

Peran RNAi dalam Menghambat Pertumbuhan Kanker: Meninjau Efek Knockdown pada Ekspresi Gen

Luluk Yunaini, Dwi Anita
Suryandari, Puji Sari

Departemen Biologi Kedokteran
Fakultas Kedokteran, Universitas
Indonesia Jakarta Pusat,
Indonesia.

Penulis korespondensi:
Luluk Yunaini

Jl Salemba Raya No.6 RW.5,
Kenari, Kec. Senen, Kota Jakarta
Pusat, Daerah Khusus Ibukota
Jakarta, Indonesia 10430.
Email: luluk.yunaini@ui.ac.id

ABSTRAK

RNAi memiliki peranan penting dalam menahan laju perkembangan kanker dengan focus pada efek knockdown terhadap ekspresi gen. Analisis literatur baru dilakukan untuk menyajikan tinjauan komprehensif tentang mekanisme RNAi dan implikasinya dalam menghambat perkembangan kanker. Artikel ini menyoroti berbagai strategi RNAi yang digunakan untuk menargetkan gen-gen kunci yang terlibat dalam proses kanker dan meninjau dampaknya terhadap regulasi ekspresi gen. Selain itu, artikel ini membahas kemajuan terbaru dalam pengembangan terapi RNAi dan potensinya sebagai pendekatan yang menjanjikan dalam pengobatan kanker. Dengan menyoroti keunggulan dan batasan teknik knockdown, artikel ini merangkum pentingnya penelitian dalam mengarahkan pengembangan terapi yang lebih efektif dan canggih untuk pengobatan kanker.

Kata Kunci: Ekspresi gen, Kanker, Knockdown, RNAi, terapi

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) plays a crucial role in restraining the progression of cancer, focusing on the knockdown effect on gene expression. A recent literature analysis was conducted to provide a comprehensive review of the RNAi mechanism and its implications in inhibiting cancer development. This article highlights various RNAi strategies used to target key genes involved in the cancer process and reviews their impact on gene expression regulation. Additionally, the article discusses recent advances in RNAi therapy development and its potential as a promising approach in cancer treatment. By highlighting the advantages and limitations of knockdown techniques, this article summarizes the importance of research in directing the development of more effective and advanced therapies for cancer treatment.

Keywords: Cancer, Gene expression, Knockdown, RNAi, therapy

PENDAHULUAN

Kanker tetap menjadi tantangan utama dalam dunia medis, dengan angka kejadian yang terus meningkat dan dampaknya yang merugikan terhadap kesehatan manusia.¹⁻³ Meskipun kemajuan signifikan telah dicapai dalam diagnosis dan terapi kanker, diperlukan pendekatan yang lebih inovatif dan terarah untuk mengatasi kompleksitas biologis penyakit ini. Salah satu pendekatan yang menarik perhatian dalam bidang terapi kanker adalah penggunaan RNA interferensi (RNAi), sebuah mekanisme alami yang dapat digunakan untuk mengontrol ekspresi gen.⁴⁻⁸

Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian intensif telah mengungkapkan peran penting RNAi dalam menghambat pertumbuhan kanker dengan menargetkan ekspresi gen yang terlibat dalam proses kanker. Teknik RNAi memungkinkan penurunan spesifik dalam ekspresi gen, yang dikenal sebagai *knockdown*, yang dapat menyebabkan penekanan aktivitas gen tertentu yang berkontribusi pada perkembangan tumor.^{5,8-11} Efek knockdown pada ekspresi gen telah menawarkan wawasan baru tentang mekanisme kritis yang mengatur proliferasi sel kanker dan pembentukan tumor.¹²⁻¹⁶

Dalam konteks ini, review ini bertujuan untuk menyajikan gambaran yang komprehensif tentang peran RNAi dalam menghambat pertumbuhan kanker, dengan fokus khusus pada efek knockdown pada ekspresi gen. Kami akan mengeksplorasi mekanisme dasar RNAi, strategi implementasinya dalam konteks kanker, serta kemajuan terbaru dalam pengembangan terapi RNAi untuk mengatasi kanker. Diharapkan bahwa pemahaman mendalam tentang interaksi antara RNAi dan ekspresi gen dalam konteks kanker akan membuka pintu bagi pengembangan terapi yang lebih efektif dan terarah dalam pengobatan kanker.

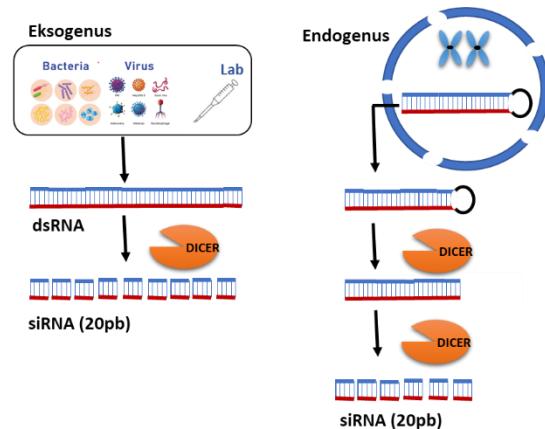
METODOLOGI

Pembuatan review artikel ini melalui pengumpulan sumber yang mencakup artikel jurnal, buku, atau sumber ilmiah lainnya yang kredibel dan relevan dengan topik yang dibahas. Pencarian artikel menggunakan mesin pencari khususnya Google Scholar, PubMed, Elsevier, dan Scopus. Artikel yang digunakan antara 2006 hingga 2024. Kata kunci yang digunakan adalah kanker, RNA interference, Knockdown, ekspresi gen, terapi, dan nanopartikel. Artikel-artikel tersebut dipilih secara khusus untuk menunjang tinjauan saat ini. Studi ini berfokus pada RNAi sebagai salah satu alternatif terapi kanker yang menjanjikan untuk masa depan. Dari proses seleksi didapatkan 52 artikel yang menunjang pembuatan review artikel ini.

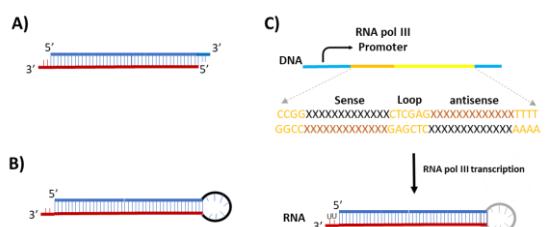
RNA interference sebagai agen *knockdown* atau *gene silencing*

RNA interference (RNAi) adalah mekanisme pengaturan sebagian besar sel eukariota yang menggunakan molekul kecil RNA untai ganda (dsRNA) untuk mengontrol aktivitas gen. RNAi diaktifasi oleh dsRNA yang dikirim ke sitoplasma sel. RNAi dapat berasal dari eksogen atau endogen. RNAi eksogen merupakan dsRNA yang didapat dari bakteri, virus atau sintetis, sedangkan endogen

berasal dari mikroRNA (miRNA) (Gambar 1). Mekanisme silencing dapat terjadi melalui degradasi mRNA target yang diinduksi oleh *small interfering RNAs* (siRNAs) atau *short hairpin RNAs* (shRNAs) atau mensupresi translasi mRNA spesifik melalui miRNA.¹⁷ Struktur siRNA dan shRNA dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. RNAi dapat berasal dari luar sel yang disebut dengan eksogen atau dari dalam sel yang disebut dengan endogen. Eksogen dapat berasal dari bakteri, virus atau sintesis secara kimia atau biokimia, sedangkan endogen berasal dari miRNA. dsRNA yang panjang akan dipotong dengan menggunakan enzim endonuclease Dicer menjadi 20pb yang disebut dengan siRNA.



Gambar 2. Struktur siRNA dan shRNA. A. Struktur siRNA berupa dupleks RNA ukuran kecil dengan memiliki ciri khas adanya overhang 2 nukleotida pada ujung 3'. B. shRNA terdiri dari urutan sense dan antisense yang dipisahkan oleh urutan yang membentuk loop. C. konstruksi shRNA yang diinsersikan ke dalam vektor ekspresi. Modifikasi dari Addgene dan Biosettia.

Sejarah penemuan RNAi pathway dimulai pada tahun 1984, adanya pengamatan yang memperlihatkan bahwa RNA anti-sense dapat menghambat ekspresi gen. Pada tahun 1993, dibuat model untuk menjelaskan observasi tersebut. Fire *et al* (1998) melaporkan dalam suatu publikasi bahwa RNAi pada *Caenorhabditis elegans* teridentifikasi sebagai dsRNA memiliki substansional yang lebih efektif dalam menghambat ekspresi gen dibandingkan dengan menggunakan single-stranded RNA (ssRNA).¹⁸ Komponen-komponen

kunci yang berperan sebagai mesin RNAi dapat dilihat pada Tabel 1.

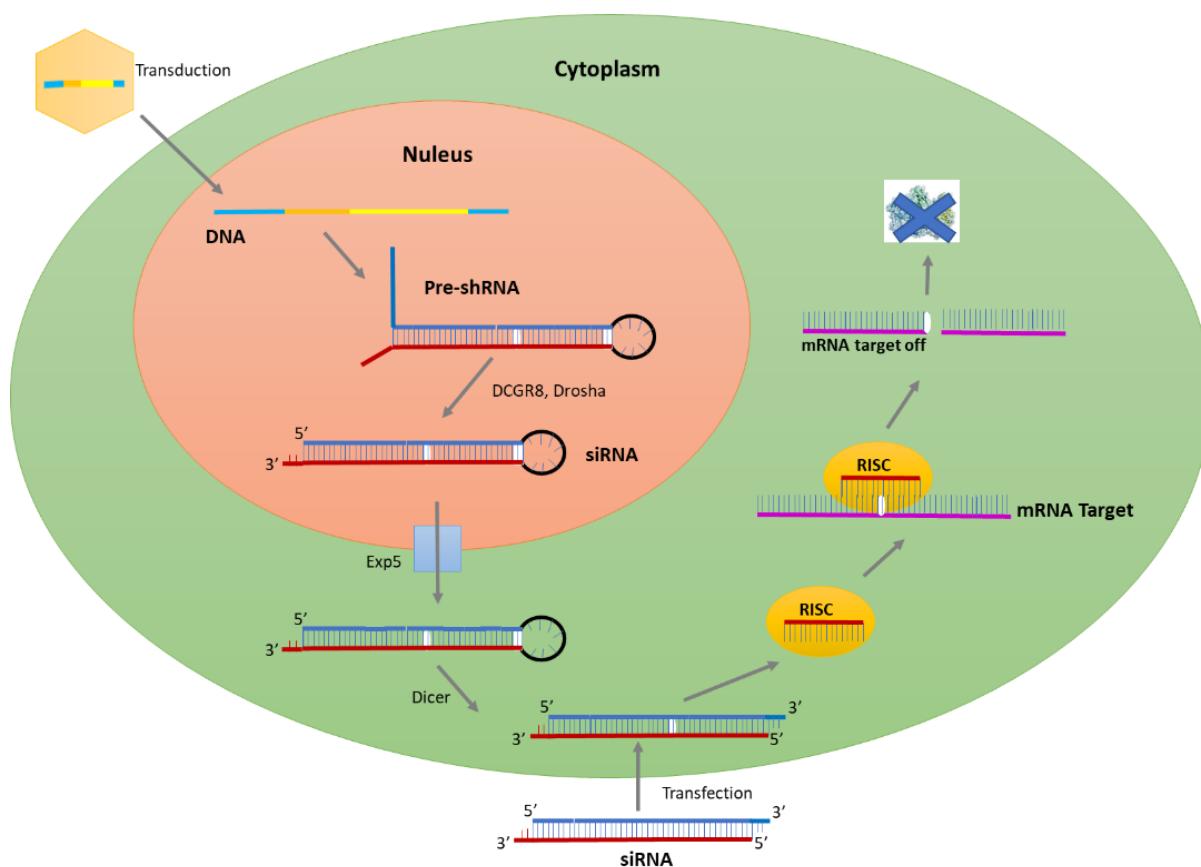
Dua kunci pendekatan RNAi yang memiliki asensial besar untuk penggunaan dalam *gene silencing* adalah siRNA dan shRNA yang berbasis vektor. siRNA dan shRNA dapat digunakan untuk *knockdown* protein, namun dengan mekanisme kerja yang berbeda (Gambar 3.). dsRNA panjang atau dupleks pendek sekitar 21 pasangan basa (pb) dapat masuk ke dalam kultur sel jaringan secara langsung. Beberapa penelitian telah melaporkan tentang siRNA yang ditranslokasi ke nukleus setelah transfeksi ke dalam sel, namun lebih umum diketahui bahwa siRNA ditransfeksikan dan menumpuk di sitoplasma. Setelah masuk ke dalam sel, dsRNA panjang membentuk kompleks dengan Dicer¹⁹, enzim RNase III spesifik dsRNA akan memprosesnya menjadi 21-23 nukleotida (nt) siRNA dengan *overhang* 2 nuklotida pada ujung 3' yang khas. Produk yang dibelah kemudian dimasukkan ke dalam RISC, yang terdiri dari Argonaute-2 (Ago-2), Dicer, dan protein pengikat TAR-RNA (TRBP). Dupleks RNA dipisahkan, dan satu untai dikeluarkan dari kompleks. Untai dengan stabilitas dupleks terendah pada ujung 5' dipilih

untuk penggabungan yang stabil ke dalam RISC.

shRNA disintesis dalam nukleus sel dan membentuk struktur hairpin yang terdiri dari daerah antisense yang berpasangan dengan sense yang dihubungkan oleh nukleotida tidak berpasangan yang membentuk satu lingkaran. Selanjutnya shRNA diubah menjadi siRNA oleh mesin RNAi yang sama untuk pemroses miRNA. shRNA dimasukkan ke dalam inti sel target menggunakan vektor bakteri atau virus yang dalam beberapa kasus dapat berintegrasi secara stabil ke dalam genom. shRNA ditranskripsi oleh RNA polimerase II atau III, tergantung pada promotor yang menggerakkan ekspresinya. Prekursor awal ini diproses oleh Drosha dan dsRNA berikatan dengan DGCR8 menghasilkan senyawa yang dikenal sebagai pra-shRNA, sebelum diekspor ke sitoplasma oleh Exportin-5. Pra-shRNA kemudian dipecah oleh Dicer dan TRBP/PACT, dengan cara memotong hairpin dan membentuk siRNA beruntai ganda ukuran 20–25 nt dengan *overhang* 2 nukleotida pada ujung 3'-nya. SiRNA aktif ini kemudian diber gabung ke dalam kompleks RISC.¹⁷

Tabel 1. Komponen kunci dalam mekanisme jalur RNAi.¹⁷

Komponen	Deskripsi
siRNA	dsRNA dengan <i>overhang</i> 2 nukleotida pada akhir 3' yang mengaktifkan RNAi, dengan cara mendegradasi target mRNA pada urutan spesifik yang komplementer.
shRNA	dsDNA yang mengandung struktur loop yang diproses menjadi siRNA, mengaktifkan RNAi yang mengarah pada degradasi mRNA dengan cara berikatan pada urutan-spesifik yang komplementer dari mRNA target.
Drosha	Enzim RNase III yang memproses pri-miRNA dan shRNA di nukleus.
Dicer	Enzim Ribonuklase (RNase) III yang memproses dsRNA menjadi 20-25 pb siRNA yang meninggalkan <i>overhang</i> 2 nukleotida pada ujung 3'. Dicer-2 berperan dalam proses cleavage dsRNA yang panjang, sedangkan Dicer-1 penting dalam pemrosesan miRNA.
RISC	RNA-induced silencing complex (RISC) mengandung protein Argonaute yang berasosiasi dengan siRNA. Kompleks ini juga mengandung PACT, TRBP dan Dicer. Perlu diketahui bahwa komposisi RISC yang tepat masih belum dapat dideskripsikan.
TRBP	Komponen ini diperlukan untuk pembelahan dsRNA oleh Dicer dan perjalanan selanjutnya ke RISC.
PACT	Protein R (PKR)-activating protein (PACT) berkaitan dengan Dicer dan TRBP untuk pembelahan dsRNA.
Protein keluarga Argonaute	Bersama dengan siRNA beruntai tunggal, protein keluarga Argonaute akan berkumpul untuk membentuk RISC. Berikatan dengan RNA pada urutan nukleotida nomor 21–35 (miRNA, siRNA maupun mRNA) yang selanjutnya akan dipotong melalui fungsi endonukleolitiknya. Memotong antara nukleotida ke-10 dan ke-11 dari anti-sense (atau guide) RNA.



Gambar 3. Mekanisme RNAi menginduksi pembungkaman gen. pada mekanisme transduksi, DNA yang terdapat dalam virus vektor akan dimasukkan ke dalam sel dan berdiam di inti sel. DNA akan diekspresikan membentuk pre-shRNA. Selanjutnya diproses menjadi shRNA dengan bantuan Drosha. shRNA yang sudah terbentuk akan dipindahkan ke sitoplasma melalui Exp5. shRNA yang berada disitoplasma akan diproses membentuk siRNA dengan bantuan Dicer. Tahap selanjutnya sama dengan mekanisme dengan menggunakan siRNA melalui proses transfeksi. Untai tunggal siRNA akan berasosiasi dengan RISC untuk selanjutnya menuju mRNA target untuk mendegradasinya. Modifikasi dari Lingor²⁰.

Setelah dimuat ke RISC, proses pengenalan dan degradasi mRNA target oleh shRNA dan siRNA pada dasarnya sama. siRNA berikatan dengan mRNA target pada urutan-spesifik yang dimediasi oleh pasangan basa komplementer, yang mengarah ke pembelahan backbone fosfat target RNA di dekat pusat dupleks melalui aktivasi RNase-H. Fitur yang menarik dari sistem ini adalah penempelan siRNA ke mRNA target pada beberapa organisme memungkinkan siRNA bertindak sebagai primer, sedangkan mRNA target bertindak sebagai cetakan untuk RNA-polimerase yang bergantung pada RNA. Hal ini akan menghasilkan dsRNA baru, yang akan diproses oleh Dicer, sehingga menciptakan loop umpan balik positif yang dapat meningkatkan kumpulan siRNA. Namun, perlu diketahui bahwa siRNA umumnya membutuhkan homologi yang sempurna untuk menginduksi degradasi.¹⁷ Proses ini diilustrasikan pada Gambar 3.

Keuntungan penggunaan shRNA dibandingkan siRNA antara lain kemampuan untuk menggunakan vektor virus untuk pengiriman dalam mengatasi kesulitan mentransfeksi jenis sel tertentu, pilihan untuk mengontrol ekspresi shRNA menggunakan promotor yang dapat diinduksi, dan kemampuan untuk mengekspresikannya bersama dengan gen reporter. Selain itu, shRNA menyebabkan efek di luar target lebih sedikit.¹⁷

Komponen inti RISC adalah anggota keluarga Argonaut (Ago). Pada manusia ada delapan anggota keluarga ini tetapi hanya Ago-2 yang memiliki domain katalitis aktif untuk aktivitas pembelahan. siRNA yang dimuat ke RISC mulanya beruntai ganda, protein Ago-2 akan membuka dsRNA menjadi ssRNA ("passenger strand" dan "guide strand") dan akan melepaskan "passenger strand". RISC dengan "guide strand" akan menuju ke mRNA target yang memiliki urutan yang komplementer dengan "guide strand" siRNA. Terdapat dua kemungkinan proses yang terjadi setelah

penempelan siRNA-RISC pada mRNA yang komplemen. Proses pertama terjadi bila siRNA menempel seluruhnya ke daerah mRNA target yang komplemen, maka kompleks RISC akan memotong mRNA sehingga mRNA tidak dapat dikenali oleh ribosom yang mengakibatkan tidak terjadinya proses translasi. Proses kedua yang mungkin terjadi adalah adanya lekukan pada daerah 3' siRNA ketika berikatan dengan mRNA komplementer yang mengakibatkan proses penempelan pada daerah komplemen tidak sempurna. Lekukan pada daerah 3'siRNA merupakan daerah yang penting dalam proses pengenalan ribosom, sehingga jika terjadi proses kedua maka akan terjadi penurunan translasi.²¹⁻²³

Proses pengenalan mRNA target oleh RISC masih belum dipahami dengan baik. Namun, sebuah laporan mengungkapkan bahwa aksesibilitas urutan target mRNA seluler mempengaruhi *cleavage*-nya.^{24,25} Laporan ini juga mencatat bahwa RISC tidak mampu membuka lipatan RNA sehingga diusulkan suatu model di mana RISC bersentuhan dengan ssRNA secara nonspesifik melalui difusi acak, dengan ujung 5' melakukan pemasangan basa lebih efisien daripada ujung 3'. Hal ini tampaknya dapat menentukan hubungan yang stabil antara RISC dan mRNA target.

RNAi endogen berasal dari miRNA yang diperoleh melalui proses transkripsi dari gen miRNA yang terjadi di dalam nukleus. Hasil transkripsi berupa RNA berbentuk *hairpin* dengan penambahan *cap* pada 5' dan *poly A-tail* pada 3' yang disebut dengan pri-miRNA. Selanjutnya dengan protein Drosha dan DGCR8 memotong bagian *cap* dan *poly A-tail* menjadi pre-RNA. Selanjutnya pre-RNA ini akan di transfer ke sitoplasma. Pada sitoplasma oleh enzim Dicer akan dipotong dengan ukuran yang lebih pendek membentuk miRNA. Proses selanjutnya sama dengan yang terjadi pada RNA eksogen.²⁶⁻³⁰

Peran RNAi melalui efek knockdown dalam Menghambat Pertumbuhan Kanker

Peran RNA interferensi (RNAi) dalam menghambat pertumbuhan kanker telah menjadi fokus penelitian yang menarik dalam bidang biologi kanker. RNAi merupakan sebuah mekanisme alami yang memainkan peranan penting dalam regulasi ekspresi gen dengan cara menurunkan atau "mematikan" aktivitas gen spesifik. Pada kanker terjadi gangguan regulasi genetik yang mengarah pada pertumbuhan sel tidak terkendali, dan RNAi menawarkan pendekatan yang menjanjikan dalam mengatasi kelainan tersebut.^{5,7,8,10,31}

Salah satu aspek penting dari peran RNAi dalam menghambat pertumbuhan kanker adalah kemampuannya untuk menargetkan gen-gen yang terlibat dalam proses kanker. Penggunaan teknik RNAi, seperti small interfering RNA (siRNA) atau short hairpin RNA (shRNA) secara spesifik dapat menghambat ekspresi gen yang memainkan peran kunci dalam proliferasi sel kanker.^{4,7,8,16} Gen-gen yang dapat menjadi target potensial untuk terapi RNAi pada penyakit kanker adalah gen-gen yang terlibat dalam regulasi siklus sel, apoptosis, dan metastasis kanker.³²⁻³⁶ Efek knockdown yang dihasilkan oleh RNAi, yaitu penurunan spesifik dalam ekspresi gen target, dapat menyebabkan penekanan aktivitas gen yang berkontribusi pada pertumbuhan tumor. Dengan mengurangi ekspresi gen yang memicu proliferasi sel kanker, RNAi dapat menghambat kemampuan sel kanker untuk berkembang biak dan menyebar ke jaringan sekitarnya. Selain itu, RNAi juga dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap terapi konvensional, seperti kemoterapi atau radioterapi, dengan menghambat jalur resistensi yang diinduksi oleh ekspresi gen tertentu.³⁷⁻⁴²

Tantangan dalam penggunaan RNAi sebagai terapi kanker tetap ada, meskipun telah banyak indikasi positif.⁴³ Tantangan tersebut antara lain efisiensi pengiriman dan keamanan. Namun, dengan kemajuan teknologi dalam pengembangan vektor nanopartikel dan strategi pengiriman obat, harapan akan terapi RNAi yang lebih efektif dan aman semakin mendekati kenyataan.

Secara keseluruhan, peran RNAi dalam menghambat pertumbuhan kanker menjanjikan pendekatan yang inovatif dan terarah dalam pengobatan kanker. Dengan terus memperdalam pemahaman kita tentang mekanisme RNAi dan interaksi antara RNAi dan ekspresi gen dalam konteks kanker, diharapkan kita dapat mengembangkan terapi yang lebih efektif, aman, dan terarah dalam memerangi penyakit mematikan ini.

Salah satu pengembangan terkini dalam terapi RNAi untuk kanker adalah penggunaan vektor nanopartikel. Nanopartikel dapat dirancang untuk mengirimkan RNAi secara spesifik ke sel kanker, meningkatkan efisiensi pengiriman dan mengurangi toksisitas terhadap sel normal. Vektor nanopartikel juga dapat dimodifikasi dengan targeting ligand yang memungkinkan mereka untuk secara selektif mengenali dan masuk ke dalam sel kanker, meningkatkan akurasi pengiriman RNAi.⁴⁴⁻⁴⁹

Strategi pengiriman obat juga menjadi fokus pengembangan terkini dalam terapi RNAi untuk kanker. Metode pengiriman yang efektif sangat penting untuk memastikan bahwa RNAi mencapai targetnya dengan tepat dan memberikan efek terapeutik yang diinginkan. Beberapa strategi pengiriman yang sedang dikembangkan termasuk penggunaan liposom, nanopartikel polimer, dan sistem pengiriman asam nukleat yang dikemas.⁵⁰⁻⁵²

Terapi RNAi menjanjikan potensi besar dalam pengobatan kanker, namun masih ada beberapa tantangan yang perlu diatasi. Salah satu tantangan utama adalah stabilitas RNAi dalam tubuh, karena RNAi rentan terhadap degradasi oleh enzim dan kondisi lingkungan. Selain itu, efisiensi pengiriman RNAi ke dalam sel kanker dan spesifikasi其实nya juga masih menjadi isu yang harus diatasi. Meskipun ada tantangan, prospek masa depan dalam penggunaan RNAi sebagai terapi kanker yang efektif sangatlah cerah. Terobosan dalam pengembangan vektor nanopartikel dan strategi pengiriman obat dapat meningkatkan efisiensi dan spesifikasi pengiriman RNAi, sementara penelitian lebih lanjut tentang mekanisme resistensi kanker terhadap terapi RNAi dapat membantu mengatasi masalah tersebut. Dengan terus berlanjutnya inovasi dan penelitian, RNAi memiliki potensi untuk menjadi salah satu terapi kanker yang paling menjanjikan dalam beberapa tahun ke depan.

PENUTUP

Dalam review ini, telah dibahas peran RNA interferensi (RNAi) dalam menghambat pertumbuhan kanker melalui efek knockdown pada ekspresi gen. RNAi telah terbukti menjadi alat dalam menargetkan gen-gen kunci yang terlibat dalam proses kanker. Hal ini, memungkinkan terjadinya penurunan spesifik dalam ekspresi gen yang dapat menghambat proliferasi sel kanker, menginduksi apoptosis, dan menghambat metastasis.

Teknik knockdown, baik menggunakan siRNA maupun shRNA, telah memberikan pemahaman mengenai mekanisme biologis yang mendasari kanker dan memberikan landasan untuk pengembangan terapi yang lebih terarah dan efektif. Meskipun ada beberapa tantangan, seperti efisiensi pengiriman dan keamanan, kemajuan dalam pengembangan vektor nanopartikel dan strategi pengiriman obat telah membawa harapan baru dalam penggunaan RNAi sebagai terapi kanker.

Pemahaman yang lebih baik tentang interaksi antara RNAi dan ekspresi gen dalam konteks kanker, maka diharapkan review ini

akan membuka jalan bagi pengembangan terapi yang lebih efektif, aman, dan terarah dalam pengobatan kanker. Dengan terus memperkuat pengetahuan kita tentang mekanisme biologis yang mendasari kanker dan kemajuan teknologi dalam pengembangan terapi RNAi, kita dapat mempercepat langkah-langkah menuju era baru dalam pengobatan kanker yang lebih efektif dan personal.

Conflicts of Interest

Tidak ada *Conflicts of Interest*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Society AC. Cancer Facts & Figures [Internet]. American Cancer Sociated. 2024 [cited 2024 May 15]. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2024-cancer-facts-figures.html>
2. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford G. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. Lancet Glob Heal. 2020;8(2):e180–90.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
4. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: Current progress and future prospects. Chem Biol. 2012;19(1):60–71.
5. Setten RL, Rossi JJ, Han S-P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2019 Jun;18(6):421–46.
6. Sayed SR El, Cristante J, Guyon L, Denis J, Chabre O, Cherradi N. MicroRNA therapeutics in cancer: Current advances and challenges. Cancers (Basel). 2021;13(11):1–28.
7. Bobbin ML, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016;56:103–22.
8. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-Targeted Therapeutics. Cell Metab. 2018;27(4):714–39.
9. Xie J, Ameres SL, Friedline R, Hung J-H, Zhang Y, Xie Q, et al. Long-term, efficient inhibition of microRNA function in mice using rAAV vectors. Nat Methods. 2012;9(4):403–9.
10. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. Nat Rev Genet. 2015;16(9):543–52.

11. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater.* 2013 Nov;12(11):967–77.
12. Mohr SE, Perrimon N. RNAi Screening: New Approaches, Understandings and Organisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(2):145–58.
13. Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. Vol. 7, *Nature reviews. Genetics.* England; 2006. p. 373–84.
14. Sims D, Mendes-Pereira AM, Frankum J, Burgess D, Cerone MA, Lombardelli C, et al. High-throughput RNA interference screening using pooled shRNA libraries and next generation sequencing. *Genome Biol.* 2011;12(10):R104.
15. Schramek D, Sendoel A, Segal JP, Beronja S, Heller E, Orstian D, et al. Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science* (80-). 2014;343(6168):309–13.
16. Bartz SR, Zhang Z, Burchard J, Imaikura M, Martin M, Palmieri A, et al. Small Interfering RNA Screens Reveal Enhanced Cisplatin Cytotoxicity in Tumor Cells Having both BRCA Network and TP53 Disruptions. *Mol Cell Biol.* 2006;26(24):9377–86.
17. O'Keefe E. siRNAs and shRNAs: Tools for protein knockdown by gene silencing. *Mater Methods.* 2013;3:197.
18. Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jul;16(7):417–30.
19. Sinha NK, Iwasa J, Shen PS, Bass BL. Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini. *Science* (80-). 2018;359(6373):329–34.
20. Lingor P. Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference – The Roles of miRNA and siRNA BT - Apoptosome: An up-and-coming therapeutic tool. In: Cecconi F, D'Amelio M, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 95–117.
21. ZHANG YL, ZHANG JS, ZHOU YC, ZHAO Y AMJ. Identification of MicroRNAs and Application of RNA Interference for Gene Targeting In Vivo in the. *J Androl.* 2011;32(6):587–91.
22. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Acids.* 2015;(July).
23. Browne JA, Leir SH, Yin S, Harris A. Transcriptional networks in the human epididymis. *Andrology.* 2019;7(5):741–7.
24. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell.* 2007;130(1):101–12.
25. Ameres SL, Horwich MD, Hung J, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *2010;328(5985):1534–9.*
26. Yu Y, Liao L, Shao B, Su X, Shuai Y, Wang H, et al. Knockdown of MicroRNA Let-7a Improves the Functionality of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Immunotherapy. *Mol Ther.* 2017;25(2):480–93.
27. Leong IUS, Lan CC, Skinner JR, Shelling AN, Love DR. In vivo testing of MicroRNA-mediated gene knockdown in zebrafish. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.
28. Fowler DK, Williams C, Gerritsen AT, Washbourne P. Improved knockdown from artificial microRNAs in an enhanced miR-155 backbone: A designer's guide to potent multi-target RNAi. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(5):e48.
29. Myburgh R, Cherpin O, Schlaepfer E, Rehrauer H, Speck RF, Krause KH, et al. Optimization of critical hairpin features allows miRNA-based gene knockdown upon single-copy transduction. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2014;3(September):e207.
30. Sun D, Melegari M, Sridhar S, Rogler CE, Zhu L. Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *Biotechniques.* 2006;41(1):59–63.
31. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med.* 2005;56:401–23.
32. Zhou Z, Gong Q, Lin Z, Wang Y, Li M, Wang L, et al. Emerging Roles of SRSF3 as a Therapeutic Target for Cancer. *Front Oncol.* 2020;10(September):1–17.
33. Áyen Á, Martínez YJ, Boulaiz H. Targeted gene delivery therapies for cervical cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(5).
34. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, et al. P53 Signaling in Cancer Progression and Therapy. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):1–15.
35. Sil S, Bertilla J, Rupachandra S. A comprehensive review on RNA interference-mediated targeting of interleukins and its potential therapeutic implications in colon cancer. *3 Biotech.* 2023;13(1):1–21.
36. Abdelrahim M, Safe S, Baker C,

- Abudayyeh A. RNAi and cancer: Implications and applications. *J RNAi Gene Silencing*. 2006;2(1):136–45.
37. Cao S, Lin C, Liang S, Tan CH, Saw PE, Xu X. Enhancing Chemotherapy by RNA Interference. *BIO Integr*. 2020;1(2):64–81.
38. Ma Y, Wang T, Zhang X, Wang P, Long F. The role of circular RNAs in regulating resistance to cancer immunotherapy: mechanisms and implications. *Cell Death Dis*. 2024;15(5).
39. Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1885–95.
40. Ha JS, Byun J, Ahn DR. Overcoming doxorubicin resistance of cancer cells by Cas9-mediated gene disruption. *Sci Rep*. 2016;6(October 2015):1–7.
41. Shu J, Li X, Dang J, Liu Y, Duan S, Zhu R, et al. Drug resistance reversal by intervening cancer bioenergetics with spherical helical polypeptide-potentiated gene silencing. *Chem Eng J*. 2021;414:128545.
42. Chen X-P, Wang Q, Guan J, Huang Z-Y, Zhang W-G, Zhang B-X. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun;12(21):3332–7.
43. Ali Zaidi SS, Fatima F, Ali Zaidi SA, Zhou D, Deng W, Liu S. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):1–15.
44. Ashique S, Garg A, Hussain A, Farid A, Kumar P, Taghizadeh-Hesary F. Nanodelivery systems: An efficient and target-specific approach for drug-resistant cancers. *Cancer Med*. 2023;12(18):18797–825.
45. Ebrahimi N, Manavi MS, Nazari A, Momayez A, Faghihkhorasani F, Rasool Riyadh Abdulwahid AH, et al. Nano-scale delivery systems for siRNA delivery in cancer therapy: New era of gene therapy empowered by nanotechnology. *Environ Res*. 2023;239(P2):117263.
46. Wang H, Yu J, Lu X, He X. Nanoparticle systems reduce systemic toxicity in cancer treatment. *Nanomedicine*. 2016;11(2):103–6.
47. Li D, Gao C, Kuang M, Xu M, Wang B, Luo Y, et al. Nanoparticles as drug delivery systems of rnai in cancer therapy. *Molecules*. 2021;26(8):1–27.
48. Sun L, Liu H, Ye Y, Lei Y, Islam R, Tan S, et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1).
49. Xin Y, Huang M, Guo WW, Huang Q, Zhang L zhen, Jiang G. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol Cancer*. 2017;16(1):1–9.
50. Xue H, Guo P, Wen W-C, Wong H. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. *Curr Pharm Des*. 2015;21(22):3140–7.
51. Chandrasekaran R, Seetharaman PK, Danaraj J, Rajiv P, Abd-Elsalam KA. Chapter 29 - Polymer and lipid-based nanoparticles to deliver RNAi and CRISPR systems. In: Abd-Elsalam KA, Lim K-TBT-C and RnaS, editors. *Nanobiotechnology for Plant Protection*. Elsevier; 2021. p. 635–59.
52. Mendes BB, Connio J, Avital A, Yao D, Jiang X, Zhou X, et al. Nanodelivery of nucleic acids. *Nat Rev Methods Prim*. 2022;2(1).