© Curr. Gynecol. Oncol. 2014, 12 (3), p. 197–205

Received: 09.10.2014
Accepted: 06.11.2014
Published: 28.11.2014

Magdalena Pankowska, Anna Stachurska, Małgorzata Woźniak, Maciej Małecki

Preparaty siRNA w terapii genowej raka jajnika

siRNA preparations in gene therapy of ovarian cancer

Препараты миРНК в генотерапии рака яичника

Katedra Farmacji Stosowanej i Bioinżynierii, Warszawski Uniwersytet Medyczny. Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki
Correspondence to: Mgr Magdalena Pankowska, Katedra Farmacji Stosowanej i Bioinżynierii, Wydział Farmaceutyczny WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, www.farmacjamolekularna.edu.pl
Praca powstała w ramach realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (DEC-2011/03/N/NZ1/00141).

Department of Applied Pharmacy and Bioengineering, Medical University of Warsaw. Head: Professor Maciej Małecki, MD, PhD
Correspondence: Magdalena Pankowska, Department of Applied Pharmacy and Bioengineering, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, www.farmacjamolekularna.edu.pl
The study was carried out within the frame of a project financed by the National Science Centre (DEC-2011/03/N/NZ1/00141).

Streszczenie

Rak jajnika według statystyk zajmuje czwarte miejsce wśród zgonów z powodu nowotworów ginekologicznych. Wynika to zarówno z późnego rozpoznania choroby, spowodowanego brakiem charakterystycznych objawów, jak i stale niezadowalających efektów leczenia, m.in. ze względu na oporność komórek na chemioterapię. Poszukiwanie nowych metod terapii jest więc nadal aktualne. Uważa się, że obiecującą grupą potencjalnych leków przeciwnowotworowych mogą być preparaty, których aktywność opiera się na zjawisku interferencji RNA, czyli wyciszaniu genów za pomocą siRNA. Za odkrycie tego zjawiska Fire i wsp. zostali uhonorowani Nagrodą Nobla. Zjawisko interferencji siRNA w prawidłowych komórkach jest naturalnym mechanizmem obronnym. Do wyciszenia genów dochodzi w cytoplazmie przy udziale enzymu Dicer. Preparaty genowe siRNA wprowadza się do komórek, wykorzystując metody wirusowe, takie jak AAV czy adenowirusy, a także za pomocą metod niewirusowych, np. z zastosowaniem liposomów. Badania kliniczne preparatów genowych siRNA znajdują się obecnie w pierwszej fazie. Prowadzone są na dwóch preparatach genowych CALAA-01 oraz na nanocząsteczce siRNA skierowanej przeciw *PLK1*. W niniejszej pracy skupiono uwagę na terapeutycznym znaczeniu sekwencji siRNA w stosunku do genów: *MDR1*, *VEGF*, *MMP*, *CD44*, *HER2*, *SHH*, *STAT*. Zarówno badania eksperymentalne, jak i kliniczne niosą nadzieję na wykorzystanie w przyszłości omawianego mechanizmu do walki z rakiem jajnika.

Słowa kluczowe: siRNA, rak jajnika, terapia genowa, badania kliniczne, chemiooporność

Abstract

According to statistics, ovarian cancer is the fourth cause of death due to gynecologic cancer. It results from late diagnosis of the disease, caused by the lack of characteristic symptoms, as well as from unsatisfactory treatment methods due to e.g. cell resistance to chemotherapy. The search for new therapies is still in progress. It is believed that preparations whose activity is based on RNA interference, i.e. gene silencing with the use of siRNA, are a promising group of new antineoplastic medications. Fire *et al.* were awarded the Nobel Prize for discovering this phenomenon. The phenomenon of siRNA interference in healthy cells is a natural protective mechanism. Genes are silenced in the cytoplasm with the use of the Dicer enzyme. siRNA gene preparations are delivered into cells with the use of viral methods such as AAV or adenoviruses, as well as non-viral methods e.g. with the use of liposomes. Clinical trials concerning siRNA preparations are now in the first phase. They are conducted on two gene preparations: CALAA-01 and siRNA nanomolecule directed against *PLK1*. In this paper attention was drawn to the therapeutic meaning of siRNA sequences in relation to the following genes: *MDR1*, *VEGF*, *MMP*, *CD44*, *HER2*, *SHH*, *STAT*. Both experimental and clinical studies give hope for the use of the described mechanisms in fight with ovarian cancer in the future.

Key words: siRNA, ovarian cancer, gene therapy, clinical research, chemoresistance

Содержание

Рак яичника по статистике занимает четвертое место по смертности из-за гинекологических онкологических заболеваний. Это следует как из позднего диагноза заболевания, обусловленного отсутствием характерных симптомов, так и все еще неудовлетворительных эффектов лечения, в том числе из-за неподдающихся химиотерапии клеток.

DOI: 10.15557/CGO.2014.0017
© Medical Communications Sp. z o.o. All rights reserved.

Поиск новых методов терапии все еще актуален. Считается, что многообещающей группой потенциальных лекарств от онкологических заболеваний могут быть препараты, активность которых основывается на явлении интерференции РНК, т.е. выключении генов с помощью миРНК. За открытие этого явления Файер и коллеги были удостоены Нобелевской премии. Явление интерференции РНК в нормальных клетках – это естественный защитный механизм. Выключение генов происходит в цитоплазме при участии энзима Dicer. Генные препараты миРНК вводятся в клетки, используя вирусные методы, такие как адено-ассоциированный вирус AAV, а также с помощью невирусных методов, например, с применением липосом. Клинические исследования генных препаратов миРНК находятся в настоящее время в первой фазе. Ведутся на двух генных аппаратах CALAA-01 и на наночастице миРНК, направленной против *PLK1*. В настоящей работе сосредоточено внимание на терапевтическом значении последовательности миРНК в отношении генов: *MDR1*, *VEGF*, *MMP*, *CD44*, *HER2*, *SHH*, *STAT*. Как экспериментальные, так и клинические исследования несут надежду на использование в будущем упоминаемого механизма для борьбы с раком яичника.

Ключевые слова: миРНК, рак яичника, генная терапия, клинические исследования, устойчивость к химиотерапии

WPROWADZENIE

Rak jajnika jest jedną z głównych przyczyn zgonów u kobiet hospitalizowanych na oddziałach ginekologicznych z powodu nowotworów[1]. Statystyki wykazują stały wzrost zachorowalności na ten rodzaj raka[2] i sugerują, że istnieje potrzeba poszukiwania coraz nowocześniejszych metod leczenia. Poznanie mechanizmów molekularnych kancerogenezy pozwala na projektowanie nowych leków przeciwnowotworowych i prowadzenie badań klinicznych. Coraz częściej notuje się próby stosowania nowoczesnej terapii genowej[3]. Dużym zainteresowaniem cieszą się również eksperymentalne preparaty przeciwnowotworowe zawierające sekwencje siRNA. W pierwszej fazie badań klinicznych znajduje się obecnie np. preparat siRNA określany jako CALAA-01[3]. Jego zadaniem jest zahamowanie wzrostu nowotworu poprzez ograniczenie ekspresji genu podjednostki M2 reduktazy rybonukleotydowej. W pierwszej fazie badań klinicznych jest również nanocząsteczka siRNA, skierowana przeciwko *PLK1*. Badania te dają nadzieję na pojawienie się nowych możliwości skuteczniejszego leczenia pacjentek z nowotworem jajnika.

MECHANIZM INTERFERENCJI siRNA

Jedną ze strategii terapii genowej jest postępowanie oparte na zjawisku interferencji RNA (*RNA interference*), wykorzystującej preparaty genowe do potranskrypcyjnego wyłączenia genów. Fire i wsp. za wykazanie mechanizmu interferencji zostali uhonorowani Nagrodą Nobla. W prawidłowych komórkach zjawisko interferencji jest naturalnym mechanizmem obronnym komórek. Zostało odkryte u roślin, a następnie dokładnie zbadane u nicieni[4]. Mechanizm interferencji jest inicjowany w cytoplazmie, gdzie egzogenny dwuniciowy RNA (dsRNA) ulega enzymatycznej hydrolizie. Za przebieg reakcji odpowiada enzym Dicer, który strukturalnie należy do RNazy III. Powstają produkty o długości od 19 do 25 nukleotydów – małe interferujące siRNA. Powstałe siRNA jest włączane do enzymatycznego kompleksu RISC (*RNA-induced silencing complex*).

INTRODUCTION

Ovarian cancer is one of the main causes of death in women hospitalized at gynecologic wards due to cancer[1]. Statistics show a constant increase in the incidence of this kind of cancer[2] and suggest that there is a need to search for modern treatment methods. The discovery of molecular mechanisms of carcinogenesis enables the development of new anticancer drugs and conduction of clinical research. Attempts to provide a modern gene therapy are more and more frequently observed[3]. Also, experimental antineoplastic preparations containing siRNA sequences are also attracting much attention. For example, an siRNA preparation known as CALAA-01 is currently in the first phase of clinical trials[3]. It is supposed to inhibit the growth of the cancer by limiting the expression of the M2 subunit of ribonucleotide reductase. Also the siRNA nanomolecule directed against *PLK1* is in the first phase of clinical trials. These studies give hope for the emergence of new possibilities for treating female patients with ovarian cancer more effectively.

siRNA INTERFERENCE MECHANISM

One of gene therapy strategies is treatment based on RNA interference which uses gene preparations to post-transcription gene knockout. Fire *et al.* were awarded the Nobel Prize because they documented the mechanism of interference. Interference is a natural protective mechanism in healthy cells. It was discovered in plants, and later on studied in nematodes[4]. The mechanism of interference is initiated in the cytoplasm, where exogenous double-stranded RNA (dsRNA) undergoes enzymatic hydrolysis. The Dicer enzyme, which is structurally an RNase III, is responsible for the reaction. Products containing 19–25 nucleotides are produced – small interfering siRNA. siRNA formed in this way is included in the enzymatic RISC complex (RNA-induced silencing complex). It is composed of, inter alia, Argonaute proteins, dsRNA-binding proteins, and proteins exhibiting helicase and nuclease activity. The RISC leads to the

Składa się on m.in. z białek Argonaute, białek, które wiąże dsRNA, oraz białek o aktywności helikaz i nukleaz. Działaniem kompleksu RISC jest ułożenie jednostek katalitycznych Ago-2 i wiązania docelowego mRNA obok siebie. Wykazano, że w procesie interferencji kluczową rolę odgrywa białko Ago-2 – komórki go pozbawione nie wykazują mechanizmu działania siRNA[5]. Białko to w kompleksie RISC zbudowane jest z dwóch domen: PAZ i Piwi. Znaczącą funkcję domeny PAZ stanowi zdolność do wiązania siRNA, natomiast z domeną Piwi wiąże się aktywność katalityczna kompleksu.

Wprowadzanie siRNA do komórki opiera się na metodach wykorzystujących wektory wirusowe i niewirusowe. Do grupy wektorów wirusowych zalicza się: retrowirusy, lentiwirusy, adenowirusy, parwowirusy oraz AAV, natomiast do niewirusowych wektorów należą: liposomy, polimery, peptydy[6–9]. Do interferencji RNA stosuje się również liposomy i kationowe polimery[8].

siRNA W TERAPII GENOWEJ RAKA JAJNIKA

Ocenia się, że w przypadku zdiagnozowania raka jajnika w stadium zaawansowanym 5-letnie przeżycie wynosi 30%[10]. A zatem czy zastosowanie mechanizmu siRNA w przyszłości może być powszechnie stosowaną alternatywną formą leczenia dla pacjentek z tym nowotworem? Ostatnio w badaniach związanych z projektowaniem nowych leków przeciwnowotworowych zwraca się uwagę na terapeutyczne znaczenie sekwencji siRNA w stosunku do genów *MDR1*, *VEGF*, *MMP*, *CD44*, *HER2*, *SHH*, *STAT*. Reprezentatywne informacje doświadczalne dotyczące tych genów scharakteryzowano w dalszych częściach publikacji. Gen *MDR1* koduje glikoproteinę P. Wpływa ona na powstawanie oporności wielolekowej w organizmie ludzkim[11]. Dla terapii onkologicznej istotny jest fakt, że bierze udział w eliminowaniu cytostatyków z komórek nowotworowych[12]. Gen *MDR1* jest eksponowany na wysokim poziomie, zatem zahamowanie ekspresji/częściowe wyciszenie może mieć potencjalne znaczenie kliniczne. W celu wyciszenia genu Xu i wsp. przeprowadzili transfekcje siRNA *MDR1* na komórkach nowotworowych raka jajnika, wykorzystując w eksperymencie adenowirusy[13]. Wyniki tych badań potwierdzają, że istnieje możliwość szybkiego i trwałego zmniejszenia ekspresji genu *MDR1*.

W nowoczesnej, innowacyjnej terapii raka jajnika celem molekularnym jest również gen *VEGF* (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu). W rozwoju guzów nowotworowych ograniczenie procesu angiogenezy/powstawania nowych naczyń stanowi jedną ze strategii terapeutycznych i co za tym idzie – może przyczynić się do zmniejszenia powstawania przerzutów[14]. Wykazano, że proces angiogenezy guza przebiega w sposób chaotyczny, co więcej, zaobserwowano występowanie różnych stref utlenowania guza nowotworowego. Zhou i wsp. przeprowadzili transfekcję w celu zbadania możliwości wyciszenia genów *VEGF* siRNA na

arrangement of Ago-2 catalytic units and to the binding of the target mRNA nearby. It has been shown that the Ago-2 protein plays a crucial role in the process of interference – cells that lack it do not exhibit the siRNA activity mechanism[5]. The protein in the RISC complex is built of two domains: PAZ and Piwi. An important function of the PAZ domain is its ability to bind siRNA, whereas the Piwi domain is connected with the catalytic activity of the complex. Delivery of siRNA into the cell is based on methods using viral and non-viral vectors. The group of viral vectors incudes retroviruses, lentiviruses, adenoviruses, parvoviruses, and AAV, whereas non-viral vectors include: liposomes, polymers and peptides[6–9]. Liposomes and cationic polymers are also used for RNA interference[8].

siRNA IN GENE THERAPY OF OVARIAN CANCER

It is established that in case of ovarian cancer of advanced stage, the 5-year survival is 30%[10]. Can the use of the siRNA interference mechanism in the future be a universally accepted alternative form of treatment of patients with this cancer then? Recently, attention has been paid to the therapeutic meaning of siRNA sequences in relation to *MDR1*, *VEGF*, *MMP*, *CD44*, *HER2*, *SHH*, *STAT* genes in the studies related to the development of new anticancer drugs. Representative experimental information concerning these genes was presented in further parts of the article.

The *MDR1* gene encodes P-glycoprotein. It influences the development of multidrug resistance in the human organism[11]. An important fact for cancer therapy is that it takes part in the elimination of cytostatics out of cancer cells[12]. The *MDR1* gene is highly expressed, and inhibition of its expression/partial silencing can have potential clinical significance. In order to silence the gene, Xu *et al.* conducted siRNA *MDR1* transfection on ovarian cancer cells, using adenoviruses in the experiment[13]. Outcomes of their studies confirm that there is a possibility of fast and constant inhibition of *MDR1* gene expression.

The *VEGF* (vascular endothelial growth factor) is also a molecular target in modern innovative ovarian cancer therapy. Limiting the process of angiogenesis/development of new vessels is one of many therapeutic strategies in inhibiting the growth of cancer tumors and, therefore, can lead to a decrease in metastasis formation[14]. It was shown that the process of angiogenesis is chaotic. Moreover, different areas of tumor oxygenation were observed. Zhou *et al.* conducted transfection in order to study the possibility of *VEGF* siRNA gene silencing using the Caov3 ovarian cancer cell line[15]. They demonstrated inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis after implementation of siRNA gene preparations.

Metalloproteinase (MMP) leads to degradation of the vessel base membrane, which results in tumor growth and is connected with formation of metastases[16]. Hu *et al.* conducted research using ovarian cancer cells that were transfected

linii komórkowej raka jajnika Caov3[15]. Po zastosowaniu preparatów genowych siRNA wykazali oni zahamowanie proliferacji komórek, indukcję apoptozy.

Metaloproteinazy (MMP) prowadzą do degradacji błony podstawnej naczyń, co skutkuje wzrostem guza i jest związane z przerzutowością[16]. Hu i wsp. przeprowadzili badania na komórkach raka jajnika, które transfekowali preparatem *MMP-9* siRNA. Dowiedli oni, że uzyskane komórki charakteryzowały się obniżoną inwazyjnością i adhezją[17].

Mechanizm z zastosowaniem siRNA jest testowany również dla genu *CD44*. Należy on do grupy receptorów adhezyjnych, bierze udział w migracji komórek nabłonka oraz wpływa na proces integralności tkankowej[18,19]. Białko błonowe CD44 wpływa także na takie procesy, jak: adhezja, agregacja i proliferacja[20]. Gen kodujący *CD44* jest zlokalizowany na chromosomie 11[21]. Powstaje w wyniku potranslacyjnej regulacji, obejmującej alternatywny splicing i modyfikację białek.

W chorobach nowotworowych CD44 odgrywa rolę w procesie transformacji, wpływa na oporność na chemioterapię. Znacząca jest też funkcja CD44 w takich jednostkach chorobowych, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory układu krwiotwórczego, choroby autoimmunologiczne, oraz w progresji guza nowotworowego[22].

Yeo i wsp. udowodnili, że wysoki poziom CD44 stanowi ważny przerzutowy marker monitorujący występowanie progresji nowotworzenia, jak również wpływa na rokowanie[23]. Zespół badawczy pod kierownictwem Li zaobserwował, że komórki raka jajnika SKOV-3 po transfekcji siRNA *CD44* oraz po zastosowaniu cytostatyku – etopozydu wykazały brak oporności na apoptozę[24]. Działanie etopozydu polega na zerwaniu jedno- i dwuniciowych nici DNA oraz zahamowaniu syntezy DNA. Podobnie Ganesh i wsp., prowadząc swoje badania na komórkach raka płuc w kombinacji CD44 siRNA z cisplatyną, wykazali zmniejszenie oporności, a także zatrzymanie rozwoju guzów[25]. Może to sugerować występowanie efektu wyciszenia w nowotworach o odmiennej etiologii. Cisplatyna należy do grupy leków alkilujących DNA; jej główny mechanizm działania to kowalencyjne wiązanie do kwasu deoksyrybonukleinowego, prowadzące do zahamowania jego syntezy i replikacji[26].

U podłoża procesu nowotworzenia mogą leżeć zarówno zmiany genetyczne, jak i epigenetyczne. Metylacja w komórkach nowotworowych może spowodować rozwój nowotworu poprzez hiper- i hipometylację. W swoich badaniach Ross i wsp. wykazali, że w przypadku raka jajnika dochodzi do spadku ekspresji CD44 spowodowanej hipermetylacją[27].

Cennym źródłem informacji są badania na zwierzętach. W jednym z nich wykorzystano myszy transfekowane siRNA CD44. Subramaniam i wsp. uzyskali zmniejszenie ekspresji CD44, które wywołało obniżenie masy nowotworu w stosunku do grupy kontrolnej[28]. W swoich badaniach transfekowali komórki plazmidem DNA siRNA *CD44*.

Gen *HER* (gen ludzkiego receptora-2 dla naskórkowego czynnika wzrostu) należy do rodziny receptorów dla

using the *MMP-9* siRNA preparation. They proved that gathered cells were characterized by lower invasiveness and adhesion[17].

The mechanism with the use of siRNA is also tested for the *CD44* gene. This gene belongs to the group of adhesive receptors, it takes part in epithelial cell migration and affects tissue integrity processes[18,19]. Membrane protein CD44 also affects such processes as: adhesion, aggregation, and proliferation[20]. The *CD44* encoding gene is located on chromosome 11[21]. It forms as a result of post-translation regulation that comprises alternative splicing and protein modification.

CD44 plays a role in transformation in neoplastic diseases; it affects resistance to chemotherapy. The function of CD44 is also important in such diseases as: rheumatoid arthritis, hematopoietic neoplasms, autoimmune diseases, and neoplastic tumor progression[22].

Yeo *et al.* proved that high CD44 level was an important metastatic marker in monitoring of the occurrence of metastasis progression, and also that it affected the prognosis[23]. The research team headed by Li observed that SKOV-3 ovarian cancer cells demonstrated lack of resistance to apoptosis after siRNA *CD44* transfection and after the use of a cytostatic – etoposide[24]. The mechanism of etoposide is based on the rupture of single- and double-stranded DNA and inhibition of DNA synthesis. Similarly, Ganesh *et al.*, when conducting their research on lung cancer cells combining *CD44* siRNA with cisplatin, demonstrated a decrease in resistance as well as inhibition of tumor development[25]. It may suggest that silencing effect occurs in cancer of different etiology. Cisplatin is a drug belonging to the group of medications that alkylate DNA; its main mechanism of action is the formation of a covalent bond to deoxyribonucleic acid, which leads to inhibition of its synthesis and replication[26].

Both genetic and epigenetic changes can underlie neoplastic processes. Methylation in cells can lead to the development of a neoplasm due to hyper- and hypomethylation. Ross *et al.* demonstrated in their research that a decrease in CD44 expression occurs in case of ovarian cancer due to hypermethylation[27].

Research conducted on animals is also a valuable source of information. Mice transfected with CD44 siRNA were used in one of such studies. Subramaniam *et al.* obtained a decrease in CD44 expression that caused a decrease in the tumor mass in comparison with the control group[28]. In their studies they transfected cells with *CD44* siRNA DNA plasmid.

The *HER* gene (human epidermal growth factor receptor 2) belongs to the group of growth factor receptors. They are receptors with tyrosine kinase activity[29]. Pathological HER2 receptor expression is observed in cancer cells[30]. HER2 is needed in healthy cells for physiological cell development and division. The evaluation of *HER2* amount enables to choose optimal treatment methods in breast cancer. Lu *et al.* demonstrated that the use

czynników wzrostu. Są one receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej[29]. W komórkach nowotworowych obserwuje się nieprawidłową ekspresję receptorów HER2[30]. W fizjologicznych komórkach receptor HER2 jest potrzebny do prawidłowego rozwoju i dzielenia się komórek. W raku piersi oznaczenie ilości *HER2* pozwala wybrać optymalne sposoby leczenia. Lu i wsp. wykazali, że zastosowanie interferencji siRNA z *HER2* prowadzi do ograniczenia proliferacji komórek oraz ich inwazji[31]. Transfekowano komórki raka jajnika SKOV-3.

Gen *EphA2* wykazuje wysoką ekspresję w raku jajnika. Shahzad i wsp. udowodnili jego wpływ na migrację, proliferację komórek oraz na angiogenezę[32]. W badaniach tych zostały użyte komórki HeyA8 oraz SKOV-3-ip1 – transfekowane komercyjnymi zestawami siRNA *EphA3* i wstrzykiwane myszom. Wykazano zmniejszenie wzrostu guzów jajnikowych w badaniach *in vivo* po zastosowaniu preparatu siRNA[33]. Zarówno Landen i wsp., jak Shahzad i wsp. wskazują na możliwość wykorzystania mechanizmu wyciszania *EphA2* w terapii raka jajnika. W badaniu preparatu siRNA *EphA2* zaobserwowano efekt wyciszający, a także zmniejszający wielkość guza[33,34].

W terapii raka jajnika celem molekularnym stają się również enzymy polimerazy ADP-rybozy: PARP1. Enzym ten katalizuje rozszczepienie NAD^+ i włączenie cząsteczki ADP-rybozy[35]. PARP1 jest zaangażowany w takie procesy komórkowe, jak przeżywalność i śmierć komórek, ponadto bierze udział w regulacji procesu transkrypcji oraz w naprawie DNA[36]. Wyróżniamy następujące PARP: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ale tylko PARP1 odgrywa zasadnicza rolę w procesach nowotworzenia, jak również w chorobach zapalnych i neurodegeneracyjnych[36]. Golberger i wsp. zastosowali mechanizm interferencji w modelu mysim raka jajnika siRNA *PARP1*. Wykazali oni zahamowanie wzrostu komórek poprzez indukcję apoptozy za pomocą mechanizmu interferencji[37]. Komórki raka jajnika transfekowano lipidoidem NC100.

Zaburzenia szlaków sygnałowych są przyczyną wielu chorób, w tym nowotworowych, dlatego w ostatnim pięcioleciu prowadzi się intensywne badania nad transdukcją sygnału indukowanego przez jeden ze szlaków sygnałowych – szlak SHH, z którym wiąże się nadzieje na wykorzystanie w terapii raka jajnika. Gen *hedgehog* (*SHH*) został odkryty u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*)[38]. SHH odgrywa rolę w wielu procesach, takich jak proliferacja, różnicowanie, czy w onkogenezie[39]. Receptorami dla szlaku SHH są dwa białka transbłonowe – PTCH (*patched*) i SMO (*smoothened*)[40]. Mechanizm aktywacji szlaku obejmuje następujące etapy: w początkowej fazie białko SHH łączy się z kompleksem receptorowym PTCH–SMO. Rolą PTCH jest hamowanie SMO, kiedy w pobliżu komórki efektorowej nie ma białka SHH, natomiast zadaniem receptora SMO jest aktywacja translokacji czynnika transkrypcyjnego GLI, a następnie przeniesienie go do jądra i związanie z DNA, zaś w końcowym etapie dochodzi do aktywacji genów zależnych od SHH, np. VEGF.

of interference of siRNA and *HER2* leads to a limitation of cell proliferation and invasion[31]. The SKOV-3 ovarian cancer cells were transfected.

The *EphA2* gene demonstrated high expression in ovarian cancer. Shahzad *et al.* proved its influence on cell migration and proliferation, and on angiogenesis[32]. The HeyA8 and SKOV-3-ip1 cells were used in those studies – they were transfected with commercial sets of *EphA3* siRNA and injected into mice. Growth limitation of ovarian tumors was demonstrated in *in vivo* studies after the use of the siRNA preparation[33]. Both Landen *et al.* and Shahzad *et al.* point that the *EphA2* silencing mechanism can possibly be used in ovarian cancer therapy. The effect of silencing and decreasing tumor growth was observed in studies on the *EphA2* siRNA preparation[33,34].

Polymerase ADP-ribose: PARP1 enzymes are becoming a molecular target in ovarian cancer therapy. This enzyme is a catalyst of NAD^+ cleavage and APD-ribose molecule inclusion[35]. PARP1 takes part in such cellular processes as cell survival and death; it is also involved in the regulation of transcription and DNA repair[36]. The following PARPs can be distinguished: 1, 2, 3, 4, 5, 6, but only PARP1 plays a crucial role in neoplastic processes as well as inflammatory and neurodegenerative diseases[36]. Golberger *et al.* used the interference mechanism of siRNA *PARP1* in the mouse model of ovarian cancer. They demonstrated inhibition of cell growth by inducing apoptosis on the basis of the interference mechanism[37]. Ovarian cancer cells were transfected with NC100 lipidoid.

Disorders of signaling pathways cause many diseases, also cancer ones, and that is why intensive studies have been conducted for the last 5 years on transduction of a signal induced by one the signal pathways – the SHH pathway, for which there are hopes in ovarian cancer therapy. The *hedgehog (SHH)* gene was discovered in a fruit fly (*Drosophila melanogaster*)[38]. SHH plays a role in many processes such as proliferation, differentiation, or oncogenesis[39]. SHH pathway receptors include two transmembrane proteins – PTCH (patched) and SMO (smoothened)[40]. The pathway activation mechanism comprises the following stages: in the initial phase, SHH protein binds to the PTCH–SMO receptor complex. The role of PTCH is to inhibit SMO if SHH protein cannot be found in the proximity of the effector cell, whereas the role of SMO is to activate transcription factor GLI translocation and to transfer it further to the nucleus and to bind it to DNA. In the final stage SHH-dependent genes are activated, e.g. VEGF.

Gli1, Gli2 are transcription factors that regulate target SHH gene expression[41]. Transcription factors are regulated by AKT and P53, affect cell proliferation and survival[42]. Many researchers proved that pathological Gli transcription factor signaling may lead to the development of a cancer, and may also correlate with tumor development and metastasis formation[43–45]. Chen *et al.* transfected ovarian cancer cells with lipofectamine 2000 using

Gen *Gene*	**Funkcja** *Function*	**Referencje** *References*
MDR1	Oporność wielolekowa *Multidrug resistance*	[11]
VEGF	Proces angiogenezy *Process of angiogenesis*	[14]
MMP	Progresja, tworzenie przerzutów *Progression, metastasis formation*	[16]
CD44	Adhezja, migracja komórek *Adhesion, cell migration*	[20]
HER	Proliferacja, podział komórek *Proliferation, cell division*	[29]
EPHA2	Migracja, proliferacja komórek *Migration, cell proliferation*	[32]
PARP1	Przeżywalność komórek, naprawa DNA *Cell survival, DNA repair*	[36]
AKT	Proliferacja, migracja, apoptoza komórek *Proliferation, migration, cell apoptosis*	[42]
CDK	Regulacja cyklu komórkowego *Cell cycle regulation*	[50]
Integryny *Integrins*	Komunikacja międzykomórkowa *Intercellular communication*	[55]
SHH	Onkogeneza *Oncogenesis*	[39]
GLI1	Proliferacja, przeżywalność komórek *Cell proliferation, cell survival*	[42]
Receptor estrogenowy *Estrogen receptor*	Mechanizm zależności hormonalnej *Mechanism of hormone dependence*	[60]
P53	Apoptoza komórek *Cell apoptosis*	[63]
STAT3	Chemiooporność, angiogeneza *Chemoresistance, angiogenesis*	[58]

Tabela 1. Charakterystyka preparatów siRNA wykorzystywanych w terapii raka jajnika
Table 1. Characteristics of siRNA preparations used in ovarian cancer therapy

Gli1, Gli2 to czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję genu docelowego SHH[41]. Czynniki transkrypcyjne są regulowane przez AKT i P53, wpływają na proliferację oraz przeżywalność komórek[42]. Wielu naukowców wykazało, że nieprawidłowa sygnalizacja czynników transkrypcyjnych Gli może przyczynić się do powstania nowotworu, a ponadto korelować z rozwojem guza oraz przerzutowością[43–45]. Chen i wsp. w swoich badaniach transfekowali komórki raka jajnika ES2 i SKOV-3 z wykorzystaniem plazmidu, za pomocą lipofektaminy 2000. Wykazali zahamowanie ekspresji Gli w wyniku zastosowania mechanizmu interferencji siRNA[45].
W chorobach nowotworowych dochodzi również do zaburzenia aktywacji szlaku sygnałowego AKT. Prowadzone są intensywne badania nad możliwością zastosowania mechanizmu siRNA w kontekście wyciszenia tego szlaku[46]. Jest to serynowo-treoninowa kinaza, która pełni funkcję głównego efektora 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). AKT odpowiada za fosforylację białek zaangażowanych w transkrypcję, proliferację, migrację oraz apoptozę[47].
Do aktywacji kinazy AKT dochodzi w wyniku stymulacji komórek insuliną, czynnikami wzrostu (np. VEGF) i cytokinami. W efekcie przyłączenia do receptorów o charakterze kinaz tyrozynowych, insuliny czy czynników wzrostu następuje aktywacja 3-kinazy fosfatydyloinozytolu.

plasmid in their studies. They demonstrated inhibition of Gli expression as a result of the implementation of the siRNA interference mechanism[45].
Disturbance of AKT signaling pathway also occurs in cancer diseases. Intensive research is conducted concerning the possibility of siRNA use in the area of this pathway silencing[46]. This is serine/threonine kinase that functions as the main effector of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K). AKT is responsible for the phosphorylation of proteins involved in transcription, proliferation, migration, and apoptosis[47].
The AKT kinase becomes activated as a result of stimulating cells with insulin, growth factors (e.g. VEGF), and cytokines. Phosphoinositide 3-kinase activation occurs because insulin or growth factors are bound to receptors of the tyrosine kinase kind.
The phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling pathway is of great importance in resistance to chemotherapy[48]. Jeong *et al.* demonstrated inhibition of cell resistance to paclitaxel using the siRNA *AKT* mechanism[49]. They used siRNA oligos with the application of lipofectamine 2000 on SKOV-3 and A2780 ovarian cancer cells.
Studies on CDK – a family of protein cyclin-dependent kinases that take part in cell cycle regulation – are conducted

Szlak sygnałowy 3-kinazy fosfatydyloinozytolu/AKT ma ogromne znaczenie w oporności na chemioterapię[48]. Jeong i wsp. wykazali zahamowanie oporności komórek na paklitaksel za pomocą mechanizmu siRNA *AKT*[49]. Zastosowali siRNA oligos przy użyciu lipofektaminy 2000 na komórki raka jajnika SKOV-3 i A2780.

W nowoczesnej terapii genowej raka jajnika prowadzi się badania nad ekspresją CDK – rodziną białkowych kinaz zależnych od cyklin, które biorą udział w regulacji cyklu komórkowego. Rozregulowanie cyklu komórkowego jest cechą wielu nowotworów, w tym nowotworu jajnika[50]. Yin i wsp. wykazali, że zastosowanie mechanizmu siRNA CDK2 hamuje proliferację i wzrost komórek raka jajnika[51].

Wiele zespołów naukowych w swoich badaniach pracuje nad możliwością wyciszenia integryn, jak również receptora estrogenowego[52–54]. Integryny regulują komunikację międzykomórkową oraz wpływają na migrację, adhezję, proliferację i przeżywalność komórek[55]. W raku jajnika dochodzi do zaburzeń w receptorze estrogenowym[56]. Thasni i wsp. zastosowali mechanizm siRNA z receptorem estrogenowym na komórkach BG1 – pochodzących od pacjentek w III stadium choroby, z gruczolakorakiem jajnika[57].

Białka STAT, wśród których znajduje się STAT3, stanowią rodzinę czynników transkrypcyjnych. Kontrolują one ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację, przeżycie, chemiooporność czy angiogenezę[58]. STAT3 wpływa na oporność na cisplatynę[59].

Białka STAT w formie nieaktywnej znajdują się w cytoplazmie po aktywacji przy udziale czynników wzrostu, cytokin czy hormonów. Przemieszczają się do jądra komórkowego w formie ufosforylowanej – w takiej postaci białko STAT3 występuje w nowotworach.

Obecnie prowadzi się liczne badania nad zastosowaniem mechanizmu STAT3 w terapii przeciwnowotworowej. Wykazują one, że zahamowanie/blokowanie ekspresji STAT3 hamuje proliferację komórek nowotworowych *in vitro* i progresję nowotworów *in vivo*.

Han i wsp. badali wpływ wyciszenia siRNA STAT3 na oporność na chemioterapię. Transfekowali oni komórki SKOV-3 i A2780 siRNA STAT3. Udowodnili zwiększenie wrażliwości komórek na cisplatynę[60].

Jiang i wsp. zastosowali wyciszenie shRNA na komórki A2780CP i A2780s, wykazując, że shRNA STAT3 powoduje apoptozę oraz zahamowanie proliferacji komórkowej, jak również zahamowanie rozwoju guzów *in vivo*[61]. Podobnie w swoich badaniach Zhao i wsp. wykazali za pomocą mechanizmu siRNA STAT3 wzrost apoptozy komórek nowotworowych, transfekując komórki SKOV-3 plazmidem[62].

W chorobach nowotworowych dochodzi do mutacji białka p53, którego kluczową funkcją jest hamowanie angiogenezy i apoptozy komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym, co może odgrywać kluczową rolę w progresji nowotworu. Meijer i wsp. wykazali, że działanie siRNA p53 prowadzi do efektu apoptotycznego[63].

in modern ovarian cancer gene therapy. Dysregulation of the cellular cycle is a characteristic feature of many cancers, including ovarian cancer[50]. Yin *et al.* demonstrated that the use of the CDK2 siRNA mechanism inhibits ovarian cancer cell proliferation and growth[51].

Numerous study teams are working on the possibility of silencing integrins as well as the estrogen receptor[52–54]. Integrins regulate intercellular communication and affect cell migration, adhesion, proliferation, and survival[55]. Disorders of the estrogen receptor occur in ovarian cancer[56]. Thasni *et al.* used the siRNA mechanism with estrogen receptor on BG1 cells – derived from patients with stage III ovarian adenocarcinoma[57].

STAT proteins, including STAT3, are a family of transcription factors. They regulate expression of genes responsible for proliferation, cell survival, chemoresistance, or angiogenesis[58]. STAT3 influences resistance to cisplatin[59].

The inactive form of STAT proteins can be found in the cytoplasm after activation with the use of growth factors, cytokines, or hormones. They migrate to the nucleus in a phosphorylated form – in such a form STAT3 protein is found in neoplasms.

Currently, numerous studies concerning the STAT3 mechanism in antineoplastic therapy are being conducted. They demonstrate that inhibiting/blocking STAT3 inhibits *in vitro* neoplastic cell proliferation and *in vivo* progression of neoplasms.

Han *et al.* studied the influence of STAT3 siRNA silencing on chemotherapy. They transfected SKOV-3 and A2780 cells with STAT3 siRNA. They demonstrated an increase in cell sensitivity to cisplatin[60].

Jiang *et al.* used shRNA silencing on A2780CP and A2780s, demonstrating that STAT3 shRNA leads to apoptosis and cell proliferation inhibition as well as inhibition of *in vivo* tumor development[61]. Similarly, Zhao *et al.* in their studies demonstrated an increase in cancer cell apoptosis using the STAT3 siRNA mechanism by transfecting SKOV-3 cells with plasmid[62].

Mutation of the p53 protein whose main function is to inhibit angiogenesis and apoptosis of cells with damaged genetic material, occurs in neoplasms, which may play a key role in neoplasm progression. Meijer *et al.* demonstrated that p53 siRNA activity leads to apoptotic effect[63].

SUMMARY

Experimental studies and preliminary clinical trials demonstrated that preparations containing siRNA sequences may in future broaden the spectrum of conventional pharmacotherapy. Further basic studies are needed in order to plan the introduction of siRNA preparations into oncology clinics. The development of effective and selective methods of psiRNA delivery to cancer cells seems an incredible challenge. On the basis of own experiences we believe that recombinant AAV viral vectors may be a platform for a safe and effective method of delivering siRNA sequences to neoplasms.

PODSUMOWANIE

Badania eksperymentalne i wstępne próby kliniczne wskazują, że preparaty zawierające sekwencje siRNA mogą w przyszłości rozszerzyć spektrum klasycznej farmakoterapii. Dalsze badania podstawowe są niezbędne do planowania wprowadzenia preparatów psiRNA do klinik onkologicznych. Niezwykłym wyzwaniem wydaje się opracowanie efektywnych i selektywnych metod dostarczania psiRNA do komórek nowotworowych. Autorzy pracy na podstawie własnych doświadczeń badawczych wyrażają przekonanie, że platformą do bezpiecznego i skutecznego wprowadzania sekwencji siRNA do nowotworów mogą być rekombinowane wektory wirusowe AAV.

Piśmiennictwo/References

1. http://globocan.iarc.fr.
2. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce – wskaźniki 5-letnich przeżyć według województw. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010: 31.
3. http://clinicaltrials.gov.
4. Fire A., Xu S., Montgomery M.K. i wsp.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391: 806–811.
5. Aronin N.: Target selectivity in mRNA silencing. Gene Ther. 2006; 13: 509–516.
6. Jeong J.H., Mok H., Oh Y.K., Park T.G.: siRNA conjugate delivery systems. Bioconjug. Chem. 2009; 20: 5–14.
7. Oh Y.K., Park T.G.: siRNA delivery systems for cancer treatment. Adv. Drug Deliv. Rev. 2009; 61: 850–862.
8. Stebelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A.F.: Charakterystyka i medyczne zastosowania konstrukcji liposomowych. Adv. Clin. Exp. Med. 2002; 2: 229–242.
9. Numnum T.M., Makhija S., Lu B. i wsp.: Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines. Gynecol. Oncol. 2008; 108: 34–41.
10. Miedzińska-Majewska M., Wcisło G., Bodnar L.: Modulacje oporności wielolekowej u chorych na raka jajnika. Współcz. Onkol. 2004; 9: 457–465.
11. Wilczyński J., Kufelnicka M., Smolarz B. i wsp.: Czy gen MDR1 jest kluczem do efektywnej chemioterapii? Ginekol. Pol. 2006; 77: 476–484.
12. Limtrakul P., Anuchapreeda S., Buddhasukh D.: Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. BMC Cancer 2004; 4: 13.
13. Xu D., McCarty D., Fernandes A. i wsp.: Delivery of MDR1 small interfering RNA by self- complementary recombinant adeno-associated virus vector. Mol. Ther. 2005; 11: 523–530.
14. Małecki M., Jastrzębski Z., Przybyszewska M. i wsp.: Anty-angiogenna terapia genowa – próby wykorzystania rozpuszczalnej formy receptora FLT-1. Adv. Clin. Exp. Med. 2004; 13: 227–233.
15. Zhou J., Gan N., Zhang W. i wsp.: Proliferation suppression and apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by small interfering RNA against vascular endothelial growth factor. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2010; 36: 232–238.
16. Kołomecki K.: Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. Onkol. Pol. 2000; 3: 163–167.
17. Hu X., Li D., Zhang W. i wsp.: Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. Arch. Gynecol. Obstet. 2012; 286: 1537–1543.
18. Louderbough J.M., Schroeder J.A.: Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. Mol. Cancer. Res. 2011; 9: 1573–1586.
19. Olczyk P., Komosińska-Vassev K., Winsz-Szczotka K. i wsp.: Hialuronian – struktura, metabolizm, funkcje i rola w procesach gojenia ran. Postępy Hig. Med. Dośw. 2008; 62: 651–659.
20. Fujii T., Sun Y.L., An K.N., Luo Z.P.: Mechanical properties of single hyaluronan molecules. J. Biomech. 2002; 35: 527–531.
21. Lou W., Krill D., Dhir R. i wsp.: Methylation of the *CD44* metastasis suppressor gene in human prostate cancer. Cancer Res. 1999; 59: 2329–2331.
22. Pongcharoen P., Jinawath A., Tohtong R.: Silencing of CD44 by siRNA suppressed invasion, migration and adhesion to matrix, but not secretion of MMPs, of cholangiocarcinoma cells. Clin. Exp. Metastasis 2011; 28: 827–839.
23. Yeo T.K., Nagy J.A., Yeo K.T.: Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. Am. J. Pathol. 1996; 148: 1733–1740.
24. Li C.Z., Liu B., Wen Z.Q., Li H.Y.: Inhibition of CD44 expression by small interfering RNA to suppress the growth and metastasis of ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Folia Biol. (Praha) 2008; 54: 180–186.
25. Ganesh S., Iyer A.K., Weiler J. i wsp.: Combination of siRNA-directed gene silencing with cisplatin reverses drug resistance in human non-small cell lung cancer. Mol. Ther. Nucleic Acids 2013; 2: e110.
26. Subocz M., Popławska B., Bielawska A., Bielawski K.: Pochodne platyny w chemioterapii chorób nowotworowych. Ann. Acad. Med. Siles. 2011; 65: 70–76.
27. Ross J.S., Sheehan C.E., Williams S.S. i wsp.: Decreased CD44 standard form expression correlates with prognostic variables in ovarian carcinomas. Am. J. Clin. Pathol. 2001; 116: 122–128.
28. Subramaniam V., Vincent I.R., Gilakjan M., Jothy S.: Suppression of human colon cancer tumors in nude mice by siRNA CD44 gene therapy. Exp. Mol. Pathol. 2007; 83: 332–340.
29. Krasińska L., Jassem J.: Kliniczne znaczenie zaburzeń HER2 w raku piersi z uwzględnieniem metod ich oznaczenia. Nowotwory 2003; 53: 68–73.
30. Sedlaczek P., Sobańska E., Gryboś M., Harłozińska-Szmyrka A.: Ocena zależności między ekspresją HER2/NEU (C-ERBB-2) w tkance a stężeniem w surowicy i płynach nowotworowych u chorych na raka jajnika. Adv. Clin. Exp. Med. 2005; 14: 663–669.
31. Lu Y.M., Rong M.L., Shang C. i wsp.: Suppression of HER-2 via siRNA interference promotes apoptosis and decreases metastatic potential of SKOV-3 human ovarian cancinoma cells. Oncol. Rep. 2013; 29: 1133–1139.
32. Thanapprapasr D., Hu W., Sood A.K., Coleman R.L.: Moving beyond VEGF for anti-angiogenesis strategies in gynecologic cancer. Curr. Pharm. Des. 2012; 18: 2713–2719.
33. Shahzad M.M., Lu C., Lee J.W. i wsp.: Dual targeting of EphA2 and FAK in ovarian carcinoma. Cancer Biol. Ther. 2009; 8: 1027–1034.
34. Landen C.N., Kinch M.S., Sood A.K.: EphA2 as a target for ovarian cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets 2005; 9: 1179–1187.
35. Louderbough J.M., Schroeder J.A.: Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. Mol. Cancer Res. 2011; 9: 1573–1586.
36. Hassa P.O., Hottiger M.O.: The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front. Biosci. 2008; 13: 3046–3082.
37. Goldberg M.S., Xing D., Ren Y. i wsp.: Nanoparticle-mediated delivery of siRNA targeting Parp1 extends survival of mice bearing tumors derived from Brca1-deficient ovarian cancer cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2011; 108: 745–750.
38. Chen X., Horiuchi A., Kikuchi N. i wsp.: Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. Cancer Sci. 2007; 98: 68–76.

39. Wan J., Zhou J., Zhao H. i wsp.: Sonic hedgehog pathway contributes to gastric cancer cell growth and proliferation. Biores. Open Access 2014; 3: 53–59.

40. Mazumdar T., DeVecchio J., Shi T. i wsp.: Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. Cancer Res. 2011; 71: 1092–1102.

41. Milla L.A., González-Ramírez C.N., Palma V.: Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy. Biol. Res. 2012; 45: 223–230.

42. Santoni M., Burattini L., Nabissi M. i wsp.: Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. Curr. Protein Pept. Sci. 2013; 14: 133–140.

43. Sanchez P., Hernández A.M., Stecca B. i wsp.: Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2004; 101: 12561–12566.

44. Liao X., Siu M.K., Au C.W. i wsp.: Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. Carcinogenesis 2009; 30: 131–1140.

45. Chen Q., Xu R., Zeng C. i wsp.: Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin β4-mediated FAK signaling. PLoS One 2014; 9: e88386.

46. Khan K.H., Yap T.A., Yan L., Cunningham D.: Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. Chin. J. Cancer 2013; 32: 253–265.

47. Huang J., Zhang L., Greshock J. i wsp.: Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome. Genes Chromosomes Cancer 2011; 50: 606–618.

48. Yu H.G., Ai Y.W., Yu L.L. i wsp.: Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. Int. J. Cancer 2008; 122: 433–443.

49. Jeong J.Y., Kim K.S., Moon J.S. i wsp.: Targeted inhibition of phosphatidyl inositol-3-kinase p110β, but not p110α, enhances apoptosis and sensitivity to paclitaxel in chemoresistant ovarian cancers. Apoptosis 2013; 18: 509–520.

50. D'Andrilli G., Kumar C., Scambia G., Giordano A.: Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. Clin. Cancer Res. 2004; 10: 8132–8141.

51. Yin J.Q., Gao J., Shao R. i wsp.: siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth. J. Exp. Ther. Oncol. 2003; 3: 194–204.

52. Piekarski J.: Receptory estrogenowe i progesteronowe w raku piersi – współczesny stan wiedzy. Współcz. Onkol. 2005; 9: 371–379.

53. Chen J., Zhang J., Zhao Y. i wsp.: Integrin beta3 down-regulates invasive features of ovarian cancer cells in SKOV3 cell subclones. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2009; 135: 909–917.

54. Beaty B.T., Sharma V.P., Bravo-Cordero J.J. i wsp.: β1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. Mol. Biol. Cell 2013; 24: 1661–1675.

55. Choi Y.P., Kim B.G., Gao M.Q. i wsp.: Targeting ILK and β4 integrin abrogates the invasive potential of ovarian cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012; 427: 642–648.

56. Docquier A., Garcia A., Savatier J. i wsp.: Negative regulation of estrogen signaling by ERβ and RIP140 in ovarian cancer cells. Mol. Endocrinol. 2013; 27: 1429–1441.

57. Thasni K.A., Rakesh S., Rojini G. i wsp.: Estrogen-dependent cell signaling and apoptosis in BRCA1-blocked BG1 ovarian cancer cells in response to plumbagin and other chemotherapeutic agents. Ann. Oncol. 2008; 19: 696–705.

58. Jiang Q., Dai L., Cheng L. i wsp.: Efficient inhibition of intraperitoneal ovarian cancer growth in nude mice by liposomal delivery of short hairpin RNA against STAT3. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2013; 39: 701–709.

59. Ji T., Gong D., Han Z. i wsp.: Abrogation of constitutive Stat3 activity circumvents cisplatin resistant ovarian cancer. Cancer Lett. 2013; 341: 231–239.

60. Han Z., Feng J., Hong Z. i wsp.: Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013; 435: 188–194.

61. Jiang Q., Dai L., Cheng L. i wsp.: Efficient inhibition of intraperitoneal ovarian cancer growth in nude mice by liposomal delivery of short hairpin RNA against STAT3. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2013; 39: 701–709.

62. Zhao S.H., Zhao F., Zheng J.Y. i wsp.: Knockdown of *stat3* expression by RNAi inhibits *in vitro* growth of human ovarian cancer. Radiol. Oncol. 2011; 45: 196–203.

63. Meijer A., Kruyt F.A., van der Zee A.G. i wsp.: Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective TRAIL over rhTRAIL. Br. J. Cancer 2013; 109: 2685–2695.