



# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการผ่าเหล่าชนิด D67E ในโปรตีน BRCA1  
ต่อการจดจำของโปรตีน BARD1 และ ubiquitin (Ub) ligase activity  
Effect of D67E mutation in BRCA1  
on BARD1 recognition and ubiquitin (Ub) ligase activity

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. อติศร รัตนพันธ์

## ABSTRACT

The BRCA1 protein participates in genomic integrity maintenance through DNA repair, cell cycle checkpoint, protein ubiquitination, and transcriptional regulation. The N-terminus of BRCA1 contains a RING domain which forms two Zn<sup>2+</sup> binding sites in an interleaved fashion. A number of deleterious BRCA1 missense mutations, which predispose an individual to a subset of hereditary breast and ovarian cancers, have been identified in the RING domain. An unprecedented D67E BRCA1 mutation, identified in Thai familial breast cancer patients, is located in the vicinity of Zn<sup>2+</sup> binding site II, and its pathogenic significance remains elusive. The present study revealed that the D67E BRCA1 RING protein assumes a preformed structure in the absence of Zn<sup>2+</sup>. The Zn<sup>2+</sup>-bound mutant protein was more folded, resulting in enhanced proteolytic resistance and dimerization. This indicated that the mutation retained Zn<sup>2+</sup> binding, and barely perturbed the native global structure of the BRCA1 RING domain. The complex between D67E BRCA1 and BARD1 RING domains exhibited a substantial ubiquitin ligase activity compared with a defective complex containing the C61G BRCA1 mutation. However, the D67E mutation was slightly less stable toward thermal denaturation. This implies that the D67E mutation might be a neutral or mild cancer-risk modifier of other defective mechanisms underlying BRCA1-mutation-related breast cancer.

## บทคัดย่อ

โปรตีนบีอาร์ซีเอวันทำหน้าที่ในการรักษาเสถียรภาพของจีโนม โดยอาศัยกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย การควบคุมวงรอบชีวิตของเซลล์ กระบวนการ ubiquitination และการควบคุมการถอดรหัส บริเวณด้านปลายอะมิโนของโปรตีนบีอาร์ซีเอวันเป็นส่วนที่เรียกว่า RING domain ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวเพื่อจับกับโลหะสังกะสี 2 ตัว การผ่าเหล่าแบบ missense ในบริเวณ RING domain จำนวนมากมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่แบบที่มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ โปรตีนบีอาร์ซีเอวันที่มีการผ่าเหล่าแบบ D67E (D67E BRCA1) ซึ่งพบเฉพาะในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นมะเร็งเต้านมอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับกรดอะมิโนที่จับกับโลหะสังกะสีและความสำคัญของการผ่าเหล่าชนิดนี้กับการก่อโรคมะเร็งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผ่าเหล่าแบบ D67E ทำให้โปรตีนบีอาร์ซีเอวันในส่วน RING domain ยังคงรูปอยู่ได้แม้อยู่ในสภาวะปราศจากโลหะสังกะสี โปรตีนผ่าเหล่าชนิดนี้ในสภาวะที่มีโลหะสังกะสีมีการม้วนตัวที่มากขึ้นซึ่งทำให้คงตัวต่อการถูกย่อยสลายและเป็น dimer เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการผ่าเหล่าชนิดนี้ไม่ได้รับกวนความสามารถในการจับกับโลหะสังกะสีและโครงสร้างโดยรวมของโปรตีนบีอาร์ซีเอวันในส่วน RING domain อย่างไรก็ตาม D67E BRCA1 ทำให้ความคงตัวต่อความร้อนลดลงเล็กน้อยและการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ubiquitin ligase ร่วมกับ BARD1 ยังคงเหมือนเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนบีอาร์ซีเอวันที่มีการผ่าเหล่าแบบ C61G (C61G BRCA1) ที่สูญเสียการทำหน้าที่ดังกล่าว ดังนั้นโปรตีนบีอาร์ซีเอวันที่มีการผ่าเหล่าแบบ D67E ซึ่งพบเฉพาะในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นมะเร็งเต้านมอาจเป็น neutral หรือ mild cancer-risk modifier โดยผ่านกลไกที่มีความบกพร่องอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนบีอาร์ซีเอวันที่ผ่าเหล่า