

ОГЛЯДИ

УДК 616-006:577.112.7

РОЛЬ ПРОТЕЇНУ Ku В НОРМАЛЬНИХ ТА ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ

О. М. СКОРОХОД, І. В. КРАВЧУК, Г. Д. ТЕЛЕГЕСВ, С. С. МАЛЮТА

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: alexskorohod@yahoo.com

Протеїн Ku – мультифункціональний гетеродимер еукаріотів, що містить дві субодиниці: Ku70 та Ku80. Він задіяний в регуляції багатьох клітинних процесів: негомологічній репарації, V(D)J-комбінації генів імунoglobулінів та генів T-клітинного рецептора, регуляції транскрипції і реплікації ДНК. На сьогодні встановлено також зв'язок Ku-протеїну із процесами, задіяними у трансформації нормальних клітин на пухлині, зокрема при Ph-позитивних лейкоміях та множинній мієломі. Однак механізми їх і досі не розкриті і потребують подальших досліджень.

Ключові слова: Ku-гетеродимер, негомологічна репарація, пухлинна трансформація, Ph-позитивна лейкомія, множинна мієлома.

Характеристика протеїну Ku

Загальна характеристика протеїну Ku. Ku – ядерний гетеродимерний протеїн (далі Ku) ідентифікований Mimori (1981 р.) як автоантиген у японського пацієнта із polyomyosis overlap syndrome. Назва протеїну походить від перших двох літер прізвища пацієнта.

Цей гетеродимер є стабільним комплексом, що включає два протеїни: Ku70 та Ku80 (у клітинах людини остання субодиниця має молекулярну масу близько 86 кДа і позначається Ku86). Ku, виявлений в багатьох внутрішньоклітинних системах ссавців, має і інші назви: NF IV (nuclear factor IV), TREF (transferin receptor promoter element binding factor), PSE1 (proximal sequence element), EBP (end binding protein) і HDHII (human DNA helicase II) [1].

У клітинах людини вміст Ku досить високий, його ідентифіковано в усіх тканинах. Відповідно до структурних особливостей цей протеїн здатен приєднуватися до різноманітних ДНК-структур (тупі кінці, шпильки тощо) та певних послідовностей РНК [2]. Такі особливості обумовлюють участь Ku-гетеродимеру в багатьох клітинних процесах, включаючи репарацію, регуляцію транскрипції, V(D)J-комбінацію, транслокацію мобільних генетичних елементів, апоптоз і підтримання стабільності теломерних комплексів.

Ku є також ДНК-зв'язувальним компонентом ДНК-залежної протеїнкінази (DNA-РК), яка фосфорилує клітинні протеїни за

сериновими та треоніновими залишками, і, відповідно, регулює їхню активність.

Хромосомна локалізація генів субодиниць Ku-протеїну. На сьогодні вже встановлено хромосомну локалізацію генів компонентів Ku-гетеродимеру. Зокрема, ген Ku70 у клітинах людини розташований на хромосомі 22(22q13), а ген Ku86 – на хромосомі 2(2q33-q35). Еволюційно субодиниці протеїну походять від одного гена-попередника [3]. З огляду на гомологію між двома субодиницями Ku, припускають, що вони утворилися внаслідок дуплікації вихідного гена, і що спочатку Ku був гомодимером з двома однаковими субодиницями. Результати досліджень гомології та консервативності локалізації цих протеїнів у трьох видів ссавців – миші, шура і людини – свідчать, що гени Ku70 і Ku86, локалізуються в певних хромосомних регіонах, консервативних у всіх трьох видів організмів [2]. Нещодавно повідомлялося також про гомологію Ku у еубактерій та архебактерій [3].

Доменна структура Ku. На сьогодні амінокислотний склад обох субодиниць Ku-протеїну досліджено. Так, відомо, що субодиниця Ku70 включає 609, а Ku80 – 732 амінокислоти. Обидві субодиниці гетеродимеру містять періодично повторювані залишки Leu або послідовності Leu-Seg – мотиви, які властиві сімейству ДНК-зв'язувальних протеїнів.

Кожен Ku-протеїн містить три домени (рис. 1): амінотермінальний (домен von Willebrand A, vWA), центральний та карбок-

ситермінальний. В амінотермінальному та центральному доменах гетеродимеру виявлено висококонсервативні ділянки (PHRs), гомологічні у багатьох видів еукаріотів [2, 4].

vWA-Домен відповідає за білок-білкові взаємодії та забезпечує безпосередню асоціацію Ku70 і Ku80. Карбокситермінальні домени Ku70 і Ku80 та регіон із 28 амінокислот центрального домену Ku86 (449–477 амінокислотні залишки) також необхідні для забезпечення взаємодій між обома субодиницями гетеродимеру [5].

Карбокситермінальний мотив Ku80 порівняно з Ku70 довший. У вищих еукаріотів в ньому виявлено розширену ділянку, що сприяє приєднанню його до каталітичної субодиниці DNA-ПК (DNA-ПК_{cs}). Ku70 у карбокситермінальному домені містить SAP-мотив, який відповідає за зв'язування з ДНК. Наявність його забезпечує асоціацію протеїну з молекулою ДНК навіть за відсутності Ku80. У кристалічній структурі гетеродимеру (рис. 2) ідентифіковано два асиметричних кільця, утворених Ku70 та Ku80, які формують комплекс із каналом усередині.

Кристалізація Ku у присутності ДНК показує, що такий канал дещо ширший за подвійну спіраль ДНК. Його поверхня покрита позитивно зарядженими амінокислотними залишками, завдяки яким практично два витки ДНК вміщуються всередині кільця, утвореного широкою основою протеїну. При цьому відбувається взаємодія між певними амінокислотами протеїну та сахарозо-фосфатним остовом ДНК, що свідчить в цілому про сиквенсезалежну взаємодію Ku із ДНК [6, 7]. Як показали дослідження, конформація Ku за взаємодії з молекулою ДНК практично не змінюється, що свідчить про високу конформаційну стабільність протеїну [4]. У деяких роботах наводяться дані щодо здатності Ku асоціюватися

зі специфічними послідовностями ДНК [1, 8]. Можливо, саме SAP-домен Ku70 забезпечує таку взаємодію.

Локалізація Ku-протеїну у клітині та його внутрішньоклітинне транспортування. Дослідження клітинної локалізації Ku показало, що гетеродимер та його окремі субодиниці локалізуються в ядрі, в цитоплазмі та плазматичній мембрані [9, 10]. Крім того, клітинна локалізація Ku-протеїну змінюється впродовж клітинного циклу [3].

Експерименти з використанням флуоресцентної мітки свідчать, що переміщення Ku всередині ядра майже у 100 разів повільніше, ніж можна було б очікувати з огляду на його розміри та структурні характеристики. Вважають, що причиною цього є ядерний матрикс, з яким протеїн безпосередньо взаємодіє, дифундує в ядрі [11]. Використання конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії (CLSM) показало, що в інтерфазі Ku70 і Ku80 локалізуються в ядрі клітини [3, 11]. При цьому частина Ku-протеїну приєднується до хромосомної ДНК і бере участь у структурній організації інтерфазного хроматину.

Зв'язування Ku з конденсованими хромосомами відбувається під час ранньої профазі, але не пізніше. Упродовж профазі й телофазі збільшується кількість молекул Ku, які дифузно розподіляються в цитоплазмі, а також, хоча і в меншій мірі, в ядрі. На внутрішніх частинах хромосом гетеродимер взагалі не виявлений. Присутність Ku70 і Ku80 на периферії хромосом (рання профазі – пізня телофазі) пов'язана з участю протеїну в репарації ушкоджень ДНК, що часто спостерігається під час зазначених фаз мітозу. Крім того, гетеродимер бере участь у підтриманні стабільності структури хромосом під час метафазі [2]. Незв'язаний Ku та його субодиниці, які дифузно розподілені в цитоплазмі, після поділу клітини використо-

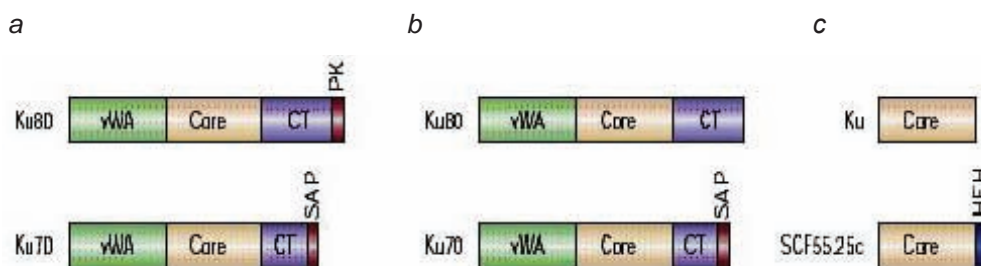


Рис. 1. Доменна організація протеїну Ku за J. A. Downs та S. P. Jackson [2]: a – вищі еукаріоти; b – нижчі еукаріоти; c – прокаріоти; PK – ділянка, що забезпечує зв'язування протеїну із DNA-ПК_{cs}; SAP – ділянка, що забезпечує зв'язування протеїну із ДНК; HEH (helix-extension-helix) – специфічна ділянка прокаріотів.

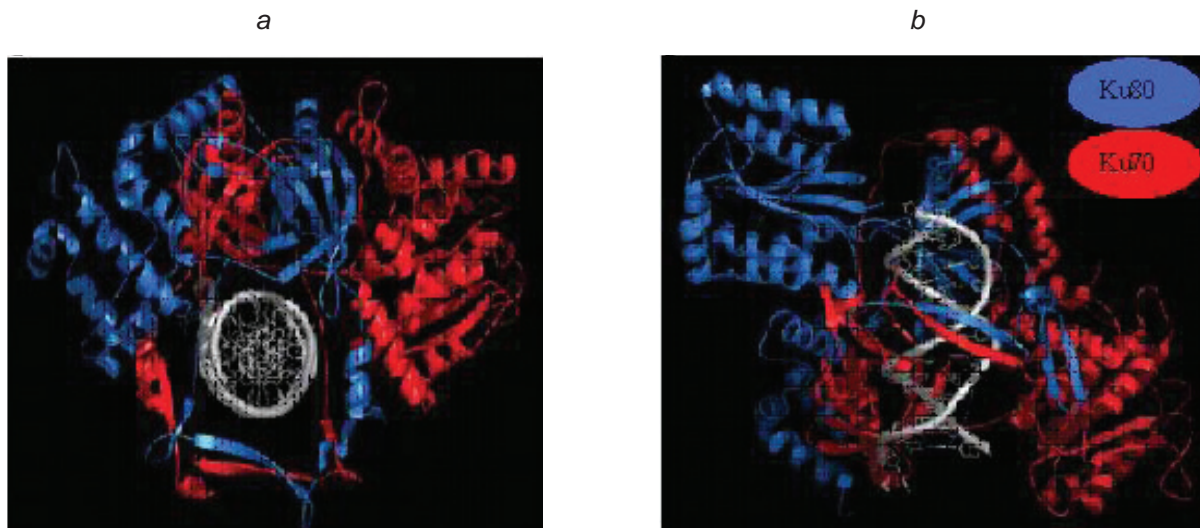


Рис. 2. Кристалічна структура Ку за даними J. A. Downs та S. P. Jackson: a – вигляд уздовж осі спіралі; b – вигляд уздовж осі спіралі з поворотом на 90°.

вуються дочірніми клітинами для формування структури хроматину.

Хоча Ku70 та Ku80 у клітинах здебільшого існують як гетеродимерний комплекс, вони здатні метаболізуватися і окремо, виконуючи при цьому різні функції. Наприклад, Ku70 може за незалежним від Ku80 механізмом приєднуватися до ДНК і брати участь в переключенні генів важких ланцюгів імуноглобулінів [12].

Транспортування Ku70 і Ku80 у клітині, як і їхня локалізація, залежить від фази клітинного циклу. Флуоресцентний аналіз показує, що під час інтерфази субодиниці гетеродимеру колокалізуються в ядрі [6]. Транспортування обох протеїнів з ядра в цитоплазму відбувається в пізній телофазі/ранній G_1 -фазі клітинного циклу, причому тривалість транслокації Ku70 та Ku80 з ядра протеїнів неоднакова. Припускають, що внутрішньоклітинне транспортування обох субодиниць Ку у клітинах досить суворо регулюється [3]. Водночас, функціонування гетеродимеру може регулюватися за допомогою транспортування його субодиниць.

Дослідження молекулярних механізмів переміщення субодиниць Ку свідчать про наявність в амінокислотному складі спеціальних NLS (nuclear localization signals)-сигнальних мотивів, які забезпечують транспортування субодиниць з ядра [13]. NLS Ku70 міститься між 539–556 амінокислотними залишками поліпептиду, а Ku86 – між 561–569. Структура обох протеїнів неоднакова, хоча і характеризується консервативністю у всіх хребетних.

Загалом, транслокація Ку з ядра в цитоплазму відбувається як цілісним гетеродиме-

ром, так і окремими субодиницями з допомогою NLS. Крім того, як показали нещодавні дослідження, локалізація Ку у клітині контролюється різноманітними зовнішніми регуляторними сигналами [3].

Специфічні властивості Ку

Здатність зв'язуватися з ДНК. Як зазначено вище, Ку здатен приєднуватися до різноманітних ДНК-структур клітини. Зокрема показано, що він “упізнає” одно- і дволанцюгові зміни в ДНК та приєднується до різних додаткових структур, включаючи розриви та шпильки [14].

Дослідження механізмів взаємодії Ку з ДНК свідчать, що гетеродимер приєднується до кінців дволанцюгової молекули і після асоціації з додатковими молекулами здатен “ковзати” вздовж нуклеїнової кислоти без витрати АТР. Зв'язування Ку з ДНК відбувається неспецифічно. Під час взаємодії великої кількості його молекул із хромосою кожна з них контактує з 13–21 п.н. послідовності ДНК, а в цілому молекула Ку може асоціюватися з 25 п. н. [15].

Установлено, що, незважаючи на загалом неспецифічне приєднання Ку до молекули ДНК, протеїн здатен специфічно приєднуватися до низки її послідовностей [2]. Передусім, це стосується сайтів у промоторних ділянках певних генів, для яких Ку може виконувати роль транскрипційного регулятора. На сьогодні послідовності, з якими специфічно взаємодіє Ку, ідентифіковано для генів, що кодують ретровірусоподібний елемент, рецеп-

тор трансферину, U1Sn РНК, β -ланцюг Т-клітинного рецептора, паратиреотропний гормон, колаген IV, с-тус, октамерний мотив імуноглобулінів, зв'язувальний елемент AP-1 та блоку теплового шоку.

АТР-азна та геліказна активність Ku. Експериментально показано, що Ku-протеїну притаманна АТР-азна активність та здатність розплітати ланцюги ДНК у присутності АТР, тобто протеїн належить до геліказ класу II [1]. Дослідження геліказної активності гетеродимеру свідчать, що вона властива його меншій субодиниці – Ku70. Для індукції геліказної активності гетеродимер потребує наявності одноланцюгових фрагментів молекули ДНК, причому він переважно бере участь у розплітанні “вилкоподібних” структур. Також було встановлено, що деякі антиракові препарати (цисплатин, актиноміцин С1, ногаламіцин) інгібують обидві (АТР-азну та геліказну) активності Ku-протеїну [16, 17].

Ku як регуляторна субодиниця ДНК-залежної протеїнкінази (DNA-ПК). Це фермент, що забезпечує фосфорилування багатьох протеїнів у клітині [18–20]. Він включає дві основні частини – каталітичну субодиницю (DNA-ПК_{cs}) та регуляторну (Ku). DNA-ПК_{cs} (М становить близько 470 кДа) є поліпептидом, який містить 4127 амінокислотних залишків [21]. Ген каталітичної субодиниці локалізується на восьмій (8q11) хромосомі. Карбокситермінальний домен протеїну належить до родини фосфатидилінозитол-3-кіназ.

Об'єднання DNA-ПК_{cs} із Ku сприяє утворенню активного комплексу DNA-ПК, що *in vitro* здатен фосфорилувати деякі ядерні ДНК-зв'язувальні регуляторні протеїни: р53, РНК-полімерази II, РР-А, топоізомерази, BPV E2-протеїн, с-Jun, с-Fos, oct-1, sp-1, с-тус, STF/NF1, TFII та деякі ін. [22, 23]. Цей фермент також фосфорилує деякі протеїни, що безпосередньо не зв'язуються з ДНК, наприклад шаперон hsp90 та протеїн мікротрубочок tau. Крім того, DNA-ПК фосфорилує свою каталітичну та регуляторну субодиниці, тобто здійснює автофосфорилування, внаслідок чого активність кінази зменшується [23]. Фосфорилування DNA-ПК відбувається за Ser- та Thr-залишками, які локалізуються безпосередньо після Glu в амінокислотному ланцюзі пептидів. Ku забезпечує, насамперед, стабілізацію зв'язування DNA-ПК_{cs} із ДНК. Він також стимулює кіназну активність. Особливу роль у цьому відіграє карбокситермінальний домен Ku80.

Здатність DNA-ПК фосфорилувати важливі регуляторні протеїни клітини вказує на

те, що протеїн відіграє важливу роль у регуляції реплікації, транскрипції, рекомбінації та репарації ДНК [8].

Важлива роль Ku, як регуляторної субодиниці DNA-ПК підтверджується тим, що при взаємодії тирозинової кінази с-Abl із ділянкою DNA-ПК_{cs}, унаслідок чого блокується приєднання гетеродимеру до DNA-ПК, активність протеїнкінази значно зменшується [24, 25].

Ku та InsP6. Відомо, що репарація ДНК у еукаріотів шляхом NHEJ (non homology end joining) починається із приєднання Ku до вільних кінцевих ділянок ДНК, що спричинює зв'язування з ушкодженою ДНК інших факторів репарації [26]. Дослідження останніх років показали, що InsP (inositol phosphate) слугує кофактором DNA-ПК під час NHEJ [27]. Так, InsP4, InsP5, передусім InsP6, здатні підвищувати ДНК-зв'язувальну активність кінази. Механізм, з допомогою якого InsP6 відіграє роль кофактора DNA-ПК, до кінця не з'ясовано [28]. Встановлено, що InsP6 приєднується до Ku, спричиняючи конформаційні зміни молекули гетеродимеру, і тим самим змінюючи здатність останнього асоціюватися з іншими молекулами.

Вважають, що більшість молекул Ku в ядрі приєднуються саме до InsP6 [29]. Такий зв'язок може також впливати на здатність субодиниць асоціюватися з ядерним матриксом [5].

Роль Ku86 у клітині

Репарація. У клітині виявлено два основних механізми репарації дволанцюгових ушкоджень (DSBs) ДНК: гомологічний та негомологічний (NHEJ). Загалом, обидва типи репарації у клітинах конкурують між собою [30–32].

Для репарації NHEJ у хребетних необхідні п'ять протеїнів: Ku70, Ku80, DNA-ПК_{cs}, XRCC4 та DNA-ligase-IV. Одним із важливих протеїнів NHEJ у людини є Ku80 [11, 26, 33–35]. Перші дослідження участі Ku разом із DNA-ПК_{cs} у негомологічній репарації було проведено на клітинах, чутливих до іонізуючої радіації [30]. Зокрема, у мишей, у яких не виявлено Ku70 або Ku80, спостерігається підвищена частота хромосомних аберацій та інших ушкоджень у разі їхнього γ -опромінення.

Нині на основі біохімічних характеристик Ku запропоновано кілька моделей участі протеїну в NHEJ. Вважають, що він може виконувати кілька функцій в цьому процесі [28, 36]. Було встановлено, що Ku-протеїн приєднується з високою афінністю безпосередньо до DSBs ДНК [37, 38]. Перш за все, така взаємодія ге-

теродимеру забезпечує утримання розірваних ланцюгів ДНК на певній невеликій відстані, запобігаючи повному розходженню їх. Відомо, що для усунення ушкоджень розірвані ланцюги ДНК потребують специфічної взаємодії з лігазою та іншими протеїнами репарації, а цим білкам необхідний доступ до DSBs. Асиметрична структура кілець Ku-гетеродимеру, з одного боку, дозволяє міцно утримувати ланцюг ДНК, а з іншого, – не перешкоджає приєднанню необхідних для репарації протеїнів [30]. Крім того, утримуючи кінці розривів разом, Ku захищає їх від дії нуклеаз [1].

Під час NHEJ Ku може функціонувати як “платформа” для залучення факторів репарації до ушкоджених сайтів ДНК. Так, показано, що Ku сприяє взаємодії DNA-PKcs з молекулою ДНК у вищих еукаріотів і є необхідним для підтримання NHEJ на нормальному рівні [26]. Було також, експериментально встановлено взаємодію Ku з ДНК-лігазою (DNA-ligase-IV-XRCC4), WRN1-геліказою та компонентами комплексу MRN (MRE11, RAD50 та NBS1), задіяного у NHEJ (рис. 3) [37].

З огляду на зазначені функції Ku в репарації (утримання розірваних ланцюгів ДНК, захист їх від дії ендонуклеаз, залучення інших факторів репарації), припускають, що він також здатний переміщувати сайти ушкоджень ДНК до репаративних комплексів [1]. Однією з найпоширеніших відповідей клітини на ушкодження ДНК є затримка молекули на певній фазі клітинного циклу. Дослідження, проведені на дріжджах, у яких не експресувався Ku, свідчать про відсутність блокування клітинного розвитку. На основі експериментів припускається, що саме Ku бере участь у блокуванні переходу клітини від однієї фази клітинного циклу до іншої [31].

V(D)J-рекомбінація генів імуноглобулінів. Створення унікальних та високоспецифічних рецепторів В- та Т-клітин у хребетних відбувається завдяки перекомбінації V(D)J-сегментів відповідних генів, а також наявності в них соматичних гіпермутацій. У з’єднанні кінцевих ділянок сегментів генів при V(D)J-рекомбінації задіяно систему репарації DSBs ДНК [40, 41]. На сьогодні в багатьох роботах показано, що в цьому процесі бере участь Ku [34, 42].

Досліджено, що у мишей, нокаутованих за геном Ku80, розвиваються імунодефіцитні стани через відсутність рецепторів В- і Т-клітин. Водночас, у мишей, нокаутованих за геном Ku70, порушується лише синтез рецептора В-клітин [1].

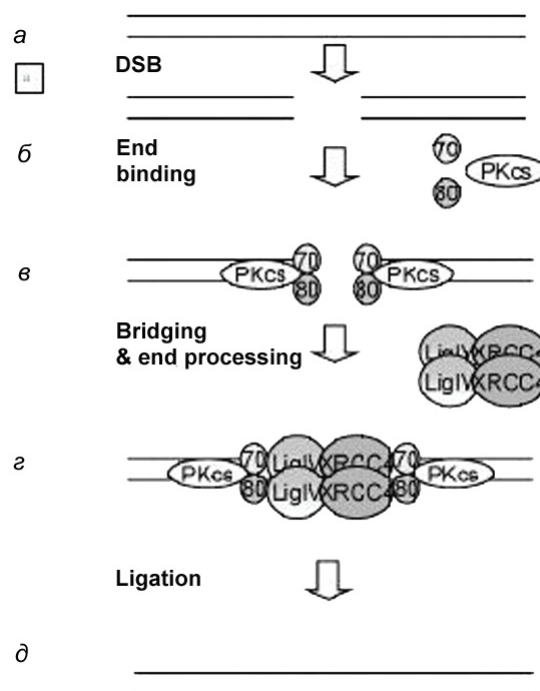


Рис. 3. Загальний механізм NHEJ [за G. Li та ін. 39]: а – подвійний ланцюг ДНК, б – ушкодження та DSB ДНК під впливом IR, в – виявлення ушкоджень Ku та DNA-PKcs, г – приєднання комплексу XRCC4 та DNA-ligase-IV, зближення розривів, полімеризація, лігування, д – відновлення ушкодженого ланцюга ДНК.

Під час V(D)J-рекомбінації важливу роль відіграє також геліказна активність Ku, що забезпечує розплітання шпилькоподібних структур, звільняючи доступ до них ендонуклеаз, а також термінальної дезоксинуклеотид-трансферази, яка вносить випадкові нуклеотидні послідовності всередину сегмента під час формування останнього, збільшуючи його унікальність. Дослідження показали важливу роль субодиниць Ku в переключенні класів імуноглобулінів під час розвитку імунної відповіді В-клітин [9, 42].

Переключення класів імуноглобулінів. Переключення класів імуноглобулінів є центральним процесом в розвитку специфічної імунної відповіді клітин та формуванні класів імуноглобулінів із ширшими ефекторними функціями ніж IgM (IgG, IgA, IgE). Цей процес індукується зв’язуванням CD40-рецептора В-лімфоцитів з CD40L (лігандом), що експресується на активованих CD4⁺ Т клітинах [43–45].

CSR (class switch DNA recombination) – це регіонспецифічний, транскрипційно регульований, негомолігичнорепаративний процес,

який ініціюється активованою цитидиндезаміназою. В ньому беруть участь ті самі інтермедіати, що і в репарації DSBs, зокрема Ku-гетеродимер [32, 41, 46].

Досліджено, що гомеодоменні протеїни NohC4 і Oct-1 разом із Ku70/Ku80-гетеродимером здатні приєднуватися до нещодавно ідентифікованих елементів АТТТ, які регулюють переключення класів імуноглобулінів у ділянках промоторів $I\gamma$ та $I\epsilon$, репресуючи CSR [47]. Цей механізм не діє в локусі $Ca1/Ca2$, оскільки в ньому відсутні SRE-елементи у промоторі. Сигнальний шлях, пов'язаний з CD40-активацією В-клітин, індукує дисоціацію комплексу NohC4-Oct-1-Ku із промоторних ділянок $I\gamma$ та $I\epsilon$ і сприяє проходженню CSR. Нині вважають, що роль Ku в переключенні класів генів імуноглобулінів полягає в об'єднанні розірваних ланцюгів ДНК, які утворюються внаслідок дії ендонуклеаз. Показано, що важливу роль при дозріванні В-клітин та CSR відіграє Ku70 [12]. Загалом, дослідження стосовно значення Ku-протеїну в CSR проводяться з урахуванням його ролі у зв'язуванні розривів ДНК та участі у функціонуванні DNA-ПК. Досі залишаються ще не до кінця з'ясованими механізми впливу Ku на проходження CSR [48]. Одні дослідники пов'язують роль Ku в цьому процесі з геліказною активністю, а інші – зі здатністю з'єднувати розірвані ланцюги ДНК [33, 41, 49]. Також припускається, що Ku активує DNA-ПК_{cs}, і якимось чином впливає на процес.

Рух мобільних генетичних елементів. Під час інтеграції ретротранспозонів та ретровірусів у геном їхні РНК-последовності зворотно транскрибуються в подвійну кДНК, яка вбудовується за допомогою кодованої ретроелементами інтегрази в певну ділянку ДНК господаря. Механізм інтеграції подібний до V(D)J-рекомбінації. Спочатку відбувається безпосередня нуклеофільна атака біля кожного 3'-ОН кінця молекули кДНК відносно протилежних сайтів ДНК господаря. Згодом за допомогою інтегрази ретроелемент інкорпорується в ланцюг ДНК. Незважаючи на відсутність при цьому DSBs, дволанцюгові кінці кДНК ретроелементів здатні взаємодіяти з Ku. Експериментально це було виявлено в *S. cerevisiae* на прикладі Ty1-ретротранспозону [2]. Ku86 та DNA-ПК_{cs} також є необхідною умовою інтеграції ретровірусів у клітини людини [50]. На відміну від Ty1 дріжджів, роль Ku86 в успішній інтеграції ретровірусу обумовлено інгібуванням клітинного апоптозу, що може бути наслідком розривів ДНК, які виникають через інтеграцію мобільного елемента. Останні роботи показали [2],

що Ku, запобігаючи асоціації ретровірусної ДНК з апаратом негомологічної рекомбінації, може заблокувати продуктивну інтеграцію цього ретроелемента в геном.

Аноптоз. У низці робіт було показано, що Ku, крім ядра, локалізується і в інших клітинних структурах [1, 50]. Так, Ku70 цитоплазми здатен приєднуватися до проапоптичного протеїну BAX та інгібувати BAX-залежний апоптоз шляхом блокування його релокалізації до мітохондрій. Більше того, встановлено, що саме регіон карбокситермінального домену Ku70 (579–609) є ключовим для вияву його активності, а також для участі в цьому процесі Ku86 [51].

Транскрипція. Показано, що Ku відіграє роль транскрипційного фактора, який приєднується специфічно до ДНК у промоторній частині певних генів [1]. В інших роботах показано, що гетеродимер бере участь у регуляції транскрипції без приєднання до специфічних последовностей ДНК [52].

Установлено здатність Ku асоціюватися із сайтами елонгації РНК-полімерази II, що опосередковується білок-білковими взаємодіями між Ku80 і протеїнами, задіяними в елонгації та транскрипції. Крім того, гетеродимеру притаманна асоціація із протеїнами, які приєднуються до ТАТА-боксу, утворюючи STCBF-комплекс. Так, Ku може взаємодіяти із Е-боксом гена XOR (xanthine oxidoreductase), регулюючи його активність [35]. Взаємодіючи також із DNA-ПК_{cs}, протеїн інгібує Pol-опосередковану транскрипцію шляхом фосфорилування компонентів транскрипційного апарату [1].

Роль Ku у підтриманні довжини теломер. На відміну від репарації DSBs, що містяться поза кінцевими ділянками хромосоми, NHEJ теломерних ділянок характеризується певними особливостями функціонування. Показано, що Ku після приєднання до теломерних комплексів у багатьох видів живих організмів, бере участь в їхній регуляції [7, 53, 54, 55]. Роль Ku-протеїну в захисті теломер та регуляції довжини цих структур досліджено на багатьох екаріотичних системах, включаючи дріжджі, рослини та миші [15, 56–60]. Однак наслідки відсутності Ku86 досить широко варіюють у різних організмів, що свідчить про значні відмінності в біології їхніх теломер. Так, для *S. cerevisiae* показано, що Ku забезпечує специфічну локалізацію теломер на периферії ядра, обов'язкову для формування транскрипційно неактивного (silent) хроматину. За відсутності гетеродимеру у штамів *S. cerevisiae* спостерігаються загальне зменшення довжини теломер і порушення ре-

гуляції довжини G-петлі [2, 61]. У деяких лабораторіях було створено мутантні штами за Ку-геном, яким притаманні дефекти в теломерах без порушення функціонування NHEJ [62].

У інших організмів відсутність Ку (чи інактивация його внаслідок певної мутації) також спричинює порушення в теломерних областях. Миші, у яких не виявлено Ku80, були життєздатними, але передчасно старіли. Фібробласти мишачих ембріонів за відсутності Ku80 характеризуються високою частотою перебудов у хромосомах. У них також спостерігається затримання росту та передчасне старіння. Результати зазначених досліджень свідчать про можливу участь Ku80 у кепуванні теломер [15, 59]. Однак слід зазначити, що окремі дослідники виявили зменшення довжини теломер у мишей із дефектом гена Ku80 [63], а це означає, що гетеродимер не єдиний чинник цього процесу. За відсутності Ку у *Schizosaccharomyces pombe*, мишей та трипаносом, довжина теломер збільшується. Це дозволяє припустити, що у цих організмів гетеродимер негативно регулює довжину теломер [64].

Останні роботи, присвячені дослідженню клітинних культур тканин людини, мутантних за геном Ку, показали, що втрата одного з алелів зазначеного гена зумовлює збільшення кількості хромосомних перебудов, в т.ч. транслокацій, нестабільність геному, зменшення проліферативного потенціалу та інтенсифікацію апоптичної загибелі клітин [15, 65]. Клітини людини, які втратили обидві алелі, нежиттєздатні [39]. Ці результати досліджень свідчать про відмінності у функціях, які виконує Ку у клітинах мишей та людини [2].

Ku-протеїн людини, як і дріжджів, здатен взаємодіяти і фізично асоціюватися з теломеразою. Причому така асоціація відбувається, передусім, з каталітичною субодиницею теломерази, а не з теломеразною РНК, хоча і такі взаємодії можливі [56]. Результати взаємодії Ку та теломерази, дослідженої на мишах, свідчать про зменшення у них теломеразної активності.

Припускають, що Ку, хоч і відіграє позитивну роль у підтриманні довжини теломер, бере участь у виникненні згубних для клітини хромосомних перебудов шляхом NHEJ, зокрема у разі порушення функціонування теломер у ссавців [63, 65, 66]. Гетеродимер, імовірно, забезпечує нормальне проходження NHEJ на теломерних ділянках тоді, коли перестає розпізнавати їх як специфічні регіони *non-broken* – структури, що свідчить про відмінність природи теломерної ДНК та DSB. Крім

того, негативний регулятор NHEJ може бути відсутнім на дисфункціональних теломерах.

Функціонування Ку у пухлинних клітинах

Різноманітний вплив Ku70/80 на перебіг процесів у разі порушень метаболізму обумовлює його істотне значення в патогенезі різних захворювань, зокрема при неопластичній трансформації. Зв'язок між гетеродимером та системою репарації, V(D)J-рекомбінації, T-клітинного рецептора досить детально досліджено на клітинах системи крові. Це, передусім, стосується двох наведених у цьому огляді нозологій – хронічної мієлоїдної лейкемії та множинної мієломи.

Ph-позитивні лейкемії. Ph-позитивні лейкемії – група онкозахворювань клітин крові, які характеризуються наявністю філадельфійської хромосоми (та гібридного гена *BCR/ABL*), утвореної внаслідок реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами. Однією з найпоширеніших форм таких лейкемій є хронічний мієлолейкоз, який становить близько 20% усіх лейкемій у дорослих [67, 68]. При транслокації *bcr/abl* утворюється гібридний продукт, якому, як і *c-Abl*-кіназі, притаманна тирозинкіназна активність, що у декілька разів перевищує активність нормальної *Abl*-кінази. Крім того, якщо білок *abl* локалізується в ядрі, то білок *bcr/abl* – у цитоплазмі. Однак, як саме продукт *bcr/abl*-транслокації впливає на компоненти негомологічної репарації та на патогенез хронічного мієлолейкозу не з'ясовано [24].

На сьогодні встановлено, що внаслідок експресії протеїну *bcr/abl* рівень активності DNA-ПК_{cs} зменшується [69]. Показано, що *c-Abl*-тирозинова кіназа, подібно до серин/треонінової кінази DNA-ПК, активується за дії іонізуючої радіації – основного ушкоджувального чинника ДНК, у відповідь на який стимулюється негомологічна система репарації, хоча нещодавно було виявлено, що така активація відбувається не безпосередньо, а опосередковано – через дію ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*)-протеїну [40, 70]. Крім того, алкілувальні агенти, цисплатин і міоміцин С, також здатні індукувати активацію тирозинової кінази, після чого, ймовірно, фермент набуває здатності приєднуватися до ділянок зв'язування та дії цих ушкоджувальних агентів на ДНК [17].

Установлено, що *in vitro* DNA-ПК здатна фосфорилувати та активувати *c-Abl* [71]. Відомий також і зворотний механізм, згідно з яким *c-Abl* фосфорилує DNA-ПК, інгібуючи здатність протеїнкінази асоціюватися з уш-

кожденою ДНК. При цьому фосфорилування Ku-гетеродимеру або його субодиниць тирозиною кінзазою не відбувається [24]. Водночас встановлено, що сайти приєднання *c-Abl*-кінази та Ku-протеїну до карбокситермінального домену DNA-ПК_{cs} перекриваються [71]. Так, для Ku – це ділянка, яка включає 3002–3850 амінокислотних залишків, а для тирозинової кінзази – 3414–3850. Тому можна припустити, що саме *c-Abl* регулює здатність DNA-ПК відповідати на ушкоджувальний вплив іонізуючої радіації. Крім того, встановлено, що в разі великої кількості ушкоджень ДНК тирозинова кінзаза *c-Abl* здатна фосфорилувати каталітичну субодиницю теломерази hTERT, інактивуючи при цьому теломеразу і спричинюючи перехід клітини до апоптозу [53].

Таким чином, можна стверджувати, що *c-Abl* є одним із ключових факторів у запуску та сигналізації процесів, пов'язаних із ушкодженнями ДНК (рис. 4). Зміна (підвищення) активності тирозинової кінзази *c-Abl* унаслідок злиття з частиною гена *bcr* та утворення гібридного продукту – протеїну BCR-ABL – комплексно впливає на низку метаболічних шляхів у клітині, включаючи й ті, регуляцію яких пов'язано з метаболізмом теломер та про-

теїнів, що беруть участь у процесах репарації, в т.ч. і гетеродимеру Ku [72].

Однак, яким чином гетеродимерний протеїн Ku, задіяний в багатьох клітинних процесах (негомологічна репарація, V(D)J-рекомбінація генів імуноглобулінів та генів Т-клітинного рецептора, регуляція транскрипції, реплікація ДНК), впливає на метаболізм *Bcr/Abl* або, навпаки, як гібридний продукт гена *bcr/abl* діє на метаболізм Ku, залишається недослідженим. Так само не з'ясовано, як змінюється метаболізм Ku86 і Ku-протеїнів загалом у клітинах, що мають *bcr/abl*-транслокацію, хоча це істотно позначається на їхній життєдіяльності.

Крім того, слід звернути увагу на те, що пухлинна тирозинкіназа *Bcr/Abl*, яка здатна фосфорилувати і зв'язувати велику кількість цитоплазматичних білків, виявляє свої властивості саме в цитоплазмі клітин, на відміну від тирозинової кінзази *c-Abl* [68]. Зважаючи на те, що протеїн Ku на різних фазах клітинного циклу міститься в різних компартментах клітини (цитоплазмі, цілісному гетеродимерному комплексі, у субодиницях), можна припустити наявність як прямих взаємодій, так і опосередкованих певними клітинними компонентами.

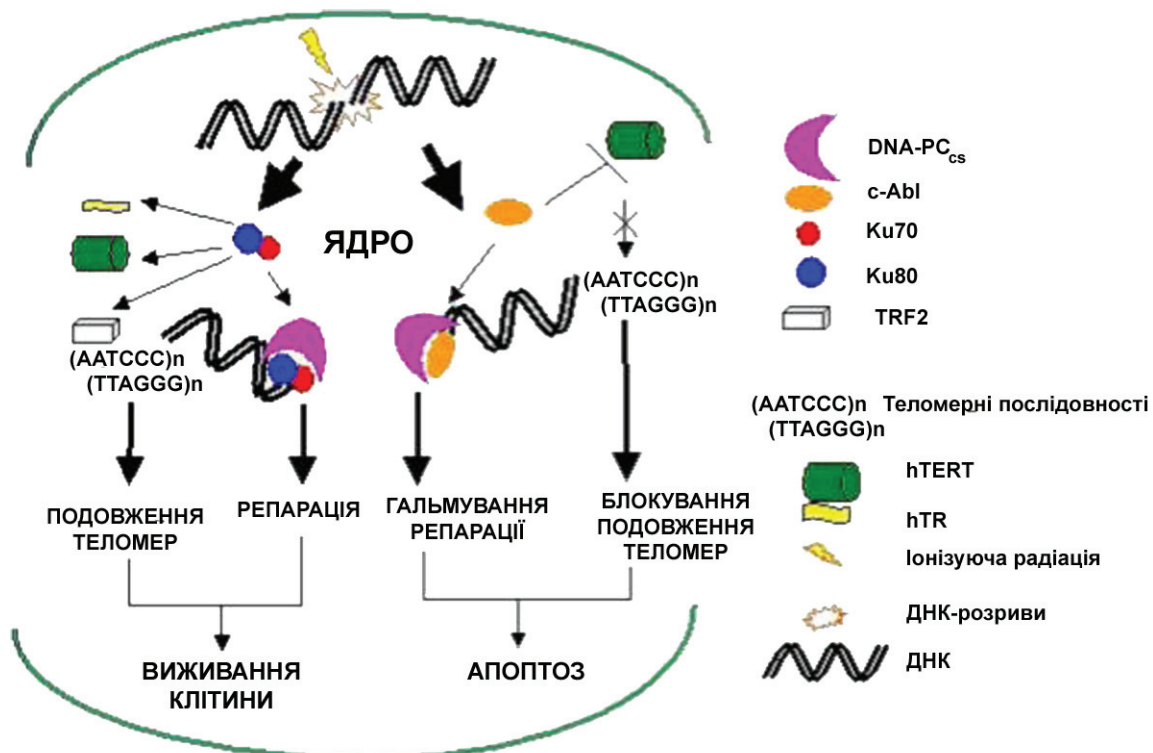


Рис 4. Варіанти розвитку клітинної відповіді залежно від взаємодії DNA-ПК_{cs} із Ku-гетеродимером або *c-Abl*.

Дволанцюгові розриви та системи репарації при множинній мієломі

Множинна мієлома – злоякісна патологія плазматичних клітин. Захворювання характеризується експансією, зазвичай в кістковому мозку і плазматичних клітинах, що повільно проліферують та виробляють велику кількість моноклональних імуноглобулінів або їхніх фрагментів. Середня тривалість життя хворих становить 30–36 міс. [73]. Множинна мієлома характеризується наявністю транслокацій, які призводять до різноманітних порушень у функціонуванні клітин на молекулярному рівні. Причину їх можуть бути ушкодження системи репарації під час дволанцюгових розривів ДНК.

Слід зазначити, що в одному з досліджень множинної мієломи у 12 з 14 пацієнтів (86%) було виявлено наявність вкороченого за С-кінцем (69 кДа) варіанту Ku80, знижену активність DNA-РК та пов'язану з цим підвищену чутливість до радіації, мітоміцину С і блеоміцину. Також було показано роль Ku як молекули адгезії (зі стромальними клітинами кісткового мозку) гомотипічного та гетеротипічного типу. Ці дані свідчать про можливість використання Ku80 як маркера або навіть нової мішені для терапії. Проте слід зауважити, що відомі дані, згідно з якими Ku80 відсутній у мієломних клітинних лініях [9, 10].

Установлено, що генетичні варіанти ДНК-лігази IV слугують ознакою ризику виникнення множинної мієломи. Можливими факторами, які здатні ініціювати порушення в переключенні імуноглобулінів різних класів, а, отже, і подальше формування множинної мієломи, є також дефекти у процесах сигналізації подвійних розривів ДНК [74, 75].

Мультифункціональний протеїн Ku відіграє важливу роль у регуляції багатьох клітинних процесів, зокрема в негомологічній репарації, реплікації, рекомбінації генів імуноглобулінів та Т-клітинних рецепторів, функціонуванні теломеразного комплексу та трансформації клітин. Така різноманітність впливу гетеродимеру обумовлює, відповідно, різноманітність його дії при багатьох патологічних процесах, зокрема пухлинних. При цьому слід зазначити, що в кожному окремому випадку під час захворювання може виявитися якась специфічна особливість дії протеїну, що, у свою чергу, обумовлює специфічність процесу та його перебіг. Подальші дослідження ролі Ku-протеїну в нормальних клітинах допоможуть дати відповідь на всі вищенаведені

питання, а також розкриють його значення у злоякісній трансформації.

РОЛЬ ПРОТЕИНА Ku В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

*А. М. Скороход, І. В. Кравчук,
Г. Д. Телегеев, С. С. Малюта*

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: alexskorohod@yahoo.com

Ku-протеин – мультифункциональный гетеродимер эукариот, состоящий из двух субъединиц: Ku 70 и Ku 80. Белок принимает участие в регуляции многих клеточных процессов: негомологичной репарации, V(D)J-рекомбинации генов иммуноглобулинов и генов Т-клеточных рецепторов, регуляции транскрипции и репликации ДНК. Показана роль Ku-протеина в опухолевой трансформации, в частности при Ph-положительных лейкомиях и множественной миеломе. Раскрытие механизмов этого процесса требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: Ku-гетеродимер, негомологичная репарация, опухолевая трансформация, Ph-позитивная лейкомия, множественная миелома.

ROLE OF Ku PROTEIN IN NORMAL AND CANCER CELLS

*O. M. Skorohod, I. V. Kravchuk,
G. D. Telegееv, S. S. Maliuta*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: alexskorohod@yahoo.com

Summary

Ku protein is a multifunctional heterodimer of eukaryotes that consists of two subunits: Ku70 and Ku80. It plays a critical role in the regulation of many cellular processes such as: non-homologous end-joining, V(D)J-recombination of immunoglobulin genes and genes of T-cellular receptors, transcription regulation, DNA replication. Now the existence of relation between Ku protein functioning and processes that lead to transformation of normal cells into cancerous ones is determined, in Ph-positive leukemias and multiple myelomas, in particular. Nevertheless, the machinery of this processes is not still completely understood and needs further researches.

Key words: Ku heterodimer, non-homologous end-joining, tumor transformation, Ph-positive leukemia, multiple myeloma.

1. Tuteja R. and Tuteja N. // *Crit. Rev. Biochem. and Molec. Biol.* – 2000. – **35**, N 1. – P. 1–33.
2. Downs J. A. and Jackson S. P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2004. – **5**. – P. 367–378.
3. Koike M. // *J. Rad. Res.* – 2002. – **43**. – P. 223–236.
4. Arosio D., Cui S., Ortega C., Chovanec M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 12. – P. 9741–9748.
5. Bertinato J., Schild-Poulter C., Hache R. // *J. Cell Science.* – 2000. – **114**. – P. 89–99.
6. Arosio D., Costantini S., Kong Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 41. – P. 42826–42835.
7. Bertuch A. A., and Lundblad V. A. // *Genes and development.* – 2003. – **17**. – P. 2347–2350.
8. Weterings E., Verkaik N., Bruggenwirth H. et al. // *Nucl. Acids Research.* – 2003. – **31**, N 24. – P. 7238–7246.
9. Tai Y.-T., Teoh G., Lin B. // *J. Immunology.* – 2000. – **165**. – P. 6347–6355.
10. Tai Y.-T., Podar K., Kraeft S.-K. et al. // *Experim. Hematology.* – 2002. – **30**. – P. 212–220.
11. Rodgers W., Jordan S., Capra J. // *J. Immunology.* – 2002. – **168**. – P. 2348–2355.
12. Manis J., Gu Y., Lansford R. // *J. Exp. Med.* – 1998. – **187**. – P. 2081–2089.
13. Hamer G., Roepers-Gajadien H. et al. // *Biol. Reproduction.* – 2003. – **68**. – P. 717–721.
14. Woodard R. L., Lee K. J., Huang J. N. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 18. – P. 15423–15433.
15. Myung K., Ghosh G., Farjana J. et al. // *Mol. and Cell. Biol.* – 2004. – **78**. – P. 5050–5059.
16. Cohen S. M., Lippard S. J. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – **67**. – P. 93–130.
17. Jensen R., Glazer P. // *PNAS.* – 2004. – **101**, N 16. – P. 6134–6139.
18. Bosma G., Kim J., Urich T. // *EMBO J.* – 2002. – **21**, N 12. – P. 3192–3200.
19. Bosma G., Kim J., Urich T. et al. // *Exp. Med.* 2002. **196**, N 11. P. 1483–1495.
20. Burma S. D., Chen D. J. // *DNA Repair.* – 2004. – **3**. – P. 909–918.
21. Graeme C. M., Jackson S. P. // *PNAS.* – 1999. – **13**, N 8. – P. 916–934.
22. Collis S. J., De Weese T. L., Jeggo P. A. et al. // *Oncogene.* – 2005. – **24**. – P. 949–961.
23. Gilley D., Tanaka H., Hande M. et al. // *PNAS.* – 2001. – **98**, N 26. – P. 15084–15088.
24. Jin S., Kharbanda S. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 40. – P. 24763–24766.
25. Smith D. L., and Whetton A. D. // *Exp. Rev. Mol. Medicine.* – 2003. – **5**, N 25. – P. 11–12.
26. Pierce A., Hu P., Han M. et al. // *Genes and development.* – 2001. – **15**. – P. 3237–3242.
27. Foriedl A. A. // *J. Biomed. Biotech.* – 2002. – **2**. – P. 61–65.
28. Hanakahi L., West S. // *EMBO J.* – 2002. – **21**, N 8. – P. 2038–2044.
29. Fox C., Eberl M. // *Complem. Therap. Medicine.* – 2002. – **10**. – P. 229–234.
30. Pawelczak K. S., Andrews B. J., Turchi J. J. // *Nucl. Acids Research.* – 2005. – **33**, N 1. – P. 152–161.
31. Wang H., Perrault A., Takeda Y. et al. // *Ibid.* – 2003. – **31**, N 18. – P. 5377–5388.
32. Ward I., Reina-San-Martin B., Oлару A. // *J. Cell Biol.* – 2004. – **165**, N 4. – P. 459–464.
33. Ma L., Wortis H., Kenter A. // *J. Immunol.* – 2002. – **168**. – P. 2835–2846.
34. Purugganan M., Shah S., Kearney J. et al. // *Nucl. Acid. Research.* – 2001. – **29**, N 7. – P. 1638–1646.
35. Xu P., La Vallee P., Lin J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 16. – P. 16057–16063.
36. Bertuch A. A., Lundblad V. A. // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – **21**. – P. 8202–8215.
37. Uziel T., Lerenthal Y. // *EMBO J.* – 2003. – **22**, N 20. – P. 5612–5621.
38. von Zglinickia T., Saretzka G., Ladhoffa J. et al. // *Mechan. Ageing and Development.* – 2005. **126**. – P. 111–117.
39. Li G., Nelsen C., Hendrickson E. // *PNAS.* – 2002. – **99**. – P. 832–837.
40. Pan-Hammarstrom Q., Dai S., Zhao Y. // *J. Immunol.* – 2003. – **170**. – P. 3707–3716.
41. Rooney S., Alt F., Sekiguchi J. et al. // *PNAS.* – 2005. – **102**, N 7. – P. 2471–2475.
42. Sandor Z., Calicchio M., Sargent R. et al. // *Nucleic. Acids Research.* – 2004. – **32**, N 6. – P. 1866–1873.
43. Brady N. N., Gaymes T. J., Cheung M. G. et al. // *Cancer Research.* – 2003. – **63**. – P. 1798–1805.
44. Doi T., Kinoshita K., Ikegawa M. // *PNAS.* – 2003. – **100**, N 5. – P. 2634–2638.
45. Reina-San-Martin B., Nussenzweig M., Ussenzweig A., Difilippantonio S. // *Ibid.* – 2005. – **102**, N 1. – P. 1590–1595.
46. Shanmugam A., Shi M.-J., Yauch L. // *J. Exp. Med.* – 2000. – **191**, N 8. – P. 1365–1380.
47. Schaffer A., Kim E., Wu X. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 25. – P. 23141–23150.
48. Lahdesmaki A., Taylor M., Chrzanowska K., Pan-Hammarstrom Q. // *Ibid.* – 2004. – **279**, N 16. – P. 16479–16487.

49. Kinoshita K. and Honjo T. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2000. – **12**. – P. 195–198.
50. d'Adda di Fagagna F., Hande M. P., Tong W. M. et al. // *Curr. Biol.* – 2001. – **11**. – P. 1192–1196.
51. Espejel S., Franco S., Rodriguez-Perales S. et al. // *EMBO J.* – 2002. – **21**, N 9. – P. 2207–2219.
52. Novac O., Matheos D., Araujo F. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**, N 11. – P. 3386–3401.
53. d'Adda di Fagagna F., Teo S.-H., Jackson S. // *Genes and development.* – 2004. – **18**. – P. 1781–1799.
54. Stellwagen A. E., Haimberger Z. W., Veatch J. R. et al. // *Ibid.* – 2003. – **17**. – P. 2384–2395.
55. Ting N., Yu Y., Pohorelic B. // *Nucl. Acids Research.* – 2005. – **33**, N 7. – P. 2090–2098.
56. Chai W., Ford L., Lenertz L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 47242–47247.
57. Chan S. W.-L. and Blackburn E. H. // *Oncogene.* – 2002. – **21**, N 4. – P. 553–563.
58. Smogorzewska A., van Steensel B. // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – **20**. – P. 1659–1668.
59. Hsu H.-L., Gilley D., Sanjeev A. // *EMBO J.* – 2000. – **14**, N 22. – P. 2807–2812.
60. Samper E., Goytisolo F., Slijepcevic P. et al. // *EMBO Reports.* – 2000. – **1**, N 3. – P. 244–252.
61. Bailey S. M., Cornforth M. N., Ullrich R. L. et al. // *DNA Repair.* – 2004. – **3**. – P. 349–357.
62. Bailey S. M., Brenneman M. A., Halbrook J. D. // *Ibid.* – P. 225–233.
63. d'Adda di Fagagna F., Reaper P., Clay-Farrace L. // *Nature.* – 2003. – **426**, N 13. – P. 194–198.
64. Cosgrove J. A., Nieduszynski C. A., Donaldson A. D. // *Genes and development.* – 2002. – **16**, N 19. – P. 2485–2490.
65. Espejel S., Franco S., Sgura A. et al. // *EMBO J.* – 2002. – **21**, N 22. – P. 6275–6287.
66. Evans S. and Lundblad V. // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**. – P. 3357–3364.
67. Enright H., Mc Glave P. B. // *Curr. Opin. Hematol.* – 1995. – **2**. – P. 293–299.
68. Melo J. V. // *Blood.* – 1996. – **88**. – P. 2375–2384.
69. Deutsch E., Dugray A., Marangoni E. // *Ibid.* – 2001. – **97**, N 7. – P. 2084–2090.
70. Pandita T. K. // *Oncogene.* – 2002. – **21**, N 4. – P. 611–618.
71. Shaul Y., Ben-Yehoyada M. // *Cell Research.* – 2005. – **15**, N 1. – P. 33–35.
72. Holyoak T. L. // *Hematol. Oncol.* – 2001. – **19**, N 3. – P. 89–106.
73. Гусєва С. А., Вознюк В. П., Бальшин М. Д. *Болезни системы крови.* – К.: Логос, 2001. – 544 с.
74. Gaymes T. J., Mufti G. J., and Rassool F. V. // *Canc. Research.* – 2002. – **62**. – P. 2791–2797.
75. O'Driscoll M., Jeggo P. // *Mutat. Research.* – 2002. – **509**. – P. 109–126.

Отримано 16.05.2006