

Received: 2016.01.08
Accepted: 2016.09.15
Published: 2016.12.08

Rola surwiwiny w diagnostyce i terapii nowotworów ginekologicznych

The role of survivin in the diagnosis and therapy of gynaecological cancers

Marta Denel-Bobrowska, Agnieszka Marczak

Katedra Biofizyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Surwiwina należy do rodziny inhibitorów apoptozy, oprócz hamowania programowanej śmierci komórek, pełni również ważną rolę w regulacji proliferacji, naprawie DNA oraz autofagii. Obecność surwiwiny wykryto w większości ludzkich nowotworów. Nadekspresja surwiwiny w tych komórkach zwykle wiąże się z występowaniem oporności zarówno na chemioterapię jak i radioterapię, często również ze złymi rokowaniami. Obecnie wiele uwagi poświęca się więc możliwościom wykorzystania tego białka jako markera diagnostycznego chorób nowotworowych lub czynnika prognostycznego. Surwiwina wydaje się także doskonałym celem terapii przeciwnowotworowej. Zainteresowanie surwiwiną jest wywołane przede wszystkim jej ważną rolą w procesie nowotworowym – zarówno na etapie inicjacji i progresji nowotworu, jak również powstawania przerzutów oraz nawrotów choroby. Obecnie trwają intensywne badania nad zahamowaniem syntezy białka w komórkach z wykorzystaniem strategii antysensu (wykorzystanie oligonukleotydów antysensownych oraz małego interferencyjnego RNA) i drobnocząsteczkowych inhibitorów aktywności białka. Naukowcy pracują również nad zastosowaniem surwiwiny do pobudzenia odpowiedzi odpornościowej u pacjentów z nowotworami. W artykule omówiono potencjalną rolę surwiwiny w diagnozie chorób nowotworowych, jak również wybrane strategie hamowania zarówno ekspresji genu jak i funkcji białka. Możliwość wykorzystania surwiwiny jako markera diagnostycznego może być przydatna w wykrywaniu na wczesnym etapie wielu typów nowotworów, umożliwiając przy tym wdrożenie odpowiedniej terapii.

Słowa kluczowe:

apoptoza • cykl komórkowy • immunoterapia • kaspazy • surwiwina

Summary

Survivin is a member of the family of apoptosis inhibitors. It regulates several essential cellular processes, i.e. it inhibits apoptosis and promotes cell proliferation, DNA repair and autophagy. Survivin is responsible for development of the cell's resistance to chemotherapy and radiotherapy. Overexpression of survivin generally correlates with poor prognosis. Its presence has been detected in most types of human tumours. Currently much attention is paid to the possibilities of using this protein as a diagnostic marker of cancer or a prognostic factor. Survivin occurs selectively in cancer cells and is essential for their survival. These features make survivin a promising target for cancer therapy. There are some strategies for discovering survivin inhibitors. The most common strategies are antisense nucleotides, RNA interference and small molecule inhibitors of protein. Scientists are also working on using survivin to induce an immune response in cancer patients. This article discusses the potential role of survivin in the diagnosis of various types of cancer, as well as selected strategies for the inhibition of both gene expression and protein function. Detailed knowledge of the mechanisms of survivin action may therefore be crucial for effective antitumor therapy development.

Keywords:

apoptosis • caspases • cell cycle • immunotherapy • survivin

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1225951>

Word count: 2874

Tables: –

Figures: 2

References: 41

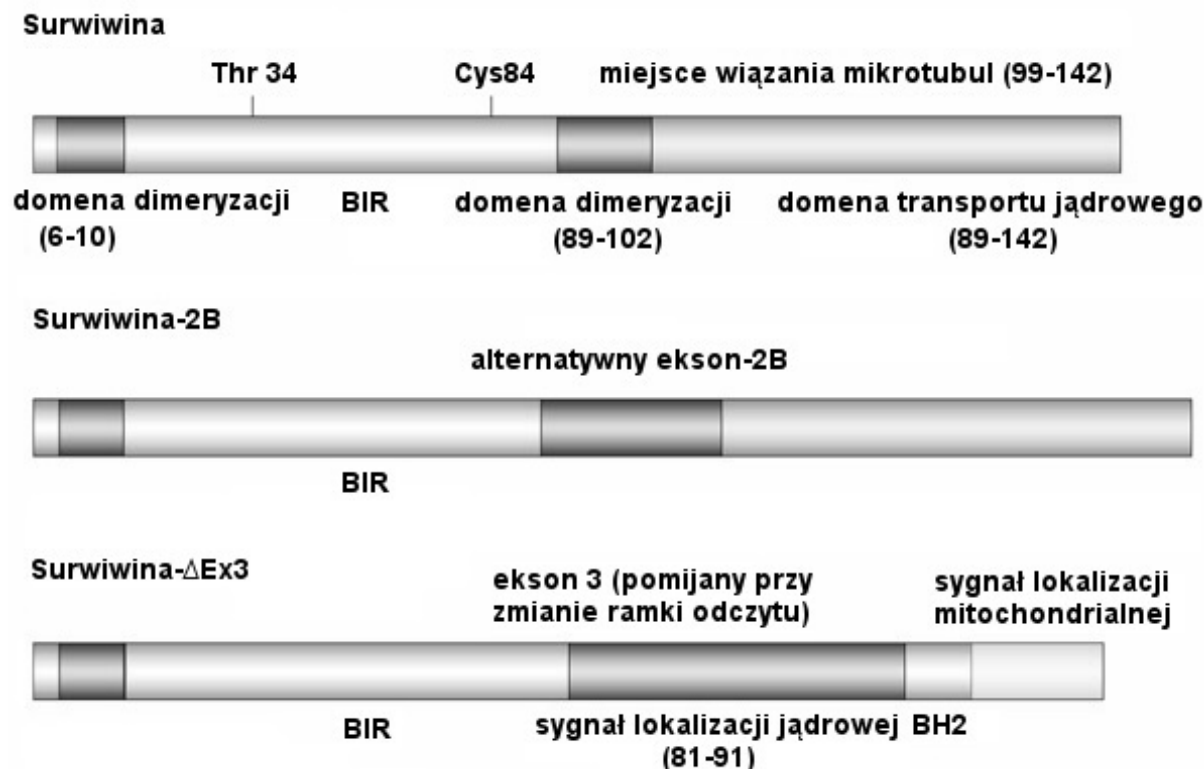
Adres autorki: mgr Marta Denel-Bobrowska, Katedra Biofizyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: mdenel@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **AO** – nukleotydy antysensowne (antisense oligonucleotides); **APC** – białko gruczolakowatego polipa okrężnicy (adenomatous polyposis coli); **BAD** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter); **Bax** – białko X związane z Bcl-2 (Bcl-2 associated X protein); **Bcl-2** – rodzina białek pro- i antyapoptotycznych oraz białko antyapoptotyczne (B-cell leukemia-2); **BIR** – domena białek IAP (baculoviral IAP – like repeats); **ciAP-1** – pierwszy komórkowy inhibitor apoptozy (cellular inhibitor of apoptosis 1); **ciAP-2** – drugi komórkowy inhibitor apoptozy (cellular inhibitor of apoptosis 2); **Cdc-2** – kinaza-2 zależna od cykliny (cyclin-dependent kinase 2); **CPC** – kompleks pasażerskich białek chromosomowych (chromosomal passenger complex); **dsRNA** – odcinki dwuniciowego RNA (double-stranded RNA); **FDA** – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **HER2** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (human epidermal growth factor receptor 2); **HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego (*Human Papilloma Virus*); **Hsp90** – białko szoku cieplnego (heat shock protein 90); **HTS** – wysokoprzepustowe badania przesiewowe (high throughput screening); **IAP** – białko inhibitorowe apoptozy (inhibitor of apoptosis proteins); **IL-6** – interleukina-6; **ILP2** – białko inhibitorowe apoptozy; **INCENP** – białko należące do pasażerskich białek chromosomowych (inner centromer protein); **MAPK** – grupa aktywowanych mitogenami kinaz białkowych; **Mcl-1** – antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2 (myeloid cell leukemia 1); **MDR** – oporność wielolekowa (multidrug resistance); **NAIP** – białko inhibitorowe apoptozy należące do rodziny receptorów NOD-podobnych (NOD-like receptors family, apoptosis inhibitory protein); **NES** – sygnał eksportu jądrowego (nuclear export signal); **PI3K** – kinaza 3-fosfatydilinozytolu; **PTEN** – gen supresji nowotworowej (phosphatase and tensin homolog); **RISC** – kompleks białkowy biorący udział w wyciszaniu ekspresji genu w procesie interferencji RNA (RNA-induced silencing complex); **RNAi** – interferencja RNA (RNA interference); **shrRNA** – cząsteczki RNA, tzw. struktury typu spinki (short hairpin RNA); **Sp-1** – białko swoistości 1 (specificity protein 1); **SNP** – polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism); **STAT-3** przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (signal transducer and activator of transcription 3); **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor); **XIAP** – inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis).

WPROWADZENIE

Wśród nowotworów ginekologicznych największy odsetek stanowią nowotwory jajnika, endometrium oraz szyjki macicy. Rak jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością spośród nowotworów złośliwych narządu płciowego. Jedną z wielu przyczyn jest zbyt późna diagnostyka zmiany nowotworowej, spowodowana nieswoistymi objawami choroby oraz brak molekularnych markerów wykrywających nowotwór we wczesnym stadium. Standardem postępowania jest zabieg operacyjny, po którym stosuje się chemioterapię. Stopień śmiertelności wywołanej rakiem szyjki macicy znacznie zmniejszył się w ciągu ostatnich 50 lat wskutek rozpowszechnienia testów skriningowych oraz szczepionce przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV – Human Papilloma Virus). Rak szyjki macicy jest obecnie

problemem w krajach rozwijających się. Leczenie operacyjne jest uzupełniane chemioterapią i radioterapią. Rak endometrium jest nowotworem ginekologicznym, którego częstość występowania znacznie wzrosła w ostatnich latach. Leczenie obejmuje operację w połączeniu z radioterapią, chemioterapią i terapią hormonalną. U pacjentek z zaawansowaną chorobą nowotworową rokowania są najczęściej niekorzystne ze względu na rozwój oporności na chemioterapię [22]. Dlatego też prowadzi się intensywne badania nad wprowadzeniem nowych terapii, które umożliwią podjęcie bardziej skutecznej walki. Obecnie wiele uwagi poświęca się surwiwinie, która jest białkiem zaangażowanym w wiele istotnych dla rozwoju nowotworu procesów i w związku z tym wydaje się dobrym celem dla potencjalnych leków przeciwnowotworowych.



Ryc. 1. Struktura domenowa surwiwiny (na podstawie [1], zmodyfikowano)

Surwiwina należy do rodziny inhibitorów apoptozy (IAP – inhibitor of apoptosis), do której należą również: XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein), c-IAP1, c-IAP2, liwina, ILP2 oraz BRUCE. Charakterystyczną cechą białek IAP jest co najmniej jedna domena BIR (zawierająca 70-80 aminokwasów) w regionie N-terminalnym (ryc. 1), z zachowanym konserwatywnym układem reszt cysteiny/histydyny (Cx2Cx6Wx3Dx5Hx6C, gdzie x jest dowolnym aminokwasem) [1]. Domena jest kluczowa w procesie dimeryzacji oraz oddziaływaniach między surwiwiną a innymi białkami.

Rodzinę IAP podzielono na 3 klasy: do pierwszej zaliczono białka z domeną RING (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ILP-2, liwina). Białka XIAP, cIAP-1 oraz cIAP-2 oprócz domeny RING zawierają również 3 domeny BIR (BIR1, BIR2 i BIR3). Do klasy drugiej należy NAIP. W jego strukturę wchodzi również trzy domeny BIR, nie występuje jednak domena RING. Trzecią klasę reprezentują surwiwina i BRUCE z jedną domeną BIR [23].

Dostępne są informacje na temat pięciu izoform transkryptu ludzkiego genu surwiwiny, kodujących następujące białka: surwiwinę, surwiwinę 2A, surwiwinę 2B, surwiwinę ΔEx3 i najczęściej występującą postać – surwiwinę 3B [34,35]. Białko funkcjonuje jako homodimer. Surwiwina ulega potranslacyjnym modyfikacjom, takim jak ubikwitynacja, deubikwitynacja, fosforylacja oraz proteolityczne rozszczepienie. Procesy te odpowiadają

za stabilność, interakcje z innymi białkami oraz transport do różnych przedziałów komórkowych. Niesłabnące od kilkunastu lat zainteresowanie surwiwiną wiąże się z jej ważną rolą w procesie nowotworowym – zarówno na etapie inicjacji i progresji nowotworu, jak również powstawania przerzutów oraz nawrotów choroby [36].

FUNKCJE SURWIIWINY

Białka rodziny IAP, oprócz hamowania procesu apoptozy, pełnią również ważną rolę w proliferacji komórek, naprawie DNA oraz autofagii (ryc. 2).

Rola w mitozie

Surwiwina odgrywa istotną rolę w procesie segregacji chromosomów w czasie podziału komórki. Głównym regulatorem mitozy jest kompleks białkowy CPC (chromosomal passenger complex). Kontroluje on stabilność genomu przez koordynowanie prawidłowej segregacji chromosomów po duplikacji. W skład CPC wchodzi kinaza Aurora B oraz białka: borealina, INCENP (inner centromer protein) i surwiwina. Podczas prawidłowej segregacji chromosomów mikrotubule wychodzące z przeciwnych biegunów wrzeczona kariokinetycznego przyłączają się do odpowiednich rejonów wiązania na przeciwnych powierzchniach zduplikowanych chromosomów, co powoduje ich odciążenie do biegunów komórki. Podczas mitozy kompleks białkowy CPC jest kierowany przez białka: surwiwinę i borealinę do tzw.



Ryc. 2. Funkcje surwiwiny

wewnętrznego centromeru. Domeny BIR surwiwiny wiążą się z ufosforylowaną treoniną w miejscu 3 histonu H3. Borealina natomiast wiąże się do treoniny 120 na histonie H2A. W fazie G2/M cyklu komórkowego surwiwina aktywuje mitotyczną kinazę Aurora B. Formowanie CPC oraz interakcja między kompleksem a kinazą Aurora B przez domenę BIR surwiwiny są głównymi etapami procesu mitozy [13,36]. W komórkach z niedoborem surwiwiny zaobserwowano zbyt wczesną, nieprawidłową segregację chromatyd siostrzanych [13]. Dla poszczególnych funkcji białka ważne jest miejsce fosforylacji. Fosforylacja surwiwiny przez cdk1 na treoninie 34 hamuje funkcje białka podczas mitozy, natomiast fosforylacja przez kinazę plk1 na serynie 20 jest istotna dla prawidłowej segregacji chromosomów [2,12].

Surwiwina jako inhibitor kaspaz

Dosyć dobrze poznano rolę surwiwiny jako inhibitora kaspaz w komórkach nowotworowych. Surwiwina, podobnie jak pozostałe białka rodziny IAP, oddziałuje z kaspazami przez domenę BIR. Wciąż nie znaleziono jednak odpowiedzi na pytanie, czy domena BIR surwiwiny wiąże się bezpośrednio z kaspazami, czy oddziaływania mają charakter pośredni. Omawiane białko odgrywa również rolę w hamowaniu apoptozy niezależnej od kaspaz. Charakterystyczna dla tego procesu jest translokacja czynnika indukującego apoptozę z cytoplazmy do jądra komórkowego. Udowodniono, że obniżenie ekspresji surwiwiny indukuje taką translokację w wielu typach komórek nowotworowych [13].

Regulacja autofagii

Coraz więcej doniesień literaturowych dokumentuje również rolę surwiwiny w autofagii. Spadek zawartości białka w komórkach może indukować apoptozę poprzez mechanizm zależny od autofagii. Istnieje interakcja

między regulatorem autofagii – białkiem beclin 1 oraz surwiwiną. Uważa się więc, że obniżenie zawartości surwiwiny w komórkach może aktywować autofagię, natomiast zwiększona zawartość białka hamuje ten typ śmierci komórkowej [36].

Rola w naprawie DNA

Wiadomo, że wspomniana wcześniej translokacja surwiwiny do jądra komórek nowotworowych wzmacnia skuteczność naprawy dwuniciowych pęknięć DNA przez zwiększenie zawartości białka Ku70, którego zadaniem jest wykrywanie uszkodzeń nici. Surwiwina może także oddziaływać z innymi cząsteczkami biorącymi aktywny udział w procesie naprawy DNA (histonem YH2AX oraz DNA-zależną kinazą białkową). Może więc spełniać w komórce różne funkcje w zależności od umiejscowienia w określonych strukturach lub organellach [18,36].

EKSPRESJA SURWIWINY W NOWOTWORACH

Przez wiele lat uważano, że surwiwina na ogół nie występuje w tkankach prawidłowych. Wyjątkiem był rozwój płodowy człowieka, gdzie obecność surwiwiny jest niezbędna ze względu na intensywne procesy proliferacji komórek oraz apoptozy. Obecnie wiadomo, że białko to występuje również w komórkach T układu odpornościowego, komórkach progenitorowych układu krwiotwórczego oraz śródbłónka naczyń i naczyniowego, a także w komórkach wątroby, błony śluzowej przewodu pokarmowego, komórkach erytroidalnych oraz wielojądrzastych [25]. Obecność surwiwiny jest powszechna w wielu typach komórek nowotworowych [19]. Podwyższona ekspresja białka może być wynikiem: amplifikacji *locus* surwiwiny na chromosomie 17q25, demetylacji DNA eksonów, zwiększonej aktywności promotora genu oraz dodatkowej regulacji ścieżek sygnałowych kinazy 3-fosfatidyloinozytolu (PI3K) oraz aktywowanych mitogenami

kinaz białkowych (MAPK) [5,41]. Surwiwina podlega ponadto regulacji przez nowotworowe cząsteczki sygnałowe. Białka, takie jak c-myc oraz STAT-3 zwiększają ekspresję białka, podczas gdy geny supresji nowotworowej (P53, APC oraz PTEN) – zmniejszają [30]. Omawiane białko zaangażowane jest w wiele mechanizmów odpowiadających za kontrolę procesu nowotworowego.

Warunkowanie oporności na chemioterapię oraz radioterapię

Wysoka ekspresja surwiwiny w komórkach nowotworowych odpowiada za oporność na wiele chemioterapeutów. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, że blokowanie działania surwiwiny wzmacnia skuteczność konwencjonalnej chemioterapii z zastosowaniem leków, takich jak paklitaksel, cisplatyna, etopozyny oraz immunoterapii [27]. Surwiwina nadaje komórkom oporność również na promieniowanie radiacyjne [8,24]. Stwierdzono, że wrażliwość na promieniowanie jest większa w komórkach raka piersi, w których nie odnotowano ekspresji receptora estrogenowego [14].

Rola w procesie angiogenezy

Surwiwina może być doskonałym celem terapii przeciwnowotworowej również ze względu na istotną rolę, jaką pełni w procesie angiogenezy. Zwiększoną ekspresję białka zaobserwowano w komórkach śródbłonna stymulowanych angiogennie naczyń śródbłonkowych czynnikiem wzrostu (VEGF vascular endothelial growth factor), jak również czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF – fibroblast growth factor). Nie stwierdzono go natomiast w śródbłonku prawidłowym (badania *in vitro* oraz *in vivo*). Wysoka ekspresja surwiwiny chroniła komórki śródbłonna przed apoptozą zarówno w fazie proliferacyjnej angiogenezy, jak również w procesie przebudowy dojrzałych naczyń kontrolowanym przez czynnik proangiogeny – angiopoetynę 1. Ograniczenie ekspresji surwiwiny podczas angiogenezy znosi ochronne działanie VEGF wywołując apoptozę komórek śródbłonna. Ponieważ angiogeneza zależy od żywotności komórek śródbłonna, obniżenie ekspresji surwiwiny wywołuje zanik nowo powstałych naczyń krwionośnych pośrednio hamując wzrost nowotworu [9,17].

Uważa się więc, że obniżenie ekspresji surwiwiny może dwójako wpływać na zahamowanie procesu nowotworowego – przez promowanie śmierci komórek guza oraz blokowanie angiogenezy. Takie doniesienia spowodowały wzrost zainteresowania surwiwiną jako celem terapii przeciwnowotworowej.

SURWIVINA JAKO CZYNNIK DIAGNOSTYCZNY ORAZ PROGNOSTYCZNY W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Ze względu na wysoką ekspresję surwiwiny w komórkach nowotworowych obecnie wiele uwagi poświęca się możliwościom wykorzystania tego białka jako markera diagnostycznego lub czynnika prognostycznego. Wysoka

ekspresja surwiwiny u chorych na różne typy nowotworów wiąże się zwykle z niekorzystnymi rokowaniami. U takich pacjentów obserwuje się istotnie krótszy czas przeżycia, zwiększone ryzyko zajęcia przez nowotwór lokalnych węzłów chłonnych, występowanie przerzutów, przyspieszenie nawrotów choroby oraz zwiększoną oporność na chemioterapię i radioterapię [19,24,27,32]. Surwiwinę wykryto we krwi pacjentek z nowotworami ginekologicznymi: rakiem jajników, szyjki macicy oraz w rakach: piersi, pęcherza moczowego, żołądka, jelita grubego, trzustki, płuc i raku wątrobowokomórkowym (HCC) [15,19,21], nie było jej natomiast u osób zdrowych [16]. W grupie pacjentek z nowotworami jajnika o charakterze surowiczym ekspresję surwiwiny wykryto u 24,0% kobiet z guzami łagodnymi, w 60,0% przypadków nowotworów granicznych oraz w 91,0% raków jajnika [29].

Zastosowanie surwiwiny jako markera może więc pomóc we wskazaniu grupy pacjentów wysokiego ryzyka, u których istnieje duże prawdopodobieństwo nawrotów choroby, uzasadniając tym samym konieczność zastosowania bardziej agresywnych schematów lub alternatywnych metod leczenia. Badania na temat wykorzystania surwiwiny w diagnostyce chorób nowotworowych nie dały jednoznacznych wyników i muszą być kontynuowane.

Obecnie coraz chętniej bada się zależność między występowaniem poszczególnych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP – single nucleotide polymorphism), a ryzykiem zachorowania na różne typy nowotworów. Ludzki genom charakteryzuje się nieznaną, bo dotyczącą zaledwie 0,1% informacji w nim zawartej, zmiennością między osobnikami. Za zmienność genomu odpowiadają głównie polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), które są najczęściej występującymi polimorfizmami w genomie człowieka. Obecność SNP w sekwencji kodującej może wywoływać zmianę w budowie białek, a we fragmentach regulatorowych – modyfikację ekspresji genu. Większość badań nad SNP skupia się na regionie promotora surwiwiny. Najczęściej badany jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu w miejscu -31G/C. Przykładem polimorfizmów genu surwiwiny, dla których wykryto zależność z występowaniem nowotworów są: rak endometrium (zwiększona częstość występowania allelu C -31G/C w stosunku do zdrowych tkanek – populacja irańska) oraz rak piersi (brak ryzyka zachorowania na raka piersi dla wariantów genów surwiwiny z polimorfizmem +9194A/G) [19]. Aktualne dane wskazują, że ekspresja surwiwiny istotnie wiąże się z występowaniem raka szyjki macicy. Ma również związek z występowaniem niektórych cech klinicznych choroby. Nie stwierdzono jak dotąd, czy ekspresja białka wpływa na czas przeżycia pacjentek [39].

SURWIVINA JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Za wykorzystaniem surwiwiny w leczeniu chorych na nowotwory przemawia to, że występuje selektywnie

w komórkach rakowych i jest niezbędna do ich przeżycia. Przez długi czas surwiwina nie była rozważana jako cel terapeutyczny, gdyż nie należy do białek błony komórkowej i nie ma aktywności enzymatycznej. Obecnie trwają badania, których celem jest zahamowanie syntezy białka. Wykorzystuje się w nich najczęściej strategię antysensu polegającą na blokowaniu mRNA surwiwiny. Oprócz tego korzysta się z farmakologicznych inhibitorów aktywności białka oraz immunoterapii. Niżej przedstawiono wybrane strategie hamowania zarówno funkcji surwiwiny, jak i ekspresji genu ją kodującego.

Oligonukleotydy antysensowne

Ekspresja genu surwiwiny może być zablokowana przez zastosowanie antysensownych nukleotydów (AO, antisense oligonucleotides). Są to krótkie (zwykle około 13-20 zasad), sekwencje jednoniciowego DNA lub RNA komplementarne do wybranej sekwencji RNA, zaprojektowane do hybrydyzacji. Utworzony w ten sposób duplex DNA/RNA znacznie utrudnia przebieg procesu transkrypcji i następującej po nim translacji, wywołując spadek ekspresji danego genu i ograniczenie ilości białka. Specyfika AO opiera się na tym, że każda sekwencja nukleotydowa składa się jedynie z około 13 zasad w RNA i 17 zasad w DNA, jest obecna więc w ludzkim genomie tylko raz, co teoretycznie eliminuje możliwość błędu. W mysim modelu raka jajnika po dootrzewnowym podaniu oligonukleotydów antysensownych skierowanych na gen surwiwiny zaobserwowano obniżenie ekspresji białka, co ograniczało migrację komórek raka jajnika oraz hamowało przerzuty do otrzewnej. W badaniach Sun i wsp. udowodniono, że hamowanie zdolności migracyjnej komórek raka jajnika odbywało się przez regulację ścieżki sygnałowej IL-6/STAT3 [33]. Poliploidię, której towarzyszyło zahamowanie wzrostu komórek oraz aktywacja kaspazy 3, odnotowano w wybranych nowotworowych liniach komórkowych raka szyjki macicy, raka jajnika oraz piersi po zastosowaniu oligonukleotydu – LY2181308 (5'-TGTGCTATTCTGTGA-ATT-3'). Główny mechanizm działania oligonukleotydu polega na selektywnym wiązaniu się do miejsca 3' regionu nieulegającego translacji w transkrypcie surwiwiny, co wywołuje degradację RNA surwiwiny przez RNazę H [6]. LY2181308 uwalnia wybrane typy nowotworów na gemcytabinę, paklitaksel oraz docetaksel [6]. Obiecujące dane uzyskane podczas badań przedklinicznych spowodowały, że FDA (Food and Drug Administration) wyraziła zgodę na rozpoczęcie badań klinicznych z wykorzystaniem LY2181308.

Małe interferencyjne RNA

Interferencja RNA (RNAi, RNA interference), jest naturalnym mechanizmem regulacji ekspresji genów, w którym stosuje się krótkie (zwykle 21-22 par zasad) odcinki dwuniciowego RNA (dsRNA, double stranded RNA). Charakterystyczną cechą siRNA jest wystający dwunukleotydowy odcinek na 3' końcu obu nici służący do swoistego, potranskrypcyjnego wyciszania genu. RNAi jest techniką bardziej skuteczną niż pozostałe strategie

antysensu ze względu na dostępność w komórce naturalnie występujących enzymów do obróbki RNA. SiRNA w komórce tworzy rybonukleoproteinowy kompleks RISC (RNA-induced silencing complex). W kompleksie tym w początkowym etapie dochodzi do rozwinięcia dwuniciowego siRNA w sposób umożliwiający odłączenie się od kompleksu nici sensownej siRNA, pozostaje jedynie nić antysensowna. Następnie kompleks RISC skanuje znajdujące się w komórce mRNA w poszukiwaniu sekwencji komplementarnej do nici antysensownej siRNA. Przyłącza się do niej zgodnie z zasadą parowania. W wyniku tego cząsteczka mRNA zostaje przecięta w połowie fragmentu komplementarnego do siRNA. Niekompletny mRNA jest rozpoznawany, a następnie degradowany, co zapobiega jego translacji, a tym samym – wycisza ekspresję genu, na matrycy którego był transkrybowany. Wyciszanie genów może zachodzić również z użyciem oligonukleotydów o charakterze palindromów rozdzielonych pętlą. Sekwencje te tworzą tzw. struktury typu spinki (shRNA, short hairpin RNA), które są rozpoznawane przez enzym Dicer, a następnie degradowane do siRNA [38]. Po raz pierwszy badania z zastosowaniem shRNA prowadzono na linii komórek raka szyjki macicy HeLa. Wyniki były bardzo obiecujące. W badanych komórkach stwierdzono opóźnioną mitozę, błędne parowanie chromosomów oraz zatrzymanie komórek w prometafazie cyklu mitotycznego [7]. W linii raka piersi MCF-7, siRNA skierowane przeciwko genowi surwiwiny potęgowało skuteczność chemioterapii zarówno paklitaksellem jak i epirubicyną, wywołując w badanych komórkach apoptozę [4]. Przy skutecznym wyciszeniu genu surwiwiny chemioterapeutyki mogłyby być stosowane w dużo niższych stężeniach, co ograniczyłoby występowanie u pacjentów działań niepożądanych. Ta technika ma więc potencjalną wartość kliniczną. Obniżenie ekspresji mRNA oraz białka surwiwiny wywołujące apoptozę oraz ograniczenie proliferacji i przerzutowania badanych komórek zaobserwowano w liniach komórkowych raka jajnika SKOV-3 oraz HO8910 [37]. Zwiększoną wrażliwość na paklitaksel po wyciszeniu genu surwiwiny odnotowano także w komórkach wyprowadzonych z wodobrzusza pacjentek z nowotworem jajnika [20].

Wielu naukowców skupia się obecnie na opracowaniu wydajnego systemu dostarczania shRNA do odpowiednich miejsc docelowych. Transport shRNA za pomocą mikropęcherzyków degradowanych ultradźwiękami przyniósł korzystne rezultaty w postaci obniżenia ekspresji surwiwiny, Bcl-2, oraz zwiększonej ekspresji Bax i kaspazy-3, a więc zwiększenia odsetka komórek apoptotycznych [10,40]. Skutecznym transporterem cząsteczek siRNA do komórek nowotworowych zwiększającym znacznie wydajność przenoszenia, co potwierdzono m.in. w badaniach na komórkach raka szyjki macicy, mogą być również liposomy [31]. Podsumowując, można stwierdzić, że wyciszenie surwiwiny przez zastosowanie syntetycznych cząsteczek siRNA, jak również wektorów transportujących do komórki shRNA wywołuje ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych, spontaniczną apoptozę oraz zahamowanie wzrostu nowotworowego.

Drobnocząsteczkowe inhibitory surwiwiny – YM155, seferdyna

YM155 jest pierwszym drobnocząsteczkowym inhibitorem surwiwiny, który został odkryty dzięki zastosowaniu technik badań przesiewowych o dużej przepustowości (HTS, high throughput screening). Na poziomie molekularnym YM155 blokuje bogaty w miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1 region promotora surwiwiny, hamując tym samym transkrypcję jej genu. Jak dotąd nie wyjaśniono jednak mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez inhibitor. Warto zauważyć, że zastosowanie YM155 zwykle nie wywoływało zmian mitotycznych oraz poliploidalności. Wiadomo, że surwiwina oddziałuje zarówno z CPC podczas mitozy, jak i z kaspazą-3. Należy więc wyjaśnić, czy YM155 aktywuje kaspazę-3 bezpośrednio, czy indukuje śmierć komórek nowotworowych przez wywołaną zmianami mitotycznymi aktywację tej proteazy. Cheng i wsp. udowodnili, że YM155 indukuje w komórkach raka piersi SK-BR-3, MDA-MB-231, MCF-7 zależną od autofagii śmierć komórkową przez mechanizm niezależny od kaspazy-3 [11]. W komórkach zaobserwowano związaną z autofagią aktywację kaspazy-7 oraz uszkodzenia DNA. YM155 jest także odpowiedzialny za degradację białka XIAP. Udowodniono, że inhibitor jest aktywny w terapii nowotworów piersi bez względu na ekspresję receptora estrogenowego, receptora HER2 oraz kaspazy-3. Obiecujące wyniki badań przedklinicznych nie przełożyły się na sukces w dalszych fazach badań nad YM155. Według ostatnich doniesień YM155 jest substratem białek oporności wielolekowej, co powoduje, że leczenie może nie być skuteczne u chorych z fenotypem MDR (multidrug resistance). Lek znajduje się obecnie w II fazie badań klinicznych [13].

Próbuje się również obniżyć stężenie surwiwiny zapobiegając tworzeniu kompleksów z białkiem opiekuńczym Hsp90. Testowane są substancje naśladujące oligopeptydy (peptidomimetics), których sekwencje opracowano na podstawie struktury surwiwiny w obrębie odcinka wiążącego Hsp90. Taką substancją jest seferdyna (shepherdin) [28].

Immunoterapia

Immunoterapia wykorzystuje działania układu immunologicznego w kierunku leczenia chorób lub zapobiegania

ich dalszemu rozwojowi. W immunoterapii onkologicznej wykorzystuje się komórki układu odpornościowego, które są izolowane od pacjenta, następnie w odpowiedni sposób aktywowane *in vitro* w celu ukierunkowania na komórki nowotworowe, po czym aplikowane ponownie do organizmu chorego. Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że limfocyty cytotoksyczne CD8⁺T wykazują silną odpowiedź cytolityczną wobec konkretnych epitopów surwiwiny [30]. Obiecujące wyniki badań klinicznych przeprowadzonych u pacjentek z rakiem jajnika przedstawili Berinstein i wsp. [3]. Udowodnili, że nowa szczepionka o nazwie DepoVax, zawierająca antygeny surwiwiny, podana z małą dawką cyklofosfamid wywoływała u badanych pacjentek aktywację odpowiedzi immunologicznej swoistych antygenowo komórek T. DepoVax to innowacyjna szczepionka o silnych właściwościach immunogennych. W celu wytworzenia swoistej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej szczepionka została stworzona z użyciem cząstek HLA klasy I wiążących surwiwinę. Uzyskano silną odpowiedź komórek CD4C i CD8C poprzedzoną różnicowaniem dziewiczych komórek T. Podanie szczepionki wywołało u pacjentek szybką aktywację swoistej odpowiedzi immunologicznej. Taka odpowiedź odpornościowa może w przyszłości zostać wykorzystana podczas produkcji szczepionek przeciwko nowotworom.

PODSUMOWANIE

Skutkiem obecności surwiwiny w komórkach nowotworowych może być m.in. odporność na chemioterapię oraz radioterapię. Nadekspresja tego białka koreluje zwykle ze złymi rokowaniami. Surwiwina jest białkiem zaangażowanym w wiele istotnych dla rozwoju nowotworu procesów. Szczegółowe poznanie mechanizmów jej działania może się więc okazać kluczowe dla terapii przeciwnowotworowej. Obiecującym kierunkiem działań wydaje się terapia kombinowana, polegająca na hamowaniu ekspresji surwiwiny i uwarstwieniu komórek nowotworowych na leczenie, przy jednoczesnym zastosowaniu konwencjonalnej chemioterapii. Ponadto, możliwość wykorzystania surwiwiny jako markera diagnostycznego może być istotna we wczesnym wykryciu wielu typów nowotworów, umożliwiając przy tym wdrożenie odpowiedniej terapii oraz wydłużenie życia pacjentów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Altieri D.C.: Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 46-54
- [2] Barrett R.M., Osborne T.P., Wheatley S.P.: Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle*, 2009; 8: 278-283
- [3] Berinstein N.L., Karkada M., Oza A.M., Odunsi K., Vilella J.A., Nemunaitis J.J., Morse M.A., Pejovic T., Bentley J., Buyse M., Nigam R., Weir G.M., MacDonald L.D., Quinton T., Rajagopalan R. i wsp.:

Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients. *Oncoimmunology*, 2015; 4: e1026529

- [4] Bi W.L., Wang F.S., Dong H.L.: Study of survivin-siRNA combined with the chemotherapy drugs to enhance the breast cancer MCF-7 cells apoptosis and reverse drug resistance. *Cancer Res Clin*, 2014; 26: 310-314

- [5] Cao X.Q., Lu H.S., Zhang L., Chen L.L., Gan M.F.: MEK3 and survivin expression in cervical cancer: association with clinicopatho-

- logical factors and prognosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 5271-5276
- [6] Carrasco R.A., Stamm N.B., Marcussen E., Sandusky G., Iversen P., Patel B.K.: Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol. Cancer Ther.*, 2011; 10: 221-232
- [7] Carvalho A., Carmena M., Sambade C., Earnshaw W.C., Wheatley S.P.: Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 2987-2998
- [8] Chen L., Liang L., Yan X., Liu N., Gong L., Pan S., Lin F., Zhang Q., Zhao H., Zheng F.: Survivin status affects prognosis and chemosensitivity in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2013; 23: 256-263
- [9] Chen P., Zhu J., Liu D.Y., Li H.Y., Xu N., Hou M.: Over-expression of survivin and VEGF in small-cell lung cancer may predict the poorer prognosis. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 775
- [10] Chen Z.Y., Liang K., Lin Y., Yang F.: Study of the UTMD-based delivery system to induce cervical cancer cell apoptosis and inhibit proliferation with shRNA targeting Survivin. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 1763-1777
- [11] Cheng S.M., Chang Y.C., Liu C.Y., Lee J.Y., Chan H.H., Kuo C.W., Lin K.Y., Tsai S.L., Chen S.H., Li C.F., Leung E., Kanwar J.R., Huang C.C., Chang J.Y., Cheung C.H.: YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 2015; 172: 214-234
- [12] Colnaghi R., Wheatley S.P.: Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 22592-22604
- [13] Coumar M.S., Tsai F.Y., Kanwar J.R., Sarvagalla S., Cheung C.H.: Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat. Rev.*, 2013; 39: 802-811
- [14] Debeb B.G., Smith D.L., Li L., Larson R., Xu W., Woodward W.A.: Differential effect of phosphorylation-defective survivin on radiation response in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer. *PLoS One*, 2015; 10: e0120719
- [15] Dobrzycka B., Mackowiak-Matejczyk B., Terlikowska K.M., Kulesza-Bronczyk B., Kinalski M., Terlikowski S.J.: Prognostic significance of pretreatment VEGF, survivin, and Smac/DIABLO serum levels in patients with serous ovarian carcinoma. *Tumor Biol.*, 2015; 36: 4157-4165
- [16] Duffy M.J., O'Donovan N., Brennan D.J., Gallagher W.M., Ryan B.M.: Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.*, 2007; 249: 49-60
- [17] Fernández J.G., Rodriguez D.A., Valenzuela M., Calderon C., Urzúa U., Munroe D., Rosas C., Lemus D., Diaz N., Wright M.C., Leyton L., Tapia J.C., Quest A.F.: Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced b-catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol. Cancer*, 2014; 13: 209
- [18] Hu S., Qu Y., Xu X., Xu Q., Geng J., Xu J.: Nuclear survivin and its relationship to DNA damage repair genes in non-small cell lung cancer investigated using tissue array. *PLoS One*, 2013; 8: e74161
- [19] Jaiswal P.K., Goel A., Mittal R.D.: Survivin: a molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.*, 2015; 141: 389-397
- [20] Kar R., Palanichamy J.K., Banerjee A., Chattopadhyay P., Jain S.K., Singh N.: Survivin siRNA increases sensitivity of primary cultures of ovarian cancer cells to paclitaxel. *Clin. Transl. Oncol.*, 2015; 17: 737-742
- [21] Khan S., Bennit H.F., Turay D., Perez M., Mirshahidi S., Yuan Y., Wall N.R.: Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer*, 2014; 14: 176
- [22] Kong B., Tsuyoshi H., Orisaka M., Shieh D.B., Yoshida Y., Tsang B.K.: Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015; 1350: 1-16
- [23] Konopelski P., Dynowska A.: Programowana śmierć komórki a białka z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich rola w nowotworzeniu. *Problemy Nauk Biologicznych*, 2014; 63: 1-12
- [24] Lee M.R., Ji S.Y., Mia-Jan K., Cho M.Y.: Chemoresistance of CD133(+) colon cancer may be related with increased survivin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 463: 229-234
- [25] Mobahat M., Narendran A., Riabowol K.: Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 2494-2516
- [26] Moraes G.M., Delbue D., Silva K.L., Robaina M.C., Khongkow P., Gomes A.R., Zona S., Crocamo Z., Mencalha A.L., Magalhães L.M., Lam E.W., Maia R.C.: FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell. Signal.*, 2015; 27: 2496-2505
- [27] Pennati M., Folini M., Zaffaroni N.: Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2008; 12: 463-476
- [28] Plescia J., Salz W., Xia F., Pennati M., Zaffaroni N., Daidone M.G., Meli M., Dohi T., Fortugno P., Nefedova Y., Gabrilovich D.I., Colombo G., Altieri D.C.: Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell*, 2005; 7: 457-468
- [29] Plewka D., Jakubiec-Bartnik B., Morek M., Bogunia E., Bienioszek M., Wolski H., Kotrych D., Dziekan K., Seremak-Mrozikiewicz A., Plewka A.: Survivin in ovary tumors. *Ginekol. Pol.*, 2015; 86: 525-530
- [30] Ryan B.M., O'Donovan N., Duffy M.J.: Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.*, 2009; 35: 553-562
- [31] Shuang Y., Zhihua G., Xuwei Y., Xie J., Lee R.J., Dan J., Lesheng T.: Enhanced survivin siRNA delivery using cationic liposome incorporating fatty acid-modified polyethylenimine. *Chem. Res. Chin. Univ.*, 2015; 31: 401-405
- [32] Soleimanpour E., Babaei E.: Survivin as a potential target for cancer therapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015; 16: 6187-6191
- [33] Sun Y., Di J.M., Chen C.N.: Effects of anti-survivin oligonucleotides on growth of peritoneally implanted ovarian cancer xenografts in nude mice. *J. Southern Med. Univ.*, 2015; 35: 1211-1214
- [34] Urbaniak J.: Ekspresja surwiwiny w nowotworach ludzkich. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13: 1037-1046
- [35] Waligórska-Stachura J., Andrusiewicz M., Sawicka-Gutaj N., Kubiczak M., Jankowska A., Liebert W., Czarnywojtek A., Wasko R., Blanco-Gangoo A.R., Ruchała M.: Evaluation of survivin splice variants in pituitary tumors. *Pituitary*, 2015; 18: 410-416
- [36] Wheatley S.P.: The functional repertoire of survivin's tails. *Cell Cycle*, 2015; 14: 261-268
- [37] Xue H., Chen Y., Cai X., Zhao L., He A., Guo K., Zheng X.: The combined effect of survivin-targeted shRNA and emodin on the proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2013; 24: 937-944
- [38] Yeung B.Z., Lu Z., Wientjes G.M., Au J.L.: High sensitivity RT-qPCR assay of nonlabeled siRNA in small blood volume for pharmacokinetic studies: application to survivin siRNA. *AAPS J.*, 2015; 17: 1475-1482
- [39] Zhang J., Wang Y., Huo J., Zhang L., Wang Z.: Expression and clinical significance of survivin in cervical cancer: a systematic review. *Chin. J. Evid-based Med.*, 2014; 14: 216-224
- [40] Zhang Y., Chang S., Sun J., Zhu S., Pu C., Li Y., Zhu Y., Wang Z., Xu R.X.: Targeted microbubbles for ultrasound mediated short hairpin RNA plasmid transfection to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis of ovarian cancer A2780/DDP cells. *Mol. Pharm.*, 2015; 12: 3137-3145
- [41] Zhang Y., Chen H.X., Zhou S.Y., Wang S.X., Zheng K., Xu D.D., Liu Y.T., Wang X.Y., Wang X., Yan H.Z., Zhang L., Liu Q.Y., Chen W.Q., Wang Y.F.: Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol. Cancer*, 2015; 14: 56

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.