ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47239

MOLECULAR MECHANISM OF PROTEIN KINASE A REGULATORY SUBUNIT 1 ALPHA (PRKAR1A) AS A DRUG TARGET FOR TREATMENT OF CHOLANGIOCARCINOMA

MISS SIRINUN JUNTANA

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

KHON KAEN UNIVERSITY

2010

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47239
b00254163

MOLECULAR MECHANISM OF PROTEIN KINASE A REGULATORY SUBUNIT 1 ALPHA (PRKAR1A) AS A DRUG TARGET FOR TREATMENT OF CHOLANGIOCARCINOMA

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

MISS SIRINUN JUNTANA

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2010

MOLECULAR MECHANISM OF PROTEIN KINASE A REGULATORY SUBUNIT 1 ALPHA (PRKAR1A) AS A DRUG TARGET FOR TREATMENT OF CHOLANGIOCARCINOMA

MISS SIRINUN JUNTANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MEDICAL BIOCHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

MASTER OF SCIENCE

IN MEDICAL BIOCHEMISTRY

Thesis Title: Molecular mechanism of protein kinase A regulatory subunit 1 alpha (PRKAR1A) as a drug target for treatment of cholangiocarcinoma

Author: Miss Sirinun Juntana

Thesis Examination Committee:

Assoc. Prof. Dr. Wichittra Tassaneeyakul	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Tuangporn Suthiphongchai	Member
Assoc. Prof. Vajarabhongsa Bhudhisawasdi	Member
Dr. Watcharin Loilome	Member
Assoc. Prof. Dr. Puangrat Yongvanit	Member
Asst. Prof. Dr.Nisana Namwat	Member

Thesis Advisors:

P. Yongvanit ..... Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Puangrat Yongvanit)

N. Namwat ..... Co-Advisor

(Asst. Prof. Dr. Nisana Namwat)

L. Manmart .....

(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

Pisake Lumbiganon .....

(Prof. Pisake Lumbiganon)
Dean, Faculty of Medicine

Copyright of Khon Kaen University

สิรินันท์ จันทนา. 2553. **กลไกการทำงานระดับโมเลกุลของ protein kinase A regulatory subunit 1 alpha (PRKAR1A) เพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. พวงรัตน์ ยงวณิชย์, ผศ. ดร. นิษณา นามวาท

บทคัดย่อ

E 47239

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีซึ่งถือเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โรคมะเร็งชนิดนี้มีลักษณะการดำเนินโรคที่ค่อนข้างช้า (slow progression) ทำให้กว่าจะสามารถตรวจพบได้ ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ก็อยู่ในระยะสุดท้ายหรือมีการแพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆแล้ว ส่งผลให้การรักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควรและมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในกระบวนการก่อมะเร็ง จึงเป็นแนวทางการวิจัยหนึ่งที่ตรงเป้าเพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีประสิทธิภาพ คณะวิจัยของเราได้ค้นพบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน PRKAR1A ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีในตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วยพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*, Ov) และสาร *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน PRKAR1A น่าจะมีบทบาทในการก่อมะเร็งและสามารถใช้เป็นเป้าหมายของยาในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในอนาคตได้

PRKAR1A เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยควบคุมของ Protein kinase A type I (PKAI) และพบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งหลายชนิดซึ่งรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของโปรตีน PRKAR1A ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการทำงานในระดับโมเลกุลของ PRKAR1A/PKAI ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อีกทั้งการยับยั้งโปรตีนดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีได้หรือไม่ โดยจากการศึกษาการแสดงออกของ PRKAR1A ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ PRKAR1A ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ในขณะที่พบการแสดงออกของ PRKAR2B ในระดับ mRNA ลดลง และไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PRKAR2B นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการศึกษาบทบาทของ PRKAR1A ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการเจริญเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เทคโนโลยีทางด้าน shRNA

E 47239

เพื่อลดปริมาณการแสดงออกของ PRKAR1A แบบถาวรในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและพบว่าการลดปริมาณการแสดงออกของ PRKAR1A ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญโดยมีกลไกการยับยั้งการกระตุ้นผ่านทาง MAPKs และ PI3K/Akt pathway นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งการทำงานของ PKA ซึ่งได้แก่ H89, 8-Cl-cAMP และ 8-Br-cAMP พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และการลดการแสดงออกของ PRKAR1A ร่วมกับการให้สารยับยั้งในกลุ่ม protein kinase หรือยาเคมีบำบัดให้ผลเสริมฤทธิ์กันในลักษณะ additive ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้พบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ PRKAR1A และกลไกการทำงานระดับโมเลกุลของ PRKAR1A/PKAI ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อีกทั้งพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญซึ่งส่งผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานของสารยับยั้งมะเร็งต่างๆ ดังนั้นโปรตีน PRKAR1A อาจใช้เป็นเป้าหมายของยาในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีโดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารยับยั้งมะเร็งอื่นๆเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี

Sirinun Juntana. 2010. **Molecular Mechanism of Protein Kinase A Regulatory Subunit 1 Alpha (PRKAR1A) as a Drug Target for Treatment of Cholangiocarcinoma.** Master of Science Thesis in Medical Biochemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Puangrat Yongvanit,
Asst. Prof. Dr. Nisana Namwat

ABSTRACT

E 47239

Cholangiocarcinoma (CCA), the malignant tumor arising from bile duct epithelia, is the common cancer and a major public health problem in northeast Thailand. CCA is a slow progression disease and difficult to diagnose until the disease becomes an advanced or metastatic stage, at which the prognosis is poor. Recently, gene expression profiles of *Opisthorchis viverrini* (Ov)-associated CCA carcinogenic model indicate that protein kinase A regulatory subunit 1 alpha (PRKAR1A) is significantly upregulated in tumor tissue suggesting that this particular protein might play role(s) in Ov associated CCA and may serve as a potential drug target for CCA treatment.

PRKAR1A, the regulatory subunit of protein kinase A type I (PKAI), is overexpressed in varieties of tumors and cancer cell lines including CCA, although its role in CCA growth modulation is unclear. Therefore, this study aimed to investigate the molecular mechanism by which PRKAR1A/PKAI associated with human CCA development as well as to elucidate whether PRKAR1A/PKA is suitable to be the potential target for inhibiting CCA cell growth.

Real time PCR demonstrated an increased mRNA expression of PRKAR1A/PKAI, whereas PRKAR2B/PKAII was down-regulated in human CCA cell lines. In accordance with mRNA level, CCA cell lines showed abundantly expressed PRKAR1A, while lacking PRKAR2B expression. To address the functional importance of PRKAR1A, shRNAs was employed to stably deplete the expression of PRKAR1A in CCA cell lines. Silencing PRKAR1A expression significantly induced growth inhibition and apoptosis of CCA cells, with an associated decrease in MAPKs and PI3K/Akt pathway signaling. The inhibition of PKA using a PKA inhibitor (H89)

E47239

and cAMP analogues (8-Cl-cAMP, 8-Br-cAMP), also led to a significant cell growth inhibition. Moreover, we have demonstrated a relevant additive effect toward tumor cell growth inhibition as well as apoptosis induction can be achieved *in vitro* by combining PRKAR1A silencing with protein kinase inhibitors as well chemotherapeutic drugs.

In conclusion, this study reports the overexpression as well as molecular mechanisms by which PRKAR1A/PKAI regulates human CCA cell growth. Importantly, abrogation of PRKAR1A expression caused significant CCA cell growth inhibition, oncogenic signaling and coupled apoptosis induction, hence enhance the cytotoxicity of anticancer drugs. Our study suggests that PRKAR1A can be a potential drug target for CCA therapy either as single-drug or in combination with other anticancer drugs.

Goodness portion to the present thesis is dedicated to my advisors, my family, and entire teaching staffs.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Puangrat Yongvanit, for providing me a good opportunity to study in this field, her kind supervisor, valuable ideas, encouragement and helpfulness throughout my study.

Deep admiration and appreciation are extended to my co-advisors, Assistant Professor Dr. Nisana Namwat for kindness, valuable advice and constructive comments. My sincere thankful is also expressed to Dr. Watcharin Loilome who instruct, advice and support as well as take a very good care of me.

I would like to express my faithful and sincere thankfulness to Professor Dr. Gregory J Riggins, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA for his kindness in providing me a good opportunity to work in his laboratory and giving me the valuable advice, comments and suggestions. I would like to express also my appreciation to all members in his laboratory for their friendship, helpfulness and providing me a chance to join every activity during my work aboard. I wish to express my sincere thankfulness to Associate Prof. Vajarabhongsa Bhudhisawasdi, Associate Prof. Dr. Wichittra Tassaneeyakul and Associate Professor Dr. Tuangporn Suthiphongchai for serving as my external examiners and providing the valuable suggestions and comments.

I would like to express my gratitude to all research fundings which supported My study including the scholarship from the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center and Grants from University Mobility in Asia and the Pacific (UMAP) for the scholarship to be in USA.

Grateful is expressed to all staffs and graduate students of the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, especially members of BC6 laboratory, Department of Biochemistry, for their friendship and kindness throughout my study. Special thank is to Dr. Chutima Subimurb for her kind suggestions in flow cytometric practice.

Finally, I wish to express my gratitude and truly appreciation to my family, for their love, cheerfulness and devoting throughout my life. Thankfulness is extended to my friends, Miss Apinya Jusakul, Miss Janpen Puetkasichonpasutha, Miss Sasithorn Yooyuen and Miss Sirinapa Sribenja who are always beside me and cheering me up.

Sirinun Juntana

TABLE OF CONTENTS

		Page
ABTRACT (IN THAI)		i
ABTRACT (IN ENGLISH)		iii
DEDICATION		v
ACKNOWLEDGEMENTS		vi
LIST OF TABLES		ix
LIST OF FIGURES		x
LIST OFABBREVIATION		xii
CHAPTER I	INTRODUCTION	1
	1.1 Background and rationale of the study	1
	1.2 Research questions	4
	1.3 Scope of the study	4
	1.4 Conceptual framework	5
	1.5 Objectives	6
	1.6 Statistical analysis	7
	1.7 Location of research conduction	7
	1.8 Anticipated outcomes	7
CHAPTER II	PART I: PRKAR1A IS OVEREXPRESSED AND REPRESENTS A THERAPEUTIC TARGET IN HUMAN CHOLANGIOCARCINOMA	8
	2.1 Introduction	8
	2.2 Materials and methods	14
	2.3 Results	21
	2.4 Discussion	33

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

			Page
CHAPTER III	PART II: ANTIPROLIFERATIVE EFFECT INDUCED BY TARGETING OF PRKAR1A/PKAI IN COMBINATION WITH CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS OR PROTEIN KINASE INHIBITORS ON HUMAN CHOLANGIOCARCINOMA CELL LINES		38
	3.1 Introduction		38
	3.2 Materials and methods		40
	3.3 Results		43
	3.4 Discussion		50
CHAPTER IV	CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES		52
	4.1 Conclusion		52
	4.2 Suggestions for further study		54
REFERENCES			55
APPENDICES			66
	APPENDIX A	Reagents for laboratory experiments	67
	APPENDIX B	Supplementary data	75
	APPENDIX C	Researchpublications & Presentations	89
VITAE			91

TABLE OF TABLES

		Page
Table 2.1	Mission™ TRC-Hs (Human) clone sets of sequence-verified shRNA lentiviral plasmid vectors against PRKAR1A	16
Table 2.2	List of differential expressed proteins related to PRKAR1A suppression in CCA cell lines	27
Table 2.3	IC_{10} values of PKA inhibitors in four CCA cell lines	32
Table 3.1	IC_{50} values of combination treatment of shPRKAR1A and protein kinase inhibitors or chemotherapeutic drugs	47
Table B.1	Effect of PRKAR1A silencing cells in combination with protein kinase inhibitors or chemotherapeutic drugs on CCA cells growth inhibition. This table represents growth inhibitory effect of either each agent alone or in combination and the expected percentage growth inhibition if drugs are additive when used in the combination	81
Table B.2	Effect of PRKAR1A silencing cells in combination with protein kinase inhibitors or chemotherapeutic drugs on induction of apoptosis. This table represents percentage apoptosis of either each agent alone or in combination and the expected percentage apoptosis if drugs are additive when used in the combination	86

TABLE OF FIGURES

		Page
Figure 1.1	The scope of the study to prove the possible mechanism of PRKAR1A/PKAI in cholangiocarcinoma	5
Figure 1.2	The conceptual framework of this study	6
Figure 2.1	Structure of regulatory and catalytic subunits of protein kinase A	8
Figure 2.2	A cAMP/PKA signaling pathway	11
Figure 2.3	Expression of PKA subunits mRNA and protein in CCA cell lines	22
Figure 2.4	PRKAR1A suppression in CCA cell lines by shPRKAR1A	23
Figure 2.5	Cell morphology of PRKAR1A stable knockdown	24
Figure 2.6	Effect of PRKAR1A silencing on PKA activity	24
Figure 2.7	The phospho-kinase array of PRKAR1A silencing cell, (A) M156 and (B) OCA17	26
Figure 2.8	The possible molecular mechanism of PKAI in M156	28
Figure 2.9	The possible molecular mechanism of PKAI in OCA17	29
Figure 2.10	Effect of shPRKAR1A on cell proliferation and cell cycle regulation proteins	30
Figure 2.11	Effect of shPRKAR1A on (A) caspase 3/7 activity and (B) apoptotic proteins. Relative caspase level was assayed in comparison to empty viral transfection control	30
Figure 2.12	The PKA inhibitor and cAMP analogues reduce CCA cell proliferation	32
Figure 3.1	Antiproliferative effect of shPRKAR1A and protein kinase inhibitors in CCA cell lines	44
Figure 3.2	Antiproliferative effect of shPRKAR1A and chemotherapeutic drugs in CCA cell lines	46
Figure 3.3	Flow cytometric analysis of combination treatment on apoptosis. shPRKAR1A in combination with 10 μM sorafenib (B) or 20 μM 5-FU (C) in M156 and OCA17	48

TABLE OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 3.4	The effect of combination treatment of shPRKAR1A and sorafenib or 5-FU on apoptosis	49
Figure B.1	Effect of shPRKAR1A on PRKACA expression	76
Figure B.2	Growth curve of PRKAR1A silencing cells in M156 (A) and OCA17 (B)	76
Figure B.3	Antiproliferative effect of 8-Cl-cAMP and protein kinase inhibitors in CCA cell lines	77
Figure B.4	Antiproliferative effect of 8-Br-cAMP and protein kinase inhibitors in CCA cell lines	78
Figure B.5	Effect of shPRKAR1A in combination with 1μM and 10μM sunitinib on induction of apoptosis in M156(A) and OCA17(B)	79
Figure B.6	Percentage of apoptosis of shPRKAR1A in combination with sunitinib in M156(A) and OCA17(B)	80
Figure B.7	Effect of shPRKAR1A in combination with 1μM sorafenib on induction of apoptosis in M156(A) and OCA17(B)	80
Figure B.8	Effect of shPRKAR1A in combination with 10μM 5-FU on induction of apoptosis in M156 (A) and OCA17(B)	81
Figure B.9	Human CCA cell lines which were used in this study	87

LIST OF ABBREVIATIONS

µl	microliter
µM	micromolar
°C	degree celsius
RIPA	Radioimmuno precipitation assay
CCA	cholangiocarcinoma
cDNA	complementary DNA
CO_2	carbon dioxide
FBS	Fetal bovine serum
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii/alia (Latin), and other people or things
PRKAR1A	protein kinase A regulatory subunit 1 alpha
PRKAR2B	protein kinase A regulatory subunit 2 beta
PKAI	protein kinase A type 1
PKAII	protein kinase A type 2
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
cAMP	Cyclic AMP
5-FU	5-Fluorouracil
h	hour
kDa	kilodalton
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
NDMA	*N*-nitrosodimethylamine

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

ng	nanogram
xg	relative centrifugal force
Ov	*Opisthorchis viverrini*
PBS	phosphate-buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
FITC	fluorescein isothiocyanate
SRB	sulforhodamine B
PVDF	polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sec	second
siRNA	small interfering RNA
shRNA	small hairpin RNA
DMSO	Dimethyl sulfoxide