

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5680034

ชื่อโครงการ : โครงการผลการผ่าเหล่าของ BARD1 RING finger domain ต่ออันตรกิริยาและกระบวนการ ubiquitination

ชื่อหลักวิจัย : ผศ.ดร.อภิชาติ อธิไกริน มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
รศ.ดร.อดิสร รัตนพันธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address : apichart.at@wu.ac.th / apichart.at@mail.wu.ac.th
adisorn.r@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 มิถุนายน 2556 – 31 พฤษภาคม 2561

ยีน *BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1)* เป็นยีนด้านการเกิดมะเร็ง สามารถถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 777 กรดอะมิโน โดยโปรตีน BARD1 สามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีน Breast cancer susceptibility protein 1 (*BRCA1*) ตรงปลายด้านอะมิโนบริเวณ RING domain ในลักษณะ heterodimer ซึ่งส่งผลในการรักษาเสถียรภาพของจีโนมผ่านกระบวนการในระดับเซลล์ คือ กระบวนการ ubiquitination การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย การควบคุมวงจรของเซลล์ และกระบวนการทำลายตัวเอง ซึ่งการผ่าเหล่าของยีน *BARD1* มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ แต่ผลการผ่าเหล่าโดยเฉพาะชนิด missense ที่สัมพันธ์กับโรคมะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาผลการผ่าเหล่าของยีน *BARD1* ที่พบในผู้ป่วยจึงมีความสำคัญเพื่อทราบกลไกในระดับโมเลกุลของการเกิดโรค โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีน *BARD1* และ *BRCA1* การสร้างการผ่าเหล่า missense แบบต่างๆ บน RING domain ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน BARD1 และ BRCA1 และการทำหน้าที่เป็น E3 ubiquitin ligase ผลการศึกษาพบว่ายีน *BARD1* ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 211-1116 และยีน *BRCA1* ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 120-1031 ถูกโคลนเข้ากับพลาสมิด pBIND และ pACT ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างการผ่าเหล่า missense ของยีน *BARD1* และ *BRCA1* แบบต่างๆ และจากการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิดด้วย CheckMate mammalian two-hybrid system โดยติดตามสัญญาณจาก luciferase พบว่าการผ่าเหล่าของโปรตีน BARD1 คือ L44P, C50A, C83G, V85L, K153E, S241C, N295S และ K312N ซึ่งพบในตำแหน่ง Zn²⁺-binding site บริเวณ RING domain และนอกเหนือบริเวณ RING domain ยังคงเกิดอันตรกิริยากับโปรตีน BRCA1 ในขณะที่โปรตีน BARD1-L107P และ BRCA1-C61G สูญเสียความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทั้งสอง นอกจากนี้เมื่อโคลนยีน *BARD1* และ *BRCA1* เข้ากับพลาสมิด pGEX-4T1 และทำการสร้างการผ่าเหล่า missense แบบต่างๆ โปรตีนทั้งหมดถูกผลิตในเซลล์ *Escherichia coli* BL21(DE3) ทำโปรตีนดังกล่าวให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography และนำมาศึกษาการทำงานของ E3 ubiquitin ligase จากการศึกษพบว่าโปรตีน BARD1 ที่มีการผ่าเหล่าแบบต่างๆ คือ L44P, C50A, C83G,

V85L, K153E, S241C, N295S และ K312N ยังคงทำหน้าที่ในกระบวนการ ubiquitination เหมือนโปรตีนชนิด wild-type แต่การผ่าเหล่าชนิด BARD1-L107P และ BRCA1-C61G สูญเสียการทำหน้าที่เป็น E3 ubiquitin ligase ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของโปรตีนทั้งสองใน luciferase assay ทั้งนี้การผ่าเหล่าชนิด BARD1-L107P เกิดบนบริเวณ four-helix bundle การแทนที่กรดอะมิโน leucine ด้วย proline จะรบกวนการเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน valine14 และ alanine17 ของโปรตีน BRCA1 และการผ่าเหล่า BRCA1-C61G เกิดบนบริเวณ Zn^{2+} -binding site II การแทนที่กรดอะมิโน cysteine ด้วย glycine จะรบกวนการเกิดอันตรกิริยากับ Zn^{2+} และสูญเสียการจัดเรียงโครงสร้างของ Zn^{2+} -finger domain ซึ่งผลการผ่าเหล่าดังกล่าวจะขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน BARD1 และ BRCA1 จนไม่สามารถทำหน้าที่เป็น E3 ubiquitin ligase ซึ่งผลการศึกษาทำให้เข้าใจกลไกและพยาธิสภาพของการเกิดมะเร็งเต้านมมากขึ้น และสามารถนำความรู้มาพัฒนารูปแบบการรักษามะเร็งแก่ผู้ป่วยเฉพาะรายให้ได้รับผลการรักษาสูงสุดและลดอาการข้างเคียงจากการรักษา

คำหลัก : BARD1, BRCA1, E3 ubiquitin ligase, protein interaction, RING domain

Abstract

Project Code : TRG5680034

Project Title : Effects of the cancer-predisposing mutations on interaction and ubiquitination of the BARD1 RING finger domain

Investigator : Asst. Prof.Dr. Apichart Atipairin Walailak University
 Assoc.Prof.Dr.Adisorn Ratanaphan Prince of Songkla University

E-mail Address : apichart.at@wu.ac.th / apichart.at@mail.wu.ac.th
 adisorn.r@psu.ac.th

Project Period : 3 June 2013 – 31 May 2018

BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1) is a tumor suppressor gene that is encoded a protein of 777 residues. It can interact with Breast cancer susceptibility protein 1 (BRCA1) at the *NH*₂-terminal RING domain in the heterodimer manner. The BARD1 and BRCA1 complexes play a cellular role in genome stability maintenance such as ubiquitination, DNA repair, cell cycle checkpoint and apoptosis. *BARD1* gene mutation is predisposed to breast and ovarian cancers but the consequence of its missense mutation on cancer disease is unknown. Therefore, it is necessary to study the effect of *BARD1* gene mutations found in patients to elucidate the molecular mechanism of disease pathogenesis. The objectives of this research project is to clone *BARD1* and *BRCA1* genes, construct several missense mutations in the RING domain, study the interaction between BARD1 and BRCA1 proteins, and investigate the function of E3 ubiquitin ligase. The result showed that *BARD1* (nucleotide 211-1116) and *BRCA1* (nucleotide 120-1031) genes were cloned into pBIND and pACT, respectively. Several missense mutageneses of *BARD1* and *BRCA1* genes were performed. CheckMate mammalian two-hybrid system was used to determine the protein interaction by monitoring luciferase signaling. It found that the mutant BARD1 proteins (L44P, C50A, C83G, V85L, K153E, S241C, N295S and K312N) were located in the Zn²⁺-binding site and regions in and beyond the RING domain. They were still interacted with BRCA1 protein. In the other hands, BARD1-L107P and BRCA1-C61G were lost their abilities in the protein interaction. Furthermore, *BARD1* and *BRCA1* genes were cloned into pGEX-4T1 and many missense mutations were generated. All proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified by affinity chromatography. They were used to study the E3 ubiquitin ligase function. The result revealed that many BARD1 mutant proteins (L44P, C50A, C83G, V85L, K153E, S241C, N295S and K312N) still exhibited the

ubiquitination function when compared with the wild-type proteins. However, the mutant BARD1-L107P and BRCA1-C61G diminished the E3 ubiquitin ligase activity. This was consistent with previous result on the study of protein interaction by luciferase assay. BARD1-L107P was in the four-helix bundle and its substitution of leucine with proline would disrupt its binding to valine14 and alanine17 of BRCA1. In addition, BRCA1-C61G was in the Zn^{2+} -binding site II and its replacement of cysteine with glycine affected the Zn^{2+} binding and protein conformation of Zn^{2+} -finger domain. These two mutations disrupted BARD1-BRCA1 interaction and function of E3 ubiquitin ligase. This study provides more understanding in mechanism and pathogenesis of breast cancer. The knowledge will be utilized to develop the personalized medicine for cancer patients and reduce the side effect of the drugs.

Keywords : BARD1, BRCA1, E3 ubiquitin ligase, protein interaction, RING domain