



กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีนและโรคที่เกี่ยวข้อง Protein Phosphorylation in Human Health and Diseases

พงศกร ถาวรพันธ์¹ สุภิญญา ธนาพงษ์รักษา² และ หาญศึก บุญเขต^{2,*}

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110

²คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110

*Corresponding Author, Email: hansuk.bu@psu.ac.th

Received: 7 January 2018 | Revised: 26 October 2018 | Accepted: 22 January 2019

บทคัดย่อ

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเป็นหนึ่งในปฏิกิริยาเคมีที่มีความสำคัญในการควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ เมื่อโปรตีนถูกเติมหรือดึงหมู่ฟอสเฟตจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชิงโครงสร้างและหน้าที่ ในปัจจุบันพบว่ากลไกทางชีววิทยาหลายชนิดถูกควบคุมด้วยหมู่ฟอสเฟต เช่น การแบ่งตัวของเซลล์ การพัฒนาเพื่อทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ และการตายของเซลล์ เป็นต้น ด้วยความสำคัญของหมู่ฟอสเฟตที่มีต่อกลไกเหล่านี้ เซลล์จึงต้องควบคุมสมดุลระหว่างการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนและการดึงหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม หากสมดุลดังกล่าวถูกรบกวนอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหรือความผิดปกติได้ เช่น โรคเบาหวาน โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคมะเร็ง บทความฉบับนี้ได้สรุปองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเติมหมู่ฟอสเฟต รวมถึงการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณและกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตในการออกแบบยาแบบมุ่งเป้า

ABSTRACT

Protein phosphorylation-dephosphorylation is the common post-translational modifications that regulate the structures and functions of cellular proteins involved in diverse biological processes ranging from control of cellular fate to regulation of metabolism. Owing to its significant roles, the cell needs to tightly modulate the phosphorylation-dephosphorylation to sustain cellular integrity. Disruption or dysregulation of the phosphorylation-dephosphorylation could lead to diseases such as diabetes mellitus, Parkinsonism, Alzheimer's disease and cancer. The review in this issue focuses on the significant role of protein phosphorylation-dephosphorylation and signaling mechanisms involved in the processes. This issue also provides the information of phosphorylation-related diseases, highlighting the application of phosphorylation in development of targeted therapy.

คำสำคัญ: การเติมหมู่ฟอสเฟต การส่งสัญญาณภายในเซลล์ เอนไซม์ไคเนส เอนไซม์ฟอสฟาเทส

Keywords: phosphorylation, cell signaling, kinase, phosphatase

บทนำ

การส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) มีความสำคัญต่อการทำงานในระดับโมเลกุลของเซลล์สิ่งมีชีวิต เมื่อมีสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (extracellular stimuli) มากระตุ้นตัวรับสัญญาณที่แทรกตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ สัญญาณเหล่านั้นจะถูกถ่ายทอดต่อไปเป็นลำดับโดยมีตัวถ่ายทอดสัญญาณคือ โปรตีนที่ทำงานประสานกันเป็นระบบเครือข่ายซับซ้อน (Jordan et al., 2000) การตอบสนองของเซลล์จะแตกต่างกันออกไปตามคำสั่งจากสัญญาณที่เซลล์ได้รับ เช่น การแบ่งตัว การเพิ่มจำนวน การพัฒนาไปทำหน้าที่เฉพาะและการตายของเซลล์ เป็นต้น (Van Hoof et al., 2009; Niemi and MacKeigan, 2013; Manuse et al., 2016) จะเห็นได้ว่าการส่งสัญญาณมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์เป็นอย่างยิ่ง การตอบสนองต่อสัญญาณที่ผิดพลาดอาจส่งผลร้ายต่อการทำงานของเซลล์และก่อให้เกิดภาวะความผิดปกติหรือโรคได้

ในกระบวนการการส่งสัญญาณ โปรตีนจะถูกดัดแปลงด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยการเติมหรือกำจัดหมู่ฟังก์ชันจำเพาะที่กรดอะมิโนในโปรตีน ส่งผลให้โครงสร้างและ/หรือหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ในปัจจุบันพบว่ามียุติกรรมเคมีที่สามารถควบคุมการทำงานของโปรตีนมากกว่า 300 รูปแบบ (Liddy et al., 2013) เช่น การเติมน้ำตาล (glycosylation) การเติมโปรตีนยูบิควิติน (ubiquitination) กระบวนการเติมกรดไขมัน (lipidation) และการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) (Chuh et al., 2016) โดยในบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีน (protein phosphorylation) ซึ่งเป็นการดัดแปลงโปรตีนที่พบได้บ่อยที่สุดในเซลล์ (Khouri et al., 2011) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญภายในเซลล์ ได้แก่ กระบวนการเมแทบอลิซึม (Humphrey et al., 2015) การเจริญของเซลล์ (Guo et al., 2016) การแบ่งเซลล์ (Rhind and Russell, 2012) การพัฒนาของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะ (Van Hoof et al., 2009) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (Eiseler et al., 2010) การเคลื่อนที่ของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ (Karlsson et al., 2000) การหดตัวของกล้ามเนื้อ (Davis et al., 2002) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Muralidharan and Mandrekar, 2013) การทำงานของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Giese and Mizuno, 2013) การ

ควบคุมการถอดรหัสของดีเอ็นเอ (transcription) (Karin and Hunter, 1995) การขนส่งสารภายในเซลล์ (phosphorylation-directed trafficking) (Offringa and Huang, 2013) การกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) (McEwan and Dikic, 2011) ในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ ประมาณ 30% ของโปรตีนในเซลล์ของมนุษย์ถูกดัดแปลงด้วยวิธีนี้ (Cohen, 2002)

เอนไซม์ที่ใช้ในการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน

กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์กลุ่มไคเนส (kinases) ซึ่งจะนำ γ -phosphate จาก ATP ไปต่อกับกรดอะมิโนบางตัวของโปรตีน (รูปที่ 1) จากการศึกษาพบว่าประมาณ 1.7-2% ของยีนในมนุษย์สามารถแสดงออกเป็นเอนไซม์ไคเนสประมาณ 2000 ชนิด (Subramani et al., 2013) เรียกชุดของยีนที่แสดงออกเป็นเอนไซม์ไคเนสทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตว่า “kinome” กรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่พบได้บ่อยได้แก่ ซีรีน ทรีโอ닌 และไทโรซีน (Silvestroni et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบได้บนกรดอะมิโนอื่น ๆ เช่น ฮิสทีน (Buchowiecka, 2014) ฮิสทีน (Puttick et al., 2008) ไลซีน (Wang et al., 2016) อาร์จินีน (Suskiewicz and Clausen, 2016) และกรดแอสปาร์ติก (Lapek et al., 2015) เป็นต้น กรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตได้ ถูกเรียกว่า “phosphoacceptor” เอนไซม์ไคเนสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทโดยอาศัยชนิดของกรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเป็นเกณฑ์ เอนไซม์ไคเนสที่สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตบนกรดอะมิโน-ซีรีนและกรดอะมิโนทรีโอ닌จะถูกเรียกว่า “Serine/Threonine kinase (Ser/Thr kinase)” ส่วนเอนไซม์ไคเนสที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน เรียกว่า “tyrosine kinase (Tyr kinase)” หากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้เกิดการตอบสนองได้ 2 ทิศทาง คือ เอนไซม์ทำงานได้ลดลง (lost-of-function) หรือเอนไซม์ทำงานได้มากกว่าปกติ (gain-of-function) กลุ่มอาการในทางคลินิกที่เกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ไคเนส เรียกว่า “kinasopathy” (Barouch-Bentov and Sauer, 2011) การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ไคเนสทั้ง 2 ประเภทก่อให้เกิดโรคได้หลายระบบ เช่น โรคทางระบบประสาท โรคกล้ามเนื้อ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางภูมิคุ้มกัน ความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อและกระบวนการเผาผลาญ (Lahiry et al., 2010) เป็นต้น ข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง

โครงสร้าง หน้าที่ และบริเวณที่พบการกลายพันธุ์ได้บ่อย (mutational hotspot) ของเอนไซม์ไคเนสได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตยา เนื่องจากสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบยาแบบมุ่งเป้า (target-based drug design) เพื่อรักษาโรคที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ผิดปกติ (Lahiry et al., 2010; Yap et al., 2013) ข้อมูลเกี่ยวข้องกับโครงสร้างหน้าที่ของเอนไซม์ไคเนส และเครื่องมือที่ใช้ในการ

ทำนายตำแหน่งที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ไคเนสได้ถูกรวบรวมและจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลมากมายเพื่อให้ช่วยต่อการศึกษา (Trost and Kusalik, 2011) ข้อดีของฐานข้อมูลเหล่านี้ คือ ผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงฐานข้อมูลผ่านอินเทอร์เน็ตโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ในบทความฉบับนี้ได้รวบรวมฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ไคเนส แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายการฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไคเนสและการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง

ลำดับที่	ฐานข้อมูล	คำอธิบาย	URL
1	Kinase Sequence Database	รวบรวม sequence ที่เกี่ยวข้องกับ kinase โดยใช้ homology บริเวณ catalytic region	http://kinase.ucsf.edu/ksd
2	Kinase.com	สำหรับศึกษาหน้าที่ ความหลากหลายและวิวัฒนาการของ kinase	http://kinase.com/
3	Protein Kinase Resource	รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้าง และโรคต่างๆที่เกี่ยวข้อง ฐานข้อมูลนี้เหมาะสำหรับนักวิจัยเกี่ยวกับ protein kinase และ computational biologist	http://www0.nih.go.jp/mirror/Kinases/
4	Kinweb	รวบรวม functional domain ที่สำคัญของเอนไซม์ kinase	http://www.itb.cnr.it/kinweb/
5	The Cancer Genome Atlas	รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโรคมะเร็งซึ่งมีข้อมูลเกี่ยวกับความผิดปกติที่เกิดจาก kinase	https://cancergenome.nih.gov/
6	Homokinase	รวบรวมข้อมูลในทางชีววิทยาเกี่ยวกับเอนไซม์ไคเนสในมนุษย์	http://www.biominig-bu.in/homokinase/

เอนไซม์ที่ใช้ในการเติมหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีน

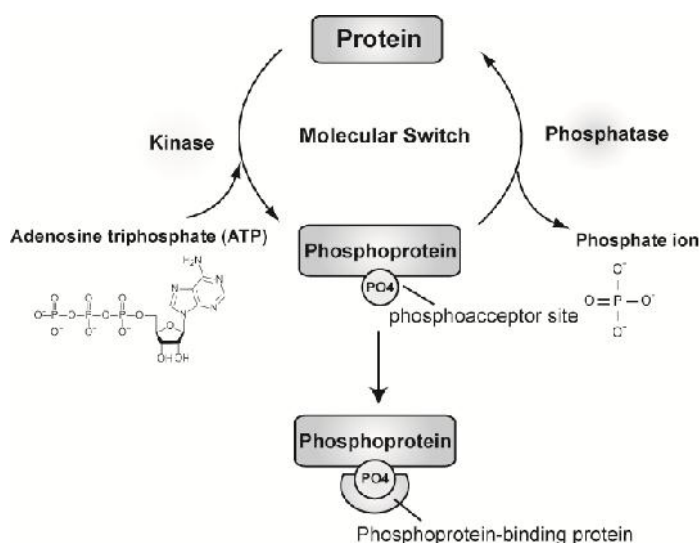
กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีนอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยมีเอนไซม์กลุ่มฟอสฟาเทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 1) เอนไซม์ชนิดนี้จะนำโมเลกุลของน้ำมาใช้ในการตัด phosphoric acid monoester เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟอสเฟตไอออนและแอลกอฮอล์ เอนไซม์ฟอสฟาเทสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการควบคุมปฏิกิริยาทางชีววิทยาเช่นเดียวกับเอนไซม์ไคเนส ในการควบคุมกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ การส่งสัญญาณในเซลล์ประสาท การหดตัวของกล้ามเนื้อ การสังเคราะห์โปรตีน และกระบวนการเมแทบอลิซึมจะมีเอนไซม์ฟอสฟาเทสที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด คือ โปรตีนฟอสฟาเทส 1 (phosphoprotein phosphatase 1; PP1) และ โปรตีนฟอสฟาเทส 2 (protein phosphatase 2A; PP2A) (Aggen et al., 2000; Jiang, 2006) การศึกษาหน้าที่ของ PP2A ในระบบประสาทแสดงให้เห็นว่า PP2A มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของโปรตีนเทา (tau protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมเสถียรภาพของไมโครทิวบูลใน

ระบบประสาท (Braithwaite et al., 2012) ส่วนโปรตีนฟอสฟาเทส 2B (protein phosphatase 2B; PP2B) จะทำงานเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณประสาทและการควบคุมการตายของเซลล์ (Hayashi et al., 2009) การทำงานของโปรตีนชนิดนี้จะต้องอาศัยแคลเซียมและโปรตีนแคลโมดูลิน (calmodulin) ทำให้ PP2B ถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า แคลซินูริน (calcineurin) (Bandyopadhyay et al., 2002) นอกจากนี้ PP2B ยังเป็นโปรตีนเป้าหมายในการพัฒนายาควบคุมกันหลายชนิด เช่น FK506 และ cyclosporin A เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของ T-cell lymphocyte ด้วยเช่นกัน (Bueno et al., 2002)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตและการเติมหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีนมีบทบาทที่สำคัญต่อกลไกทางชีววิทยา เซลล์จึงต้องควบคุมกระบวนการดังกล่าวอย่างเคร่งครัดโดยอาศัยเอนไซม์กลุ่มไคเนสและฟอสฟาเทสเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการส่งสัญญาณมากหรือน้อยเกินไป ในปัจจุบัน

พบว่าโรคมะเร็งหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเติม และดึงหมู่ฟอสเฟต โดยในบทความฉบับนี้ได้ยกตัวอย่าง 4 โรคมะเร็ง

สำคัญ ได้แก่ โรคมะเร็งปอด โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โรคมะเร็งเต้านม และโรคมะเร็งรังไข่ ซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดของแต่ละโรคในหัวข้อถัดไป



รูปที่ 1 การควบคุมสมดุลของหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีนโดยเอนไซม์กลุ่มไคเนส (kinases) และเอนไซม์กลุ่มฟอสฟาเทส (phosphatases)

วิธีการส่งสัญญาณที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่ฟอสเฟต

การตอบสนองหลังจากได้รับปัจจัยกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นเซลล์จึงใช้กลุ่มโปรตีนต่างชนิดกันเพื่อทำให้เกิดการตอบสนองในรูปแบบที่จำเพาะ โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีการส่งสัญญาณเป็นทอด ๆ ตามลำดับ เรียกว่า วิธีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) ในบทความฉบับนี้จะกล่าวถึงวิธีการส่งสัญญาณที่สำคัญ 3 วิธี (รูปที่ 2) ดังนี้

วิถี Ras/Raf/MEK/ERK

วิถี Ras/Raf/MEK/ERK มีความสำคัญต่อกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยับยั้งการตายของเซลล์ กระตุ้น transcription factor ให้ทำงาน รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีน (Steelman et al., 2004) กลไกการส่งสัญญาณของวิถีนี้เป็นไปตามลำดับขั้นตอน เมื่อโปรตีนตัวรับได้รับสัญญาณจากภายนอกเซลล์จะเกิดการกระตุ้นโปรตีน Ras จากนั้น โปรตีน Ras จะไปกระตุ้นโปรตีน Raf โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Raf ส่งผลให้โปรตีน Raf อยู่ในสถานะถูกกระตุ้น จากนั้นโปรตีน Raf จะไปกระตุ้นโปรตีน MEK1/2 โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต และในขั้นสุดท้าย โปรตีน MEK1/2 ซึ่งอยู่ในสถานะถูกกระตุ้นจะไปกระตุ้นโปรตีน ERK1/2 โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (McCubrey et

al., 2007) โปรตีน ERK1/2 นั้นทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในระดับโมเลกุลของเป้าหมาย เช่น การกระตุ้น transcription factor และการกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Roskoski, 2012) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับวิถี Ras/Raf/MEK/ERK นี้ มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งบางชนิด และถูกใช้เป็นเป้าหมายของการพัฒนายารักษาโรคมะเร็ง โดยรายละเอียดที่เกี่ยวข้องจะถูกกล่าวถึงต่อไปในบทความนี้

วิถี PI3K/Akt/mTOR

การอยู่รอดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือดถูกควบคุมโดยวิถี PI3K/Akt/mTOR กลไกการส่งสัญญาณของวิถีนี้เริ่มต้นเมื่อโปรตีนตัวรับได้รับสัญญาณจากปัจจัยกระตุ้นต่าง ๆ เช่น epidermal growth factor (EGF) และ insulin-like growth factor (IGF) โปรตีนตัวรับจะไปกระตุ้น phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) เพื่อเติมหมู่ฟอสเฟตแก่ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์คือ phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P3) สารชนิดนี้จะไปกระตุ้นโปรตีน Akt ส่งผลให้โปรตีน Akt อยู่ในสถานะถูกกระตุ้น จากนั้นโปรตีน Akt จะไปกระตุ้นโปรตีน mammalian target of rapamycin (mTOR) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต ใน

ขั้นตอนสุดท้ายโปรตีน mTOR จะส่งสัญญาณไปยังตัวตอบสนอง 2 ชนิดซึ่งทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแปลรหัส นั่นคือ 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) และ 40S ribosomal protein S6 (40SrpS6) (Hemmings and Restuccia, 2012) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโปรตีนในวิถี PI3K/Akt/mTOR มีความสัมพันธ์กับโรคบางชนิด เช่น โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ การพัฒนายาบางชนิดอาศัยวิถี PI3K/Akt/mTOR เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ โดยรายละเอียดที่เกี่ยวข้องจะถูกกล่าวถึงต่อไปในบทความนี้

วิถี JAK/STAT

วิถี JAK/STAT ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเกิดมะเร็ง และการตายของเซลล์ (Thomas et al., 2015) วิถี JAK/STAT จะรับสัญญาณจากปัจจัยกระตุ้นภายนอกเซลล์ เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดต่างๆ องค์ประกอบที่สำคัญของวิถีนี้มี 3 ส่วน คือ โปรตีนตัวรับที่ผิวเซลล์ เอนไซม์ JAK และโปรตีน STAT กลไกการส่งสัญญาณของวิถี JAK/STAT เป็นไปตามลำดับขั้นตอนดังนี้ เมื่อ ไซโตไคน์ภายนอกเซลล์จับกับโปรตีนตัวรับที่แทรกตัวอยู่บริเวณผิวเซลล์ เอนไซม์ JAK จะทำการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนตัวรับ จากนั้นโปรตีน STAT จะเข้ามาจับกับโปรตีนตัวรับที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว ในขั้นตอนสุดท้าย โปรตีน STAT จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้วเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสดีเอ็นเอ (Hong and Laimins, 2013) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนบางชนิดในวิถี JAK/STAT ได้ถูกใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนารักษาโรคมะเร็งบางชนิด โดยรายละเอียดที่เกี่ยวข้องจะถูกกล่าวถึงต่อไปในบทความนี้

ความผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตที่พบในโรคเบาหวาน และภาวะดื้อต่ออินซูลิน

อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่สำคัญ 4 ประการ คือ นำกลูโคสเข้าสู่เซลล์บริเวณกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน เพิ่มการสะสมพลังงานบริเวณกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน กระตุ้นการสังเคราะห์ไกลโคเจนและโปรตีน และลดการสลายไขมัน ไกลโคเจนและโปรตีน (Dimitriadis et al., 2011) กลไกการส่งสัญญาณจะเกิดขึ้นภายหลังจากอินซูลินจับกับโปรตีนตัวรับ (insulin receptor) การจับกันระหว่างโปรตีนทั้งสองจะทำให้

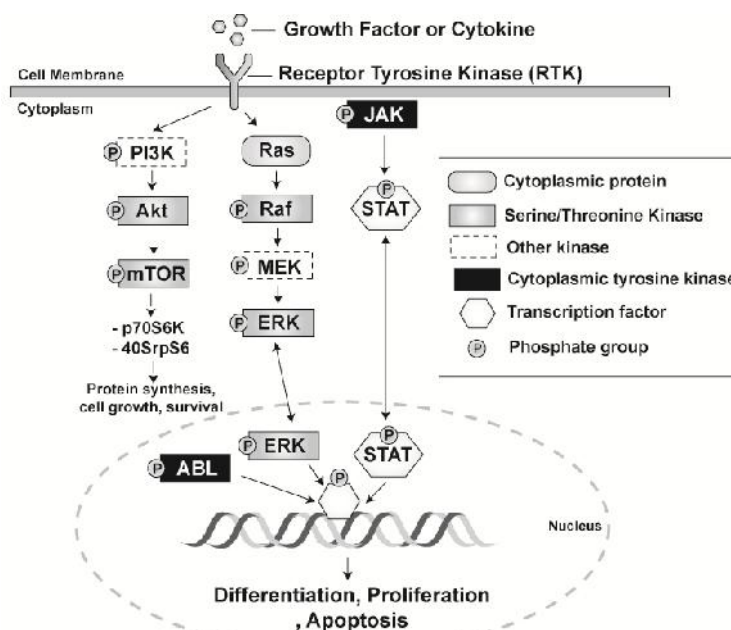
insulin receptor เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโมเลกุลตัวเอง (autophosphorylation) ที่กรดอะมิโนไทโรซีนบริเวณ intracytoplasmic domain หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้วโปรตีนตัวรับจะอยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น ในสภาวะนี้ insulin receptor จะสามารถจับกับโปรตีน insulin receptor substrate (IRS) ได้ เนื่องจากโปรตีน IRS มีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า “Src homology-2 (SH2) domain” ซึ่งสามารถจับกับกรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตได้ เมื่อ IRS จับกับ insulin receptor แล้ว จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตบนกรดอะมิโนไทโรซีน ทำให้สามารถจับกับโปรตีน phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ได้เนื่องจาก PI3K มี SH2 domain เช่นกัน ต่อมา PI3K จะไปกระตุ้นโปรตีน Akt ทำให้เกิดการตอบสนองต่ออินซูลิน (Boucher et al., 2014) คือ กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งกลูโคส (GLUT4) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และกระตุ้นให้ถุงเยื่อหุ้ม (vesicle) เคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมไปยังเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ในที่สุดกลูโคสที่อยู่ภายนอกเซลล์จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ผ่าน GLUT4 (Siddle, 2011; Artunc et al., 2016)

ในกรณีที่เกิดความผิดปกติกับวิถีการส่งสัญญาณด้วย Akt kinase จะก่อให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โรคเบาหวาน และภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดตามมาได้ จากการศึกษาในเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ตอบสนองต่ออินซูลินพบว่าโปรตีน Akt เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยปกติโปรตีน Akt จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต 2 ตำแหน่ง คือ กรดอะมิโนไทโรซีนตำแหน่งที่ 308 และกรดอะมิโนซีรีนตำแหน่งที่ 473 (Vincent et al., 2011) แต่ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน จะพบการลดลงของการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน Akt (Karlsson et al., 2005) และลดการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ (Mueckler, 2001) สาเหตุที่ทำให้การเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน Akt ลดลงอาจเกิดจากการมีระดับกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้น ภาวะ oxidative stress (Tangvarasittichai, 2015) ความผิดปกติของ insulin receptor (Catalano et al., 2014) และการได้รับสาร ceramide ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีน (Hsieh et al., 2014)

ความผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตที่พบในภาวะแทรกซ้อนทางหัวใจและหลอดเลือดของโรคเบาหวาน

การส่งสัญญาณโดยอาศัยโปรตีน Akt มีความเกี่ยวข้องกับภาวะแทรกซ้อนทางหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน โดยปกติการส่งสัญญาณของอินซูลินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือด (antiatherosclerotic action) แต่เมื่ออยู่ในภาวะที่อินซูลินไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคหลอดเลือดของอินซูลินจะลดลง จึงทำให้คนไข้

โรคเบาหวานมีโอกาสเกิดโรคทางหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น (King et al., 2016) การศึกษาในหนูทดลองแสดงให้เห็นว่าภาวะหลอดเลือดแดงเออร์ตาอุดตัน (aortic plaque) และภาวะหลอดเลือดแดงโคโรนารีอุดตัน (atherosclerosis) จะพบได้ในหนูที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Akt (Fernández-Hernando et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุภายในหัวใจ (endothelial cell) ที่ลดลงกว่าปกติอีกด้วย (Somanath et al., 2006)



รูปที่ 2 การถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์อย่างเป็นลำดับขั้นตอนโดยใช้วิถี Ras/Raf/MEK/ERK วิถี PI3K/Akt/mTOR และวิถี JAK/Stat ในการควบคุมกระบวนการทางชีววิทยาภายในเซลล์ เช่น การพัฒนาเพื่อทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ (cell differentiation) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการตายของเซลล์ (apoptosis)

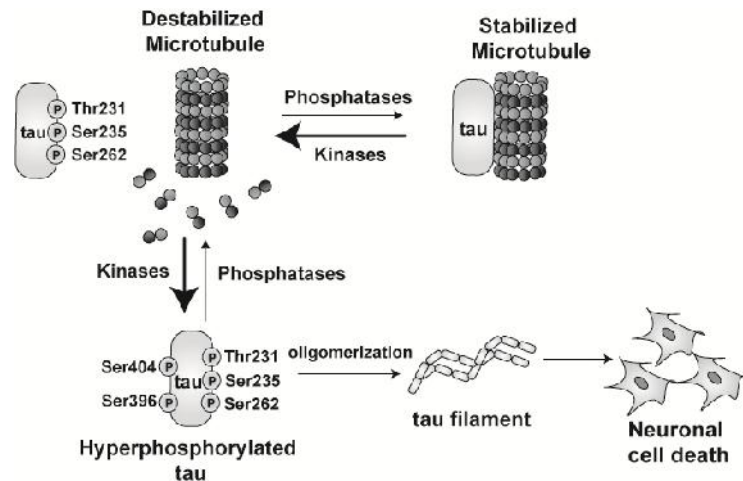
ความผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตในโรคอัลไซเมอร์

ในโรคอัลไซเมอร์ จะพบความผิดปกติของโปรตีนที่มีชื่อว่า โปรตีนเทา (tau protein) (Iqbal et al., 2010) ในสภาวะปกติ โปรตีนเทามีหน้าที่สำคัญในการรักษาเสถียรภาพของไมโครทิวบูล เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีหมู่ฟอสเฟต โปรตีนเทาจะเข้าไปจับกับไมโครทิวบูลินเพื่อรวมตัวกันเป็นเส้นใยไมโครทิวบูลในเซลล์ประสาท (Kadavath et al., 2015) โดยทั่วไปโรคอัลไซเมอร์จะเกิดขึ้นแบบค่อยเป็นค่อยไป จนกระทั่งผู้ป่วยมีภาวะความจำเสื่อม (dementia) มักพบได้ในผู้ที่มียายุมากกว่า 65 ปี (Isik, 2010)

รอยโรคที่สำคัญของโรคนี้คือ รอยโรคในสมองซึ่งจะมีลักษณะที่เรียกว่า neurofibrillary tangles (NFT) ซึ่งเกิดจาก โปรตีนเทาถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไคเนสและฟอสฟาเทสขาดความสมดุล จึงทำให้เอนไซม์ไคเนสเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเทามากกว่าปกติ (Gong and Iqbal, 2008) ตำแหน่งที่พบการเติมหมู่ฟอสเฟตได้แก่ กรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่งที่ 231 กรดอะมิโนเซอรีนตำแหน่งที่ 235, 262, 396 และ 404 จากนั้นโปรตีนชนิดนี้จะรวมตัวกัน (oligomerization) เป็นลักษณะเส้นใยเกลียวคู่ (paired helical filaments; PHFs) (Barghorn et al., 2004) ดังแสดงใน รูปที่ 3

เมื่อโปรตีนเหล่านี้รวมตัวกันจะทำให้การส่งสัญญาณประสาทผ่านแอกซอน (axon) และทำให้เซลล์ประสาทตาย (Al-Hilaly et al., 2017) ในปัจจุบันการตรวจวัดระดับโปรตีนเทาโดยรวม (total tau, t-tau) และระดับของโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต

(phospho-tau, p-tau) ได้ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) ในการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ (Nägga et al., 2002)



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการเสื่อมของเซลล์ประสาทเมื่อมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเทา (tau) มากเกินไปที่พบในโรคอัลไซเมอร์

ความผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตในโรคมะเร็ง

การเคลื่อนที่ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการมีชีวิตรอดของเซลล์ถูกควบคุมโดยวิธีการส่งสัญญาณหลายรูปแบบ หากการควบคุมการส่งสัญญาณเสียสมดุลไปอาจเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งได้ โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งจะมีลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์ที่ปกติเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งมีผลทำให้การส่งสัญญาณภายในเซลล์ผิดปกติไปจากเดิม เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้โดยไม่อาศัยการกระตุ้นของปัจจัยกระตุ้นการเจริญเติบโต เซลล์เหล่านี้สามารถแทรกตัวระหว่างเซลล์ข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นได้ เรียกว่า “metastasis” (Seyfried and Huysentruyt, 2013) อย่างไรก็ตาม เซลล์มะเร็งยังจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่น ๆ เพื่อความอยู่รอด เช่น ก๊าซออกซิเจน สารอาหาร อีกทั้งยังต้องการกำจัดของเสียออกจากเซลล์ เซลล์มะเร็งจึงพัฒนาความสามารถในการหลั่งปัจจัยกระตุ้นเพื่อสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenic factor) เพื่อรับอาหารและกำจัดของเสีย (Nishida et al., 2006) วิธีการรักษามะเร็งในปัจจุบันทำได้โดยการให้ยาที่จำเพาะกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณที่ผิดปกติภายในเซลล์มะเร็ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ยับยั้งความสามารถในการรุกราน ลดความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็ง และยับยั้ง

ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Steeg and Theodoreescu, 2008; Baig et al., 2016)

ความสามารถในการรุกรานไปยังบริเวณอื่น ๆ ของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ focal adhesion kinase (FAK) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม tyrosine kinase ชนิด non-receptor ที่มีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Zhao and Guan, 2009) เมื่อ FAK ถูกเติมฟอสเฟตที่กรดอะมิโนไทโรซีนตำแหน่งที่ 397, 576 และ 577 แล้ว FAK จะสามารถจับกับเอนไซม์ Src ซึ่งมี SH-2 domain ได้ (Ruest et al., 2000) การทำงานของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังนั้นการยับยั้งโปรตีนทั้ง 2 จึงเป็นเป้าหมายหลักในการพัฒนายาต้านการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (Mitra et al., 2005)

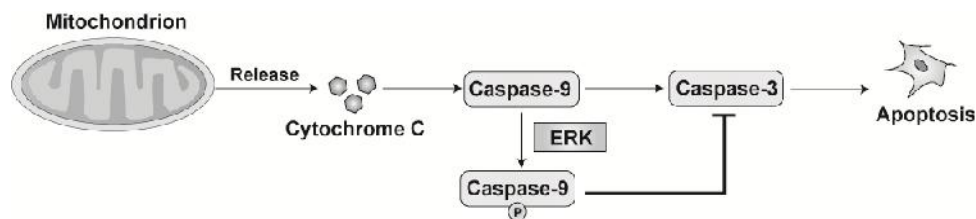
ความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับวิถี Ras/Raf/MEK/ERK การกลายพันธุ์ของโปรตีน Ras ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์หลายชนิด (McCubrey et al., 2007) โดยปกติโปรตีน Ras ทำงานร่วมกับตัวตอบสนอง (effector) คือ เอนไซม์ Ser/Thr kinase ที่มีชื่อว่าโปรตีน Raf วิถีนี้ถูกควบคุมและอาศัยโปรตีนค้ำจุน (scaffolding protein) ในการทำงาน โปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับวิถี Ras/Raf/MEK/ERK เป็นเป้าหมายที่สำคัญของการพัฒนาสารยับยั้งมะเร็ง (Hilger et al., 2002; Roberts and Der, 2007;

Santarpia et al., 2012) จากการศึกษาพบว่าการกระตุ้นเอนไซม์ ERK สามารถยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ โดยปกติเมื่อมีการรั่วของ cytochrome c ออกมาจากไมโทคอนเดรียจะทำให้เอนไซม์ caspase 9 ไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase 3 ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ดังนั้นหากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase 9 จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ apoptosis ด้วย จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ ERK สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase 9 (รูปที่ 4) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ caspase 9 ที่กรดอะมิโนทรินิโอนีนตำแหน่งที่ 125 (Allan et al., 2003)

ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับวิถี PI3K/Akt/mTOR หากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้จะทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่างไม่จำกัด (Cho et al., 2009) จากการศึกษาพบว่ายีน Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PI3KCA) เป็นยีนที่พบการกลายพันธุ์ได้บ่อยในโรคมะเร็งเต้านม (Mukohara, 2015) และมะเร็งชนิดอื่น ๆ (Samuels and Waldman, 2010)

กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตในโรคพาร์กินสัน

โปรตีน alpha-synuclein เป็นโปรตีนที่ทำงานร่วมกับเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถพบได้ในส่วนปลายของเซลล์ประสาทก่อนไซแนปส์ (presynaptic neuron) การเติมหมู่ฟอสเฟตบนกรดอะมิโนซีรีนตำแหน่งที่ 129 ทำให้โปรตีน alpha-synuclein เกิดการจับกลุ่มและไม่สามารถละลายน้ำได้ เรียกว่า Lewy body (Samuel et al., 2016) ซึ่งเป็น intracellular inclusion body ที่พบได้ในสมองของผู้ป่วย โรคพาร์กินสัน เรียกภาวะความผิดปกติที่เกิดจากการรวมตัวกันของ alpha-synuclein ว่า “synucleinopathies” (Zaccai et al., 2015)



รูปที่ 4 แสดงกลไกการควบคุมการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยเริ่มต้นเมื่อมีการรั่วซึมของ cytochrome C จากไมโทคอนเดรีย ทำให้ caspase-9 ไปกระตุ้น caspase-3 ในที่สุดเซลล์จะ apoptosis เมื่อ caspase-9 ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วย ERK จะทำให้ caspase-9 สูญเสียความสามารถในการกระตุ้น caspase-3 ส่งผลให้ไม่สามารถเกิด apoptosis ได้

การประยุกต์ใช้องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณและกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตในการออกแบบยา

ความรู้เกี่ยวกับวิถีการส่งสัญญาณ และการเติมหมู่ฟอสเฟตมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับโรค การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคเนสและเอนไซม์ฟอสฟาเทสเป็นหนึ่งในกลยุทธ์ที่สำคัญสำหรับการออกแบบยาเพื่อรักษาโรคที่มีความผิดปกติของการเติมหมู่ฟอสเฟต

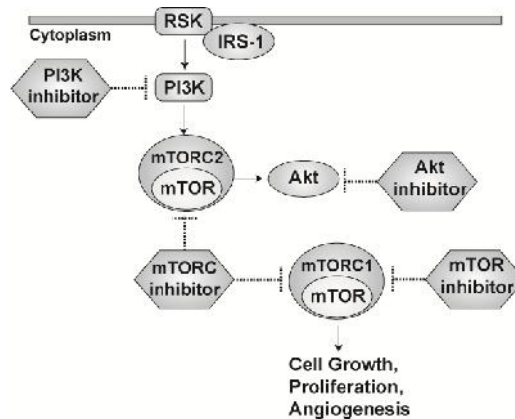
ตัวอย่างแรก คือ การใช้ยายับยั้งเอนไซม์ไคเนสในวิถี PI3K/Akt/mTOR เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Matsuoka and Yashiro, 2014; Dey et al., 2017) ดังแสดงในรูปที่ 5

วิถี PI3K/Akt/mTOR มีความสำคัญต่อการควบคุมการเจริญของเซลล์ (cell growth) การแบ่งเซลล์ (cell proliferation) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) (Karar and Maity, 2011; Mori et al., 2014) เมื่อโปรตีนตัวรับบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับสัญญาณกระตุ้นจากภายนอกจะเกิดการกระตุ้นโปรตีน PI3K, Akt และ mTOR ตามลำดับ ในที่สุดโปรตีน mTOR จะไปกระตุ้นกระบวนการแปลรหัสโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนสำคัญสองชนิด คือ 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) และ 40S ribosomal protein S6 (40SrpS6) (Shin et al., 2011) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้น 4EBP1 translation initiation factor ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการแปลรหัสของโปรตีนสองชนิด คือ cyclin D1 และ c-myc (Corradetti and Guan, 2006) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มี

ความสำคัญในการกำหนดวัฏจักรของเซลล์ ด้วยเหตุนี้ทำให้มีการพัฒนาสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในวิถี PI3K/Akt/mTOR ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้

ตัวอย่างที่สอง คือ ยาที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคเนสซึ่งมีชื่อว่า Imatinib (Gleevec) ยาชนิดนี้ถูกพัฒนาโดยบริษัท Novartis (Iqbal and Iqbal, 2014) และประสบความสำเร็จในการรักษามะเร็ง chronic myeloid leukemia (CML) ซึ่งเป็นโรคทางโลหิตวิทยาชนิดหนึ่ง CML มีสาเหตุมาจาก translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 22 (t(9;22)(q34;q11)) ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม ที่เรียกว่า Philadelphia chromosome (Druker, 2008) และเกิดการรวมกันของยีน *BCR/ABL* ซึ่งแสดงออกเป็นเอนไซม์ *BCR/ABL tyrosine kinase* เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยจะไปกระตุ้นโปรตีนเป้าหมายได้แก่

phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (Li et al., 2015) RAS (Cilloni and Saglio, 2012) และ STAT5 (Steelman et al., 2004) เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ยา Imatinib จึงถูกออกแบบให้มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกับ ATP ทำให้สามารถยับยั้งการจับกันระหว่าง ATP และ *BCR/ABL tyrosine kinase* การแย่งจับจะเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปอัมมฤต (inactive form) โดยปกติเอนไซม์ *ABL kinase* จะใช้ส่วน ATP-binding pocket (gatekeeper residue) ซึ่งมีกรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่งที่ 315 คอยควบคุมการจับของ ATP และตัวยับยั้งที่มีโครงสร้างคล้าย ATP (ATP-mimetic inhibitor) (Reddy and Aggarwal, 2012) จากการศึกษาพบว่าหากมีการกลายพันธุ์จากกรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่งที่ 315 เป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน และกลายพันธุ์จากกรดอะมิโนกลูตามิกตำแหน่งที่ 255 เป็นกรดอะมิโนไลซีนจะทำให้เกิดการดื้อต่อยา Imatinib (Yamamoto et al., 2004)



รูปที่ 5 ลำดับการส่งสัญญาณด้วยวิถี PI3K/Akt/mTOR และ inhibitor ที่ใช้ในการยับยั้ง

→ = แสดงการส่งสัญญาณจากโปรตีนตัวหนึ่งไปยังโปรตีนอีกตัวหนึ่ง

- - - ! = แสดงการยับยั้งการทำงานของโปรตีนด้วย inhibitor

นอกจากการยับยั้งเอนไซม์ไคเนสแล้ว เอนไซม์ฟอสฟาเทสถูกใช้เป็นเป้าหมายเพื่อรักษาโรคด้วยเช่นกัน เช่น การยับยั้ง wild-type p53-induced phosphatase 1 (WIP1) (Richter et al., 2015) การยับยั้ง Src homology-2 (SH2) domain-containing phosphatase 2 (SHP2) (Chen et al., 2016) และการยับยั้ง protein phosphatase 1 B (PTP1B) (Jiang and Zhang, 2008) เพื่อใช้ในการรักษามะเร็ง นอกจากนี้มีรายงานว่าเอนไซม์ฟอสฟาเทสถูกใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาโรคอื่น ๆ เช่น การยับยั้ง PTP1B และ lymphoid-specific

tyrosine phosphatase (LYP) ในโรคเบาหวาน (Jintong et al., 2014; Tamrakar et al., 2014) การยับยั้ง PTP1B ในโรคอ้วน (Koren and Fantus, 2007) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์ฟอสฟาเทสยังคงช้ากว่าการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์ไคเนสมาก ทั้งนี้เป็นเพราะข้อจำกัดทางเทคนิคในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสและข้อจำกัดด้านข้อมูลเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทสภายในเซลล์ (Vintonyak et al., 2009; Nguyen et al., 2013)

สรุป

การเติมหมู่ฟอสเฟตเป็นหนึ่งในปฏิกิริยาเคมีที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนภายในเซลล์ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ การแบ่งตัว การพัฒนาเพื่อทำหน้าที่เฉพาะและการตายของเซลล์ถูกควบคุมโดยหมู่ฟอสเฟต เอนไซม์ 2 ชนิดที่มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมสมดุลของหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน คือ เอนไซม์ไคเนส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน และเอนไซม์ฟอสฟาเทส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีน การเติมหรือดึงหมู่ฟอสเฟตจำเป็นต้องถูกควบคุมเป็นอย่างดีเคร่งครัดเพื่อให้อยู่ในสมดุล มิเช่นนั้นการทำงานของโปรตีนอาจจะมากหรือน้อยกว่าปกติ เมื่อโปรตีนในร่างกายทำงานผิดปกติไปจะเกิดการรบกวนกลไกทางชีววิทยา ซึ่งอาจส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคเบาหวาน โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคมะเร็ง เป็นต้น องค์ความรู้เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่ฟอสเฟตและวิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ไม่เพียงแต่ช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของเซลล์ในสภาวะปกติเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทสำคัญในการทำความเข้าใจกลไกการเกิดและพัฒนาของโรคในระดับโมเลกุล ตลอดจนการออกแบบและพัฒนายาให้สามารถรักษาได้อย่างจำเพาะเจาะจงไปยังตำแหน่งที่เป็นต้นเหตุของความผิดปกติของโรคอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Aggen, J.B., Nairn, A.C. and Chamberlin, R. (2000). Regulation of protein phosphatase-1. *Chemistry & Biology* 7(1): R13-R23.
- Al-Hilaly, Y.K., Pollack, S.J., Vadukul, D.M., Citossi, F., Rickard, J.E., Simpson, M. et al. (2017). Alzheimer's disease-like paired helical filament assembly from truncated tau protein is independent of disulfide crosslinking. *Journal of Molecular Biology* 429(23): 3650-3665.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S. and Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology* 5: 647.
- Artunc, F., Schleicher, E., Weigert, C., Fritsche, A., Stefan, N. and Häring, H.-U. (2016). The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nature Reviews Nephrology* 12: 721.
- Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H.Z. and Kamarul, T. (2016). Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death & Disease* 7(1): e2058.
- Bandyopadhyay, J., Lee, J., Lee, J., Lee, J.I., Yu, J.-R., Jee, C. et al. (2002). Calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, is involved in movement, fertility, egg laying, and growth in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 13(9): 3281-3293.
- Barghorn, S., Davies, P. and Mandelkow, E. (2004). Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on β -structure in the core domain. *Biochemistry* 43(6): 1694-1703.
- Barouch-Bentov, R. and Sauer, K. (2011). Mechanisms of Drug-Resistance in Kinases. *Expert opinion on investigational drugs* 20(2): 153-208.
- Boucher, J., Kleinriders, A. and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1): a009191.
- Braithwaite, S.P., Voronkov, M., Stock, J.B. and Mouradian, M.M. (2012). Targeting phosphatases as the next generation of disease modifying therapeutics for Parkinson's disease. *Neurochemistry International* 61(6): 899-906.
- Buchowiecka, A.K. (2014). Puzzling over protein cysteine phosphorylation-assessment of proteomic tools for S-phosphorylation profiling. *Analyst* 139(17): 4118-4123.
- Bueno, O.F., Brandt, E.B., Rothenberg, M.E. and Molkenkin, J.D. (2002). Defective T cell development and function in calcineurin $\text{A}\beta$ -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(14): 9398-9403.
- Catalano, K.J., Maddux, B.A., Szary, J., Youngren, J.F., Goldfine, I.D. and Schaufele, F. (2014). Insulin resistance induced by hyperinsulinemia coincides with a persistent alteration at the insulin receptor tyrosine kinase domain. *PLoS ONE* 9(9): e108693.
- Chen, Y.-N.P., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M.G. et al. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* 535: 148.

- Cho, D., Mier, J.W. and Atkins, M.B. (2009). PI3K/Akt/mTOR pathway: a growth and proliferation pathway. *Renal Cell Carcinoma: Molecular Targets and Clinical Applications*. R. M. Bukowski, R. A. Figlin and R. J. Motzer. Totowa, NJ, Humana Press: 267-285.
- Chuh, K.N., Batt, A.R. and Pratt, M.R. (2016). Chemical methods for encoding and decoding of posttranslational modifications. *Cell Chem Biol* 23(1): 86-107.
- Cilloni, D. and Saglio, G. (2012). Molecular pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research* 18(4): 930-937.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4(5): E127-130.
- Corradetti, M.N. and Guan, K.L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25: 6347.
- Davis, J.S., Satorius, C.L. and Epstein, N.D. (2002). Kinetic effects of myosin regulatory light chain phosphorylation on skeletal muscle contraction. *Biophys J* 83(1): 359-370.
- Dey, N., De, P. and Leyland-Jones, B. (2017). PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. *Pharmacology & Therapeutics* 175(Supplement C): 91-106.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E. and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93(Supplement 1): S52-S59.
- Druker, B.J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112(13): 4808-4817.
- Eiseler, T., Hausser, A., De Kimpe, L., Van Lint, J. and Pfizenmaier, K. (2010). Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem*. 285(24): 18672-18683.
- Fernández-Hernando, C., Ackah, E., Yu, J., Suárez, Y., Murata, T., Iwakiri, Y. et al. (2007). Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metabolism* 6(6): 446-457.
- Giese, K.P. and Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem*. 20(10): 540-552.
- Gong, C.X. and Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current medicinal chemistry* 15(23): 2321-2328.
- Guo, X., Wang, X., Wang, Z., Banerjee, S., Yang, J., Huang, L. et al. (2016). Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 18(2): 202-212.
- Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E. and Vance, J.E. (2009). Protection of neurons from apoptosis by apolipoprotein E-containing lipoproteins does not require lipoprotein uptake and involves activation of phospholipase $\text{C}\gamma 1$ and inhibition of calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 284(43): 29605-29613.
- Hemmings, B.A. and Restuccia, D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(9): a011189.
- Hilger, R.A., Scheulen, M.E. and Strumberg, D. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Oncology Research and Treatment* 25(6): 511-518.
- Hong, S. and Laimins, L.A. (2013). The JAK-STAT transcriptional regulator, STAT-5, activates the ATM DNA damage pathway to induce HPV 31 genome amplification upon epithelial differentiation. *PLoS Pathogens* 9(4): e1003295.
- Hsieh, C.-T., Chuang, J.-H., Yang, W.-C., Yin, Y. and Lin, Y. (2014). Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle. *Cellular Signalling* 26(7): 1400-1408.
- Humphrey, S.J., James, D.E. and Mann, M. (2015). Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 26(12): 676-687.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X. and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research* 7(8): 656-664.
- Iqbal, N. and Iqbal, N. (2014). Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemotherapy Research and Practice* 2014: 9.
- Isik, A.T. (2010). Late onset Alzheimer's disease in older people. *Clinical Interventions in Aging* 5: 307-311.
- Jiang, Y. (2006). Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2): 440-449.

- Jiang, Z.-X. and Zhang, Z.-Y. (2008). Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer metastasis reviews* 27(2): 263-272.
- Jintong, D., Yu, Q., Lele, S. and Xiuwen, W. (2014). Lymphoid-specific tyrosine phosphatase (Lyp): a potential drug target for treatment of autoimmune diseases. *Current Drug Targets* 15(3): 335-346.
- Jordan, J.D., Landau, E.M. and Iyengar, R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 103(2): 193-200.
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H. et al. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(24): 7501-7506.
- Karar, J. and Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4: 51.
- Karin, M. and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol.* 5(7): 747-757.
- Karlsson, A.M., Lerner, M.R., Unett, D., Lundstrom, I. and Svensson, S.P. (2000). Melatonin-induced organelle movement in melanophores is coupled to tyrosine phosphorylation of a high molecular weight protein. *Cell Signal* 12(7): 469-474.
- Karlsson, H.K.R., Zierath, J.R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G.E. and Wallberg-Henriksson, H. (2005). Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 54(6): 1692.
- Khoury, G.A., Baliban, R.C. and Floudas, C.A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 1.
- King, G.L., Park, K. and Li, Q. (2016). Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes* 65(6): 1462-1471.
- Koren, S. and Fantus, I.G. (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 21(4): 621-640.
- Lahiry, P., Torkamani, A., Schork, N.J. and Hegele, R.A. (2010). Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics* 11: 60.
- Lapek, J.D., Tomblin, G., Kellersberger, K.A., Friedman, M.R. and Friedman, A.E. (2015). Evidence of histidine and aspartic acid phosphorylation in human prostate cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388(2): 161-173.
- Li, Q., Wu, Y., Fang, S., Wang, L., Qi, H., Zhang, Y. et al. (2015). BCR/ABL oncogene-induced PI3K signaling pathway leads to chronic myeloid leukemia pathogenesis by impairing immuno-modulatory function of hemangioblasts. *Cancer Gene Therapy* 22: 227.
- Liddy, K.A., White, M.Y. and Cordwell, S.J. (2013). Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Medicine* 5(2): 20.
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C. and Grangeasse, C. (2016). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 40(1): 41-56.
- Matsuoka, T. and Yashiro, M. (2014). The role of PI3K/Akt/mTOR signaling in gastric carcinoma. *Cancers* 6(3): 1441.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F. et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773(8): 1263-1284.
- McEwan, D.G. and Dikic, I. (2011). The Three Musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol.* 21(4): 195-201.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A. and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 56.
- Mori, S., Nada, S., Kimura, H., Tajima, S., Takahashi, Y., Kitamura, A. et al. (2014). The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS ONE* 9(2): e88891.

- Mueckler, M. (2001). Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* 107(10): 1211-1213.
- Mukohara, T. (2015). PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer : Targets and Therapy* 7: 111-123.
- Muralidharan, S. and Mandrekar, P. (2013). Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol.* 94(6): 1167-1184.
- Nägga, K., Gottfries, J., Blennow, K. and Marcusson, J. (2002). Cerebrospinal fluid phospho-tau, total tau and β -amyloid (1–42) in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 14(4): 183-190.
- Nguyen, L.K., Matallanas, D., Croucher, D.R., von Kriegsheim, A. and Kholodenko, B.N. (2013). Signalling by protein phosphatases and drug development: a systems-centred view. *The FEBS journal* 280(2): 751-765.
- Niemi, N.M. and MacKeigan, J.P. (2013). Mitochondrial Phosphorylation in Apoptosis: Flipping the Death Switch. *Antioxid Redox Signal* 19(6): 572-582.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 2(3): 213-219.
- Offringa, R. and Huang, F. (2013). Phosphorylation-dependent trafficking of plasma membrane proteins in animal and plant cells. *J Integr Plant Biol.* 55(9): 789-808.
- Puttick, J., Baker, E.N. and Delbaere, L.T.J. (2008). Histidine phosphorylation in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1784(1): 100-105.
- Reddy, E.P. and Aggarwal, A.K. (2012). The ins and outs of Bcr-Abl inhibition. *Genes & Cancer* 3(5-6): 447-454.
- Rhind, N. and Russell, P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(10).
- Richter, M., Dayaram, T., Gilmartin, A.G., Ganji, G., Pemmasani, S.K., Van Der Key, H. et al. (2015). WIP1 phosphatase as a potential therapeutic target in neuroblastoma. *PLoS ONE* 10(2): e0115635.
- Roberts, P.J. and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66(2): 105-143.
- Ruest, P.J., Roy, S., Shi, E., Mernaugh, R.L. and Hanks, S.K. (2000). Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth Differ.* 11(1): 41-48.
- Samuel, F., Flavin, W.P., Iqbal, S., Pacelli, C., Sri Renganathan, S.D., Trudeau, L.-E. et al. (2016). Effects of serine 129 phosphorylation on α -synuclein aggregation, membrane association, and internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 291(9): 4374-4385.
- Samuels, Y. and Waldman, T. (2010). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Current topics in microbiology and immunology* 347: 21-41.
- Santarpia, L., Lippman, S.L. and El-Naggar, A.K. (2012). Targeting the mitogen-activated protein kinase RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 16(1): 103-119.
- Seyfried, T.N. and Huysentruyt, L.C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis* 18(1-2): 43-73.
- Shin, S., Wolgamott, L., Yu, Y., Blenis, J. and Yoon, S.-O. (2011). Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(47): E1204-E1213.
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology* 47(1): R1-R10.
- Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W.-J., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A. et al. (2009). Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen Group B streptococcus. *Journal of proteome research* 8(5): 2563-2574.
- Somanath, P.R., Razorenova, O.V., Chen, J. and Byzova, T.V. (2006). Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 5(5): 512-518.
- Steeg, P.S. and Theodorescu, D. (2008). Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 5(4): 206-219.

- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E. and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18: 189.
- Subramani, S., Jayapalan, S., Kalpana, R. and Natarajan, J. (2013). HomoKinase: a curated database of human protein kinases. *ISRN Computational Biology* 2013: 5.
- Suskiewicz, Marcin J. and Clausen, T. (2016). Chemical Biology Interrogates Protein Arginine Phosphorylation. *Cell Chemical Biology* 23(8): 888-890.
- Tamrakar, A.K., Maurya, C.K. and Rai, A.K. (2014). PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24(10): 1101-1115.
- Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes* 6(3): 456-480.
- Thomas, S.J., Snowden, J.A., Zeidler, M.P. and Danson, S.J. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British Journal of Cancer* 113(3): 365-371.
- Trost, B. and Kusalik, A. (2011). Computational prediction of eukaryotic phosphorylation sites. *Bioinformatics* 27(21): 2927-2935.
- Van Hoof, D., Munoz, J., Braam, S.R., Pinkse, M.W., Linding, R., Heck, A.J. et al. (2009). Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5(2): 214-226.
- Vincent, E.E., Elder, D.J.E., Thomas, E.C., Phillips, L., Morgan, C., Pawade, J. et al. (2011). Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 104(11): 1755-1761.
- Vintonyak, V.V., Antonchick, A.P., Rauh, D. and Waldmann, H. (2009). The therapeutic potential of phosphatase inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology* 13(3): 272-283.
- Wang, T.-Y., Chai, Y.-R., Jia, Y.-L., Gao, J.-H., Peng, X.-J. and Han, H.-F. (2016). Crosstalk among the proteome, lysine phosphorylation, and acetylation in romidepsin-treated colon cancer cells. *Oncotarget* 7(33): 53471-53501.
- Yamamoto, M., Kurosu, T., Kakiyama, K., Mizuchi, D. and Miura, O. (2004). The two major imatinib resistance mutations E255K and T315I enhance the activity of BCR/ABL fusion kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319(4): 1272-1275.
- Yap, T.A., Omlin, A. and Bono, J.S.d. (2013). Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *Journal of Clinical Oncology* 31(12): 1592-1605.
- Zaccai, J., Brayne, C., Matthews, F.E. and Ince, P.G. (2015). Alpha-synucleinopathy and neuropsychological symptoms in a population-based cohort of the elderly. *Alzheimer's Research & Therapy* 7(1): 19.
- Zhao, J. and Guan, J.-L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 28(1): 35-49.

