

Praca poglądowa/Review paper

# Interferencja RNA jako potencjalne narzędzie w terapii genowej nowotworów rejonu głowy i szyi

## RNAi as a potential tool in gene therapy of head and neck cancer

Agnieszka Sobecka<sup>1,2</sup>, Wojciech Barczak<sup>1,2</sup>, Wiktoria Maria Suchorska<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Radiobiologii, Zakład Fizyki Medycznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Elektroradiologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii

### Streszczenie

Rak płaskonabłonkowy rejonu głowy i szyi (HNSCC, ang. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) jest szóstym najczęściej występującym nowotworem na świecie. Leczenie tego typu nowotworów polega głównie na stosowaniu metod chirurgicznych uzupełnionych pooperacyjną chemio- i/lub radioterapią. Prowadzone są też badania nad zastosowaniem terapii genowej poprzez wykorzystanie zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. RNA interference). RNAi jest efektywnym narzędziem w terapii wielu chorób, takich jak zakażenia wirusowe, cukrzyca czy choroby neurodegeneracyjne. Wykazano, że cząsteczki siRNA (krótkie interferujące RNA, ang. small interfering RNA) oraz miRNA (mikroRNA, ang. microRNA) zaangażowane są w regulację wielu patologicznych procesów zachodzących podczas nowotworzenia. RNAi stała się zatem cennym narzędziem badawczym pozwalającym na lepsze poznanie mechanizmów regulujących patogenezę raka. Uważa się również, że dzięki swojej wysokiej specyficzności, zjawisko RNAi może być użytecznym narzędziem w terapii genowej nowotworów. Niniejsza praca stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat badań przedklinicznych sugerujących możliwość wykorzystania RNAi w leczeniu nowotworów rejonu głowy i szyi. W pracy dokonano również krótkiego podsumowania trwających obecnie prób klinicznych z zastosowaniem RNAi w terapii innych typów nowotworów.

### Abstrakt

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), the sixth most common cancer worldwide, represents over half a million cases every year. The treatment of choice in the case of head and neck cancer is surgery, followed by chemo- or/and radiotherapy. RNA interference (RNAi) is a potentially effective and useful

Adres do korespondencji

dr n. med. Wiktoria M. Suchorska

Pracownia Radiobiologii

Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, Polska

e-mail: [wiktoria.suchorska@wco.pl](mailto:wiktoria.suchorska@wco.pl), tel.: +48 61 88 50 474

instrument in therapy of many diseases, including viral infections, diabetes and neurodegenerative diseases. It has been shown that siRNA and miRNA molecules are involved in many pathological processes in cancer development. Thus, RNAi has become an interesting research tool, which allows a better understanding of mechanisms involved in the regulation of cancerogenesis. Considering its advantages (including high specificity and efficacy), RNAi is believed to be a potentially useful tool in cancer therapy. This review presents current knowledge about preclinical studies suggesting possibility of RNAi usage in HNSCC treatment. In this work we also summarized pending clinical trials on RNAi application in therapy of other neoplasms.

*Słowa kluczowe:* nowotwory głowy i szyi, RNAi, siRNA, miRNA, terapia genowa

*Keywords:* head and neck cancers, RNA interference, gene therapy, siRNA, miRNA

## Wstęp

Rak płaskonabłonkowy rejonu głowy i szyi (HNSCC, ang. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) jest szóstym pod względem częstości nowotworem na świecie, stanowiącym około 500 tys. zachorowań w skali roku (1,2). Badania epidemiologiczne wykazały, że ekspozycja na kancerogeny, takie jak dym tytoniowy czy alkohol, związana jest z podwyższonym prawdopodobieństwem zachorowania na HNSCC. Do czynników ryzyka należą również zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. Human Papilloma Virus) ze szczególnym uwzględnieniem typów HPV16 i HPV18 (2 – 6). Leczenie HNSCC polega na stosowaniu metod chirurgicznych uzupełnionych pooperacyjną chemio- i/lub radioterapią (1,7, 8). Mimo znaczącego rozwoju tych metod terapeutycznych, 5-letnie przeżycie wśród chorych na HNSCC nie uległo poprawie (2). Konieczne stało się zatem opracowanie alternatywnych sposobów leczenia, wśród których rosnące zainteresowanie zyskują metody molekularne, takie jak terapia genowa.

Interferencja RNA (RNAi, ang. RNA interference) jest naturalnym procesem, który gwarantuje komórce ochronę genomu przed wirusami i transpozonami (9). Zjawisko to polega na wyciszaniu genów na drodze degradacji lub hamowania ekspresji ich transkryptu przez egzogeny lub endogenne dsRNA (dwuniciowy RNA, ang. double-stranded RNA). Wykazano, że dwuniciowa cząsteczka RNA ma zdolność do bardziej efektywnego wyciszania genów niż ma to miejsce w przypadku cząsteczki jednoniciowej. W pierwszym etapie procesu RNAi wprowadzone do komórki cząsteczki dsRNA są hydrolizowane przez enzym Dicer do krótkich cząsteczek siRNA o długości około 21-23 par zasad. Każda z nici siRNA posiada grupę fosforanową na końcu 5' oraz grupę hydroksylową na 2-3-nukleotydowym, lepkiem końcu 3'. W kolejnym etapie sensowna nić siRNA ulega degradacji, natomiast nić antysensowna wiąże się z kompleksem RISC (ang. RNA - induced silencing complex), uczestnicząc w jego aktywacji. Kompleks ten kierowany jest do docelowej cząsteczki mRNA, po czym wchodzące w jego skład białko Argonaua o aktywności RNAzy H katalizuje degradację transkryptu. W efekcie tego procesu dochodzi do wyciszenia ekspresji genu (10 – 20).

Interferencja RNA może stanowić efektywne narzędzie w terapii genowej. Wciąż istnieje jednak potrzeba stworzenia wydajnych systemów jej zastosowania – zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Systemy te powinny charakteryzować się wysoką specyficznością wobec danego typu komórki czy tkanki. Istotną kwestię stanowi również wyeliminowanie ryzyka wystąpienia odpowiedzi immunologicznej (21). Aktualnie wyróżnia się dwa główne typy systemów umożliwiających wprowadzanie egzogennej RNA do wnętrza komórki: wirusowe (z zastosowaniem retrowirusów, adenowirusów i wirusów związanych z adenowirusami (AAV, ang. Adeno-Associated Virus) (22-26) oraz nie wirusowe (27, 28).

Celem niniejszej pracy jest przegląd aktualnej literatury dotyczącej użyteczności zjawiska interferencji RNA w terapii nowotworów rejonu głowy i szyi.

### **RNAi w terapii nowotworów rejonu głowy i szyi - badania przedkliniczne**

### **siRNA skierowane przeciw HIF1 $\alpha$ skojarzone z terapią fotodynamiczną jako potencjalna strategia terapeutyczna w terapii nowotworów rejonu głowy i szyi**

HIF1 (czynnik 1 indukowany hipoksją, ang. hypoxia inducible factor 1) jest istotnym czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w regulację odpowiedzi komórki na warunki niedoboru tlenu (hipoksji). HIF1 jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek: HIF1 $\alpha$  i HIF1 $\beta$ . Należy do czynników

transkrypcyjnych z tzw. rodziny bHLH (Helisa-Pętla-Helisa, ang. basic helix-loop-helix). W warunkach normoksji HIF1 $\alpha$  jest niezwłocznie degradowany przy udziale PHD (hydroksylaza prolinowa, ang. prolinę hydroxylase) hydroksylującej prolinę w pozycjach 402 i 564. Hydroksylowana forma HIF1 $\alpha$  jest rozpoznawana przez pVHL (białko von Hippel-Lindau, ang. von Hippel-Lindau tumor suppressor) będące częścią kompleksu ligazy ubikwityny, a następnie podlega degradacji w proteasomie. W warunkach hipoksji HIF1 $\alpha$  zostaje przetransportowany do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z podjednostką HIF1 $\beta$ , tworząc heterodimer HIF1. Podjednostka  $\beta$  (zwana także ARNT, ang. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) specyficznie wiąże się do HREs (elementy odpowiedzi na hipoksję, ang. hypoxia-response elements) znajdujących się w promotorach genów regulowanych stężeniem tlenu. Utworzenie heterodimerów HIF1 skutkuje aktywacją transkrypcji szeregu genów (VEGF, GLUT-1, CAIX) zaangażowanych w procesy samoodnowy, przerzutowania i angiogenezy, co z kolei może przyczyniać się do zwiększonej progresji nowotworowej i wykształcenia oporności na leczenie. HIF1 pełni zatem kluczową rolę w kancerogenezie, gwarantując nowotworowym komórkom macierzystym w warunkach hipoksji nieograniczoną zdolność do samoodnowy (29-33).

Chen i wsp. (2014) badali możliwość wykorzystania wyciszenia genu HIF1 $\alpha$  skojarzonego z terapią fotodynamiczną w leczeniu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC, ang. Oral Squamous Cell Carcinoma). siRNA skierowane przeciwko genowi HIF1 $\alpha$  wprowadzono do komórek linii SCC4 i SAS (wyprowadzonych z nowotworów języka wykazujących wysoką ekspresję receptorów sigma) za pomocą nanocząstek fosforanu wapnia opłaszczonych lipidami (LCP, ang. lipid-coated calcium phosphate nanoparticles). Cząstki te sprzężone były z ligandem anisamidowym wykazującym wysokie powinowactwo wobec receptorów sigma. Komórki poddano także terapii fotodynamicznej. W celu zbadania wydajności dostarczania siRNA przez cząsteczki LCP wykonano test z użyciem HIF1 $\alpha$  dsDNA wyznakowanego barwnikiem Texas Red. Wykazano, że cząsteczki LCP posiadają wysokie powinowactwo do receptorów sigma, w związku z czym są zdolne do efektywnego dostarczania oligonukleotydów do komórek OSCC. Wynik ten potwierdzono również in vivo z wykorzystaniem modelu mysiego. W kolejnym etapie zbadano efekt terapeutyczny wyciszenia genu HIF1 $\alpha$  (również w sprzężeniu z terapią fotodynamiczną), a także toksyczność LCP in vitro oraz in vivo. Wykazano, że wyciszenie genu HIF1 $\alpha$  prowadzi do obniżenia szybkości proliferacji komórek OSCC oraz indukcji procesu apoptozy. Zarówno toksyczny, jak i immunogeny wpływ LCP na organizm myszy nie zostały zaobserwowane. Uznano zatem, że wprowadzenie siRNA skierowanego przeciwko genowi HIF1 $\alpha$  z użyciem nanocząstek LCP może stanowić użyteczne narzędzie w terapii genowej OSCC (29). Rezultaty te potwierdzili Ahn i wsp. (2014) oraz Liang i wsp. (2014), którzy dokonali supresji wzrostu guza nowotworowego poprzez pośrednie wyciszenie genu HIF1 $\alpha$  na drodze regulacji ekspresji VEGF (7,8).

## **Wyciszenie genu ABCG2 hamuje rozwój raka płaskonabłonkowego krtani**

ABCG2 (BCRP, białko oporności raka piersi, ang. breast cancer resistance protein) jest białkiem o masie 72 kDa składającym się z 655 aminokwasów. Należy do rodziny transporterów ABC (posiadających kasetę wiążącą ATP, ang. ATP-binding cassette transporters) i pierwotnie zostało wyizolowane z komórek raka piersi linii MCF-7 wykazujących oporność na dokсорubicynę. Nadekspresję ABCG2 obserwuje się w wielu różnych typach nowotworów, do których należą m. in. białaczki oraz niektóre nowotwory płaskonabłonkowe (SCC, ang. squamous cell carcinomas). Wzmocniona ekspresja ABCG2 w komórkach nowotworowych prowadzi do wytworzenia oporności na leki cytostatyczne, a także indukuje proliferację oraz zapobiega kierowaniu komórek na drogę apoptozy (34-39).

Xie i wsp. badali znaczenie ABCG2 w rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani

(LSCC, ang. Laryngeal Squamous Cell Carcinoma) oraz jego wpływ na akumulację mitoksantronu (MX, ang. mitoxantrone) w komórkach nowotworowych. siRNA skierowane przeciwko genowi ABCG2 wprowadzono do komórek dwóch linii LSCC: HEP-2 oraz HEP-2T (odpornej na Taxol). Wykazano, że wyciszenie genu ABCG2 hamuje wzrost guza nowotworowego poprzez regulację proliferacji komórek oraz indukcję procesu apoptozy. Potwierdzono również, że wyciszenie genu zwiększa akumulację MX w obu badanych liniach, nasilając tym samym cytostatyczne działanie leku. Uważa się zatem, że ABCG2 stanowić może potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej (34).

## **Wyciszenie integryny $\alpha 3$ zwiększa radiowrażliwość i indukuje proces apoptozy w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi**

Integryny są heterodimerycznymi receptorami powierzchniowymi odpowiedzialnymi za przyleganie komórek do białek macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix). Pełnią również ważną rolę w adhezji międzykomórkowej oraz w tworzeniu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych. Uważa się, że istnieją co najmniej 24 różne heterodimery tworzone poprzez kombinację 18 podjednostek  $\alpha$  i 8 podjednostek  $\beta$ . Każdy z nich posiada specyficzność wobec określonych białek ECM (36). Uważa się, że w proces progresji nowotworowej zaangażowany jest szereg różnych integryn. Białka te mogą przyczyniać się do wzmożonej migracji i proliferacji komórek nowotworowych. Ponadto, w zależności od warunków środowiska, integryny mają zdolność zarówno do podtrzymywania przeżycia komórek, jak i do indukowania ich apoptozy (40 – 44).

Steglich i wsp. badali wpływ wyciszenia genu ITG3A kodującego integrynę  $\alpha 3$  na progresję oraz radiowrażliwość komórek raka płaskonabłonkowego rejonu głowy i szyi. Analizie poddano pięć linii komórkowych HNSCC (UTSCC5, UTSCC14, UTSCC15, Cal33, HSC4), w których wykazano podwyższoną ekspresję białka integryny  $\alpha 3$ . Wynikiem wyciszenia genu ITG3A było zahamowanie proliferacji, indukcja procesu apoptozy w komórkach nowotworowych oraz zwiększenie ich wrażliwości na działanie promieniowania jonizującego. Zatem można stwierdzić, że ITG3A może być interesującym celem w terapii HNSCC (41).

## **Genetyczna i farmakologiczna inhibicja aktywności Bmi-1 jako narzędzia w terapii raka płaskonabłonkowego języka**

Białka z grupy Polycomb (PcG, ang. Polycomb group proteins) są ważnymi represorami transkrypcji, które biorą udział w epigenetycznych modyfikacjach chromatyny, a także w nadawaniu komórkom zdolności do samoodnowy oraz w przebiegu procesu nowotworzenia. Białko Bmi-1 (ang. B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) należy do tzw. kompleksu represyjnego Polycomb 1 (PRC1, ang. Polycomb repressive complex 1) – jednego z dwóch kompleksów represyjnych PcG. Pełni rolę epigenetycznego wyciszacza licznych genów docelowych, takich jak: p19Arf czy p16Ink4a, które biorą udział w regulacji cyklu komórkowego komórek nowotworowych. Modyfikacje chromatyny zachodzące z udziałem Bmi-1 mają istotne znaczenie w zachowaniu macierzystości komórek, ich proliferacji, regulacji starzenia, apoptozy czy przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition). Nadekspresję Bmi-1 wykazano w wielu nowotworach,

m. in.: w białaczce szpikowej, raku płuca, raku piersi czy w nowotworach rejonu głowy i szyi. Podwyższona ekspresja białka związana jest z wykształceniem oporności na terapię, agresywnym przebiegiem choroby oraz pesymistycznym rokowaniem. Ponadto nadekspresja Bmi-1 silnie pobudza proliferację komórek nowotworowych oraz wystąpienie przejścia epitelialno-mezenchymalnego skutkujące tworzeniem przerzutów. Wykazano jednak, że supresja Bmi-1 inicjuje proces starzenia i apoptozy w komórkach nowotworowych, hamując progresję choroby (45, 46).

Li i wsp. badali potencjał Bmi-1 jako celu genetycznej i farmakologicznej terapii TSCC (raka płaskonabłonkowego języka, ang. Tongue Squamous Cell Carcinoma). siRNA skierowane przeciwko genowi Bmi-1 wprowadzono do komórek TSCC linii: HN4, HN6, HN12, Tca8113, Cal27, SCC9 i SCC25 z użyciem Lipofectamine2000 (Roche, Niemcy). Aby ocenić wpływ wyciszenia genu Bmi-1 na metabolizm komórek po 24-godzinnej hodowli przeprowadzono szereg analiz (test MTT, cytometria przepływowa, PCR w czasie rzeczywistym, test leczenia ran in vitro). Jednocześnie, w celu zbadania przeciwnowotworowego działania inhibitorów deacetylaz histonowych (HDACis, ang. histone deacetylase inhibitors), przeprowadzono eksperyment z użyciem mysiego modelu TSCC. Wykazano, że wyciszenie genu Bmi-1 wywołało zahamowanie migracji i proliferacji komórek nowotworowych, a także spowodowało indukcję procesu apoptozy w tych komórkach. Ponadto udowodniono, że inhibitory HDAC takie jak NaB (maślan sodu, ang. sodium butyrate) i TSA (trichostatyna A, ang. trichostatin A) działają antynowotworowo, hamując ekspresję białka Bmi-1. Uważa się zatem, że genetyczne i farmakologiczne ograniczenie aktywności białka Bmi-1 może stanowić strategię terapeutyczną w walce z rakiem płaskonabłonkowym języka (46).



## **Wyciszenie ekspresji kinazy Aurora A skojarzone z terapią paklitakselem – nowa strategia terapeutyczna w walce z HNSCC**

Kinaza Aurora A (AURKA, ang. Aurora Kinase A) jest białkiem należącym do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. Jej aktywność regulowana jest na drodze fosforylacji w zależności od fazy cyklu komórkowego. Białko to bierze udział w tworzeniu wrzeciona podziałowego oraz segregacji chromosomów podczas podziałów komórkowych. Wykazano, że u gryzoni nadekspresja białka AURKA może być związana z amplifikacją centrosomu i występowaniem aneuploidii, co z kolei prowadzić może do wystąpienia transformacji nowotworowej. Podwyższoną ekspresję kinazy zaobserwowano również w wielu nowotworach u ludzi (rak piersi, pęcherza moczowego, okrężnicy, jajnika, trzustki). Białko to związane było z nabywaniem oporności przez komórki nowotworowe na paklitaksel. Wykazano również istotny związek pomiędzy podwyższonym poziomem ekspresji białka AURKA i skróconym przeżyciem chorych na HNSCC (48 – 54).

Mazumdar i wsp. badali możliwość wykorzystania wyciszenia genu AURKA w terapii HNSCC z wykorzystaniem siRNA skierowanych przeciwko AURKA (linie Tu138, UMSCC1, Tu167, OSC19, Tu177, JMAR). Komórki hodowano przez 72 godziny, a następnie poddano licznym analizom. Wykazano, że wyciszenie genu AURKA hamuje proliferację komórek HNSCC oraz znacznie obniża liczbę komórek znajdujących się w fazie G1 cyklu komórkowego. Ponadto obniżenie ekspresji AURKA powoduje znaczne nasilenie cytotoksycznego oddziaływania paklitakselu (47). Terapeutyczny efekt wyciszenia AURKA potwierdzili także Tanaka i wsp. (2013) w badaniach nad możliwością wykorzystania kinazy Aurora A, jako celu terapii przeciwnowotworowej w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej (53).

## **Interferencja RNA w próbach klinicznych**

Pierwsze próby kliniczne z wykorzystaniem zjawiska RNAi zapoczątkowane zostały w roku 2004 przez koncern Acuity Pharmaceuticals w celu leczenia AMD (związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej, ang. Age-related Macular Degeneration). siRNA skierowane przeciwko genom: VEGF oraz VEGFR (receptor czynnika wzrostu śródbłónki naczyniowej, ang. vascular endothelial growth factor receptor) wykazało duży potencjał terapeutyczny, hamując postępujący proces waskularyzacji oka, który w efekcie prowadzi do wystąpienia AMD (54). Szczegółowe dane na temat prowadzonych badań klinicznych dostępne są w bazie ClinicalTrials.gov zarządzanej przez NLM (Narodową Bibliotekę Medyczną, ang. National Library of Medicine) Narodowych Instytutów Zdrowia (NIH, ang. National Institutes of Health) (55).

Zgodnie z danymi zawartymi w bazie ClinicalTrials.gov, Comprehensive Cancer Center Uniwersytetu Wake Forest przeprowadza badania kliniczne fazy I nad bezpieczeństwem i dawkowaniem transfekowanych siRNA komórek jednojądrzastych krwi obwodowej APN401, które mają stanowić narzędzie w terapii czerniaka, raka nerki, trzustki oraz innych nieoperacyjnych nowotworów litych. Uważa się, że te genetycznie zmodyfikowane komórki immunologiczne zdolne będą do wywołania silnej odpowiedzi przeciwnowotworowej (56). M.D. Anderson Cancer Center prowadzi badania kliniczne fazy I nad bezpieczeństwem i dawkowaniem cząsteczki siRNA-EphA2-DOPC stworzonej w celu hamowania aktywności biomarkera EphA2 (2 receptora efrynowego typu A, ang. ephrin type-A receptor 2) u chorych z zaawansowanymi guzami litymi (57). Próby kliniczne fazy I prowadzi aktualnie również koncern Calando Pharmaceuticals. Przedmiotem badania jest nanocząsteczka CALAA-01, której aktywnym składnikiem jest siRNA skierowane przeciwko podjednostce M2 reduktazy rybonukleozydowej. Uważa się, że dożylnie wstrzyknięcie cząsteczki CALAA-01 działa hamująco na rozwój nowotworu zwłaszcza u chorych z nawracającą postacią choroby (58). Silenseed Ltd przeprowadza próby kliniczne fazy II nad wykorzystaniem cząsteczki siG12D LODER (Local Drug EluteR) w leczeniu nieoperacyjnego raka gruczołowego trzustki. siG12D LODER jest biodegradowalną nanocząstką przenoszącą siRNA zaprojektowane w celu wyciszenia ekspresji onkogenu k-RAS (ang. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Uważa się, że wyciszenie tego genu prowadzić będzie do zatrzymania rozwoju guza oraz indukcji procesu apoptozy w komórkach raka trzustki (59,60).

Powyżej przedstawione przykłady badań klinicznych z wykorzystaniem mechanizmu interferencji RNA w terapii wielu nowotworów wskazują, że zjawisko to coraz częściej uznawane jest za potencjalnie użyteczne narzędzie w praktyce klinicznej. Dostępne dane literaturowe dostarczają również informacji o licznych badaniach przedklinicznych, które potwierdziły ewentualną przydatność RNAi w terapii nowotworów rejonu

głowy i szyi. Żadne z nich nie znalazły jednak kontynuacji w próbach klinicznych.

## **Podsumowanie**

Odkrycie zjawiska RNAi wywarło istotny wpływ na rozwój badań naukowych. Istnieje wiele dowodów na to, że cząsteczki siRNA i miRNA są zaangażowane w szereg procesów patologicznych takich jak proces nowotworzenia. Zjawisko RNAi stało się zatem wartościowym narzędziem badawczym pozwalającym na lepsze poznanie mechanizmów patogenezы nowotworowej.

Biorąc pod uwagę zdolność siRNA do specyficznego eliminowania wadliwych produktów białkowych, cząsteczki te uznać można za doskonałe narzędzia terapeutyczne w leczeniu wielu chorób (nowotworów, cukrzycy, infekcji wirusowych). Zjawisko RNAi posiada wiele zalet, takich jak wysoka wydajność i specyficzność, która pozwala na zredukowanie ryzyka wystąpienia efektów ubocznych. RNAi wydaje się zatem być narzędziem w terapii wielu chorób o znanym mechanizmie patogenezы.

## **Konflikt interesu / Conflict of interest**

Nie występuje. / None.

## **Finansowanie / Financial support**

Niniejsza praca jest finansowana ze środków Wielkopolskiego Centrum Onkologii [Grant 3/2014(62) (1/07/2014/PRB/WCO/004)].

## **Etyka / Ethics**

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

## **Piśmiennictwo / References**

- [1] Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M: Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 5: e1018, 2014.
- [2] Thomas SM, Grandis JR: The current state of head and neck cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 20: 1565–75, 2009.
- [3] Maiti GP, Mondal P, Mukherjee N, Ghosh A, Ghosh S, Dey S, Chakrabarty J, Roy A, Biswas J, Roychoudhury S, Panda CK: Overexpression of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes. *PLoS One* 8: e63440, 2013.
- [4] Kolenda T, Teresiak A, Kapalczyńska M, Przybyła W, Zajęczkowska M, Bliźniak R, Lamperska K: let-7d and miR-18a as biomarkers of head and neck cancers. *Letters in Oncology Science*, 12, 37-47, 2015.
- [5] Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J: The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 51: 423–30, 2015.
- [6] Szybiak B, Trzeciak P, Golusiński W: Role of extended histological examination in the assessment of local recurrence of tongue and floor of the mouth cancer. *Rep Pract Oncol Radiother*, 17, 319–32, 2012.
- [7] Ahn S-H, Choi JY, Kim DW, Lee DY, Jeon E-H, Jeong W-J, Paik JH: Targeting HIF1alpha Peri-operatively Increased Post-surgery Survival in a Tongue Cancer Animal Model. *Ann Surg Oncol Jan*: 2015.
- [8] Liang J, Zhang Z, Liang L, Shen Y, Ouyang K: HIF-1alpha regulated tongue squamous cell carcinoma cell growth via regulating VEGF expression in a xenograft model. *Ann Transl Med* 2: 2014.
- [9] Kolenda T, Przybyła W, Mańczak-Teresiak A, Kapalczyńska M, Kowalik A, Kruszyna M, Jackowiak W, Bliźniak R, Golusiński W, Lamperska KM: mikroRNA jako biomarker personalizacji terapii nowotworów głowy i szyi. *Letters in Oncology Science*, 10, 50-51, 2013.
- [10] Hamilton AJ, Baulcombe D: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–2, 1999.

- [11] Collins RE, Cheng X: Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. *J Cell Biochem* 99: 1251–66, 2006.
- [12] Zaleska K.: miRNA – Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now? *Rep Pract Oncol Radiother*, 20, 79–86, 2015.
- [13] Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK: RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657–85, 2003.
- [14] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415–9, 2003.
- [15] Wilson RC, Doudna JA: Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 42: 217–39, 2003.
- [16] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS: Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15: 331–41, 2005.
- [17] Liu Q, Paroo Z: Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu Rev Biochem* 79: 295–319, 2010.
- [18] Ouellet DL, Perron MP, Gobeil L-A, Plante P, Provost P: MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* 2006: 69616, 2006.
- [19] Yeom K-H, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN: Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 34: 4622–9, 2006.
- [20] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell. United State* 115: 209–16, 2003.
- [21] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK: RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 11: 59–67, 2011.
- [22] Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset F-L: Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* 157: 153–65, 2009.
- [23] Kantor B, Bailey RM, Wimberly K, Kalburgi SN, Gray SJ: Methods for gene transfer to the central nervous system. *Adv Genet* 87: 125–97, 2014.
- [24] Galanis E, Vile R, Russell SJ: Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit Rev Oncol Hemato* 138: 177–92, 2001.
- [25] Morris KV, Rossi JJ: Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* 13: 553–8, 2006.
- [26] Wold WSM, Toth K: Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 13: 421–33, 2013.
- [27] Ramamoorth M, Narvekar A: Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res* 9: GE01–6, 2015.
- [28] Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 579: 5996–6007, 2005.
- [29] Chen W-H, Lecaros RLG, Tseng Y-C, Huang L, Hsu Y-C: Nanoparticle delivery of HIF1alpha siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. *Cancer Lett* 359: 65–74, 2015.
- [30] Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T: The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 268–77, 2007.
- [31] Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T: Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 96: 394–402, 2005.
- [32] Mimeault M, Batra SK: Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* 17: 30–54, 2013.
- [33] Jing S, Wang J, Liu Q, Cheng Y, Yang C, Wang Y, Cao F, Wen B, Jiao W, Guo Y: Relationship between hypoxia inducible factor-1alpha and esophageal squamous cell carcinoma: a meta analysis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 43: 593–9, 2014.
- [34] Xie J, Jin B, Li D-W, Shen B, Cong N, Zhang T-Z, Dong P: ABCG2 regulated by MAPK pathways is associated with cancer progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 4: 698–709, 2014.
- [35] Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD: A multidrug resistance

- transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 95: 15665–70, 1998.
- [36] Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, Zhang L, Han Z: Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *Int J Cancer* 126: 841–51, 2010.
- [37] Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y: Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmgenomics Pers Med* 5: 53–64, 2014.
- [38] Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD: Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Cancer Drug Resistance. *Biochem Pharmacol* 15: 1084–103, 2012.
- [39] Nakanishi T, Ross DD: Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer* 31: 73–99, 2012.
- [40] Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673–87, 2002.
- [41] Steglich A, Vehlows A, Eke I, Cordes N: alpha integrin targeting for radiosensitization of three-dimensionally grown human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 357: 542–8, 2015.
- [42] Hehlhans S, Haase M, Cordes N: Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775: 163–80, 2007.
- [43] Onodera Y, Nam J-M, Sabe H: Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol Ther* 140: 1–9, 2013.
- [44] Desgrosellier JS, Cheresch DA: Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9–22, 2010.
- [45] Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, Witte ON: Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell Stem Cell* 7: 682–93, 2010.
- [46] Li Z, Wang Y, Yuan C, Zhu Y, Qiu J, Zhang W, Qi B, Wu H, Ye J, Jiang H, Yang J, Cheng J: Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer. *Lab Invest* 94: 1431–45, 2014.
- [47] Mazumdar A, Henderson YC, El-Naggar AK, Sen S, Clayman GL: Aurora kinase A inhibition and paclitaxel as targeted combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 31: 625–34, 2009.
- [48] Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD: A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17: 3052–65, 1998.
- [49] Goepfert TM, Adigun YE, Zhong L, Gay J, Medina D, Brinkley WR: Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 62: 4115–22, 2002.
- [50] Kovarikova V, Burkus J, Rehak P, Brzakova A, Solc P, Baran V: Aurora kinase A is essential for correct chromosome segregation in mouse zygote. *Zygote* 15: 1–12, 2015.
- [51] Katsha A, Belkhir A, Goff L, El-Rifai W: Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target. *Mol Cancer* 20: 106, 2015.
- [52] Sun J-M, Yang L-N, Xu H, Chang B, Wang H-Y, Yang G: Inhibition of Aurora A promotes chemosensitivity via inducing cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Am J Cancer Res* 5: 1133–45, 2015.
- [53] Tanaka H, Nakashiro K, Iwamoto K, Tokuzen N, Fujita Y, Shirakawa R, Oka R, Goda H, Hamakawa H: Targeting Aurora kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oral Oncol* 49: 551–9, 2013.
- [54] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG: Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 8: 129–38, 2009.
- [55] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: ClinicalTrials.gov Background. [<https://clinicaltrials.gov/ct2/about-site/background>]. Dostęp: 29.06.2016.
- [56] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: APN401 in Treating Patients With Melanoma, Kidney Cancer, Pancreatic Cancer, or Other Solid Tumors That Are Metastatic or Cannot Be Removed By Surgery. [<http://clinicaltrials.gov/show/NCT02166255>]. Dostęp: 29.06.2016.
- [57] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: EphA2 Gene Targeting Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. [<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01591356>]. Dostęp: 29.06.2016.



- [58] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: Safety Study of CALAA-01 to Treat Solid Tumor Cancers. [<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00689065>]. Dostęp: 29.06.2016.
- [59] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: Phase I-Escalating Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Locally Advanced Adenocarcinoma of the Pancreas and a Single Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Non-operable Adenocarcinoma of the Pancreas. [ <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01188785>]. Dostęp: 29.06.2016.
- [60] U.S. National Institutes of Health: ClinicalTrials.gov: A Phase II Study of siG12D LODER in Combination With Chemotherapy in Patients With Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer. [<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01676259>]. Dostęp: 29.06.2016.