

# Baş ve boyun kanserlerinin genetik temeli ve gen tedavisi

## Genetic basis of head and neck cancers and gene therapy

Dr. Halil Erdem Özel, Dr. Mahmut Özkırış, Dr. Zeliha Kapusuz Gencer, Dr. Levent Saydam

*Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye*

Cerrahi ve geleneksel kombine tedaviler özellikle ileri evre baş ve boyun kanserlerinde yeterince başarılı olamamaktadır. Hedef dokuya özgül olmamaları ve hastada oluşturduğu toksisite kemoterapi ve radyoterapinin önemli dezavantajlarıdır. Bu nedenle, gen tedavisi daha özgül bir yaklaşım sunabilir. Gen tedavisinin amacı, hastada sistemik toksisite oluşturmadan, malign hücreleri seçici olarak elimine eden terapötik genlerin kanser hücrelerine aktarılmasıdır. Bu makalede baş ve boyun kanserlerinin genetik temeli ve gen tedavisinin önemli unsurları gözden geçirildi: (i) Onkogenlerin inhibisyonu; (ii) tümör supresör gen replasmanı; (iii) malign hücrelere karşı immün yanıtın düzenlenmesi; (iv) ön ilaçların genetik aktivasyonu; ve (v) antianjiyogenik gen tedavisi. Günümüzde gen tedavisi baş ve boyun kanserlerinde geleneksel tedavilerinin yerini alacak düzeyde değildir, ancak yakın gelecekte önemli rolü olacağına şüphe yoktur.

**Anahtar Sözcükler:** Adenoviral vektör; apoptozis; gen tedavisi; baş boyun kanseri; moleküler patogenezi; p53.

Surgery and combinations of traditional treatments are not successful enough particularly for advanced stage head and neck cancer. The major disadvantages of chemotherapy and radiation therapy are the lack of specificity for the target tissue and toxicity to the patient. As a result, gene therapy may offer a more specific approach. The aim of gene therapy is to present therapeutic genes into cancer cells which selectively eliminate malignant cells with no systemic toxicity to the patient. This article reviews the genetic basis of head and neck cancers and important concepts in cancer gene therapy: (i) inhibition of oncogenes; (ii) tumor suppressor gene replacement; (iii) regulation of immune response against malignant cells; (iv) genetic prodrug activation; and (v) antiangiogenic gene therapy. Currently, gene therapy is not sufficient to replace the traditional treatments of head and neck cancers, however there is no doubt that it will have an important role in the near future.

**Key Words:** Adenoviral vector; apoptosis; gene therapy; head and neck cancer; molecular pathogenesis; p53.

Cerrahi tekniklerin daha iyi tanımlanmasıyla, radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) uygulamasındaki gelişmeler sayesinde baş ve boyun kanserlerinin (BBK) tedavisi oldukça iyi bir düzeye gelmiştir.

Ancak bütün bu yeniliklerin özellikle de ileri evre BBK'lerdeki sağkalıma olumlu etkisi sınırlıdır. Bu durum gen tedavisi gibi yeni arayışlara girilmesine neden olmuştur.



Canlıların tüm özellikleri kuşaktan kuşağa, 'gen' adı verilen maddelerle taşınmaktadır. Genetik materyal hücrelerde deoksiribonükleik asit (DNA) olarak bulunur. Deoksiribonükleik asitteki kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Germ hücrelerini etkileyen mutasyonlar sonraki kuşaklara iletilir ve kalıtsal hastalıklara neden olabilir. Somatik hücrelerdeki mutasyonlar ise sonraki kuşaklara iletilmez; ancak, kanser ve doğuştan bozukluklara neden olduklarından önemlidir. İnsanlarda birçok malign tümör genetik ve çevresel faktörlerin kompleks etkileşimi sonucu gelişir. Aslında, en temel düzeyde, kromozomal ve genetik mutasyonların birikimi söz konusu olduğu için, tüm kanserlerin gelişimi ve progresyonu genetik zeminde olur.<sup>[1]</sup> Genetik yatkınlığı olan kişilerde çok az miktarlarda tütün ve alkol kullanımı olsa bile baş ve boyun skuamöz hücreli kanseri (BBSHK) gelişme olasılığı yüksektir; oysa, çok yoğun tütün ve alkol kullanan ancak genetik yatkınlığı olmayan kişilerde BBSHK gelişme olasılığı daha düşük olabilir.<sup>[2]</sup> Baş ve boyun skuamöz hücreli kanserlerinde karsinogenezi açıklamak için en iyi model alan kanserleşmesidir. Doku yüzeyinin tekrarlayan (tütün gibi) kanserojen etkilere maruz kalması birden fazla bağımsız premalign ve malign odakların gelişmesi riskini artırır.<sup>[3]</sup> Birçok kanser tipinde, tümör supresör genlerin kaybı ve onkogen aktivasyonu kanser gelişiminde beraber rol oynar.<sup>[4]</sup>

### TÜMÖR SUPRESÖR GENLER VE ONKOGENLER

Tümör supresör genleri hücre siklusunu düzenleyen genlerdir. İnsanlarda kanserle ilgili olarak en fazla çalışılan hücre siklusunu geni 17p kromozomunda bulunan p53 tümör supresör genidir.<sup>[5,6]</sup> p53'ün BSK'lerde de önemli rol oynadığı bilinmektedir.<sup>[7]</sup> Bu gen hücrenin DNA hasarının veya oluşmuş bir mutasyonun onarılmasına olanak tanır. Eğer DNA onarımı başarısız olursa, p53 apoptozisi veya programlanmış hücre ölümünü indükleyebilir.<sup>[8]</sup> p53 aktivitesindeki kayıp kromozomal anormalliklerin sayısında artış ile sonuçlanır.<sup>[9]</sup> Cerrahi sınırlar mikroskopik inceleme ile normal görünse de marjinlerde mutant p53'ün varlığı nüks için bir habercidir. p53'de bir anormallik olması, normal mukozanın displastik mukozaya dönüşümü gibi skuamöz hücreli karsinomdaki erken genetik değişikliklerden sorumlu olabilir.<sup>[9]</sup> p53'ün aktivitesinin iyi olması KT ve diğer yardımcı tedavilere yanıtın daha yüz güldürücü olması ile de ilintilidir.<sup>[10]</sup>

Onkogenler kanser gelişimine neden olan genler olarak aydınlatılmıştır. Bunun bir örneği RET (REarranged during Transfection) onkogenidir. 10q11.2 kromozomunda yerleşik olan RET geninde germline mutasyonlar olan ailelerde herediter medüller tiroid karsinomu geliştiği ortaya çıkmıştır.<sup>[11]</sup> 11q13 kromozomunda yerleşmiş olan siklin D1, BBSHK'lerde sıklıkla amplifiye olan protoonkogenidir.<sup>[12]</sup> Aşırı aktivasyonu ilerlemiş hastalık ile ilişkilidir ve hastalısız sağkalım süresini azaltır. p16 geni ürünü, siklin yollarının ve siklin D1'in bir inhibitörüdür ve dolayısıyla, hücre siklusunu regülasyonuna katılır. p16 inaktivasyonu BBSHK'lerdeki en erken genetik olaylardan biridir.<sup>[13,14]</sup>

B-cell lymphoma 2 (bcl-2) gen ailesi ürünleri hücre siklusunu regülasyonuna ve apoptozise katılır. B-cell lymphoma-2 geni ürünü p53 bağımlı yolları bloke ederek apoptozisi inhibe eder. B-cell lymphoma 2'nin fazla aktivasyonu KT'de dirence neden olur. Bax geni, bcl-2'nin bir inhibitörünü kodlar. Bax geni apoptozisin indüksiyonunda rol oynar.<sup>[15]</sup> Bax ile bcl-2'nin oranı bir apoptotik uyarıya takiben hücrenin sağkalımını veya ölümünü belirler.<sup>[16]</sup>

### SİTOGENETİK VE BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KANSERİ İLİŞKİSİ

Baş ve boyun skuamöz hücreli kanserlerinde birtakım kromozomal anormallikler ortaya konmuştur. Onkogenlerin ve tümör supresör genlerin delesyonlar, amplifikasyonlar ve translokasyonların kırılma noktalarında yerleştiği düşünülmektedir. Kanser hücreleri haploid (normal DNA'nın yarısı miktarda), diploid (normal DNA'nın iki katı miktarda); veya tetraploid (normal DNA'nın dört katı miktarda) olabilir. Aneuploidi (anormal DNA miktarı) birçok kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Bunların tümör hücrelerinin bozulmuş proliferasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir ve agresif klinik davranışı yansıtmaktadır.<sup>[17,18]</sup>

### Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) alfa, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

Epidermal büyüme faktörü, EGF reseptörü ve TGF alfa gen ürünleri BBSHK'lerde sıklıkla fazla miktarda ifade edilmektedir. Fibroblast büyüme faktörü ile ilişki genlerin (hst-1 ve int-2) amplifikasyonu ile klinik evrenin korelasyon eğilimi olduğu görülmüştür.<sup>[19]</sup> Hayvanlarda yapılan çalışmalarda IGF reseptörlerini antagonize eden gen tedavilerinin sağkalım üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir.<sup>[20]</sup>

## TEK VURUŞ VE İKİ VURUŞ TEORİLERİ

Bazı kişiler kansere karşı daha yatkındır, çünkü tümör supresör veya onkogen mutasyonları için heterozigot durumundadır. Bir diploid hücrede zaten hazırda bir bozuk gen kalıtımla kazanılmıştır (tek vuruş) ve kalan normal gen kopyasının mutasyona uğraması (iki vuruş) kanser oluşumu için yeterlidir. Kalıtımla kazanılmış bir anormallik olmadan kanser oluşması ise daha düşük olasılıklıdır, çünkü iki mutasyonun da sonradan kazanılması gerekmektedir. Bu görüşün doğruluğu bazı kanserler için gösterilmiştir.<sup>[2,7]</sup> Retinoblastoma hem sporadik hem de kalıtsal şekilde oluşabilir. Sporadik retinoblastoma tek taraflıdır. Herediter forma sahip kişiler 'RB1' isimli bir tümör supresör genin kaybına, mutasyonuna veya inaktivasyonuna sahiptir. Bu kişiler herediter olarak belirlenmiş tek vuruşa sahiptir. Retinoblastoma oluşma olasılığı yüksektir ve genellikle bu lezyonlar tek taraflıdır.<sup>[21]</sup> Baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde bu genin kullanılmasının başarılı sonuçları olduğu gösterilmiştir.<sup>[22]</sup>

Baş ve boyun skuamöz hücreli kanserleri, bir klonal hücre grubunda, sonradan kazanılmış birçok genetik bozukluğun neticesinde birkaç basamakta oluşmaktadır. Bu genetik mutasyonlar muhtemelen belli tek bir sırada oluşmamaktadır. Ancak p16 kaybı gibi bir takım genetik değişikliklerin erken oluştuğu ve bunların displastik dokularda bulunduğu düşünülmektedir. Cyclin D1 aşırı aktivasyonu gibi diğer değişiklikler ise geç oluşmaktadır ve invaziv skuamöz karsinom ve metastaza neden olabilmektedir.<sup>[23]</sup>

## GEN TEDAVİSİNİN TEMEL PRENSİPLERİ

Gen tedavisi, bir kişinin somatik hücrelerine, bir hastalığı tedavi etmek amacıyla fonksiyonel genlerin verilmesi olarak tanımlanabilir. Kanser gen tedavisinin amacı, genleri bir ilaç olarak kullanarak malign hücreleri onarmak veya öldürmektir. Kanser tedavisinde kullanılan genler dört sınıfta toplanabilir:

1. Malign hücrelere karşı immün yanıtını düzenleyen genler (T hücrelerini, doğal öldürücü hücreleri ve makrofajları uyaran bir dizi sitokin ve alloantijen genleri),<sup>[24]</sup>

2. Malign hücrelerin ölümünü uyaran genler (Apoptozisi uyaran genler, önilaçların aktivasyonunu sağlayan genler veya hücreleri RT'ye duyarlı kılan genler),<sup>[25]</sup>

3. Tümör oluşumunu önleyen genler (Tümör supresör genleri uyaran veya onkogenleri etkisizleştiren genler),<sup>[14,24]</sup>

4. Hastayı diğer tedavi yaklaşımlarının zararlı etkilerinden koruyan genler (Normal kemik iliğini KT'ye dirençli hale getiren genler).

## GEN TRANSFER EDİCİ AJANLAR

Hedef hücrelere gen transferini sağlayan ajanlara 'vektör' denir. Vektör, çıplak bir DNA veya RNA olabileceği gibi, DNA veya RNA ile bağlanmış diğer bir ajan (örn: ligand veya lipozom) veya tedavi edici geni taşıyan bir virüs partikülü de olabilir. İdeal bir vektör organizmaya toksik etki yaratmadan hedef tümör hücrelere gen aktarımını sağlayabilmelidir. Virüsler genetik materyali doğal olarak aktarabilen mikroorganizmalardır.

### 1. Viral vektörler

#### a. Retrovirüs

Retrovirüs gen tedavi protokollerinde kullanılan ilk vektördür. RNA virüsüdür. Viral RNA konak genoma bir provirüs şeklinde kalıcı olarak entegre olur ve konakta genetik değişikliklere neden olabilir. Hücreleri nonspesif olarak enfekte eder. Viral kod sekansları [group-specific antigen (gag), polymerase (pol), envelope (env)] çıkarılarak yerlerine tedavi edici genler yerleştirilir. Lentivirüs dışında retrovirüsler sadece bölünen hücrelere etkilidir. Bu vektörlerin dezavantajları konsantrasyon edilmelerinin güç olması, *in vivo* ortamda transdüksiyonun yeterli etkinlikte olmaması ve hedef hücre dışındaki hücreleri de etkilemesidir. Retrovirüsler ile *in vitro* ortamlarda dil kanserinin gen tedavisinde olumlu sonuçlar bildirilmiştir.<sup>[26]</sup>

#### b. Adenovirüs

Adenoviral vektörler E1 bölgesi değiştirilerek kullanılmaktadır. E1 bölgesinin çıkarılması virüsün litik proliferasyonunu önlemektedir ve replikasyon açısından defektif bir vektör haline gelmesini sağlamaktadır. Adenovirüs bölünmeyen hücreleri etkili bir biçimde enfekte edebilir ve çok miktarda gen ürünü oluşturur. Ancak, gen ürünleri konakta immüniteyi uyardıkları için etki geçicidir. Bu nedenle tekrarlayan dozlara gereksinim gösterebilir ve kanser tedavisinde nükse neden olabilir. Oral skuamöz hücreli karsinom tedavisinde transdüksiyon etkinliğinin iyileştirilmesi amacıyla katyonik lipozom ile konjuge rekombinant adenovirüs vektörü kullanılarak başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir.<sup>[27]</sup>

c. *Adeno-yardımcı virüs (Adeno-associated virus; AAV)*

Adeno-yardımcı virüs, zarfsız, tek sarmal DNA virüsüdür. Hücrede latent olarak kalır ve replikasyon için genellikle bir yardımcı virüsle (adenovirüs, herpesvirüs veya vaccinia virüs) ko-enfeksiyon gerektirir. Adeno-yardımcı virüs bölünmeyen hücreleri enfekte edebilir ve konak genomuna entegre olarak genin tedavi edici etkinliği devamlı olabilir. Üstelik viral kod sekansları olmadığı için konakta immün yanıtı neden olmaz. Ancak üretimi zordur ve transdüksiyon düşük etkinliktedir. Adeno-yardımcı virüs ile apoptozisi ündükleyen genlerin transferi ve cisplatinin kombine tedavisinin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda BBSHK'lerde sinerjistik etkili olduğu bildirilmiştir.<sup>[28]</sup>

d. *Herpesvirüs*

Herpes simpleks virüsü (HSV) zarflı, bir çift sarmal DNA virüsüdür. Nöronal hücrelere spesifik bir tropizm gösterir ve hücrelerde gizli olarak kalabilir. Geniş bir genoma sahip olması nedeniyle büyük miktarda yabancı DNA fragmanlarını yerleştirebilir. Ancak yeterince karakterize edilememiştir. Baş boyun kanserlerinin tedavisinde HSV ile transfer edilen intihar genlerinin *in vitro* çalışmalarında başarılı olduğu bildirilmiştir.<sup>[29]</sup>

e. *Vaccinia virüs*

Vaccinia virüs, poks virüsler ailesinin bir üyesi olarak, DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonu ayrıcalıklı olarak sitoplazmada gerçekleşen tek virüstür. Poks virüsler, büyük miktarlarda DNA taşıyabilir. Genomlarını entegre etmedikleri için etkileri geçicidir. Baş ve boyun skuamöz hücreli kanserlerinin gen tedavisinde bu virüs denenmiştir ve umut verici sonuçlar alınmıştır.<sup>[30]</sup>

f. *Simian virüs 40 (SV40)*

Simian virüs 40 ile transfer edilen genin peristan olarak ifade edildiği bulunmuştur. Tüm viral kodlama sekansları uzaklaştırılabilir ve bir yardımcı adenovirüs ile üretilebilir. İnsan hücrelerinde transdüksiyonunun düşük etkinliğe sahip olması SV40 vektörünün kullanımını kısıtlamaktadır. Bu virüsün BBSHK'lerde kullanım alanı olduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>[31]</sup>

## 2. Viral olmayan vektörler

Viral olmayan vektörlerin spesifik doku ve organlara yönlendirilmesi nispeten kolaydır. Zayıf

immünojenik etkilerinden dolayı tekrarlayan uygulamalar yapmak mümkündür. Ayrıca taşıma kapasiteleri bazı özelliklerin DNA molekülüne eklenmesine uygundur. Çıplak DNA ve DNA taşıyıcı kompleksler bu amaçla kullanılabilir.<sup>[32]</sup> Çıplak DNA (saflaştırılmış plazmid) en basit vektördür. Lipozomlar herhangi bir boyutta DNA ile kombine edildiklerinde birçok hücre tipine aktarılabilecek bir lipid - DNA kompleksi oluşturur. Ancak verilen genlerin ifadenmesi düşük ve geçici olmaktadır.

## KANSERDE GEN TEDAVİSİ STRATEJİLERİ

### 1. Onkogenlerin aktivasyonunun inhibe edilmesi

Hedef onkogene ait nükleotid dizisini tamamlayıcı DNA parçaları içeren bir vektör verilir ve bu şekilde onkogene ait protein sentezi bloke edilmiş olur.<sup>[33]</sup> Onkogenlerin inaktivasyonu için onkoproteinleri nötralize eden antikoları kodlayan vektörler de bu amaçla kullanılabilir.<sup>[34]</sup> Onkogen inaktivasyonu ile tümör hücreleri ortadan kaldırılamaz. Bu nedenle tümörün baskılanmasını sağlamak için onkogene ait "antisense" moleküllerin devamlı olarak verilmesi gerekmektedir.

### 2. Tümör supresör gen aktivasyonu

p53 mutasyonu bütün insan kanserlerinin %50'den daha fazlasında bulunmaktadır.<sup>[5]</sup> Fonksiyonel p53 eksikliği olan kanser hücrelerinde p53 gen aktivasyonunun yeniden inşa edilmesi apoptozise neden olmaktadır.<sup>[35]</sup> Baş boyun bölgesine ait kanserlerde en sık rastlanan genetik değişikliklerden biri de p16 tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonudur. Bu nedenle p16 geni gen replasmanında ideal bir hedef olmuştur. Bu şekilde tümör baskılayıcı genlerin verilmesi durumunda apoptozisin uyarıldığı bildirilmiştir.<sup>[13]</sup> Kemoterapötik ilaçların, iyonize radyasyonun veya diğer tümör baskılayıcı genlerin kombine tedavisi p53 gen tedavisi için terapötik yanıtı güçlendirmektedir.<sup>[10]</sup>

### 3. İmmünoterapi

İmmünoterapide amaç tümörle ilişkili antijenlerin (bağışıklık sistemi tarafından antikor üretimine yol açan yabancı moleküller) belirlenmesi ve antijen sunucu hücrelerin antitümör immün yanıtının artırılmasıdır. Bu şekilde tümör hücreleri CD8+, CD4+ T lenfositleri veya dendritik hücreler tarafından tanınabilmektedir.<sup>[36,37]</sup> Ancak tümör hücrelerinin tümünde sadece bir antijenin dominant olarak

bulunma şansının düşük olması nedeniyle birden fazla antijeni içeren aşılama kullanılmaktadır. Otoimmün hastalık gelişimi bu tedavinin potansiyel bir riskidir.<sup>[38]</sup>

#### 4. İntihar gen tedavi

Bu tedavide önce tümör hücrelerine gen yerleştirilir, daha sonra bu gene ait protein ürünü hastaya verilen bir ön ilaç (henüz aktif hale dönüştürülmemiş ilaç) toksik ürünlere çevirerek hücre ölümüne yol açar. İntihar gen tedavisi ile ilgili BBSHK'ler için hayvan çalışmalarında başarılı sonuçların alındığı bildirilmiştir.<sup>[29,39]</sup>

#### 5. Antianjiyogenik gen tedavisi

Tümör dokusundaki büyümenin en önemli ayırt edici özelliklerinden biri anjiyogenezis yoluyla sağlanan yüksek düzeydeki kan akımıdır.<sup>[9]</sup> Tümör hücreleri tarafından üretilen anjiyogenetik faktörler arasında vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve anjiyoproteinler bulunmaktadır. Anjiyogenezis inhibitörleri arasında endostatin, anjiyostatin, antitrombin bulunmaktadır. Bu iki grup arasındaki denge tümörün anjiyogenezis özelliğini belirlemektedir.<sup>[40,41]</sup>

Sonuç olarak, gen tedavisi uygulamalarında çeşitli sınırlamalar bulunmakla birlikte pratikte klinik kullanımının bulunduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde gen tedavisi geleneksel tedavilerin yerini alacak düzeyde değildir ancak KT ve RT ile kombine edilerek tedavinin etkinliği artırılabilir. Ancak gelecek yıllarda gen tedavisinde önemli gelişmelerin yaşanacağı kuşkusuzdur.

#### Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

#### Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

#### KAYNAKLAR

1. Concus AP, Benninger MS, Van Dyke DL, Korf BR. Genetics. In: Bailey BJ, editor. Head and neck surgery-otolaryngology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. p. 19-33.
2. Knudson A Jr. Genetics of tumors of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119:735-7.
3. Lippman SM, Shin DM, Lee JJ, Batsakis JG, Lotan R, Tainsky MA, et al. p53 and retinoid chemoprevention of oral carcinogenesis. Cancer Res 1995;55:16-9.
4. Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene 1989;4:1463-8.
5. Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. Nucleic Acids Res 1997;25:151-7.
6. Nielsen LL, Maneval DC. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. Cancer Gene Ther 1998;5:52-63.
7. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. J Oral Pathol Med 2000;29:413-25.
8. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997;88:323-31.
9. Moon C, Oh Y, Roth JA. Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. Clin Cancer Res 2003;9:5055-67.
10. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang WW, Owen-Schaub LB, Roth JA. Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. Cancer Res 1994;54:2287-91.
11. Martucciello G, Lerone M, Bricco L, Tonini GP, Lombardi L, Del Rossi CG, et al. Multiple endocrine neoplasias type 2B and RET proto-oncogene. Ital J Pediatr 2012;38:9. doi: 10.1186/1824-7288-38-9.
12. Sabir M, Baig RM, Mahjabeen I, Kayani MA. Novel germline CDK4 mutations in patients with head and neck cancer. Hered Cancer Clin Pract 2012;10:11.
13. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta 1998;1378:F115-77.
14. Li AA, Ng E, Shi W, Lee A, Chia M, Liu TJ, et al. Potential efficacy of p16 gene therapy for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 2004;110:452-8.
15. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 1995;80:293-9.
16. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993;74:609-19.
17. Hui AB, Lo KW, Leung SF, Teo P, Fung MK, To KF, et al. Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridisation. Int J Cancer 1999;82:498-503.
18. Mäkitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O'Sullivan B, et al. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 2003;9:2177-84.
19. Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res 1989;49:5505-8.
20. Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, et al. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. Cancer Res

- 1996;56:3038-41.
21. Pradhan MA, Ng Y, Strickland A, George PM, Raizis A, Warrington J, et al. Role of genetic testing in retinoblastoma management at a tertiary referral centre. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:231-6. doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02239.x.
  22. Li D, Day KV, Yu S, Shi G, Liu S, Guo M, et al. The role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:4637-44.
  23. Gallick GE, Sacks PG, Maxwell SA, Steck PA, Gutterman JU. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines as a model system for the study of oncogene expression during tumor progression and metastasis. *Prog Clin Biol Res* 1986;212:97-111.
  24. Qiu ZH, Wu CT, Lao MF, Pan LZ, Li YM. Growth suppression and immunogenicity enhancement of Hep-2 or primary laryngeal cancer cells by adenovirus-mediated co-transfer of human wild-type p53, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1 genes. *Cancer Lett* 2002;182:147-54.
  25. Wang CH, Tsai LJ, Tsao YP, Hsieh JT, Chien WW, Liao CL, et al. Recombinant adenovirus encoding H-ras ribozyme induces apoptosis in laryngeal cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:805-14.
  26. Ji YX, Zhang P, Chen WM, Zhu SR, Tao XJ. Construction of antisense human tankyrase-1 RNA retroviral vector and its inhibition on tongue cancer cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007;42:180-3. [Abstract]
  27. Fukuhara H, Hayashi Y, Yamamoto N, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, et al. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2003;39:601-9.
  28. Jiang M, Liu Z, Xiang Y, Ma H, Liu S, Liu Y, et al. Synergistic antitumor effect of AAV-mediated TRAIL expression combined with cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2011;11:54. doi: 10.1186/1471-2407-11-54.
  29. Price DL, Lin SF, Han Z, Simpson G, Coffin RS, Wong J, et al. Oncolysis using herpes simplex virus type 1 engineered to express cytosine deaminase and a fusogenic glycoprotein for head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;136:151-8. doi: 10.1001/archoto.2009.214.
  30. Tysome JR, Wang P, Alusi G, Briat A, Gangeswaran R, Wang J, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther* 2011;22:1101-8. doi: 10.1089/hum.2010.172.
  31. Wollenberg B, Lang S, Schmitt B, Kastenbauer E, Zeidler R. In vitro studies of liposome-mediated gene transfer into head and neck cancer cell lines. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254 Suppl 1:S130-2.
  32. Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997;15:647-52.
  33. Hélène C, Toulmé JJ. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990;1049:99-125.
  34. Deshane J, Siegal GP, Wang M, Wright M, Bucy RP, Alvarez RD, et al. Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti-erbB-2 intracellular single-chain antibody for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol* 1997;64:378-85.
  35. Hamada K, Alemany R, Zhang WW, Hittelman WN, Lotan R, Roth JA, et al. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res* 1996;56:3047-54.
  36. Mayordomo JL, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995;1:1297-302.
  37. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725-9.
  38. Pardoll DM. Inducing autoimmune disease to treat cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5340-2.
  39. Ambade AV, Joshi GV, Mulherkar R. Effect of suicide gene therapy in combination with immunotherapy on antitumour immune response & tumour regression in a xenograft mouse model for head & neck squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 2010;132:415-22.
  40. Taniguchi T, Rigg A, Lemoine NR. Targeting angiogenesis: genetic intervention which strikes at the weak link of tumorigenesis. *Gene Ther* 1998;5:1011-3.
  41. Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol* 1999;17:343-8.