

Abstract

Project Code: MRG5680015

Project Title: Role of p73 in the induction of cell death by inhibition of Aurora kinases in oral squamous cell carcinoma cell lines

Investigators: Asst. Prof. Dr. Poramaporn Klanrit Khon Kaen University

Dr. Poramate Klanrit Khon Kaen University

Prof. Dr. Temduang Limpai boon Khon Kaen University

E-mail Address: porakla@kku.ac.th

Project Period: 2 years

The purposes of this study were 1) to investigate the expression of Aurora kinase family members including Aurora-A, Aurora-B and Aurora-C as well as p73 isoforms in p53-mutated oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines, ORL-48T and ORL-136T as compared with normal human gingival epithelial cells by real-time reverse transcription PCR and Western blot analysis, 2) to investigate the induction of cell death by inhibition of Aurora kinases using the MTT assay and 3) to investigate whether the levels of p73 were affected by Aurora kinase inhibitor in OSCC cell lines using real-time reverse transcription PCR. ORL-136T, but not ORL-48T, expressed a significant increase in mRNA and protein levels of Aurora-A as compared to normal gingival epithelial cells. Although ORL-136T did not demonstrate a significantly increased level of Aurora-B mRNA, this cell line demonstrated a remarkable higher level of Aurora-B protein than normal gingival epithelial cells. Furthermore, ORL-136T expressed a significant higher level of Aurora-C mRNA than ORL-48T and normal gingival epithelial cells. In addition, ORL-48T and ORL-136T expressed higher mRNA levels of p73 isoforms, including TAp73, $\Delta N'p73$, $\Delta Ex2p73$, and $\Delta Ex2/3p73$, than normal gingival epithelial cells. Both oral cancer cell lines expressed TAp73 and $\Delta Np73$ protein and they expressed higher level of $\Delta Np73$ protein than normal gingival epithelial cells. Pan-Aurora kinase inhibitor CCT137690 can inhibit growth of both OSCC cell lines with ORL-136T were more resistant to this drug than ORL-48T. However, CCT137690 showed a cytotoxic effect to normal gingival epithelial cells. Furthermore, CCT137690-treated ORL-48T cells showed a significant decrease in the mRNA levels of $\Delta Np73$ and $\Delta Ex2/3p73$. However, CCT137690-treated ORL-136T cells which were more resistant showed a significant increase in the mRNA levels of $\Delta Ex2/3p73$ and $\Delta Ex2p73$. In conclusion, Aurora kinases and p73 isoforms are aberrantly expressed in these two OSCC cell lines. These data support an essential role of Aurora kinases and p73 isoforms in

tumourigenesis of oral cancer. Pan-Aurora kinase inhibitor can inhibit growth of OSCC cells; however, the specificity is not high. The anti-growth property of this small molecule inhibitor against sensitive cells might be due to its ability to reduce the expression of oncogenic Δ Np73 and Δ Ex2/3p73. Further study is required to elucidate the underlying mechanism by which Aurora kinase inhibitor used to inhibit OSCC cells.

Keywords: Aurora kinases, Cell death, Oral cancer, p73

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5680015

ชื่อโครงการ: บทบาทของ p73 ต่อการตายของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสโดยการยับยั้ง Aurora kinases

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผศ.ดร. ประมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.ดร. ประเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ.ดร. เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมล: porakla@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาการแสดงออกของออโรราไคเนสแฟมิลีเมมเบอร์ ได้แก่ ออโรรา-เอ ออโรรา-บี และออโรรา-ซี รวมทั้งฟิเจตลิบสามไอโซฟอร์มในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์ (ORL-48T, ORL-136T) โดยเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ ด้วยวิธีเรียลไทม์รีเวอร์สทรานสคริปชัน พีซีอาร์และวิธีเวสเทิร์นบลอต 2) ศึกษาการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์จากการยับยั้งออโรราไคเนสด้วยวิธีเอ็มทีที และ 3) ศึกษาการทำงานของฟิเจตลิบสามไอโซฟอร์มจากการยับยั้งออโรราไคเนสด้วยตัวยับยั้งออโรราไคเนสด้วยวิธีเรียลไทม์รีเวอร์สทรานสคริปชัน พีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ ORL-136T พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ ออโรรา-เอ เอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีน เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ แม้ว่าเซลล์ ORL-136T ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ ออโรรา-บี เอ็มอาร์เอ็นเอ แต่พบว่ามีระดับการแสดงออกของออโรรา-บี โปรตีนสูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ และเซลล์ ORL-136T ยังมีระดับการแสดงออกของออโรรา-ซี เอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่สูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์และ ORL-48T ด้วย นอกจากนี้ ORL-48T และ ORL-136T มีระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของฟิเจตลิบสามไอโซฟอร์ม ได้แก่ TAp73, $\Delta N'p73$, $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ ที่สูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ และพบการแสดงออกของโปรตีน TAp73 และ $\Delta Np73$ ในเซลล์มะเร็งช่องปากทั้งสองเซลล์ โดยมีระดับการแสดงออกของโปรตีน $\Delta Np73$ ที่สูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยตัวยับยั้งออโรราไคเนส CCT137690 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด โดย ORL-136T จะทนต่อความเป็นพิษจาก CCT137690 ได้มากกว่า ORL-48T อย่างไรก็ตาม CCT137690 ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ นอกจากนี้เซลล์ ORL-48T ที่สัมผัสกับ CCT137690 มีการลดลงของระดับการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ $\Delta Np73$ และ $\Delta Ex2/3p73$ ในขณะที่เซลล์ ORL-136T ซึ่งทนต่อความเป็นพิษจาก CCT137690 พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ $\Delta Ex2/3p73$ และ $\Delta Ex2p73$ เอ็มอาร์เอ็นเอ โดยสรุป เซลล์มะเร็งช่องปากทั้งสองเซลล์มีการแสดงออกที่ผิดปกติของออโรราไคเนสและฟิเจตลิบสามไอโซฟอร์ม ผลการศึกษานี้ยืนยันบทบาทของออโรราไคเนสและฟิเจตลิบสามไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของมะเร็งช่องปาก ตัวยับยั้งออโรราไคเนสแบบไม่จำเพาะ

สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ อย่างไรก็ตามยังคงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ความสามารถของตัวยับยั้งออโรราไคเนสในการยับยั้งการเจริญในเซลล์ที่ไวต่อยานี้อาจเป็นผลบางส่วน จากการลดระดับการแสดงออกของ $\Delta Np73$ และ $\Delta Ex2/3p73$ ซึ่งมีคุณสมบัติส่งเสริมการเกิดมะเร็ง การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตมีความจำเป็นเพื่อวิเคราะห์หากลไกที่ตัวยับยั้งออโรราไคเนสใช้ในการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก

คำหลัก : ออโรราไคเนส, การตายของเซลล์, มะเร็งช่องปาก, พีเจ็ดสิบสาม