับกับ DNA พบว่า Ku protein จะทำงานได้ (Active form) ต้องอยู่ในสถานะที่ไม่มี Sulphydryl group (คือต้องเป็น Reduced cysteins) และถูกทำลายได้ด้วยความร้อนตั้งแต่ 37 °C เขาศึกษาโดยการ Treat sulphydryl group ด้วยการใช้น-ethylmaleimide เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Alkylation หรือใช้ Azodicarboxylic acid เพื่อให้เกิด Cross-linking หรือด้วยการใช้ความร้อน พบว่า Ku protein เกิด Cross-link และไม่สามารถจับกับ dsDNA ได้ ที่น่าสนใจคือหากทำปฏิกิริยา ร่วมกับ Hela cell extract จะสามารถลด Inhibition effect นี้ได้ แสดงว่า Nuclear factor มีบทบาทในการคงสถานะ Reduced cysteins ของ Ku protein ได้ใน *in vivo*

ในปี 1994 Tuteja และคณะ⁵ แยกโปรตีนชนิดหนึ่งจาก Hela cell lines และศึกษาพบว่ามีความสมบัติเหมือน Ku protein โปรตีนตัวใหม่ที่แยกได้จาก Hela cell lines นี้เรียกว่า Human DNA helicase II (HDH II) มีความสมบัติเป็น ATP-dependent DNA unwinding enzyme เป็น Heterodimer ประกอบด้วย Polypeptide ขนาด 72 kD และ 87 kD สามารถคลายเกลียวได้ทั้ง dsDNA และ ssDNA การศึกษาลำดับกรดอะมิโนและการทำปฏิกิริยากับซีรัมจากผู้ป่วยโรค Scleroderma และ SLE พบว่ามีรูปแบบเดียวกับ Ku protein

ในปี 1995 Tetuja และคณะ⁶ ยังได้ศึกษาต่อโดยเทคนิค Immunoprecipitation โดยใช้ Hela cell extract จับด้วย Anti-Ku antibodies ภายหลังจาก Immunoblot พบว่าได้สารประกอบที่ประกอบด้วย Ku protein และ p350 ซึ่งเป็น DNA-dependent protein

kinase (DNA-PK) และพบว่าสารประกอบนี้จะเกิดขึ้นเฉพาะกับ dsDNA เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า Ku protein จับกับ DNA ก่อนซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่จำเพาะต่อการจับของ p350 หรือกล่าวได้ว่า Ku protein ทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวช่วยการประกอบกัน (Assembly) ของ DNA-PK holoenzyme

ในปี 1995 Kim และคณะ⁷ ศึกษา Ku protein ในสัตว์ทะเล โดยวิธี Heat shock และแยก Heat shock element (HSE)-binding protein มาทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ Constitutive HSE-binding factor (CHBF) ที่แยกจาก Hela cell line ซึ่ง Treat ด้วยวิธีเดียวกันพบว่า ทั้ง HSE และ CHBF มีรูปแบบเหมือนกับ Ku protein คือเป็น Heterodimer ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 70 และ 86 kD ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Immunoblot และ Electromobility Shift Assay (EMSA) พบว่าจับกับ dsDNA ได้และดีกว่า ssDNA ทำให้เชื่อว่า Ku protein (หรือ CHBF ในสัตว์ทะเล) มีบทบาทควบคุมโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ในการตอบสนองต่อความร้อนที่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ ในปีเดียวกัน Li และคณะ⁸ ได้พิสูจน์ว่า Ku protein มีบทบาทเกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของ Hsp70 ภายในเซลล์

ในปี 1995 DiCrocce⁹ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งหรือบริเวณที่ Ku protein เข้าจับคือบริเวณ Bcl2 major breakpoint region (mbr) ซึ่งเป็นบริเวณจับจำเพาะของ ssDNA-binding protein จากการศึกษาพบว่า Helicase และ ssDNA-binding protein มีการทำงานสอดคล้องกันตลอดในวงจรการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell cycle) โดยเอ็นไซม์ Helicase จะแสดงบทบาทและทำงานในระยะ G1 และ Early S phase ของวงจรการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่วน ssDNA-binding protein จะแสดงบทบาทในระยะ Late S และ G2/M phase และเมื่อใช้สารยับยั้งเอ็นไซม์ Helicase พบว่าสามารถยับยั้งได้ในระยะ Late S และ G2/M

phase แสดงว่า Ku protein มี Helicase activity และมีบทบาทต่อ Double-strand breaks, Variable (Diversity) recombination และควบคุมวงจรการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยมีตำแหน่งจำเพาะคือ Bcl2 mbr

ในปี 1996 Giffen และคณะ¹⁰ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Ku protein เข้าจับจำเพาะใน MMTV (Mouse mammary tumour virus) พบว่าการทำงานของ Ku protein อาศัย Phosphorylation ของ DNA-PK และ Specific sequence คือ -394/-381 ซึ่งเป็น Negative Regulatory Element (NRE1) อยู่ใน LTR ของ MMTV เมื่อจับแล้วมีผลทำให้เกิดการแสดงออกของ Glucocorticoid-induced MMTV transcription

แม้การศึกษาเบื้องต้นได้แสดงให้เห็นว่าส่วนที่ทำหน้าที่ในการจับกับ dsDNA คือส่วน p70 ก็ตาม แต่การศึกษาในระยะหลังๆ เกี่ยวกับบทบาทของ p86 พบว่าในหนูที่ขาด Ku p86 จะแสดงอาการของ SCID (Severe combined immunodeficiency) และมีความผิดปกติในกระบวนการ V (D) J recombination แสดงว่า Ku protein p86 ก็มีส่วนเกี่ยวข้องใน Gene processing และ Joining เช่นกัน¹¹

ในปี 1998 นี้เอง Yoo และคณะ¹² ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า Ku protein สามารถจับกับ RNA ได้เช่นกัน โดยจับกับ Small RNAs การศึกษาใช้เทคนิค SELEX (Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment technology)

การได้รับรู้ข้อมูลต่างๆ ของ Ku protein ซึ่งเป็น DNA-binding protein ชนิดหนึ่งและเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันวิทยา ทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้เรียนรู้กลไกการทำงาน บทบาทหน้าที่ และความสำคัญของโปรตีนดังกล่าวต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ สิ่งเหล่านี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษายาพิษสภาพและพยาธิกำเนิดของโรคต่างๆ ที่สำคัญคือพยาธิสภาพที่มีสาเหตุจากการสร้างภูมิคุ้ม

กันต่อตนเอง (Autoimmune disease) โรคเกี่ยวกับ
ภูมิคุ้มกันบกพร่องและโรคมะเร็งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Reeves WH, Stoege ZM. Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus auto-antigen. *J Biol Chem* 1989; 264: 5047-52.
2. Yaneva M, Wen J, Ayala A, Cook R. cDNA-derived amino acid sequence of the 86-Kda subunit of the Ku antigen. *J Biol Chem* 1989; 264: 13407-11.
3. Mimori T, Hardine JA. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 1986; 261: 10375-9.
4. Zhang WW, Yaneva M. Reduced suphydryl groups are required for DNA binding of Ku protein. *Biochem J* 1993; 293: 1128-34.
5. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits S, *et al.* Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* 1994; 13: 4991-5001.
6. Tuteja N, Ochem A, Taneja P, Tuteja R, Shopac D, Falaschi A. Purification and properties of human DNA helicase VI. *Nucleic Acids Res* 1995; 13: 2457-63.
7. Kim D, Ouyang H, Yang S-H, Nussenzweig A, Burgman P, Li GC. A constitutive heat shock element-binding factor is immunologically identical to the Ku autoantigen. *J Biol Chem* 1995; 270: 15277-84.
8. Li GC, Yang SH, Kim D, Nussenweig A, Ouyang H, Wei J, *et al.* Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4512-6.
9. DiCroce PA, Krontiris TG. The BCL2 major breakpoint region is a sequence-and cell-cycle-specific binding site of the Ku antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10137-41.
10. Giffin W, Torrance H, Rodda DJ, Prefontaine GG, Pope L, Hache VRJ. Sequence specific DNA binding by Ku auto-antigen and its effects on transcription. *Nature* 1996; 380: 265-8.
11. Zhu C, Bogue MA, Lim D-S, Hasty P and Roth DB. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 1996; 86: 379-89.
12. Yoo S, Dynan WS. Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. *Biochem* 1998; 37: 1336-43.