



Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kinga Henryka Nowacka

Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka
płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi.

Rozprawa doktorska
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: *Prof. dr hab. Ewa Jabłońska*

Białystok 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Prof. dr hab. Ewie Jabłońskiej
za opiekę promotorską, cierpliwość, wszechstronną pomoc
oraz poświęcony czas przy realizacji niniejszej pracy.
Jestem ogromnie wdzięczna za możliwość realizacji pracy doktorskiej
w Zakładzie Immunologii pod opieką naukową Pani Profesor.*

*Dziękuję również dr Marzenie Garley za pomoc w realizacji niniejszej rozprawy, cenne
wskazówki oraz wsparcie podczas procesu jej tworzenia.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom i Doktorantkom z Zakładu Immunologii
za współpracę, pomoc oraz pracę w miłej i przyjaznej atmosferze.*

*Chciałabym serdecznie podziękować mojej Rodzinie, a w szczególności
Rodzicom za wyrozumiałość i wsparcie podczas pisania pracy.*

*Dziękuję mojej Siostrze Urszuli, której wsparcie pozwoliło mi dokończyć pracę,
nawet w chwilach największego zwątpienia.*

Serdecznie dziękuję.

*Jeśli robisz tylko to co umiesz,
to nigdy nie prześcigniesz samego siebie.*

Shifu „Kung Fu Panda”

Spis treści

I.	Wstęp	10
1.	Nadrodzina TNF.....	10
1.1.	Ligandy nadrodziny TNF.....	11
1.2.	Receptory nadrodziny TNF	11
1.3.	Biologiczna rola członków nadrodziny TNF.....	13
2.	APRIL	14
2.1.	Struktura i wytwarzanie	14
2.2.	Receptory APRIL	16
2.3.	Szlaki sygnalizacyjne indukowane przez APRIL.....	17
2.4.	Fizjologiczna rola APRIL.....	18
2.5.	APRIL w różnych stanach patologii.....	19
3.	Apoptoza komórek nowotworowych	23
3.1.	Szlak receptorowy (zewnątrzkomórkowy)	23
3.2.	Kaspazy.....	25
3.3.	Szlak mitochondrialny (wewnątrzpochodny)	26
4.	Prolifercja komórek nowotworowych.....	28
4.1.	Metabolizm komórek nowotworowych.....	28
4.2.	Czynniki wpływające na proliferację komórek nowotworowych	29
5.	Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC)	30
II.	Założenia i cele rozprawy doktorskiej	35
1.	Założenia	35
2.	Cele badawcze.....	36
III.	Materiał i metody	37
1.	Materiał	37
1.1.	Linie komórkowe HNSCC	37
2.	Metody	38

2.1.	Hodowla HNSCC	38
2.2.	Test MTT	39
2.3.	Ocena cytometryczna.....	39
2.4.	Izolacja białka	39
2.5.	Western blot	40
IV.	Wyniki.....	42
1.	Ocena proliferacji komórek metodą MTT	42
2.	Ocena cytometryczna apoptozy	45
3.	Ocena ekspresji białek pro-apoptotycznych metodą Western blot	51
3.1.	Białko Bak	51
3.2.	Białko Bax	54
4.	Ocena ekspresji białek anty-apoptotycznych metodą Western blot.....	57
4.1.	Białko Bcl-2.....	57
4.2.	Białko Bcl-xL	60
5.	Ocena ekspresji kaspaz metodą Western blot	63
5.1.	Kaspaza-3.....	63
5.2.	Kaspaza-9.....	66
6.	Ocena ekspresji białek szlaku PI3K/Akt/surwiwina metodą Western blot.....	69
6.1.	Białko PI3K	69
6.2.	Białko p-Akt1/2/3	72
6.3.	Białko surwiwina	75
V.	Dyskusja.....	78
VI.	Wnioski	88
VII.	Streszczenie w języku polskim	89
VIII.	Streszczenie w języku angielskim	91
IX.	Piśmiennictwo	93

Wykaz skrótów najczęściej występujących w pracy:

Akt	(<i>Protein Kinase B</i>) kinaza białkowa B
APRIL	(<i>A Proliferation-inducing Ligand</i>) ligand indukujący proliferację
BAFF	(<i>B-cell Activating Factor</i>) czynnik aktywujący limfocyt B
BCMA	(<i>B-cell Maturation Antygen</i>) antygen dojrzewania limfocytów B
BH	(<i>Bcl-2 Homology Domains</i>) domeny homologii z Bcl-2
DD	(<i>Death Domain</i>) domena śmierci
DNA	(<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) kwas deoksyrybonukleinowy
HNSCC	(<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>) rak płaskonabłonkowy głowy i szyi
HSPG	(<i>Heparan Sulfate ProteoGlycan</i>) proteoglikan siarczanu heparanu
IgAN	(<i>IgA Nephropathy</i>) nefropatia IgA
MM	(<i>Myeloma Multiplex</i>) szpiczak mnogi
mRNA	(<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>) matrycowy kwas rybonukleinowy
NF-κB	(<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells</i>) jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
OSCC	(<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>) rak płaskonabłonkowy jamy ustnej
PC	(<i>Plasma Cells</i>) komórki plazmatyczne
PI3K	(<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>) kinaza-3 fosfatydyloinozytolu
TACI	(<i>Transmembrane Activator and CAML Interactor</i>) transbłonowy aktywator i białko reagujące z ligandem cytofiliny modulowanym wapniem
THD	(<i>TNF Homology Domain</i>) domena homologii TNF
TNF	(<i>Tumor Necrosis Factor</i>) czynnik martwicy nowotworu
TNFR	(<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>) receptor czynnika martwicy nowotworu
TNFSF	(<i>Tumor Necrosis Factor Super Family</i>) nadrodzina cząsteczek czynnika martwicy nowotworu
TNF-α	(<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>) czynnik martwicy nowotworu α

WYKAZ RYCIN

Rycina 1 Ligandy i receptory nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF).	10
Rycina 2 Struktura wstążkowa APRIL.	15
Rycina 3 Trimer APRIL i monomer BCMA przed i po związaniu.....	17
Rycina 4 Szlaki sygnałowe indukowane przez interakcję między HSPG, czynnikami wzrostu i receptorami, prowadzące do rozwoju i progresji guza.....	18
Rycina 5 Udział HSPG w reakcji APRIL-komórka nowotworowa.	21
Rycina 6 Zewnętrzne (ang. extrinsic) i wewnętrzne (ang. intrinsic) szlaki apoptozy oraz inne formy śmierci komórki, takie jak nekroza, nekroptoza czy autofagia.	24
Rycina 7 Struktura domen ludzkich kaspaz.	25
Rycina 8 Bezpośrednia i pośrednia aktywacja wewnętrznego szlaku apoptozy.....	27
Rycina 9 Schematyczne przedstawienie różnic między fosforylacją oksydacyjną, glikolizą beztlenową i glikolizą tlenową (efekt Warburga).	29
Rycina 10 Progresja HNSCC.	31
Rycina 11 Proliferacja komórek linii FaDu, mierzona testem MTT.....	42
Rycina 12 Proliferacja komórek linii CAL 27, mierzona testem MTT.....	43
Rycina 13 Proliferacja komórek linii SCC-9, mierzona testem MTT.....	44
Rycina 14 Ocena apoptozy komórek linii FaDu.	45
Rycina 15 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.....	46
Rycina 16 Ocena apoptozy komórek linii CAL 27.	47
Rycina 17 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.....	48
Rycina 18 Ocena apoptozy komórek linii SCC-9.	49
Rycina 19 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.....	50
Rycina 20 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii FaDu.....	51
Rycina 21 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii CAL 27.....	52
Rycina 22 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii SCC-9.....	53
Rycina 23 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii FaDu.....	54

Rycina 24 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii CAL 27.....	55
Rycina 25 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii SCC-9.....	56
Rycina 26 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii FaDu.	57
Rycina 27 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii CAL 27.	58
Rycina 28 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii SCC-9.	59
Rycina 29 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii FaDu.....	60
Rycina 30 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii CAL 27.....	61
Rycina 31 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii SCC-9.....	62
Rycina 32 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii FaDu.	63
Rycina 33 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii CAL 27.....	64
Rycina 34 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii SCC-9.....	65
Rycina 35 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii FaDu.	66
Rycina 36 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii CAL 27.....	67
Rycina 37 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii SCC-9.....	68
Rycina 38 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii FaDu.....	69
Rycina 39 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii CAL 27.....	70
Rycina 40 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii SCC-9.....	71
Rycina 41 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii FaDu.....	72
Rycina 42 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii CAL 27.	73
Rycina 43 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii SCC-9.....	74
Rycina 44 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii FaDu.	75
Rycina 45 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii CAL 27.	76
Rycina 46 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii SCC-9.	77
Rycina 47 Zmiany w ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych, kaspaz oraz białek szlaku PI3K/p-Akt1/2/3/surwiwina w komórkach linii FaDu, CAL 27 i SCC-9.	86

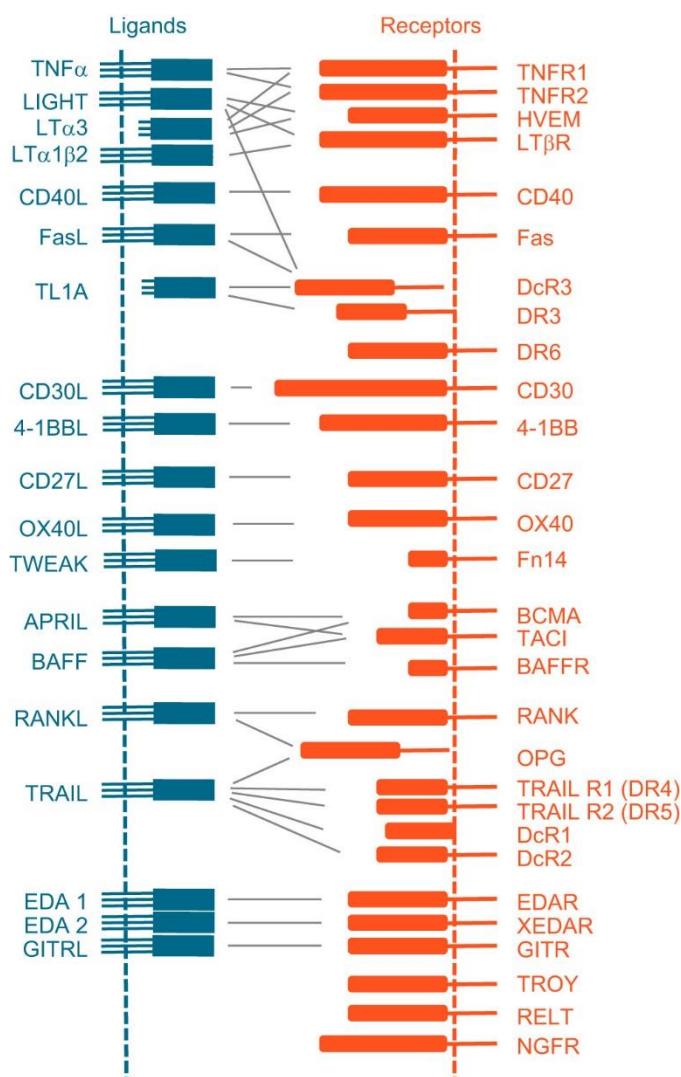
WYKAZ TABEL

Tabela 1 Podział receptorów nadrodziny TNF.	12
Tabela 2 Źródła APRIL w stanach fizjologicznych i patologicznych.	16
Tabela 3 Poziomy ekspresji APRIL w różnych jednostkach chorobowych.	22
Tabela 4 Białka nadrodziny Bcl-2.....	26
Tabela 5 Charakterystyka HPV-dodatniego i negatywnego HNSCC.....	31
Tabela 6 Klasyfikacja stopnia klinicznego zaawansowania raków płaskonabłonkowych głowy i szyi na wardze i w jamie ustnej (UICC TNM 8 z 2017 roku).	33
Tabela 7 Skala oceny histopatologicznej guzów pierwotnych.....	34
Tabela 8 Odczynniki użyte do hodowli komórek.	38
Tabela 9 Zasada bramkowania komórek wyznakowanych aneksyną V i 7-AAD.....	39

I. Wstęp

1. Nadrodzina TNF

Nadrodzina cząsteczek czynnika martwicy nowotworu (TNFSF, ang. *Tumor Necrosis Factor Super Family*) to grupa cytokin, do której należy 19 ligandów białkowych i 29 strukturalnie pokrewnych receptorów (TNFSF-R). [1]. Cząsteczki TNFSF są wytwarzane przez różne komórki organizmu, wśród których większość stanowią komórki układu odpornościowego. Wszechobecność białek TNF i ich wielokierunkowe działanie sprawia, że biorą one udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Wykazano ich rolę m. in. w regulacji procesu zapalenia, autoimmunizacji, czy powstawaniu i rozwoju nowotworów [2].



Rycina 1 Ligandy i receptory nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF) [3].

1.1. Ligandy nadrodziny TNF

Ligandy TNF są glikoproteinami transbłonowymi typu II, które mają wspólną część strukturalną, domenę homologii TNF (THD). Członkowie tej nadrodziny wykazują 20 - 30% podobieństwa w strukturze tej domeny [4,5]. THD wiąże się z domenami receptorów TNF bogatymi w cysteinę (CRD) i jest odpowiedzialna za trimeryzację ligandów TNF oraz ich wiązanie z trimeryzowanym kompleksem receptora [1].

Ligandy TNF są zwykle syntetyzowane w postaci związanej z błoną i są prezentowane na powierzchni komórki. Następnie przechodzą proteolizę, która prowadzi do powstania formy rozpuszczalnej poprzez rozszczepienie ich regionów „łodygi” (łącznik między zewnątrzkomórkową THD i domenami transbłonowymi) przez metaloproteiny [6]. Proces proteolizy jest niezbędny dla fizjologicznej funkcji niektórych ligandów TNF, takich jak EDA (ang. *Ectodysplasin-A*), natomiast hamuje działanie innych, takich jak FasL [1]. Forma ligandów wpływa na reaktywność receptorów z nadrodziny TNF, część receptorów jest silnie aktywowanych przez rozpuszczalne ligandy, inne tylko przez ligandy związane z błoną [7]. Cechą charakterystyczną tej grupy cząsteczek jest zdolność ligandów do wiązania się nie tylko z jednym, ale też większą liczbą receptorów (Ryc. 1).

Ligandy TNF są syntetyzowane i uwalniane głównie przez komórki prezentujące antygen układu odpornościowego, takie jak komórki dendrytyczne (DC), makrofagi lub limfocyty B, ale również przez limfocyty T, komórki NK, komórki tuczne, neutrofile, eozynofile, bazofile, komórki śródbłonka, komórki nabłonka grasicy, komórki mięśni gładkich. Są one także produkowane przez komórki, które uległy transformacji nowotworowej [4].

1.2. Receptory nadrodziny TNF

Zidentyfikowano trzy grupy receptorów nadrodziny TNF (TNFRs) (Tabela 1). Receptory TNFRs to w większości białka transbłonowe typu I, ale niektóre z nich mają strukturę białek typu III [4].

Tabela 1 Podział receptorów nadrodziny TNF [5,8–10].

GRUPA	RECEPTOR	CECHY
1	Fas	Zawierają domenę śmierci (DD) w ogonie cytoplazmatycznym.
	TNF-R1	
	TRAIL-R1 (DR4)	
	TRAIL-R2 (DR5)	
	DR3	
	DR6	
2	TNF-R2	Zawierają jeden lub więcej Motywów Oddziałujących z TRAF (TIM) w swoich ogonach cytoplazmatycznych.
	CD40	
	CD30	
	CD27	
	LTR	
	Ox40	
	4-1BB	
	BAFF-R	
	BCMA	
	TACI	
	RANK	
	p75NGFR	
	HVEM	
	TNFRSF18	
	TROY	
	EDAR	
XEDAR		
RELT		
Fn14		
3	TRAIL-R3 (DcR1)	Nie zawierają funkcjonalnych domen wewnątrzkomórkowych.
	TRAIL-R4 (DcR2)	
	wabik-R3	
	osteoprotegeryna (OPG)	

Receptory grupy 1 po związaniu ligandu odpowiadają głównie za rekrutację wewnątrzkomórkowej domeny śmierci (FADD, *ang. Fas Associated Death Domain*), która powoduje aktywację kaskady kaspaz i indukcję apoptozy [11].

Receptory grupy 2, zawierające jeden lub więcej Motywów Oddziałujących z TRAF (TIM), odpowiadają za rekrutację członków rodziny TRAF i aktywację wielu szlaków transdukcji sygnału: czynnika jądrowego B (NF- κ B), kinazy N-końcowej Jun (JNK), kinazy p38, a także szlaku związanego z sygnałem zewnątrzkomórkowym kinazy (ERK) oraz kinazy-3 fosfatydyloinozytolu (PI3K) [12].

Receptory grupy 3, nie zawierające funkcjonalnych domen wewnątrzkomórkowych, konkurują z pozostałymi grupami receptorów o odpowiadające im ligandy i działają jako blokery aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych [1].

TNFR mają domeny zewnątrzkomórkowe charakteryzujące się obecnością CRD, które zazwyczaj zawierają sześć reszt cysteiny zaangażowanych w tworzenie trzech wiązań dwusiarczkowych [1].

Podobnie jak w przypadku innych cytokin, w obrębie nadrodziny TNF występują rozpuszczalne formy receptora (sTNFR). Rozpuszczalne TNFR są wytwarzane przez obróbkę proteolityczną lub alternatywne składanie. sTNFRs wiążą krążące cząsteczki TNF α , blokując wiązanie z receptorem błonowym, przez co ograniczają jego działanie, m. in. tłumią odpowiedź zapalną [13,14].

1.3. Biologiczna rola członków nadrodziny TNF

Znaczna większość komórek organizmu wykazuje ekspresję receptorów nadrodziny TNF, a wiele z nich obecność również ligandów. Każda para receptor-ligand kontroluje szeroki zakres aktywności związanych z powstawaniem, dojrzewaniem, różnicowaniem, proliferacją i funkcją wielu komórek organizmu. Szczególnie ważną rolą tych cząsteczek jest wpływ na czas przeżycia komórek, w tym również komórek nowotworowych [15].

Przykładem jest ligand FasL, który oddziałuje z transbłonowym receptorem Fas (FasR) na komórkach docelowych i indukuje apoptozę, m. in. komórek B, po zakończonej odpowiedzi immunologicznej [16]. Wykazano także, że ten sam ligand bierze również udział w immunoregulacji i progresji nowotworów. Komórki nowotworowe różnego pochodzenia stymulują ekspresję FasL, indukując w ten sposób apoptozę limfocytów naciekających nowotwór [17].

Najlepiej udokumentowaną i kluczową rolą ligandów z nadrodziny TNF jest udział w przewlekłych chorobach zapalnych, poprzez indukcję rozwoju i utrzymanie stanu zapalnego, na drodze rekrutacji i aktywacji komórek zapalnych oraz stymulację uwalniania białek pro-zapalnych. Cząsteczki TNF kontrolują ten proces także poprzez szereg antagonistycznych działań: indukują śmierć zużytych w procesie zapalnym komórek, stymulują wzrost i czas przeżycia nowych komórek, niezbędnych do odbudowy uszkodzonych tkanek. Ponadto, wpływają na komórki śródbłonka naczyń, prowadząc z jednej strony do indukcji sygnałów prowadzących do degradacji zniszczonych naczyń włosowatych, z drugiej zaś strony stymulując proces angiogenezy w odbudowywanych tkankach [18].

Białka nadrodziny TNF biorą udział również w przebudowie tkanek w odpowiedzi na uraz i pełnią rolę m. in. w utrzymaniu homeostazy kości, w której kluczową rolę odgrywiają

osteoklasty, za co odpowiada m. in. cząsteczka RANKL (*ang. Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand*) [19].

Cząsteczki nadrodziny TNF wykazują podwójną rolę w rozwoju nowotworów. Część białek tej nadrodziny bierze udział w rozwoju nowotworów, m. in. hamując apoptozę komórek nowotworowych czy stymulując ich proliferację (APRIL, BAFF, CD40L) [20,21]. Inne białka, m. in. TNF- α , TWEAK, LIGHT, wykazują działanie przeciwnowotworowe, poprzez kontrolę proliferacji, różnicowania oraz apoptozy komórek nowotworowych [22–24].

2. APRIL

Białko APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) jest członkiem nadrodziny TNF (*tumor necrosis factor*), jego gen zlokalizowany jest na ludzkim chromosomie 17p13 [25]. Cząsteczka APRIL promuje proliferację komórek w warunkach prawidłowych, jak i w przebiegu różnych stanów patologicznych. Fizjologicznie, APRIL gromadzi się w dużych ilościach w szpiku, prowadząc do szybszego dojrzewania granulocytów i komórek plazmatycznych oraz ich wyrzutu na obwód [20,26].

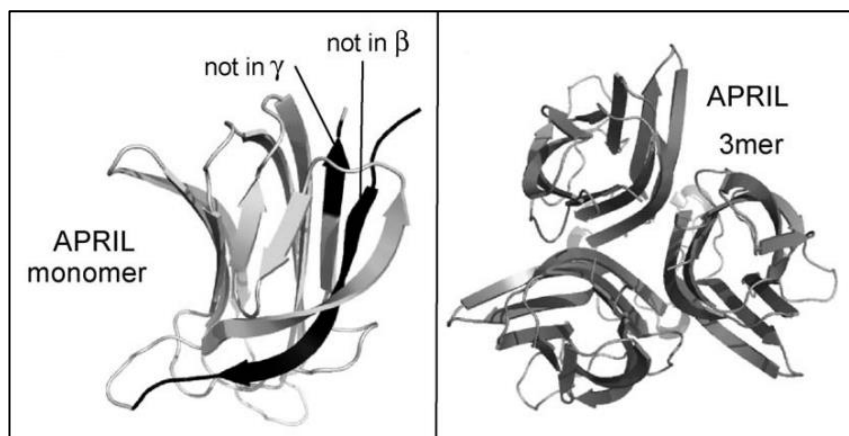
2.1. Struktura i wytwarzanie

APRIL jest homotrimerem, składającym się z trzech identycznych protomerów, zawierających 250 aminokwasów [27,28]. Opisano trzy alternatywne „splicingowe” warianty transkryptu genu *APRIL*, kodujące różne izoformy tej cząsteczki:

- APRIL- δ , związany z błoną, nierozszczepialny ludzki APRIL nie wiążący się z glikozaminoglikanami,
- APRIL- β , nie posiada pierwszej β -wstążki z domeny homologii (THD) (Ryc. 3);
- APRIL- γ , ma skrócony C-koniec o cztery aminokwasy, które są zastąpione przez pojedynczą resztę, ta izoforma nie została dokładnie zbadana [29].

W skład protomerów APRIL wchodzi dwie harmonijki beta:

- Wewnętrzna, złożona z nici A, C, E, F i H, jest najbardziej trwała i zaangażowana w łączenia trimeru
- Zewnętrzna złożona z nici B', B, G, D, E, jest odsłonięta na powierzchni cząsteczki [4].



Rycina 2 Struktura wstążkowa APRIL [29].

Na czarno zaznaczono fragmenty nie występujące w izoformach APRIL- γ oraz APRIL- β .

Cząsteczka APRIL występuje w dwóch formach: nieprzetworzonej o masie 30kDa oraz przetworzonej 17kDa. Wydzielana na zewnątrz komórki przetworzona postać APRIL jest biologicznie aktywna, a aktywność ta jest regulowana przez przetwarzanie wewnątrzkomórkowe. APRIL jest przetwarzany wewnątrzkomórkowo bezpośrednio przez konwertazę furynową w aparacie Golgiego poprzez cięcie długiej formy w miejscu występowania motywu bogatego w argininę/lizynę (RKRR – *ang. arginine/lysine-rich motif*), przy aminokwasach 101–104 [28].

Już w szpiku kostnym komórki mieloidalne i ich prekursorzy wytwarzają cząsteczkę APRIL [26]. Jak w przypadku wielu innych ligandów nadrodziny TNF, zdolność do syntezy i uwalniania APRIL wykazują liczne leukocyty: neutrofile, eozynofile, komórki dendrytyczne, monocyty i makrofagi [26,30–32] oraz komórki różnych tkanek, m. in. komórki nabłonka migdałków czy keratynocyty [33–35].

Badania wykazały, że neutrofile były głównym źródłem APRIL w obrębie zakażonej błony śluzowej jamy ustnej, natomiast w tkance niewykazującej oznak zakażenia rolę tę pełniły keratynocyty [35]. Neutrofile nie tylko wytwarzają APRIL w odpowiedzi na stymulację, ale są zdolne do konstytutywnego uwalniania tej cząsteczki [36]. W przebiegu chorób nowotworowych istotnym źródłem APRIL są także komórki nowotworowe [37].

Tabela 2 Źródła APRIL w stanach fizjologicznych i patologicznych [38]

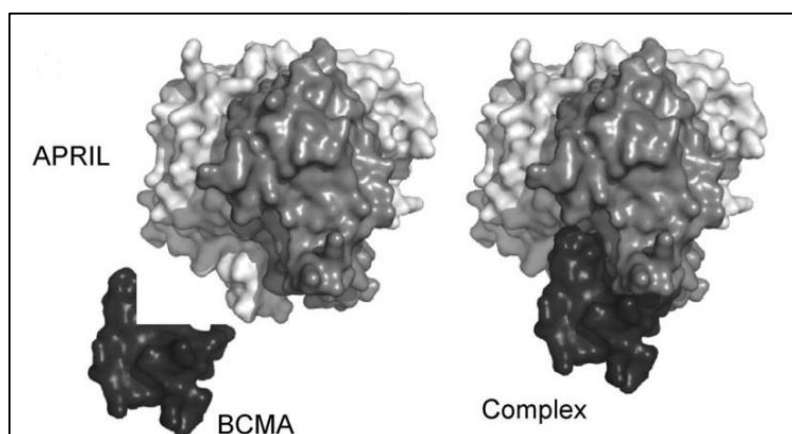
Stan	Źródło APRIL
Fizjologia - szpik	mieloblasty
	promielocyty
	mieloblasty
	metamielocyty
	neutrofile pałeczkowate
	eozynofile
Fizjologia – obwód i tkanki	neutrofile segmentowane
	eozynofile
	komórki dendrytyczne
	monocyty i makrofagi
	komórki nabłonka migdałków (keratynocyty)
	GALT
	keratynocyty
Stan zapalny	neutrofile
Nowotwory	komórki nowotworowe
	neutrofile

2.2. Receptory APRIL

Zidentyfikowano dwa receptory wiążące APRIL: TACI (*ang. Transmembrane activator and CAML interactor*) oraz BCMA (*ang. B-cell maturation antigen*). Oba receptory mogą wiązać zarówno APRIL, jak i inne białko nadrodziny TNF – BAFF (*ang. B-cell activating factor*) [39]. APRIL nie wiąże się natomiast z receptorem swoistym dla BAFF - BAFF-R [40]. APRIL wiąże się silnie z BCMA i umiarkowanie z TACI [41]. U ludzi TACI ulega ekspresji w komórkach B pamięci. Ekspresja BCMA jest ograniczona do plazmoblastów, komórek plazmatycznych (PC) oraz komórek B pamięci [42]. TACI jest złożonym receptorem komórek B, który promuje zależne i niezależne od komórek T różnicowanie komórek B [43,44]. BCMA jest białkiem transbłonowym typu III bez peptydu sygnałowego i zawierającym domeny zewnątrzkomórkowe bogate w cysteinę [45].

Charakterystyczną cząsteczką z, którą wiąże się APRIL jest HSPG (Proteoglikan siarczanu heparanu), który jest białkiem pozakomórkowym (np. Perlecan, Agrin) lub transbłonowym (tj. Syndekan-1-4, glipikan 1-6 lub CD44v3) [46]. Wydzielony APRIL łączy się z HSPG poprzez jego podstawowy N-końcowy region. HSPG jest wyrażany przez wiele komórek, m. in. plazmatyczne, zrębowe szpiku kostnego, śródbłonka czy osteoblasty. HSPG występuje także na komórkach nowotworowych. Stwierdzono jego obecność na komórkach szpiczaka mnogiego (MM) i wielu innych komórek nowotworowych m. in. raka piersi, trzustki czy glejaka [47–51].

Wykazano, że do swojej aktywności cząsteczka APRIL wymaga usieciowania. APRIL, sieciowany z proteoglikanami związanymi z komórkami docelowymi lub macierzą, z racji miejsca wiązania heparansulfanu, może uzyskać podobną aktywność, jak tą przy wiązaniu z błoną prawidłowych komórek [52]. Po związaniu z heparyną APRIL swobodnie wchodzi w interakcję z BCMA. Zatem prawidłowe pozycjonowanie przez HSPG jest możliwym modelem wiązania APRIL z komórkami nowotworowymi [53]. Badania wykazały, że interakcja APRIL z N-końcową częścią HSPG jest blokowana przez heparynę, co sugeruje, że może ona być użyteczna w blokowaniu wiązania APRIL z powierzchniowym proteoglikanem HS na komórkach nowotworowych [53,54].



Rycina 3 Trimer APRIL i monomer BCMA przed i po związaniu [29].

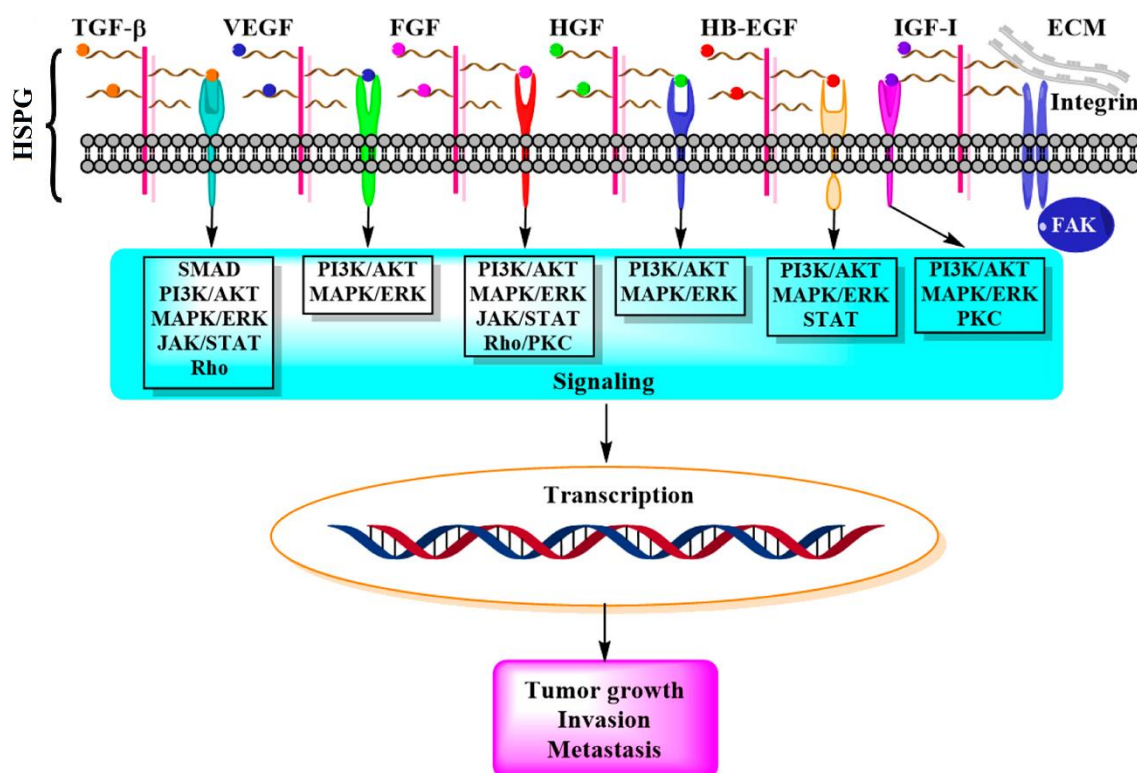
2.3. Szlaki sygnalizacyjne indukowane przez APRIL

Kluczowymi szlakami indukowanymi przez APRIL są te prowadzące do przeżycia komórek plazmatycznych (PC) w szpiku kostnym. Komórki plazmatyczne mają dwa receptory dla APRIL i BAFF, a mianowicie TACI i BCMA [55]. Sygnalizacja BCMA ma kluczowe znaczenie dla przeżycia PC w szpiku kostnym [56].

Przeżycie komórek plazmatycznych w szpiku zależy również od sygnalizacji PI3K. Sygnalizacja PI3K jest indukowana w PC przez bezpośredni kontakt z komórkami zrębowymi i prowadzi do inaktywacji czynnika transkrypcyjnego Forkhead-Box-Protein O1/3 (FoxO1/3), który jest niezbędny do przeżycia PC. Przeżycie PC zależy również od czynnika jądrowego κ B (NF- κ B), który jest indukowany przez APRIL. Dodatkowo, w obecności komórek zrębowych szpiku, APRIL znacząco hamuje aktywację kaspazy-12, ale nie kaspaz 3 i 7 [57].

Jeden z najlepiej zbadanych mechanizmów sygnalizacji za pośrednictwem HSPG jest związany z działaniem członków rodziny czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) i ich receptorów (FGFR). W zależności od rodzaju guza, regulowane przez HSPG wiązanie FGF

i dimeryzacja receptora wywołują aktywację czterech głównych szlaków sygnałowych: PI3K/Akt (kinaza-3 fosfatydyloinozytolu/kinaza białkowa B), MAPK/ERK (kinaza białkowa aktywowana mitogenem/kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym), JAK/STAT (kinaza janusowa/przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji), Rho/PKC (Rho GTPaza/kinaza białkowa C). Powszechnie, kaskada sygnalizacyjna MAPK/ERK aktywowana przez FGF bierze udział we wzroście i różnicowaniu komórek, kaskada sygnalizacyjna PI3K/AKT w przeżyciu komórek i określaniu ich losu, a PKC w polaryzacji komórek [58].



Rycina 4 Szlaki sygnałowe indukowane przez interakcję między HSPG, czynnikami wzrostu i receptorami, prowadzące do rozwoju i progresji guza [58].

2.4. Fizjologiczna rola APRIL

APRIL w warunkach fizjologicznych reguluje wzrost, dojrzewanie, różnicowanie i przeżycie komórek B. APRIL po połączeniu się z TACI promuje różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych oraz ich przeżycie. [59] [60–63]. TACI występuje w dwóch formach, długiej i krótkiej - pozbawionej pierwszej domeny wiążącej ligand. APRIL preferencyjnie wiąże krótką izoformę, która jest bardziej skuteczna w indukowaniu aktywacji czynnika NF-κB, powodując różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych oraz translokację jądrową p65 [64–66].

Udowodniono, że cząsteczka APRIL uczestniczy w procesie przełączania klas przeciwciał w komórkach B. Stwierdzono, że bierze udział w regulowanym przez iNOS procesie przełączenia klasy IgA, niezależnym od limfocytów T [67]. Ponadto dowiedziono, że niezależne od komórek T, przełączanie klas na IgG i IgA może być inicjowane przez komórki dendrytyczne oraz makrofagi z wykorzystaniem APRIL. Potwierdzono także, że wydzielana przez komórki dendrytyczne cząsteczka APRIL indukuje przełączanie klas w limfocytach B z pominięciem udziału cząsteczki CD40 [68].

APRIL w szpiku kostnym jest zatrzymywany przez otaczające go tkanki i za pośrednictwem HSPG nie ulega retencji. W szpiku gromadzi się w dużych ilościach, prowadząc do, wcześniej już wspomnianego, szybszego dojrzewania komórek oraz ich wyrzutu na obwód [20,26]. APRIL wydzielany przez komórki zrębowe szpiku kostnego i jego interakcja z HSPG na powierzchni plazmoblastów jest niezbędna do indukcji procesu ich różnicowania [69].

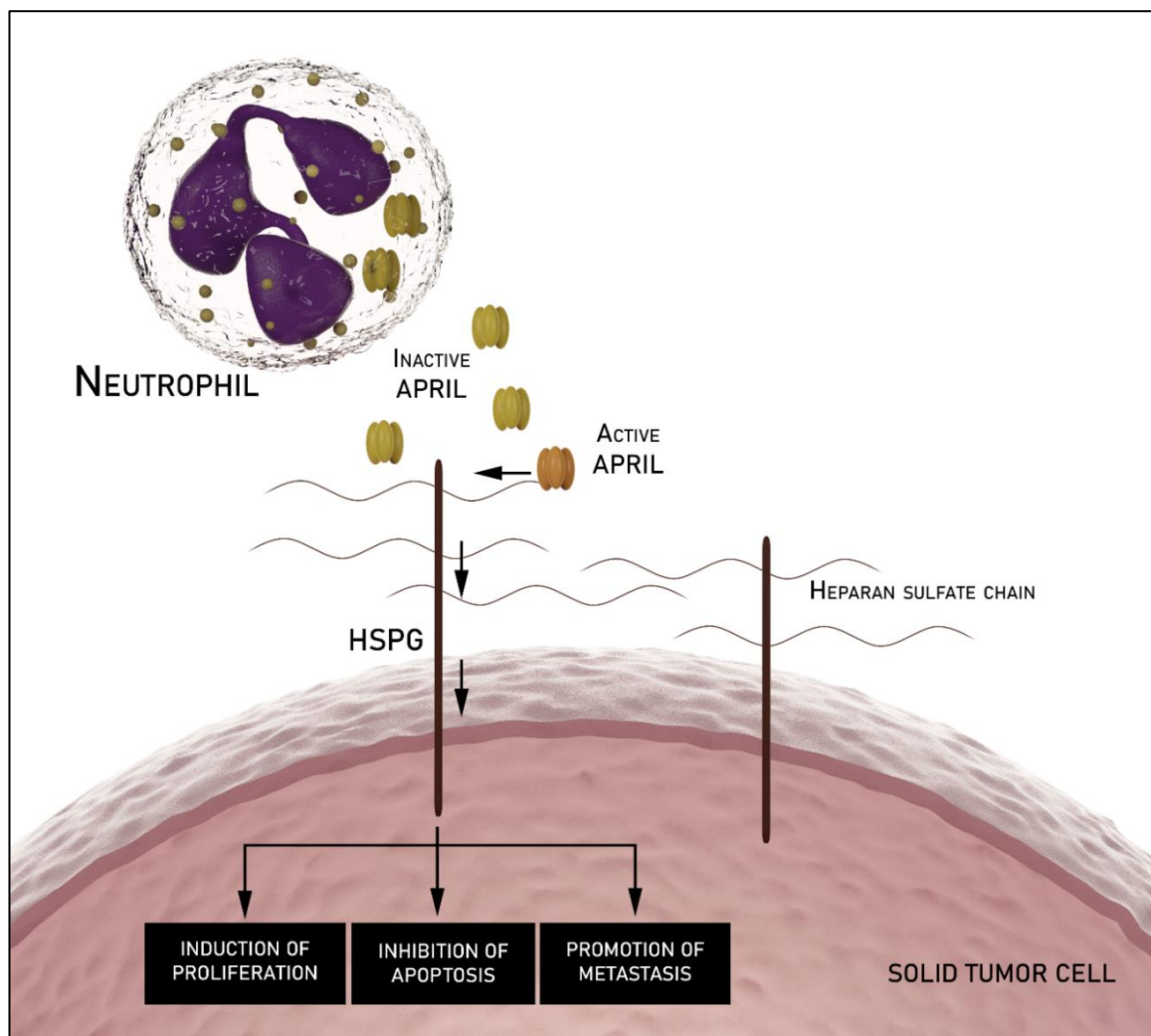
2.5. APRIL w różnych stanach patologii

APRIL bierze udział w patogenezie wielu stanów chorobowych. Dotyczy to m. in. nefropatii IgA (IgAN). Wśród czynników zaangażowanych w patogenezę nefropatii IgA, nieprawidłowa odporność błony śluzowej inicjuje rozwój choroby. APRIL jest zaangażowany w nieprawidłową odporność błony śluzowej poprzez niezależną od komórek T produkcję IgA przez limfocyty B oraz zmianę klasy przeciwciał IgA1 na IgA2 [70]. W nefropatii IgA, APRIL razem z IL-6 odpowiada za zwiększoną syntezę Gd-IgA1 (IgA1 z niedoborem galaktozy) [71]. Ponadto, szlaki APRIL i IL-6 niezależnie pośredniczą w nadprodukcji Gd-IgA1 indukowanej przez TLR9 (Toll-Like receptor 9), co dodatkowo nasila uszkodzenie nerek w IgAN. Zaobserwowano, że u pacjentów z IgAN komórki jednojądrzaste migdałków wytwarzają znacząco więcej APRIL w stosunku do pacjentów bez IgAN, a mRNA APRIL jest wykrywalne w monocytach, makrofagach i DC po stymulacji interferonem- γ (IFN- γ) [72].

Udowodniono, że APRIL wraz z BAFF regulują proces autoimmunizacji poprzez wpływ na przeżycie i różnicowanie limfocytów B oraz ekspansję pomocniczych limfocytów pęcherzykowych T (Tfh) [73]. Stwierdzono wzrost stężenia APRIL w surowicy pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym (SLE, *ang. systemic lupus erythematosus*) i dodatnią korelację z aktywnością choroby i markerami serologicznymi, takimi jak poziomy przeciwciał anty-dsDNA [74]. Oś APRIL/TACI jest kluczowa w rozwoju toczenia układowego, ponieważ badania wykazały, że produkcja autoreaktywnych limfocytów B

była znacznie zmniejszona kiedy występował brak obu białek [75]. Oprócz białka APRIL wykazano również związek między SLE a polimorfizmem w kodonie 67 genu *APRIL* [76,77]. Ponadto, w przypadku toczniowego zapalenia nerek (LN) podwyższone poziomy APRIL w surowicy korelowały z nasileniem proliferacyjnego zapalenia nerek. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie blokady BAFF i APRIL może być przydatne w leczeniu toczniowego zapalenia nerek [78].

Szczególnie ważną rolę cząsteczka APRIL wykazuje w procesie nowotworowym. Komórki nowotworowe nie wykazują ekspresji TACI oraz BCMA [39,40]. APRIL na powierzchni komórek nowotworowych, jak również w macierzy pozakomórkowej (ECM) wiąże się z proteoglikanami siarczanu heparanu (HSPG). Bezpośrednie wiązanie się z komórkami nowotworowymi za pomocą HSPG obserwowano w doświadczeniach *in vitro* oraz potwierdzono w nowotworach *in situ*, co wskazywało na potencjalną rolę interakcji HSPG/APRIL w rozwoju nowotworów (Rycina 5) [40].



Rycina 5 Udział HSPG w reakcji APRIL-komórka nowotworowa [38].

Neutrofile obecne w obrębie guza, uwalniają nieaktywny APRIL. Niezwiązany, trimeryczny APRIL wiąże się z łańcuchem siarczanu heparanu HSPG i zostaje zaktywowany. Inaczej niż w nowotworach krwi i chłoniakach, w guzach litych, HSPG pozostają na powierzchni komórki, a ich rdzeń polipeptydowy bezpośrednio przekazuje sygnały do wnętrza komórki.

Szereg badań potwierdziło ekspresję cząsteczki APRIL w tkankach nowotworowych różnego pochodzenia oraz w komórkach towarzyszących, obecnych w mikrośrodowisku guza (Tabela3).

Tabela 3 Poziomy ekspresji APRIL w różnych jednostkach chorobowych [38].

Jednostka chorobowa	Miejsce pomiaru APRIL	Poziom ekspresji APRIL
Rak piersi	Neutrofile bez stymulacji	+
	Neutrofile kohodowane z komórkami raka piersi	+++
Rak piersi	Komórki linii: MDA-MB468	+++
	Komórki linii: MDA-MB231	+
	Komórki linii: T47D	++
	Komórki linii: MCF7	+
Rak żołądka	Komórki raka żołądka	+++ / +++ / +
	Komórki zdrowej tkanki	+ / -
Rak pęcherza moczowego	Tkanka guza	+++ (52/50% próbek)
	Komórki nowotworowe	++ (30% próbek)
Rak jajnika	Tkanka guza	+++ (51/52% próbek)
	Komórki nowotworowe	++ (13% próbek)
Nowotwory głowy i szyi	Tkanka guza	+++ (53/55% próbek)
	Komórki nowotworowe	++ (36% próbek)
Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego	Komórki nowotworowe	+++ (42,7% próbek)
Niedrobnokomórkowy rak płuc	Tkanka guza	+++ (71% próbek) +++ (50% próbek)
POChP	Komórki nabłonka pęcherzykowego	+
	Leukocyty (komórki B, makrofagi pęcherzykowe i neutrofile)	+
Niedrobnokomórkowy rak płuc	Komórki nabłonka pęcherzykowego	++
	Leukocyty (komórki B, makrofagi pęcherzykowe i neutrofile)	++
POChP + Niedrobnokomórkowy rak płuc	Komórki nabłonka pęcherzykowego	+++
	Leukocyty (komórki B, makrofagi pęcherzykowe i neutrofile)	+++
Niedrobnokomórkowy rak płuc	Tkanka guza	+++
Płaskonabłonkowy rak jamy ustnej	Neutrofile u chorych w stadium I/II	+++
	Neutrofile u chorych w stadium III/IV	+++

3. Apoptoza komórek nowotworowych

Terminu „apoptoza” używa się do opisu sytuacji, w której komórka po otrzymaniu określonych bodźców aktywnie zmierza ku śmierci [79]. Po raz pierwszy apoptoza została opisana przez Kerr *i wsp.* w latach 70-tych i pozostaje jednym z najczęściej badanych procesów biologii komórek. Zjawisko to obejmuje zmiany morfologiczne w komórce takie jak fragmentacja DNA, pyknoza jądra, kondensacja chromatyny, ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej, wypuklenie błony komórkowej i formowanie ciałek apoptotycznych [80].

Apoptoza umożliwia organizmowi eliminację zbędnych lub uszkodzonych komórek, odgrywając ważną rolę w homeostazie tkanek przez całe życie. Nieprawidłowa regulacja apoptozy przyczynia się do wielu chorób, w tym chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych i neurodegeneracyjnych. Różne rodzaje stresu komórkowego, na przykład uszkodzenie DNA lub pozbawienie czynnika wzrostu, mogą wywołać apoptotyczną eliminację komórek [81].

W latach 80-tych, wraz z odkryciem fragmentacji DNA w komórkach limfoidalnych, a następnie w nowotworach poddawanych chemioterapii, indukcja apoptozy stała się celem terapii przeciwnowotworowej [82]. Zmniejszona apoptoza lub jej zahamowanie odgrywa istotną rolę w karcynogenezie. Istnieje wiele sposobów, dzięki którym komórka nowotworowa może hamować proces swojej apoptozy, a mechanizmy te można podzielić na:

- zakłócenie równowagi pomiędzy białkami pro-apoptotycznymi i anty-apoptotycznymi,
- zmniejszenie funkcji kaspaz,
- upośledzenie sygnalizacji receptorów śmierci [83].

W zależności od czynnika inicjującego, apoptoza może przebiegać szlakiem wewnątrzkomórkowym (receptorowym) lub wewnątrzkomórkowym (mitochondrialnym).

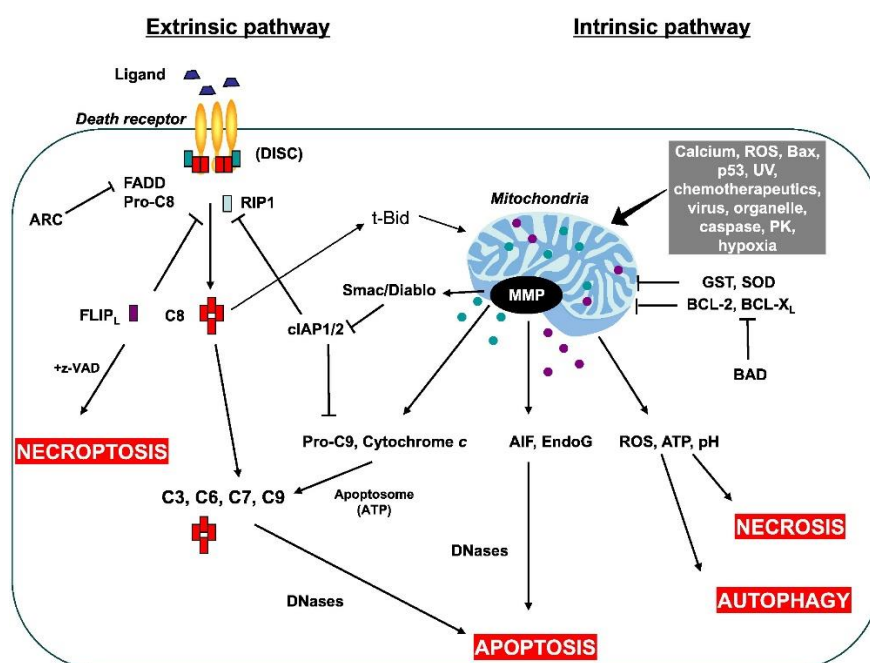
3.1. Szlak receptorowy (zewnątrzkomórkowy)

Zewnątrzkomórkowa ścieżka apoptozy, rozpoczyna się, gdy ligandy wiążą się z odpowiednim receptorem śmierci. Najbardziej znanymi receptorami śmierci są receptor TNF typu 1 (TNFR1) i receptor Fas (FasR, CD95), wiążące odpowiednie ligandy: TNF- α i FasL [84].

Z poznanych receptorów nadrodziny TNF, osiem zawiera tzw. domenę śmierci (DD, *ang. Death Domain*) w cytosolu. Receptory zawierające DD wykorzystują aktywację kaspaz jako mechanizm sygnalizacyjny [85].

Wiązanie ligandu FasL z FasR powoduje związanie białka adaptorowego FADD (*ang. Fas Associated Death Domain*), natomiast wiązanie ligandu TNF α z receptorem TNFR powoduje związanie białka adaptacyjnego TRADD (*ang. Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain*) oraz rekrutację białek adaptorowych FADD i RIP (*ang. Receptor-Interacting Protein*). Następnie FADD łączy się z prokaspazą-8 poprzez dimeryzację domeny efektoru śmierci. W tym momencie powstaje wywołujący śmierć kompleks sygnałowy (DISC, *ang. Death-Inducing Signaling Complex*), który powoduje autokatalityczną aktywację prokaspazy-8. Aktywowana postać kaspazy-8 jest kaspazą inicjatorową, która inicjuje apoptozę przez rozszczepianie innych kaspaz [86].

Innymi przykładami receptorów śmierci są DR3, DR4, DR5, DR6, receptor ektodysplazyny A (EDAR) i receptor czynnika wzrostu nerwów (NGFR). Receptory te posiadają domenę śmierci, a gdy są aktywowane przez sygnał śmierci, pewna liczba cząsteczek ulega rekrutacji do domeny śmierci, co powoduje aktywację kaskady sygnalizacyjnej [85].

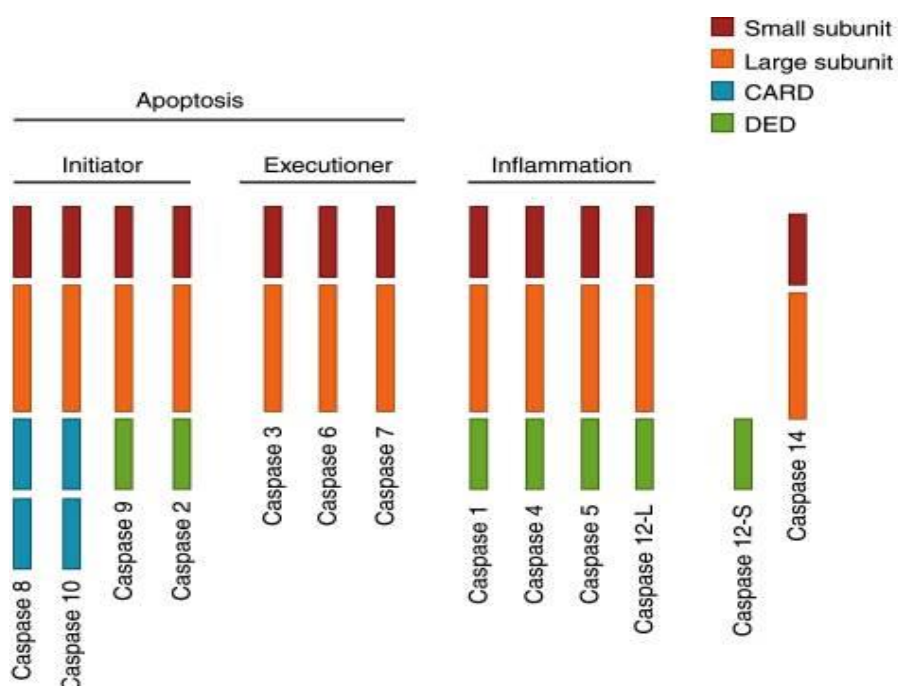


Rycina 6 Zewnętrzne (*ang. extrinsic*) i wewnętrzne (*ang. intrinsic*) szlaki apoptozy oraz inne formy śmierci komórki, takie jak nekroza, nekroptoza czy autofagia [87].

3.2. Kaspazy

Zidentyfikowano dotychczas trzy grupy kaspaz [88]:

- **Kaspazy zapalne (związane z kaspazą 1)** (np. kaspazy-1, -4, -5, -13 i -14), zaangażowane w przetwarzanie cytokin podczas procesów zapalnych;
- **kaspazy inicjatorowe** (np. kaspazy-2, -8, -9 i -10), które są odpowiedzialne za inicjację szlaku apoptozy. Każda z nich ma długą prodomenę, która koduje motyw interakcji białko-białko, używany do ułatwienia dimeryzacji domen katalitycznych. Motywy te obejmują domenę rekrutacji kaspazy (CARD, *ang. caspase recruitment domain*) w kaspazie-2 i kaspazie-9 oraz domenę efektorową śmierci (DED, *ang. death effector domain*), znajdującą się w prodomenach kaspazy-8 i kaspazy-10. Powyższe domeny umożliwiają przyłączenie kaspaz inicjatorowych do kompleksu sygnalizacyjnego indukującego śmierć (DISC), co prowadzi do autoaktywacji kaspaz i indukcji apoptozy [89,90].
- **kaspazy efektorowe** (kaspazy-3, -6 i -7), są odpowiedzialne za rozszczepianie składników komórkowych podczas apoptozy. Kaspazy należące do tej grupy mają wspólną krótką prodomenę składającą się z 20–30 reszt, w której brakuje określonego motywu lub miejsca interakcji białek. Wywołują fazę egzekucji apoptozy poprzez rozszczepianie wielu różnych białek strukturalnych i regulatorowych, które wyłączają funkcje komórki i przyczyniają się do powstawania morfologicznych cech apoptozy [88,91].



Rycina 7 Struktura domen ludzkich kaspaz [92].

3.3. Szlak mitochondrialny (wewnątrzpochodny)

Szlak wewnątrzpochodny jest inicjowany przez wewnętrzne bodźce, takie jak nieodwracalne uszkodzenia genetyczne, niedotlenienie, ekstremalnie wysokie stężenia cytozolowego Ca^{2+} , silny stres oksydacyjny lub niedobór czynników wzrostu. Niezależnie od bodźców, szlak ten jest wynikiem zwiększonej przepuszczalności mitochondriów i uwalniania do cytoplazmy cząsteczek pro-apoptotycznych, takich jak cytochrom-c [93]. Szlak ten jest ściśle regulowany przez grupę białek należących do nadrodziny Bcl-2, nazwaną tak od genu *BCL2*. Cechą charakterystyczną białek Bcl-2 są domeny homologiczne (BH) w ich strukturze: BH1, BH2, BH3 i BH4 [94].

Białka Bcl-2 ze względu na obecność domen homologicznych oraz funkcje zostały sklasyfikowane w 3 grupach:

Tabela 4 Białka nadrodziny Bcl-2 [95,96].

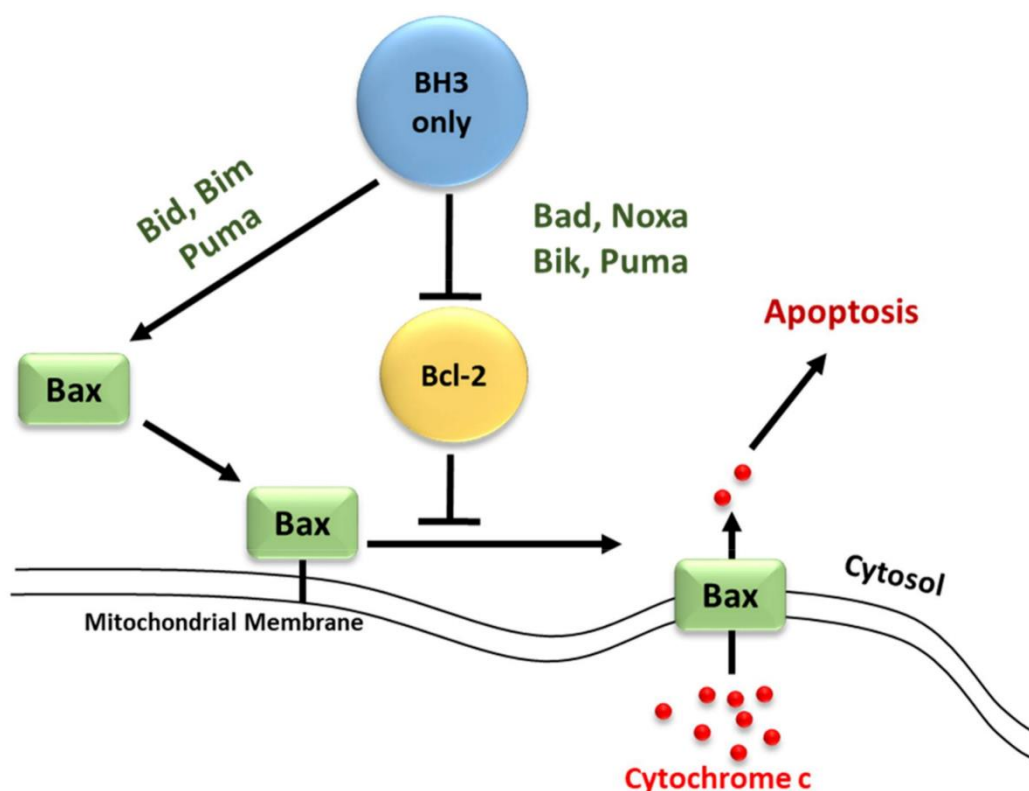
Grupa białek	Białka	Struktura	Funkcja
białka anti-apoptotyczne	Bcl-2	<ul style="list-style-type: none"> • domeny BH (BH1-BH4) • region transbłonowy wiążący białka z zewnętrzną błoną mitochondrialną (MBR, ang. <i>Membrane Binding Region</i>) 	Wiązanie białek rodziny Bax w celu zachowania ciągłości błony mitochondrialnej.
	Bcl-X _L		
	Bcl-W		
	Bcl-B		
	Mcl-1		
A-1			
pro-apoptotyczne białka Bax	Bax	<ul style="list-style-type: none"> • domeny BH (BH1-BH4) 	Wolne białka wiążą się z błoną mitochondrialną, tworząc w niej pory.
	Bak		
	Bok		
białka BH3-only	Bad	<ul style="list-style-type: none"> • domena BH3 	Bezpośrednie wiązanie i aktywacja białek Bax i Bak. Wiązanie i aktywacja białek anti-apoptotycznych Bcl-2, aby te nie hamowały działania białek podrodziny Bax.
	Bid		
	Bim		
	Bik		
	Bmf		
	Hrk		
	Noxa		
Puma			

Dwa modele wyjaśniają aktywację Bak/Bax poprzez interakcję członków nadrodziny białek Bcl-2: model aktywacji bezpośredniej i model aktywacji pośredniej.

W modelu pośrednim aktywacja Bax/Bak występuje tylko wtedy, gdy białka zawierające tylko BH3 wiążą się i hamują wszystkie anti-apoptotyczne białka nadrodziny

Bcl-2 [97]. Domena BH3 znajdująca się na białkach BH3-only zawiera α -helisę, która wchodzi w interakcję z hydrofobową kieszenią domen BH1, 2 i 3 białek anty-apoptotycznych, prowadząc do ich inaktywacji i uwolnienia pro-apoptotycznych Bax/Bak. Białka Bim, Bid i Puma wiążą wszystkie białka anty-apoptotyczne z wysokim powinowactwem i są silnymi induktorami apoptozy, natomiast Bad i Noxa, które łączą się tylko z kilkoma białkami anty-apoptotycznymi, są słabymi induktorami [98].

W modelu bezpośrednim białka zawierające tylko BH3 mogą bezpośrednio aktywować efekторы pro-apoptotyczne Bax/Bak pod nieobecność elementów anty-apoptotycznych [99]. Niektórzy członkowie BH3-only (Bid, Bim i Puma) są aktywatorami, zdolnymi do bezpośredniej interakcji z Bax/Bak i wywołania ich zmian konformacyjnych, które prowadzą do ich aktywacji. Natomiast inne białka tej grupy (Bad, Noxa, Bik i Puma) są klasyfikowane jako uczulające. Działają w celu sekwestracji białek anty-apoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1), a tym samym hamują ich zdolność do tłumienia aktywacji Bax/Bak [100].



Rycina 8 Bezpośrednia i pośrednia aktywacja wewnętrznego szlaku apoptozy [101].

Podczas, gdy białka anty-apoptotyczne regulują apoptozę poprzez blokowanie mitochondrialnego uwalniania cytochromu-c, białka pro-apoptotyczne działają poprzez promowanie jego uwalniania. Równowaga między białkami pro- i anty-apoptotycznymi lub jej zaburzenie determinuje zainicjowanie procesu apoptozy [102].

Innymi czynnikami apoptotycznymi, uwalniającymi się z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy są m. in. czynnik indukujący apoptozę (AIF), drugi aktywator kaspazy pochodzący z mitochondriów, białko bezpośrednio wiążące IAP o niskim pI (Smac/DIABLO) i Omi/HtrA2 (białko wymagające wysokiej temperatury A). Cytoplazmatyczne uwalnianie cytochromu c aktywuje kaspazę-3 poprzez tworzenie kompleksu znanego jako apoptosom, który składa się z cytochromu c, Apaf-1 i kaspazy-9. Z drugiej strony Smac/DIABLO lub Omi/HtrA2 promuje aktywację kaspazy poprzez wiązanie się z inhibitorem białek apoptozy (IAP), co z kolei prowadzi do zakłócenia interakcji IAP z kaspazą-3 lub -9 [103].

4. Proliferacja komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe mają zdolność do przeżywania ponad normalną, zaprogramowaną długość życia cechując się nieprawidłową, zwiększoną proliferacją. Wzrost prawidłowych komórek jest ściśle regulowany m. in. przez czynniki wzrostu i hormony, podczas gdy w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu zmian w szlakach sygnałowych, co powoduje utratę regulacji wzrostu komórki i sprzyja niekontrolowanej proliferacji [104].

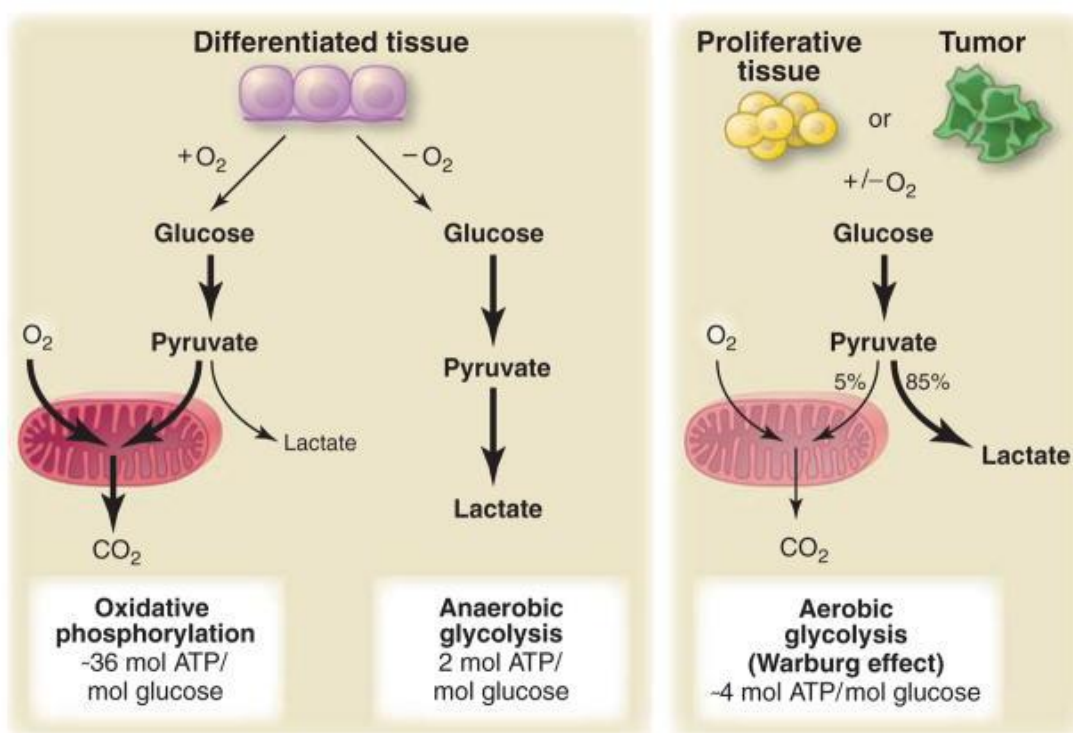
4.1. Metabolizm komórek nowotworowych

W 1924 r. Otto Warburga jako pierwszy zaobserwował, że komórki nowotworowe metabolizują glukozę w sposób inny niż komórki w prawidłowych tkankach [105]. Mutacje onkogenne mogą skutkować pobieraniem składników odżywczych, zwłaszcza glukozy, które spełniają lub przekraczają wymagania bioenergetyczne wzrostu i proliferacji komórek. W przeciwieństwie do większości prawidłowych tkanek, komórki nowotworowe mają tendencję do metabolizmu glukozy do mleczanu, nawet w obecności wystarczającej ilości tlenu dla podtrzymania mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [106].

Dodatkowo lub alternatywnie komórki nowotworowe wykorzystują zwiększone ilości glukozy jako źródła węgla dla reakcji anabolicznych. Chociaż zjawisko Warburga nie ma uniwersalnego zastosowania do wszystkich nowotworów [107], zwiększony wychwyty glukozy jest na tyle powszechny, że wykorzystuje się go do obrazowania raka metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) [108].

Istnieje kilka powodów, dla których zwiększony wychwyty glukozy do glikolitycznego wytwarzania ATP lub reakcji anabolicznych stanowi zaletę dla wzrostu guza [106,109–111]:

1. Kwasy wodorowęglanowy i mlekowy, wytwarzane przez komórki nowotworowe, warunkują środowisko komórkowe, które sprzyja inwazji nowotworu oraz tłumieniu przeciwnowotworowych mechanizmów immunologicznych.
2. W warunkach glikolizy tlenowej komórki mogą żyć w warunkach zmiennego ciśnienia tlenu, co byłoby zabójcze dla komórek, które korzystają z fosforylacji oksydacyjnej.
3. Komórki nowotworowe wykorzystują produkty pośrednie szlaku glikolitycznego do reakcji anabolicznych m. in. syntezy alaniny i jabłczanu.
4. Glukoza może być metabolizowana poprzez szlak pentozofosforanowy (PPP), w celu wytworzenia fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), a to zapewnia obronę antyoksydacyjną komórki przed niekorzystnym działaniem mikrośrodowiska i środków chemioterapeutycznych.



Rycina 9 Schematyczne przedstawienie różnic między fosforylacją oksydacyjną, glikolizą beztlenową i glikolizą tlenową (efekt Warburga) [112].

4.2. Czynniki wpływające na proliferację komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe angażują różne szlaki metaboliczne w celu wspierania szybkiej proliferacji. Mutacje, które prowadzą do nieprawidłowej aktywacji szlaków, takich jak Ras i kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), które z kolei aktywują kolejne kinazy, w tym MEK/ERK, AKT i mTOR, należą do najczęstszych zmian w ludzkich komórkach

nowotworowych. Aktywacja szlaku PI3K uzależnia komórki od wysokiego poziomu glukozy. Małe cząsteczki, które zakłócają sygnalizację PI3K, prowadzą do zmniejszenia wychwytu glukozy przez guzy, co koreluje z regresją guza [113,114].

Innym czynnikiem regulującym metabolizm glukozy jest czynnik transkrypcyjny MYC (protoonkogen), którego ekspresja często ulega zwiększeniu w nowotworach. MYC stymuluje metabolizm glukozy i glutaminy oraz koordynuje anaboliczne programy ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm glutaminy [115]. Podobnie, utrata p53, skutkuje konstytutywnym przejściem od katabolizmu składników odżywczych do anabolizmu i zwiększoną glikolizą [116].

Nasiloną glikolizę powoduje także czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF1), który jest często aktywowany przez kombinację czynników genetycznych i środowiskowych w różnych nowotworach [117].

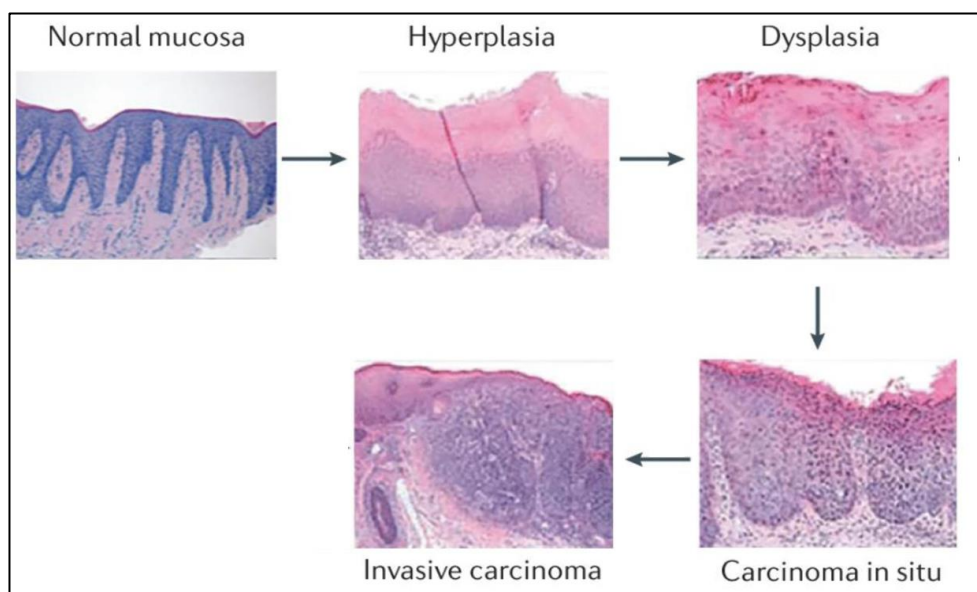
5. Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC)

Raki płaskonabłonkowe głowy i szyi (HNSCC) są szóstym najczęściej występującym rakiem na świecie, z 890 000 nowych przypadków i 450 000 zgonów w 2018 roku [118]. Mężczyźni wykazują 2–4-krotnie większe ryzyko rozwoju HNSCC niż kobiety. HNSCC rozwijają się z nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, gardła i krtani, i są najczęstszymi nowotworami złośliwymi głowy i szyi [119]. Obciążenie HNSCC różni się w zależności od kraju/regionu i jest głównie skorelowane z narażeniem na czynniki rakotwórcze pochodzące z tytoniu oraz nadmiernym spożyciem alkoholu. Jako inna przyczynę nowotworów jamy ustnej i gardła wskazuje się wcześniejszą infekcję onkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), głównie HPV-16 oraz w mniejszym stopniu HPV-18 i innymi szczepami [120]. Mediana wieku rozpoznania HNSCC niezwiązanego z wirusem HPV wynosi 66 lat, podczas gdy mediana wieku rozpoznania raka jamy ustnej i gardła związanego z HPV – 53 lata, a raka nosogardzieli związanego z wirusem Epstein-Barr (EBV) – 50 lat [121,122].

Tabela 5 Charakterystyka HPV-dodatniego i negatywnego HNSCC [123].

Charakterystyka	HPV-dodatni	HPV-ujemne
Zachorowalność	Wzrastająca	Malejąca
Lokalizacja choroby	Przeważa w części ustnej gardła	Różny
Wiek	U osób młodszych	U osób starszych
Występowanie	Bardziej rozpowszechnione u ludzi rasy białej	Mniej rozpowszechnione u ludzi rasy białej
Status społeczno-ekonomiczny	Wyższy	Niższy
Tytoń/Alkohol	Słabo powiązany	Mocno powiązany
Higiena jamy ustnej/uzębienie	Lepsza	Gorsza
Marihuana	Powiązany	Niepowiązany
Liczba partnerów seksualnych	Wyższa	Niższa
Oralny kontakt seksualny	Częściej	Rzadziej
Zmiany genomowe	<i>FGFR3, E2F1, TRAF3</i>	<i>TP53, CDKN2A, MYC, CCND1</i>
Rokowanie	Lepsze	Gorsze

Histologicznie progresja komórki do inwazyjnego HNSCC następuje przez kolejne etapy: hiperplazję komórek nabłonka, dysplazję (łagodną, umiarkowaną i ciężką), raka *in situ* i ostatecznie raka inwazyjnego [124].



Rycina 10 Progresja HNSCC [124].

U większości pacjentów, u których zdiagnozowano HNSCC, nie występowała wcześniejsza zmiana przednowotworowa. HNSCC ma charakter heterogeny, komórka pierwotna nowotworu zależy od lokalizacji anatomicznej i czynnika etiologicznego (czynnik rakotwórczy lub wirus) [125]. Dorosłe komórki macierzyste lub progenitorowe są prawdopodobnymi kandydatami na komórkę zapoczątkowującą zmiany nowotworowe, przekształcając się, po transformacji onkogennej, do nowotworowych komórek macierzystych (CSC) o właściwościach samoodnawiania i pluripotencji [123].

Biomarkerami molekularnymi dla komórek CSC, które mają znaczenie prognostyczne są: CD44, CD133 i ALDH1 [126]. CD44 jest receptorem powierzchniowym komórki dla kwasu hialuronowego i metaloproteinaz macierzy (MMP), który bierze udział w interakcjach międzykomórkowych i migracji komórek. Komórki HNSCC z wysokimi poziomami CD44 są zdolne do samoodnawiania, a poziomy CD44 w guzach HNSCC są związane z przerzutami i złym rokowaniem [127]. Podobnie, zwiększone poziomy białka przenikającego przez błonę CD133 są związane z inwazyjnością i przerzutami HNSCC. ALDH1 to wewnątrzkomórkowy enzym, który przekształca retinol w kwas retinowy, jest markerem zarówno prawidłowych komórek macierzystych, jak i CSC. Wysokie poziomy ekspresji lub aktywności ALDH1 są związane z samoodnawianiem, inwazją i powstawaniem przerzutów [126,128].

Jednym z istotnych oddziaływań członków nadrodziny TNF u pacjentów z HNSCC jest cząsteczka OX40, która ulega silnej ekspresji w limfocytach naciekających nowotwór, co prowadzi do tłumienia odpowiedzi ze strony mikrośrodowiska immunologicznego guza [129]. Inne badanie wykazało, że TNF- α sprzyja inwazji i przerzutom poprzez szlak NF- κ B w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej [130]. Jednak wzorce ekspresji i funkcje rodziny TNF w HNSCC wymagają dalszej poszerzonej analizy.

W odniesieniu do nabłonkowych nowotworów narządów głowy i szyi stosuje się klasyfikację zaawansowania klinicznego (TNM, tumor-node-metastasis).

Tabela 6 Klasyfikacja stopnia klinicznego zaawansowania raków płaskonabłonkowych głowy i szyi na wardze i w jamie ustnej (UICC TNM 8 z 2017 roku) [131].

Ocena zaawansowania ogniska pierwotnego — cecha T
<p>Tx — guz pierwotny nie może być oceniony</p> <p>T0 — brak klinicznych cech guza pierwotnego</p> <p>Tis — rak in situ</p>
<p>T1 — guz, którego największy wymiar nie przekracza 2 cm, naciekający na głębokość nie większą niż 5 mm</p> <p>T2 — guz, którego największy wymiar nie przekracza 2 cm, naciekający na głębokość większą niż 5 mm, ale nie większą niż 10 mm, lub guz, którego największy wymiar przekracza 2 cm, ale nie przekracza 4 cm, naciekający na głębokość nie większą niż 10 mm</p> <p>T3 — guz, którego największy wymiar jest większy niż 4 cm lub naciekający na głębokość nie większą niż 10 mm</p> <p>T4a — Warga: guz nacieka warstwę korową kości, nerw zębodołowy dolny, dno jamy ustnej lub skórę (bródki bądź nosa)</p> <p>T4a — Jama ustna: guz nacieka warstwę korową żuchwy lub nacieka zatokę szczękową lub skórę twarzy</p> <p>T4b — Warga i jama ustna: guz nacieka przestrzeń żwaczy, wyrostki skrzydłowe lub podstawę czaszki, lub obejmuje tętnicę szyjną wewnętrzną</p>
Ocena węzłów chłonnych szyi — cecha N
<p>Nx — regionalne węzły chłonne nie mogą być ocenione</p> <p>N0 — brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych</p> <p>N1 — przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza. Największy wymiar przerzutu nie przekracza 3 cm. Bez naciekania poza torebkę węzła.</p> <p>N2 — przerzuty opisane następująco:</p> <p>N2a — przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza. Największy wymiar przerzutu jest większy niż 3 cm, ale nie przekracza 6 cm. Bez naciekania poza torebkę węzła.</p> <p>N2b — przerzuty w wielu węzłach chłonnych po stronie guza. Największy wymiar żadnego z przerzutów nie przekracza 6 cm. Bez naciekania poza torebkę węzła.</p> <p>N2c — przerzuty w węzłach chłonnych obustronnie lub przerzuty w węzłach chłonnych po stronie przeciwnej do guza. Największy wymiar żadnego z przerzutów nie przekracza 6 cm. Bez naciekania poza torebkę węzła.</p> <p>N3a — przerzut w węźle chłonnym. Największy wymiar przerzutu jest większy niż 6 cm. Bez naciekania poza torebkę węzła.</p> <p>N3b — Przerzuty w jednym węźle chłonnym lub w wielu węzłach chłonnych, z klinicznie jawnym naciekaniem poza torebkę węzła</p>
Ocena przerzutów w odległych narządach — cecha M
<p>M0 — przerzuty odległe nieobecne</p> <p>M1 — przerzuty odległe obecne</p>

Do ustalenia etapu rozwoju i dojrzałości guza pierwotnego nowotworów głowy i szyi onkolodzy wykorzystują skalę oceny histopatologicznej:

Tabela 7 Skala oceny histopatologicznej guzów pierwotnych [131].

Ocena histopatologiczna – cecha G
Gx — Nie można ocenić stopnia zróżnicowania
G1 — Dobrze zróżnicowane
G2 — Średnio zróżnicowane
G3 — Słabo zróżnicowane

II. Założenia i cele rozprawy doktorskiej

1. Założenia

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma – HNSCC*) jest siódmą najczęściej występującą formą raka na świecie. Wpływ na rozwój HNSCC ma szereg czynników pochodzenia endo- i egzogenego, w tym liczne białka o charakterze immunoregulacyjnym. Należą do nich m. in. cytokiny uwalniane przez komórki systemu odpornościowego oraz komórki nowotworowe. Wśród cząsteczek wpływających na komórki nowotworowe istotną rolę pełnią białka nadrodziny TNF (*Tumor Necrosis Factor – czynnik martwicy nowotworu*), wśród nich APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand, TALL-2, TNFSF13*).

APRIL, w odróżnieniu od wielu innych ligandów nadrodziny TNF, może stymulować wzrost komórek różnych linii nowotworowych. Jest białkiem błonowym typu II z domeną cytoplazmatyczną, hydrofobowym regionem transbłonowym oraz domeną zewnątrzkomórkową. Cząsteczka APRIL jest wytwarzana przez komórki systemu odpornościowego, a także komórki nowotworowe. Zaobserwowano, że zmiany w syntezie i uwalnianiu cząsteczki APRIL mogą przyczyniać się do rozwoju wielu nowotworów płaskonabłonkowych. Mechanizm działania cząsteczki APRIL związany jest z regulacją proliferacji i czasu przeżycia komórek nowotworowych.

Kluczowymi cząsteczkami w regulacji czasu przeżycia na drodze apoptozy mitochondrialnej są białka nadrodziny Bcl-2. W nadrodzinie tej wyróżniamy dwie grupy: białka pro-apoptotyczne (m. in. Bax, Bak, Bid) oraz anty-apoptotyczne (m.in. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1). Szlak mitochondrialny apoptozy rozpoczyna się od usunięcia białka Bcl-2, następnie udrożnionym kanałem, poza mitochondrium, wydostaje się cytochrom c i aktywowana jest kaspaza-9 oraz kaspaza-3 i -6. Istotną rolę w regulacji apoptozy komórek nowotworowych pełni białko rodziny inhibitorów apoptozy - surwiwina, której ekspresja prowadzi do zahamowania apoptozy komórek nowotworowych.

Biorąc powyższe pod uwagę istotne wydaje się zbadanie wpływu i potencjalnego mechanizmu działania cząsteczki APRIL na proliferację i czas przeżycia komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi.

2. Cele badawcze

- Zbadanie wpływu rekombinowanej cząsteczki APRIL (rhAPRIL) na procesy proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych wybranych linii HNSCC: FaDu, CAL 27 i SCC-9.
- Ocena roli rhAPRIL w regulacji apoptozy badanych komórek na drodze mitochondrialnej.
- Zweryfikowanie udziału szlaku PI3K/p-Akt/surwiwina w komórkach badanych linii HNSCC poddanych działaniu rhAPRIL.

III. Materiał i metody

1. Materiał

Panel badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – uchwała numer R-I-002/439/2019.

1.1. Linie komórkowe HNSCC

Do badań użyto komórki z panelu obejmującego linie komórek nowotworowych z grupy nowotworów głowy i szyi (Head and Neck Cancer Panel, ATCC®):

1.1.1 FaDu

FaDu (ang. Pharyngeal Carcinoma, human; ATCC® HTB-43™) jest linią komórkową wywodzącą się z guza gardła dolnego. Są to pierwotne komórki raka kolczystokomórkowego o morfologii nabłonka. Komórki zostały pobrane w 1968 roku biopsją punktową z guza 56-letniego mężczyzny rasy białej, a następnie wyizolowane i przekazane do banku ludzkich komórek nowotworowych. Linia ta ma zastosowanie w badaniach onkoimmunologicznych oraz jest dobrym materiałem do transfekcji.

1.1.2 CAL 27

CAL 27 (ang. Epithelial Squamous Cell Carcinoma, human; ATCC® CRL-2095™) jest linią komórkową ludzkiego raka kolczystokomórkowego. Komórki CAL 27 są nabłonkowe, wielokątne z wysoce ziarnistą cytoplazmą. Komórki zostały wyizolowane w 1982 roku z tkanki pobranej przed leczeniem od 56-letniego białego mężczyzny ze zmiany chorobowej na środku języka.

1.1.3 SCC-9

SCC-9 (ang. Tongue Carcinoma, human; ATCC® CRL-1629™) to linia komórkowa wyizolowana z języka 25-letniego mężczyzny z rozpoznaniem rakiem płaskonabłonkowym. Ta linia komórkowa została zdeponowana przez JG Rheinwalda i ma zastosowanie w badaniach onkoimmunologicznych oraz jest dobrym materiałem do transfekcji.

2. Metody

2.1. Hodowla HNSCC

W butelkach adhezyjnych EasYFlasks™ 75cm³ (Thermo Scientific Nunc, 156499) prowadzono hodowlę komórek HNSCC w dedykowanych podłożach z dodatkiem 5% surowicy cielęcej z nowonarodzonych cieląt oraz 1% antybiotyku penicylina-streptomycyna w inkubatorze Forma™ Steri-Cycle™ i160 CO₂ (Thermo Scientific) z przepływem 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Po uzyskaniu pojedynczej, adherentnej warstwy, komórki poddawano trypsynizacji. Zebrane i przepłukane PBSem (gibco, 10010-015) komórki zawieszano w odpowiednim podłożu hodowlanym.

Liczbę komórek oceniano metodą komorową. Sporządzano zawiesinę zebranych komórek w płynie Türka (Aqua-med., 2010.3) którą pipetowano do uprzednio przygotowanej komory Bürkera (BRAND). Liczbę komórek zliczano w mikroskopie świetlnym (Olympus, CX23).

Założono hodowle komórek:

- w płytkach 96-studzienkowych (Falcon, 353072) w celu przeprowadzenia testu MTT;
- w płytkach 6-studzienkowych (Sarstedt, 83.3920) celem uzyskania komórek do oznaczeń cytometrycznych;
- w butelkach EasYFlasks™ 25cm³ (Thermo Scientific Nunc, 156367) w celu izolacji białka z wyhodowanych komórek do oceny metodą western blot.

Hodowlę prowadzono przez 24 i 48 godzin w obecności rhAPRIL (R&D Systems, 5860-AP-010) w stężeniu 100ng/ml oraz bez rhAPRIL, w inkubatorze w warunkach 5% CO₂ i temperaturze 37°C.

Tabela 8 Odczynniki użyte do hodowli komórek.

Linia:	FaDu	CAL 27	SCC-9
Podłoże	MEM (gibco, 11095-08)	DMEM F12 (gibco, 11320-033)	DMEM F12 (gibco, 11320-033)
Surowica	NBCS (gibco, 16010159)		
Antybiotyk	Pen Strep (gibco, 15140-122)		
Trypsyna	2,5% Trypsin (gibco 15090-046)		
PBS	PBS pH 7.4 (gibco, 10010-015)		

2.2. Test MTT

Przy użyciu testu MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen™, V13154) oceniono proliferację komórek HNSCC. Po 24 lub 48-godzinnej hodowli w studzienkach wymieniono podłoże hodowlane. Do badanych komórek dodano roztwór MTT i ponownie inkubowano 2 godziny w inkubatorze w warunkach 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Następnie dodano roztwór SDS i inkubowano komórki kolejne 4 godziny w inkubatorze. Po tym czasie spektrofotometrycznie (ASYS, UVM 340) oznaczano absorbancję we wszystkich badanych próbach przy długości fali 570nm.

Uzyskane wyniki absorbancji pomniejszono o tło odczynników, a dane przedstawiono w postaci procentowego odsetka proliferacji komórek.

Wykonano trzy niezależne czasowo powtórzenia dla każdej linii komórkowej.

2.3. Ocena cytometryczna

Po 24 i 48-godzinnej hodowli przeprowadzono ocenę żywotności i apoptozy komórek HNSCC metodą cytometrii przepływowej. Do oceny żywotności komórek oraz intensywności zachodzącego w komórkach procesu apoptozy wykorzystano cytometr BD Acurri C6 Plus. Oceniono morfologię komórek HNSCC na podstawie wielkości (FSC, *forward scatter channel*) i ziarnistości cytoplazmatycznych komórek (SSC, *side scatter channel*). Zastosowano barwienie APC Annexin V (BD Biosciences, 550474) w połączeniu z barwnikiem przyżyciowym 7-amino-aktynomocyną (7-AAD) (BD Biosciences, 51-68981E) które umożliwia określenie żywotności oraz odsetka komórek na różnych etapach apoptozy.

Otrzymane wyniki poddano analizie za pomocą programu FlowJo.

Tabela 9 Zasada bramkowania komórek wyznakowanych aneksyną V i 7-AAD.

Odczynnik	komórki żywe	wczesna apoptoza	późna apoptoza	nekroza
Aneksyna V	—	+	+	—
7-AAD	—	—	+	+

2.4. Izolacja białka

Zebrane po hodowli HNSCC traktowano Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, MERCK) i poddawano sonifikacji (SONICS Vibra Cell). Uzyskane lizaty komórkowe

wirowano przy RPMI = 15300 przez 15 minut w temperaturze pokojowej. W supernatancie mierzono ilość białka całkowitego przy użyciu Qubit™ Protein Assay Kit oraz aparatu Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) zgodnie z procedurą załączoną przez producenta.

2.5. Western blot

Za pomocą techniki Western blot oceniano ekspresję białek: PI3K, p-Akt, surwiwina, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, katepsyna-3 i katepsyna-9 w zawiesinach białka całkowitego z komórek HNSCC.

Białko zawieszano w Laemmli Sample Buffer z dodatkiem β ME (Bio-Rad, 161-0737). Próbkę inkubowano 5 minut w temperaturze 95°C. Elektroforezę prowadzono na SDS-PAGE (Bio-Rad, 1610416) w aparacie Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Podczas transferu (Bio-Rad Laboratories Mini PROTEAN® Tetra Cell) rozdzielone białka na żelu przeniesiono na membranę nitrocelulozową 0.45 μ m (Bio-Rad). Membranę blokowano przy użyciu 1xTBS 1% Casein Blocker (Bio-Rad, 1610782) w urządzeniu Millipore SNAP i.d.™ Protein Detection System. W następnym etapie nitrocelulozę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z przeciwciałami pierwszorzędowymi:

- goat polyclonal antibody p-PI 3-kinase p85 α (Tyr 508) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- rabbit polyclonal antibody p-Akt1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody Survivin (C-6) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody Bax (2D2) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody Bak (AT38E2) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody Bcl-2 (100) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody Bcl-xL (H-5) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody caspase-3 (4.1.18) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),
- mouse monoclonal antibody caspase-9 (96.1.23) (Santa Cruz Biotechnology, 1:100).

Następnie membranę odpłukano z niezwiązanych przeciwciał pierwszorzędowych roztworem TBS-T buffer [Tween®-20 (Sigma, P9416) with 10xTBS (Bio-Rad,1706435)] i ponownie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi:

- goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:5000),
- rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:5000),

- mouse anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:5000).

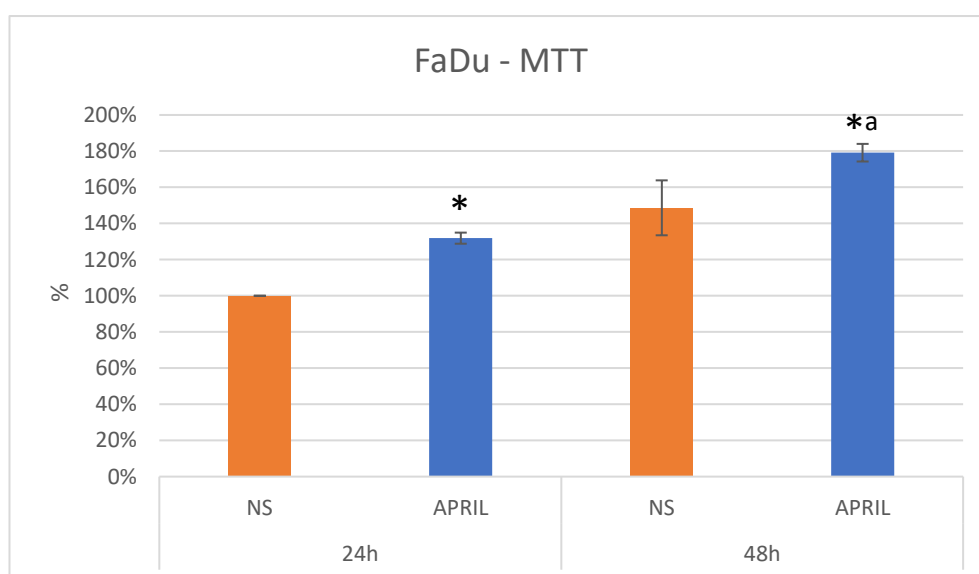
Po przepłukaniu nitrocelulozy TBS-T buffer z niezwiązanych przeciwciał drugorzędowych dodawano BCIP®/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich MERCK) w celu uzyskania immunoreaktywnych prążków w miejscu występowania badanych białek, których intensywność oceniono densytometrycznie w programie ImageJ i podano w jednostkach umownych.

Oznaczono ekspresję β -Actin (9) (Santa Cruz Biotechnology, 1:200) i zastosowano 3-Colour Prestained Protein Marker (BLIRT S.A.) jako kontrole dla metody.

IV. Wyniki

1. Ocena proliferacji komórek metodą MTT

Wyniki testu MTT wykazały, że komórki FaDu traktowane rhAPRIL wykazują wzrost proliferacji w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez rhAPRIL w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji. W 48-godzinnym wariantcie badania proliferacja komórek inkubowanych z rhAPRIL była wyższa w porównaniu do wariantu 24-godzinnego (Ryc. 11).

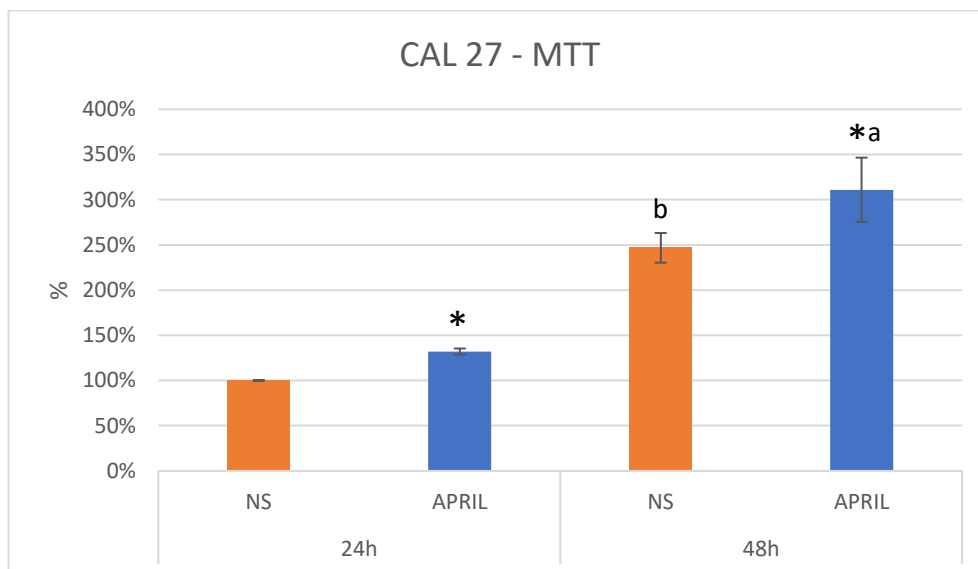


Rycina 11 Proliferacja komórek linii FaDu, mierzona testem MTT.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL przez 24h i 48h ($p < 0,005$)

Komórki linii CAL 27 w obecności rhAPRIL wykazały podobny wzrost intensywności proliferacji w obu zakresach czasowych. Ponadto, wykazano istotne różnice między komórkami inkubowanymi w czasie 24- i 48-godzin, zarówno w przypadku stymulacji rhAPRIL, jak i bez stymulacji (**Ryc. 12**).



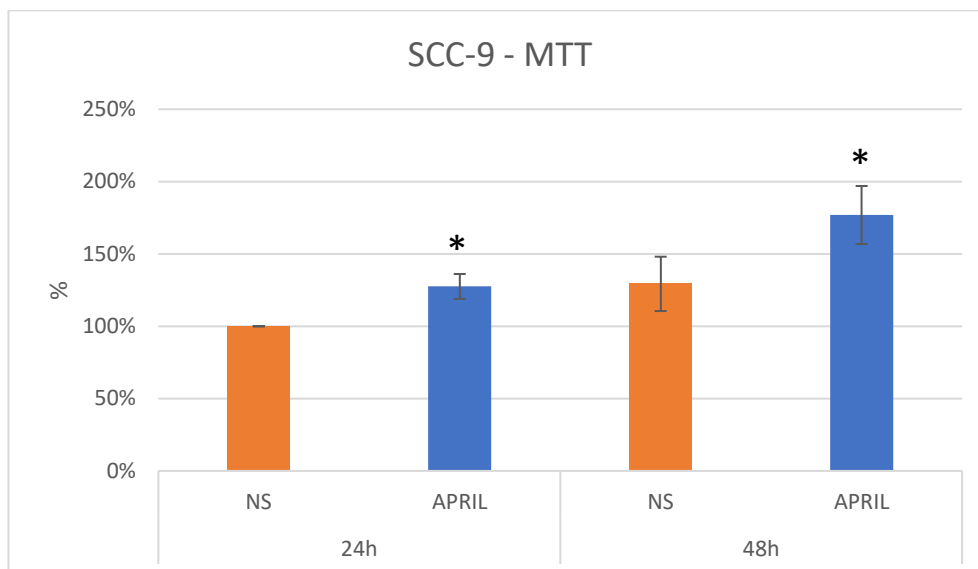
Rycina 12 Proliferacja komórek linii CAL 27, mierzona testem MTT.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

W komórkach linii SCC-9, podobnie do komórek FaDu i CAL 27, istotny statystycznie wzrost proliferacji zaobserwowano w komórkach traktowanych rhAPRIL w porównaniu z komórkami niestymulowanymi, zarówno w czasie 24-, jak i 48-godzinnej inkubacji (**Ryc. 13**).



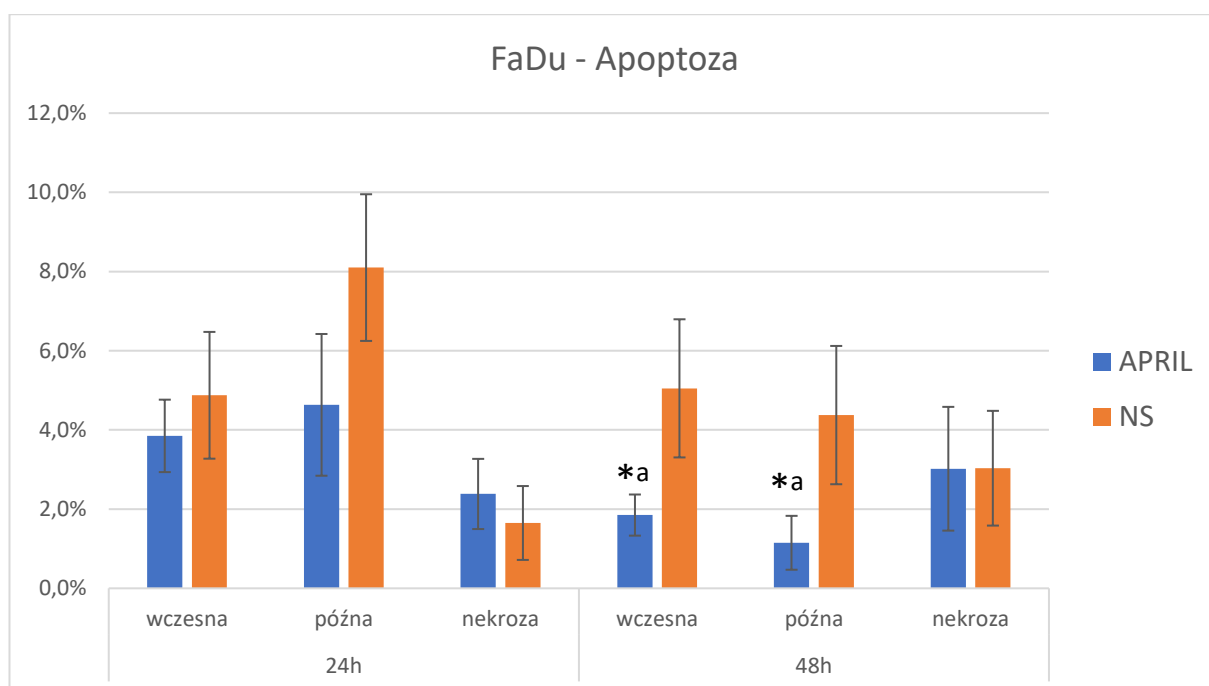
Rycina 13 Proliferacja komórek linii SCC-9, mierzona testem MTT.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

2. Ocena cytometryczna apoptozy

Po 24- i 48-godzinnej hodowli badanych komórek HNSCC z rhAPRIL lub bez, dokonano oceny intensywności apoptozy metodą cytometrii przepływowej.

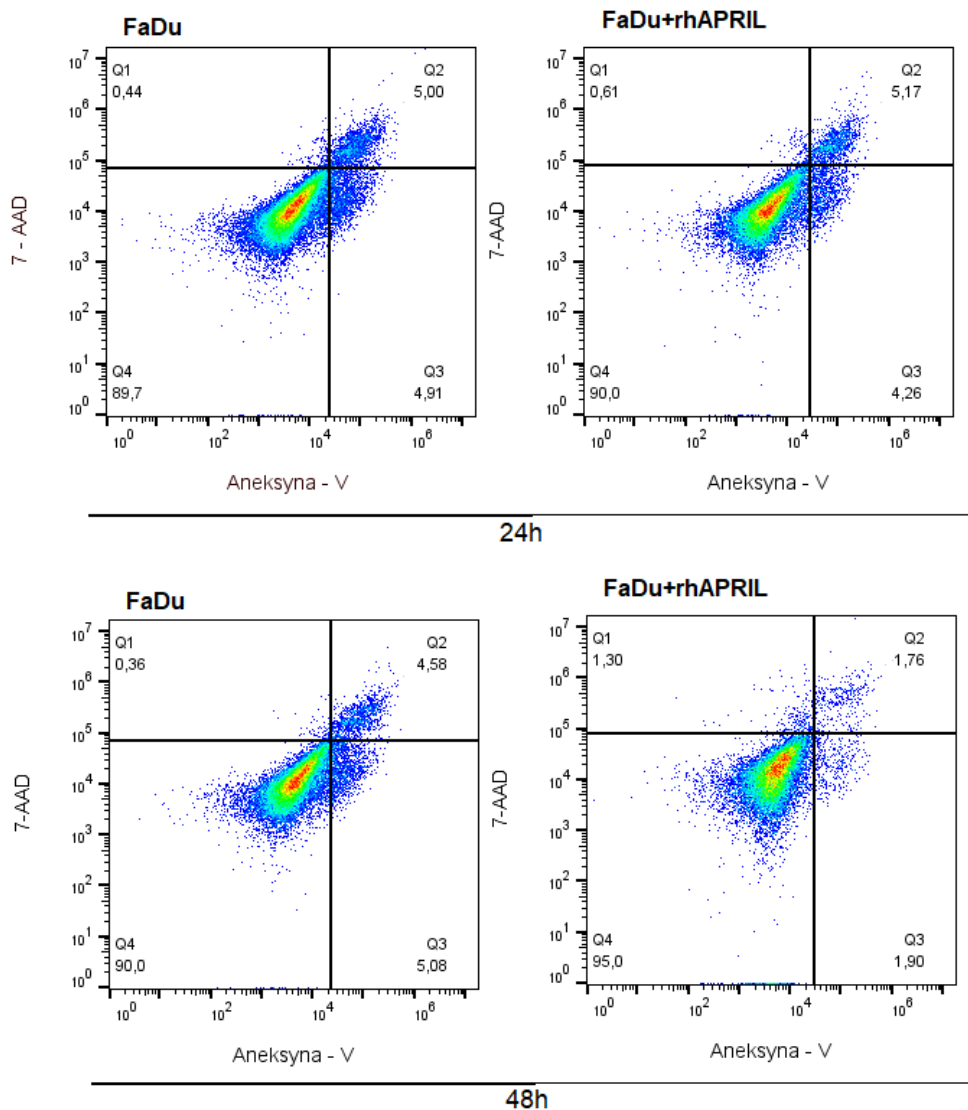
W komórkach linii FaDu po 48-godzinnej inkubacji z rhAPRIL stwierdzono istotnie niższy odsetek komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL (**Ryc. 14**). Ponadto, po 48-godzinnej inkubacji, stwierdzono niższy odsetek komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek po 24-godzinnej inkubacji (**Ryc. 14**).



Rycina 14 Ocena apoptozy komórek linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

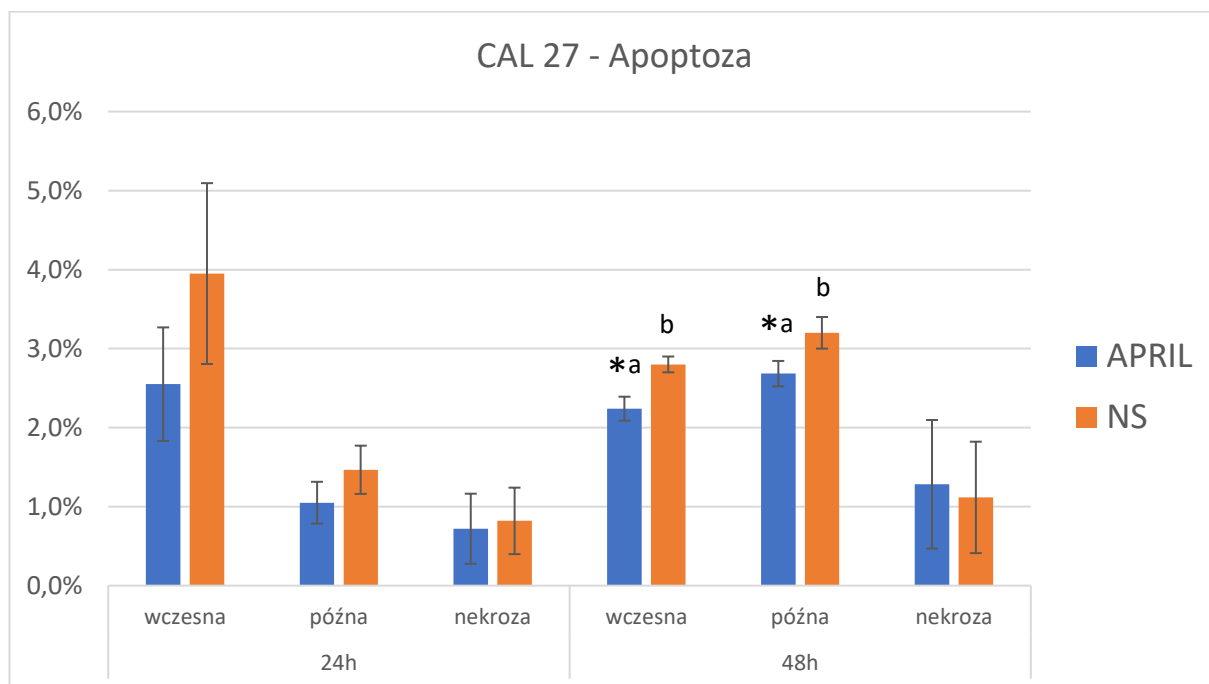
^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)



Rycina 15 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.

Q1 – nekroza; Q2 – późna apoptoza; Q3 – wczesna apoptoza; Q4 – żywe komórki.

W przypadku linii CAL 27 obserwowano istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy po 48 godzinach inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Jednocześnie wykazano istotnie wyższe wartości odsetka komórek apoptotycznych po 48 godzinach w porównaniu do inkubacji 24-godzinnej (**Ryc. 16**).

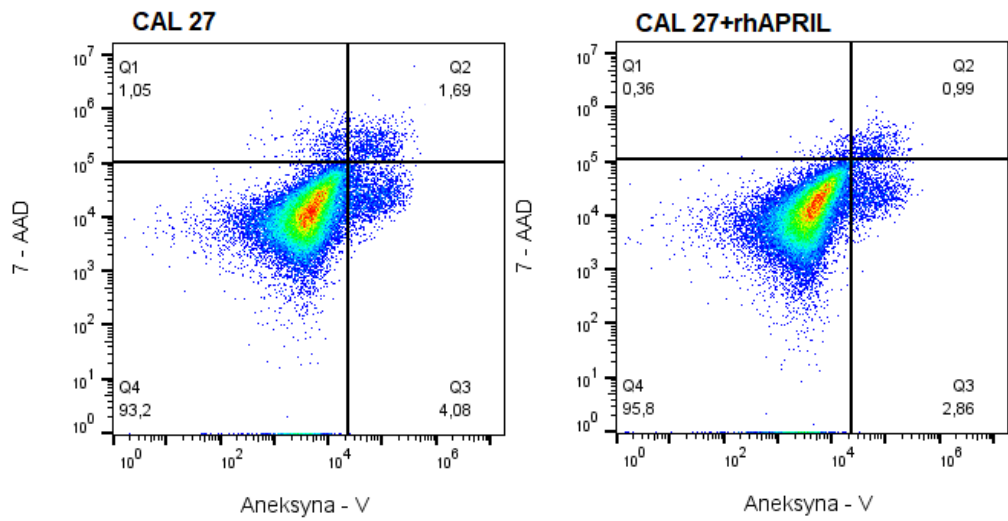


Rycina 16 Ocena apoptozy komórek linii CAL 27.

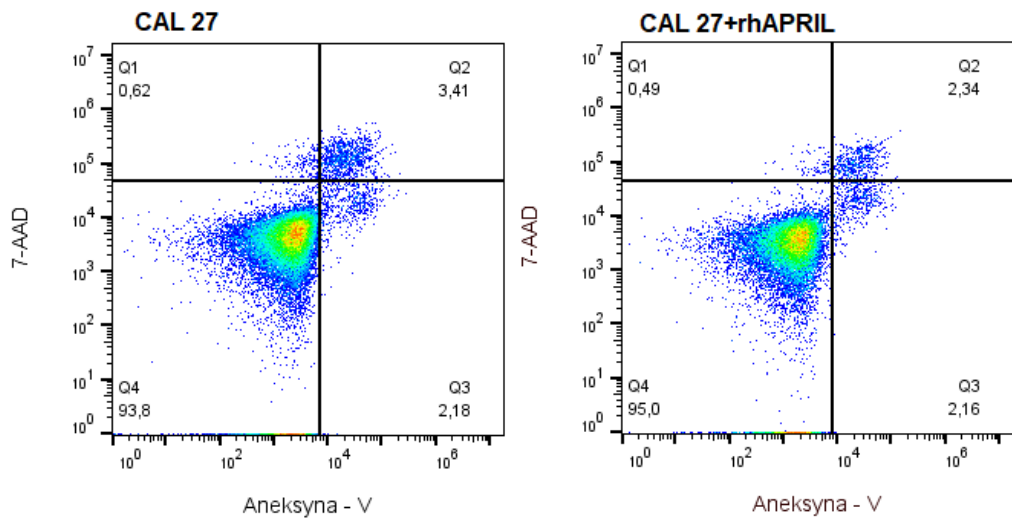
* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)



24h

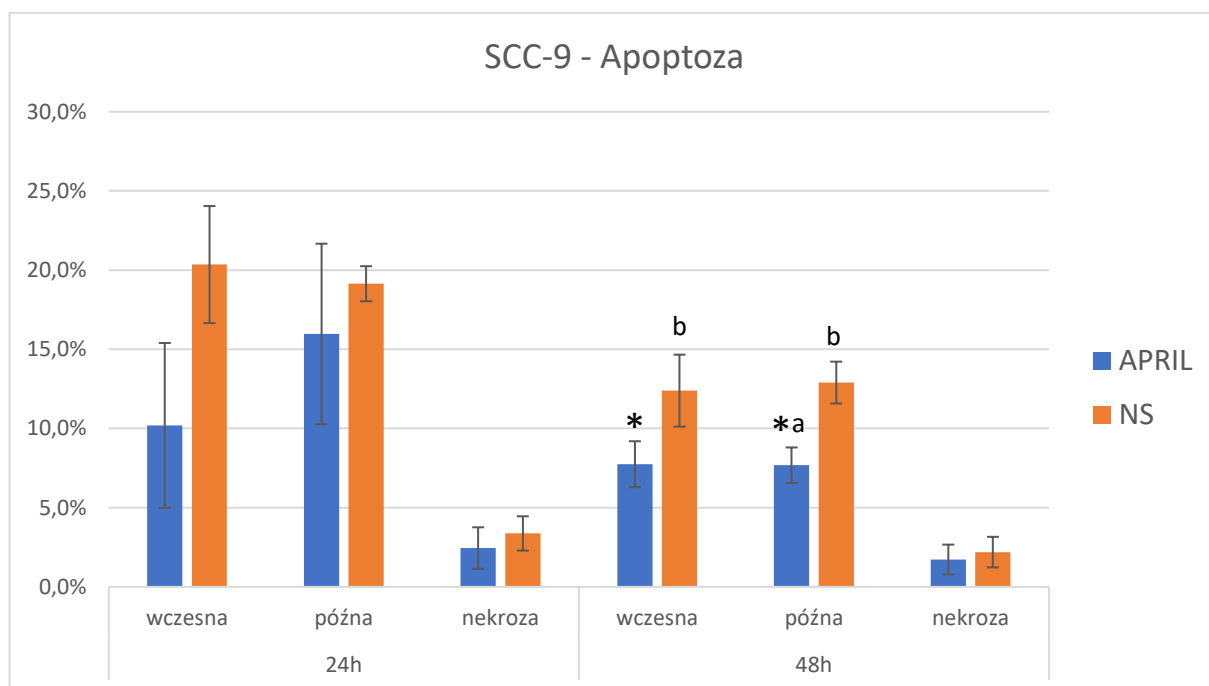


48h

Rycina 17 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.

Q1 – nekroza; Q2 – późna apoptoza; Q3 – wczesna apoptoza; Q4 – żywe komórki.

W komórkach linii SCC-9 stwierdzono istotnie niższy odsetek komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy po 48-godzinnej inkubacji z rhAPRIL, w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Odsetek komórek apoptotycznych w inkubowanych bez rhAPRIL po 48 godzinach był niższy w porównaniu do komórek po 24-godzinnej inkubacji. Jednocześnie odsetek komórek inkubowanych z rhAPRIL w późnej fazie apoptozy był niższy w porównaniu do tych samych komórek inkubowanych krócej (**Ryc. 18**).

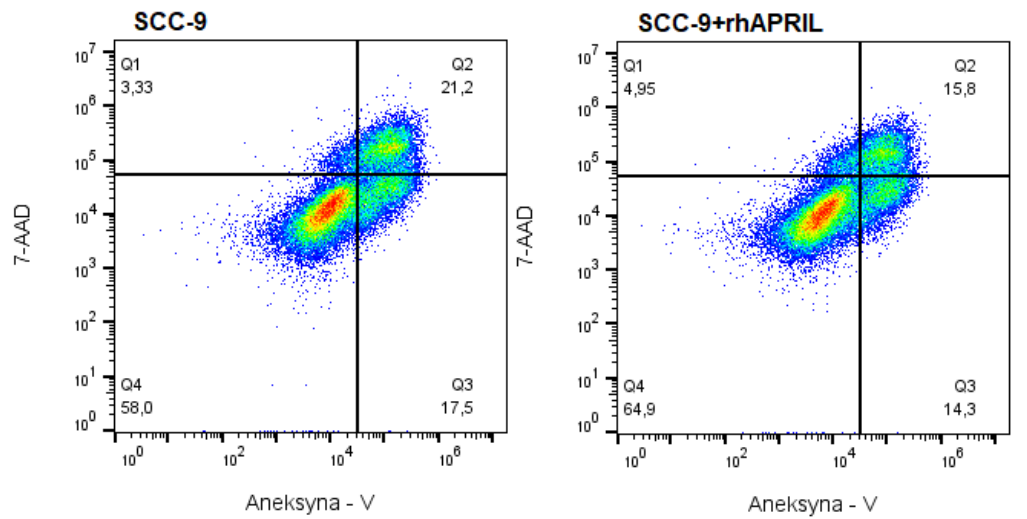


Rycina 18 Ocena apoptozy komórek linii SCC-9.

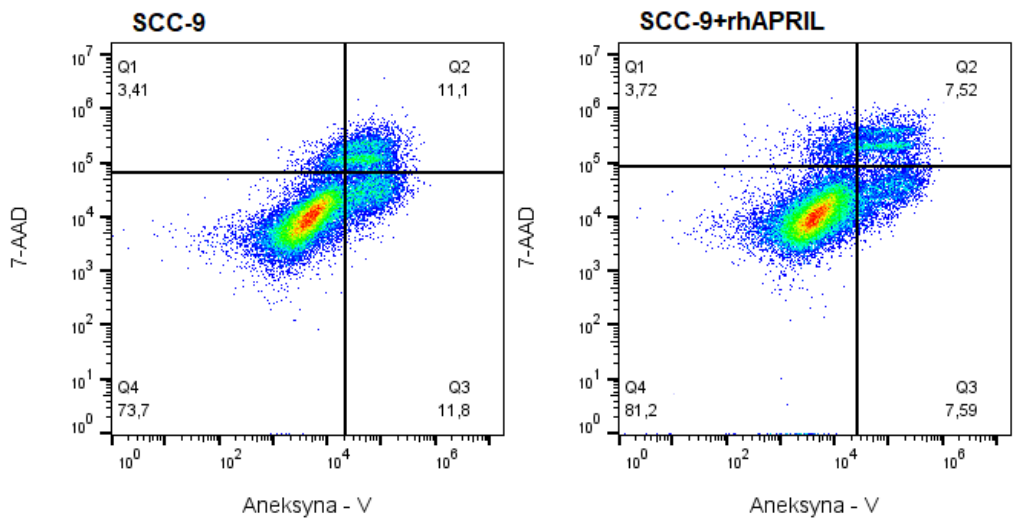
* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)



24h



48h

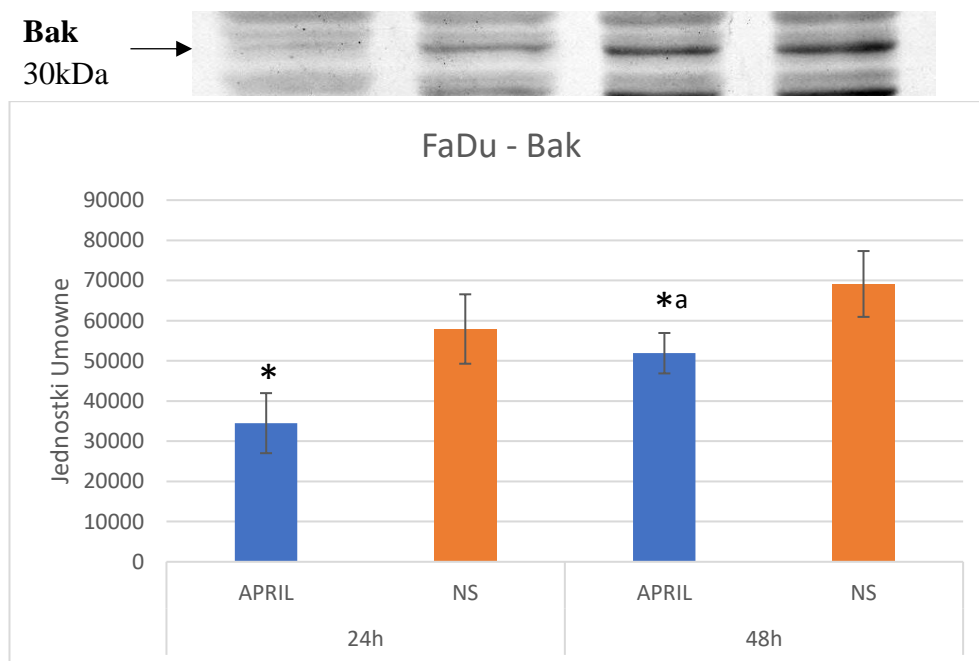
Rycina 19 Wyniki reprezentatywne dla 6 oznaczeń.

Q1 – nekroza; Q2 – późna apoptoza; Q3 – wczesna apoptoza; Q4 – żywe komórki.

3. Ocena ekspresji białek pro-apoptycznych metodą Western blot

3.1. Białko Bak

Po 24 i 48 godzinach inkubacji z rhAPRIL ekspresja białka Bak była istotnie niższa w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Ekspresja białka Bak w komórkach inkubowanych z rhAPRIL przez 48 godzin była wyższa w porównaniu do komórek inkubowanych 24 godziny (**Ryc. 20**).

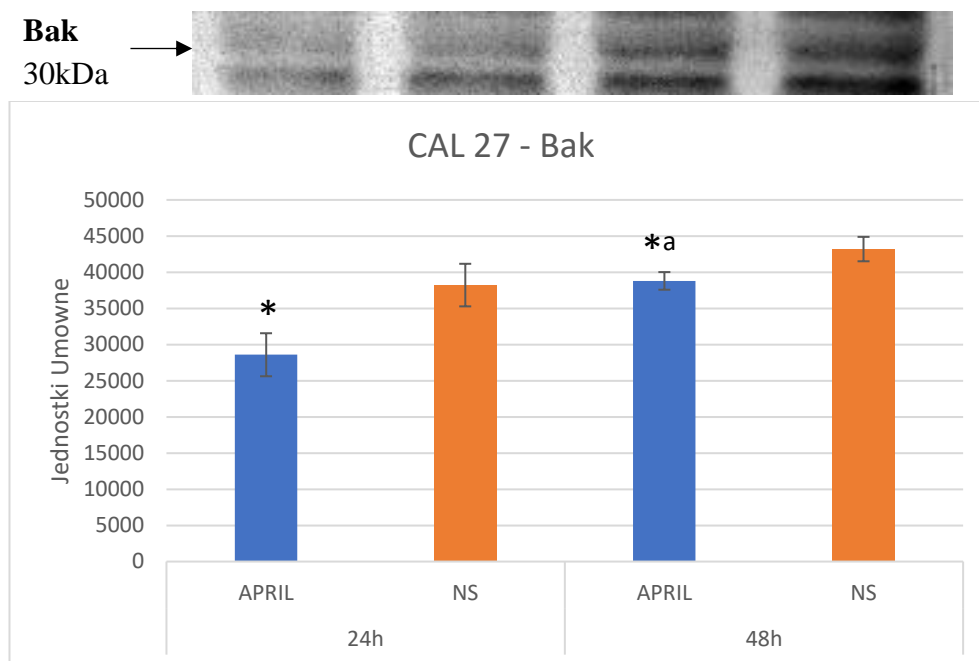


Rycina 20 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

Ekspresja białka Bak w komórkach linii CAL 27 zmieniała się tak samo, jak w komórkach linii FaDu. Inkubacja komórek z rhAPRIL spowodowała obniżenie ekspresji białka Bak w obu eksperymentach. Ponadto, dłuższa inkubacja komórek z rhAPRIL spowodowała wzrost ekspresji tego białka w porównaniu do komórek inkubowanych 24 godziny (**Ryc. 21**).

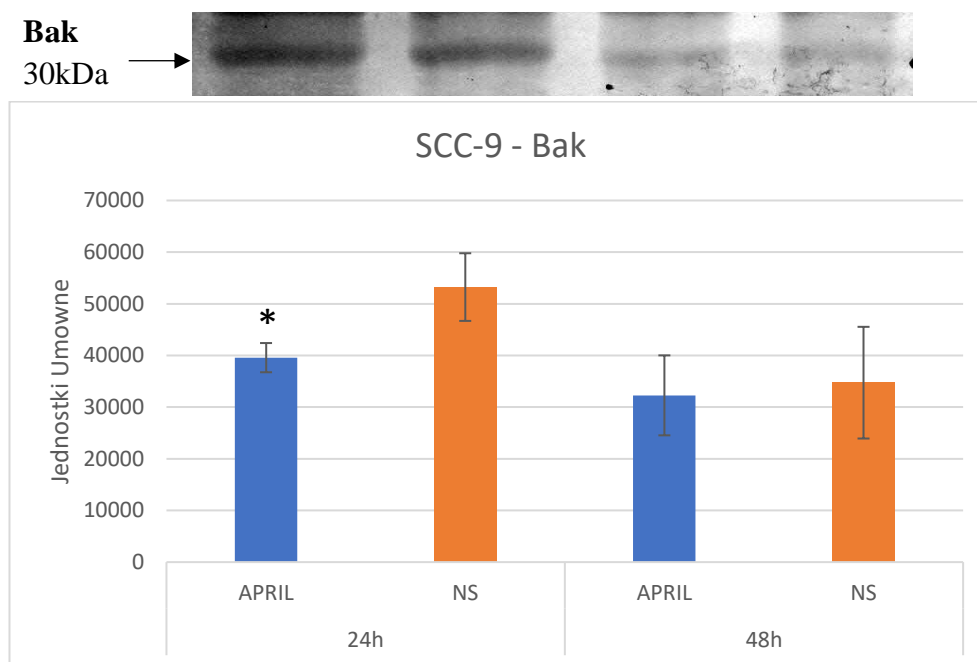


Rycina 21 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

W komórkach linii SCC-9 stwierdzono istotnie niższą ekspresję białka Bak po 24-godzinnej inkubacji z rhAPRIL. Nie obserwowano takich różnic w przypadku 48-godzinnej hodowli (**Ryc. 22**).

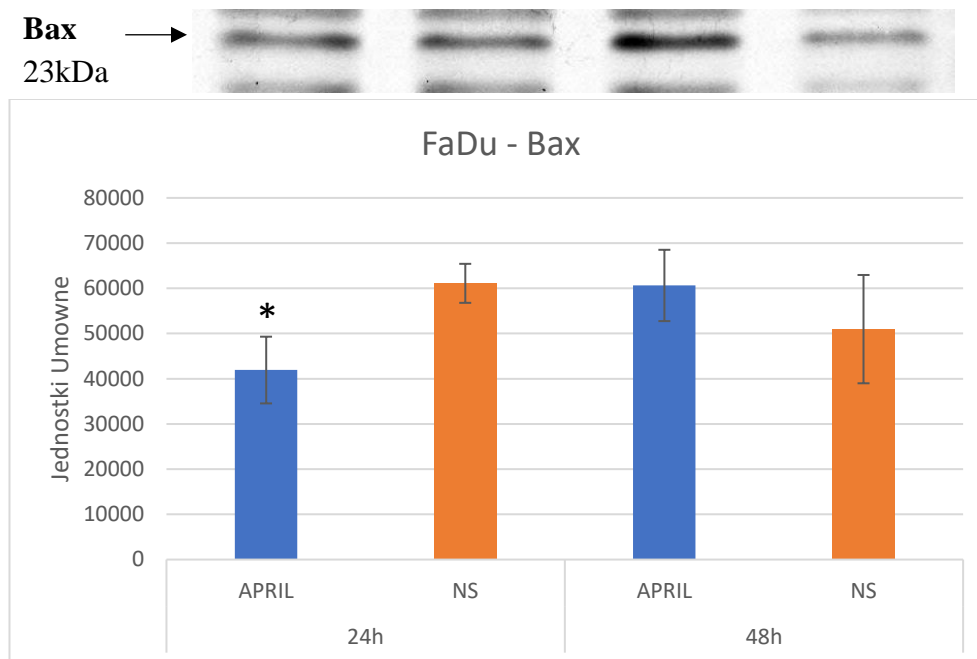


Rycina 22 Ocena ekspresji Bak w komórkach linii SCC-9.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

3.2. Białko Bax

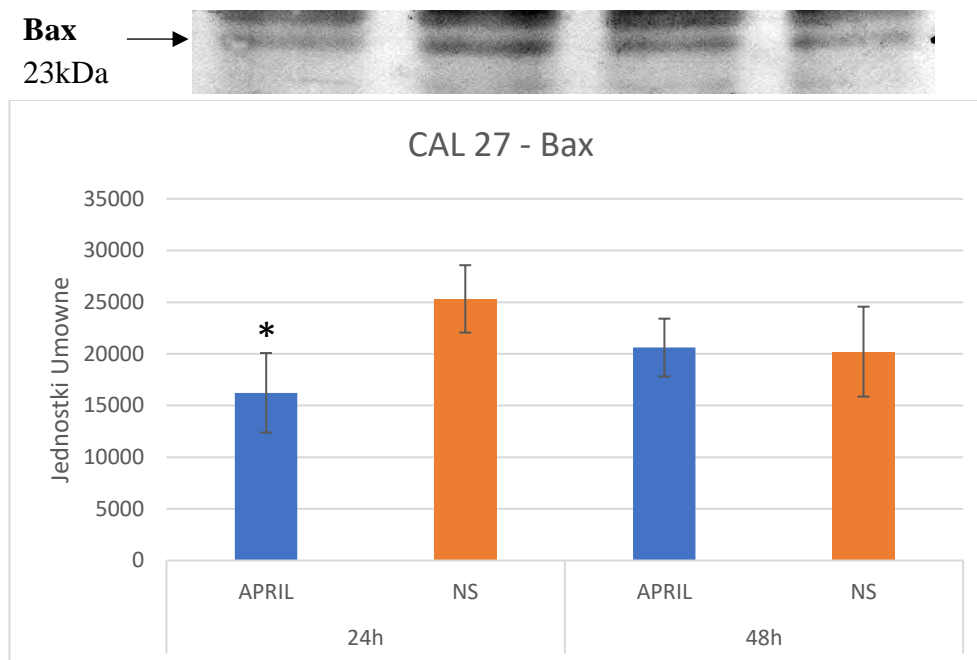
Białko Bax było znacząco słabiej ekspresjonowane przez komórki FaDu ekspozycje na rhAPRIL podczas 24-godzinnej inkubacji. Natomiast, po 48-godzinnej inkubacji zaobserwowano odwrotny kierunek zmian w ekspresji tego białka po 48-godzinnej inkubacji (Ryc. 23).



Rycina 23 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

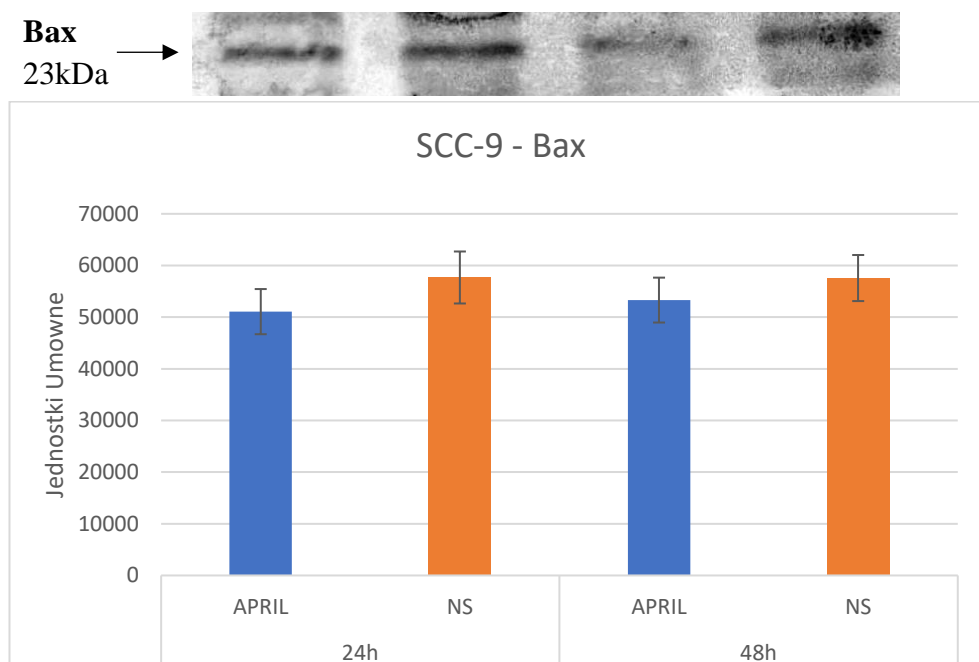
Komórki linii CAL 27 podobnie reagowały na 24-godziną stymulację rhAPRIL, która prowadziła do obniżenia ekspresji białka Bax w porównaniu do komórek bez stymulacji. Nie obserwowano takich zmian w hodowli 48-godzinnej (**Ryc. 24**).



Rycina 24 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

W komórkach linii SCC-9, podobnie jak w pozostałych liniach, zaobserwowano tendencję w kierunku obniżenia ekspresji białka Bax po 24 i 48 godzinach inkubacji z rhAPRIL, jednak nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (**Ryc. 25**).

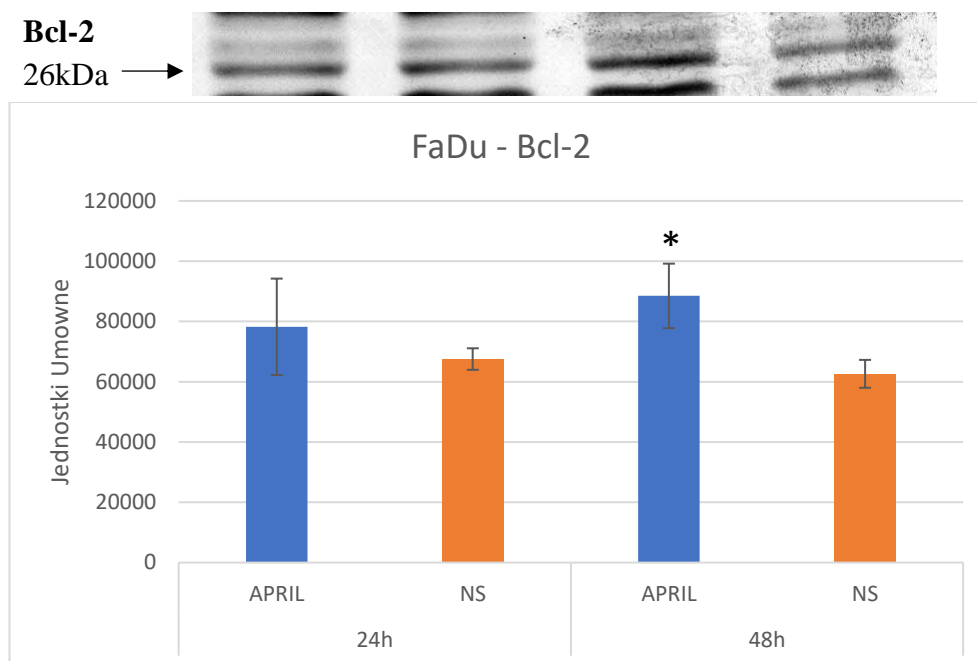


Rycina 25 Ocena ekspresji Bax w komórkach linii SCC-9.

4. Ocena ekspresji białek anty-apoptotycznych metodą Western blot.

4.1. Białko Bcl-2

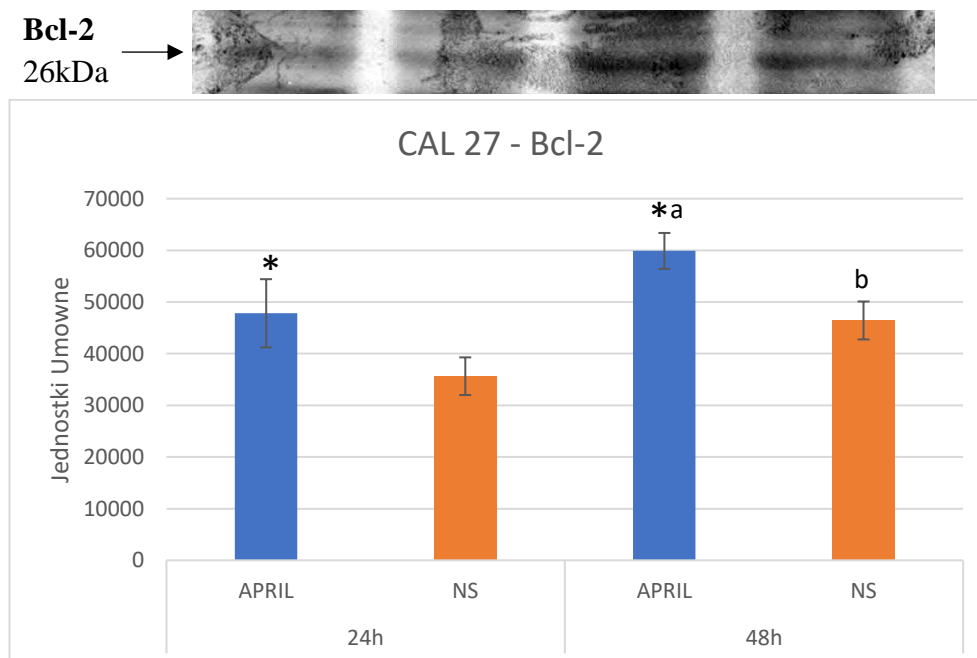
Ekspresja białka Bcl-2 w komórkach linii FaDu była wyższa po 48-godzinnej inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Nie stwierdzono istotnych zmian w hodowli 24-godzinnej (**Ryc. 26**).



Rycina 26 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

W komórkach linii CAL 27 także zaobserwowano wzrost ekspresji białka Bcl-2 w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL w obu eksperymentach czasowych. Ponadto, zaobserwowano, że ekspresja białka Bcl-2 była wyższa w komórkach inkubowanych z rhAPRIL, jak i komórkach niestymulowanych (**Ryc. 27**).



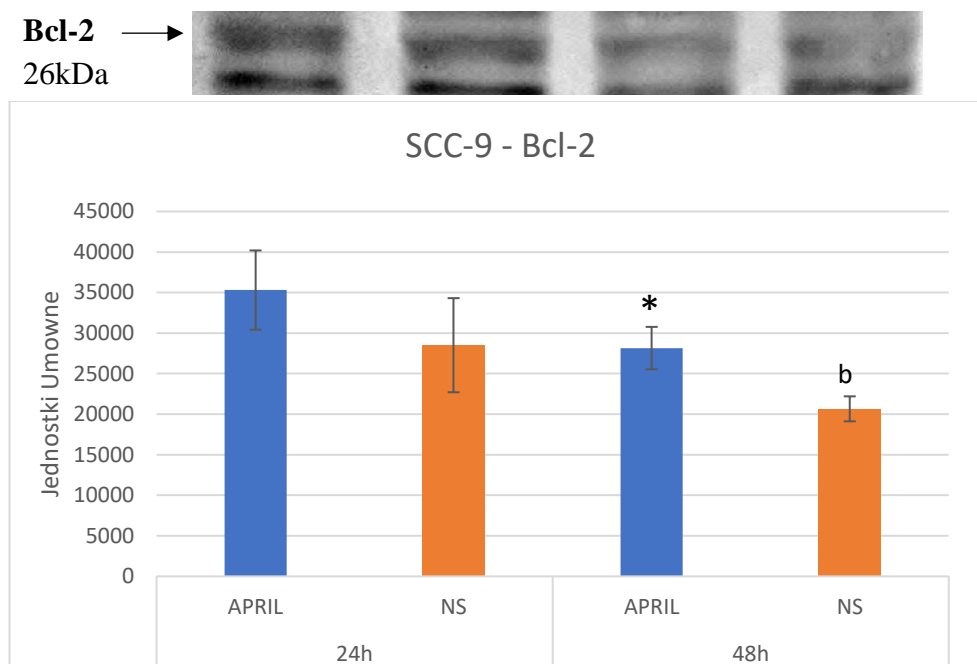
Rycina 27 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

Podobnie do pozostałych linii, ekspresja Bcl-2 w komórkach linii SCC-9 była znacząco wyższa w komórkach inkubowanych z rhAPRIL w eksperymencie 48-godzinnym, w porównaniu do komórek inkubowanych bez obecności rhAPRIL. Ponadto, w komórkach inkubowanych bez rhAPRIL w wyniku dłuższej inkubacji doszło do obniżenia ekspresji białka Bcl-2 w porównaniu do komórek po 24-godzinnej inkubacji (**Ryc. 28**).



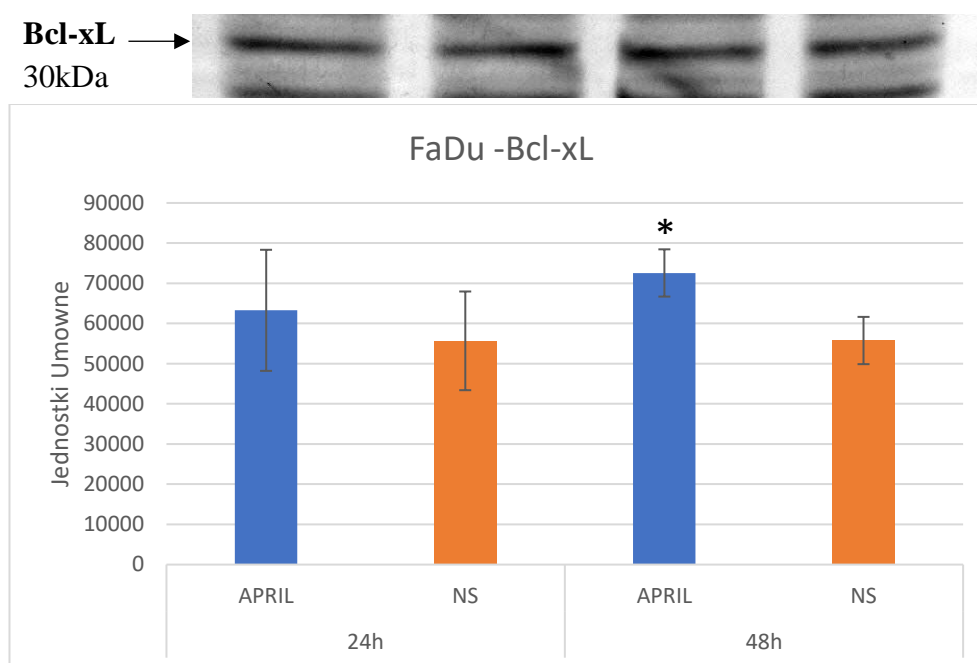
Rycina 28 Ocena ekspresji Bcl-2 w komórkach linii SCC-9.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

4.2. Białko Bcl-xL

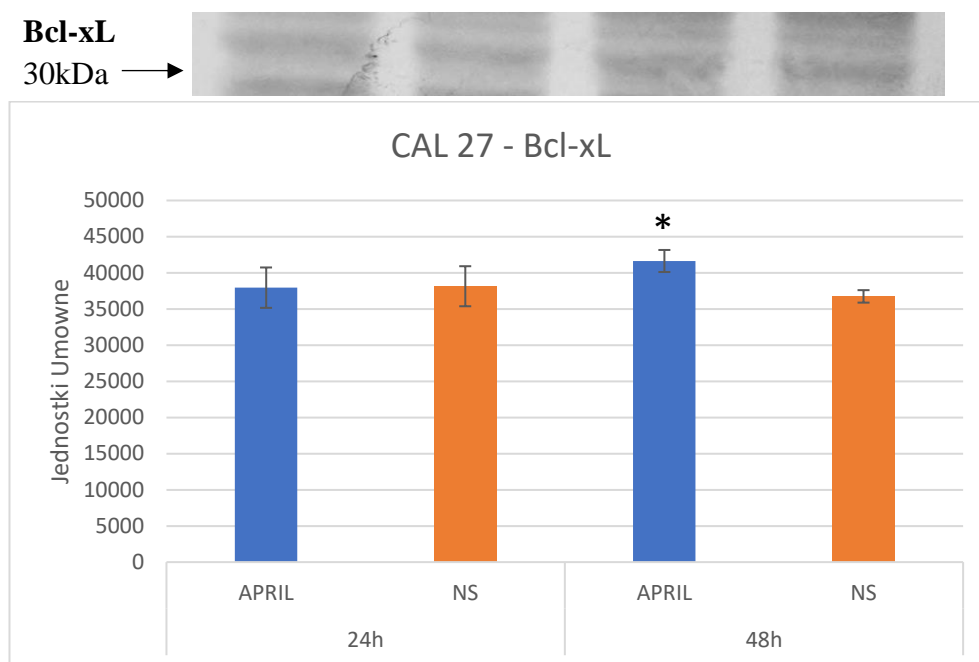
Ekspresja białka Bcl-xL w komórkach FaDu była znacząco wyższa po 48-godzinnej inkubacji z rhAPRIL w odniesieniu do komórek niestymulowanych (**Ryc. 29**). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji tego białka w przypadku 24-godzinnej hodowli.



Rycina 29 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

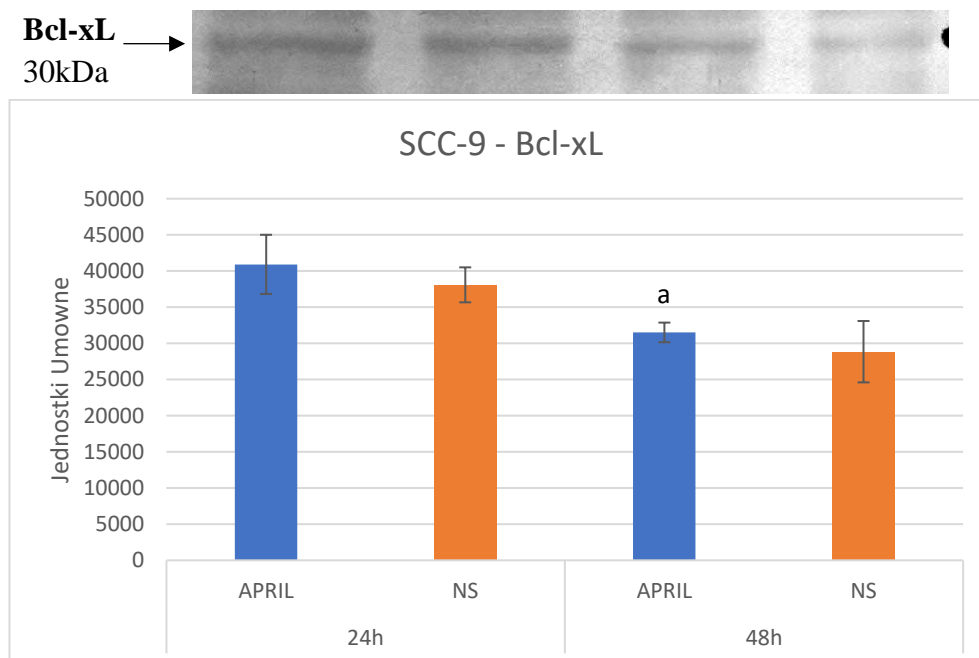
W linii CAL 27, podobnie jak w FaDu, ekspresja białka Bcl-xL wzrosła istotnie w eksperymencie 48-godzinnym po stymulacji rhAPRIL (**Ryc. 30**). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji tego białka w przypadku 24-godzinnej hodowli.



Rycina 30 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

Mniej znaczące zmiany stwierdzono w komórkach linii SCC-9 inkubowanych z rhAPRIL. Zaobserwowano nieznaczny wzrost ekspresji białka Bcl-xL. Ponadto, obniżeniu uległa ekspresja białka Bcl-xL w komórkach niestymulowanych po 48 godzinach w stosunku do komórek po 24 godzinach (**Ryc. 31**).



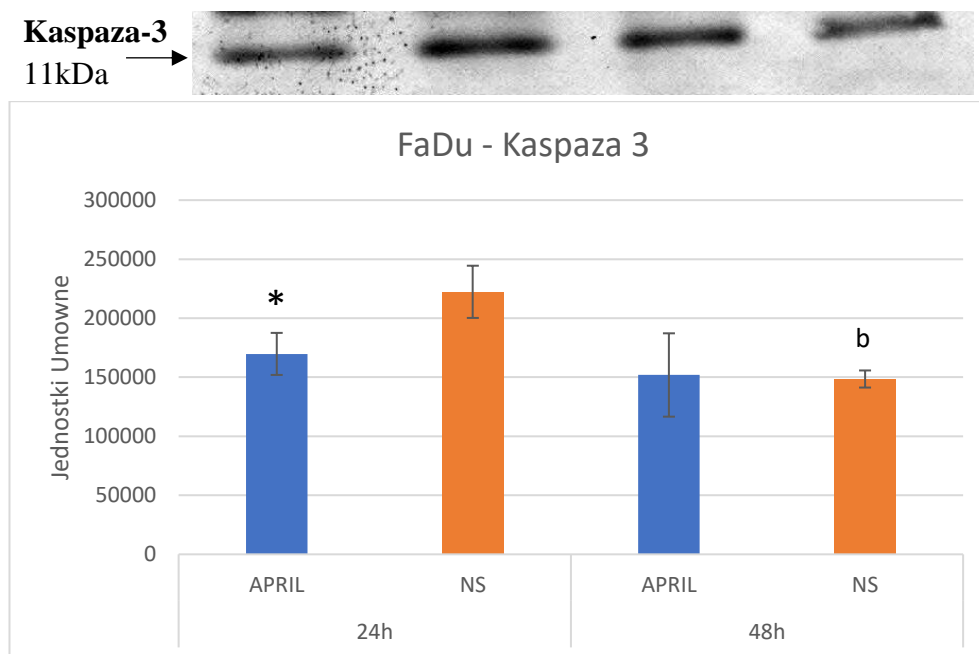
Rycina 31 Ocena ekspresji Bcl-xL w komórkach linii SCC-9.

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

5. Ocena ekspresji kaspaz metodą Western blot

5.1. Kaspaza-3

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja kaspazy-3 w komórkach linii FaDu obniża się pod wpływem działania rhAPRIL w czasie 24-godzinnej inkubacji. Ponadto, obniżeniu uległa ekspresja białka po 48-godzinnej inkubacji komórek bez rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych 24 godziny (**Ryc. 32**).

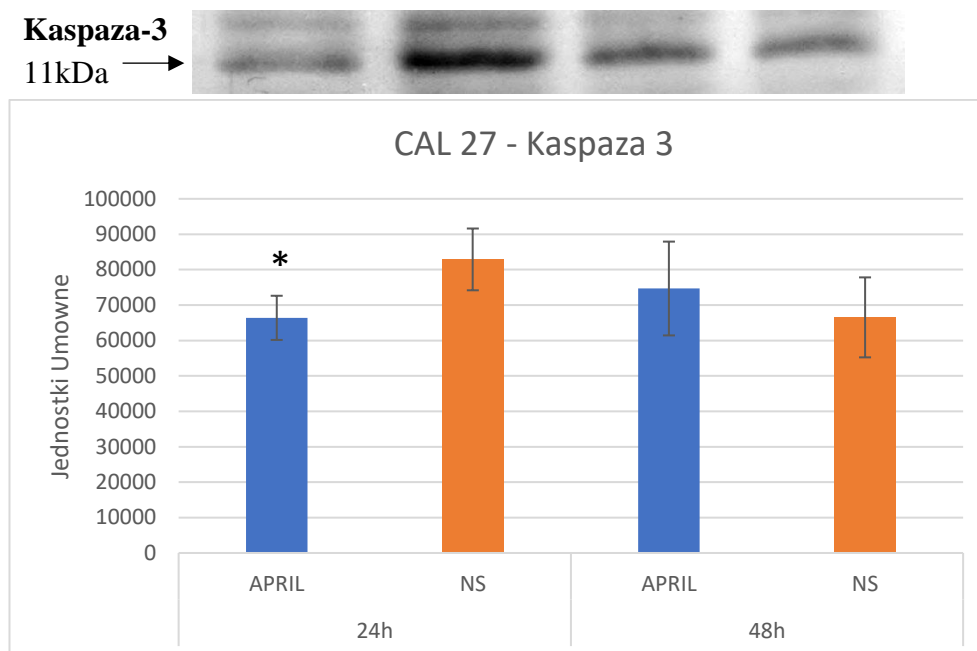


Rycina 32 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

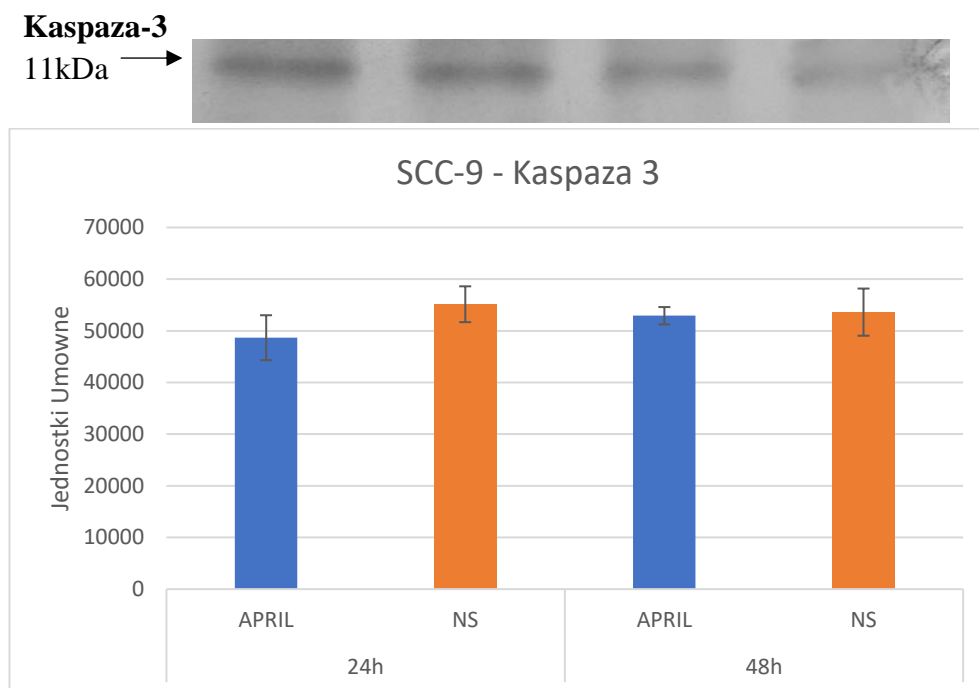
Kaspaza-3 w komórkach CAL 27, inkubowanych w obecności rhAPRIL przez 24 godziny, wykazywała niższą ekspresję w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL (**Ryc. 33**). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w hodowli 48-godzinnej, a nawet zaobserwowano tendencję wzrostową ekspresji tego białka.



Rycina 33 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

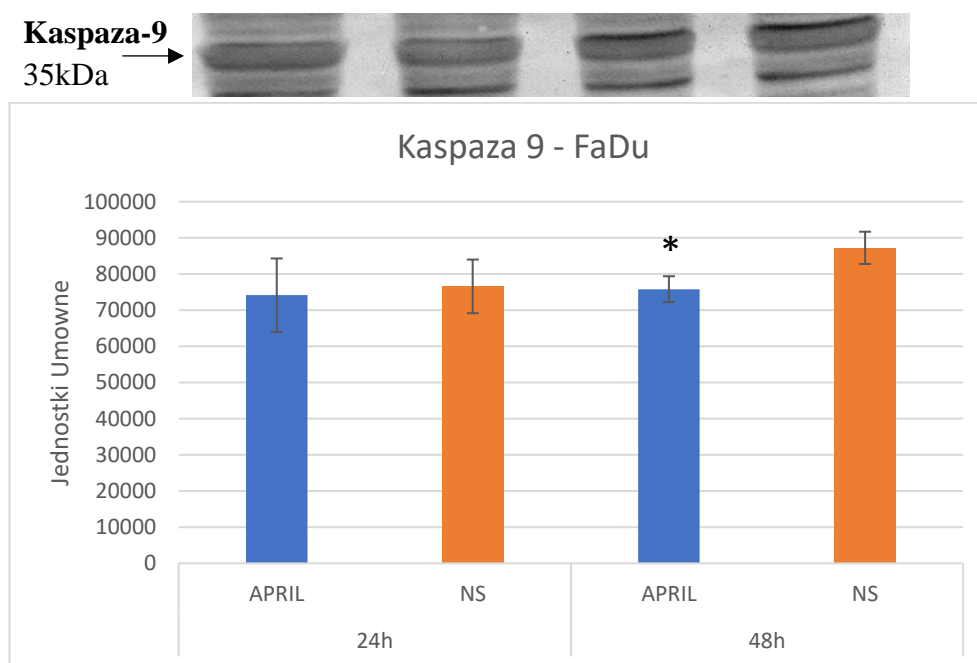
W komórkach linii SCC-9, nie wykazano różnic istotnych statystycznie w ekspresji kaspazy-3 między komórkami inkubowanymi z rhAPRIL i bez obecności rhAPRIL w obu eksperymentach czasowych (**Ryc. 34**).



Rycina 34 Ocena ekspresji kaspazy-3 w komórkach linii SCC-9.

5.2. Kaspaza-9

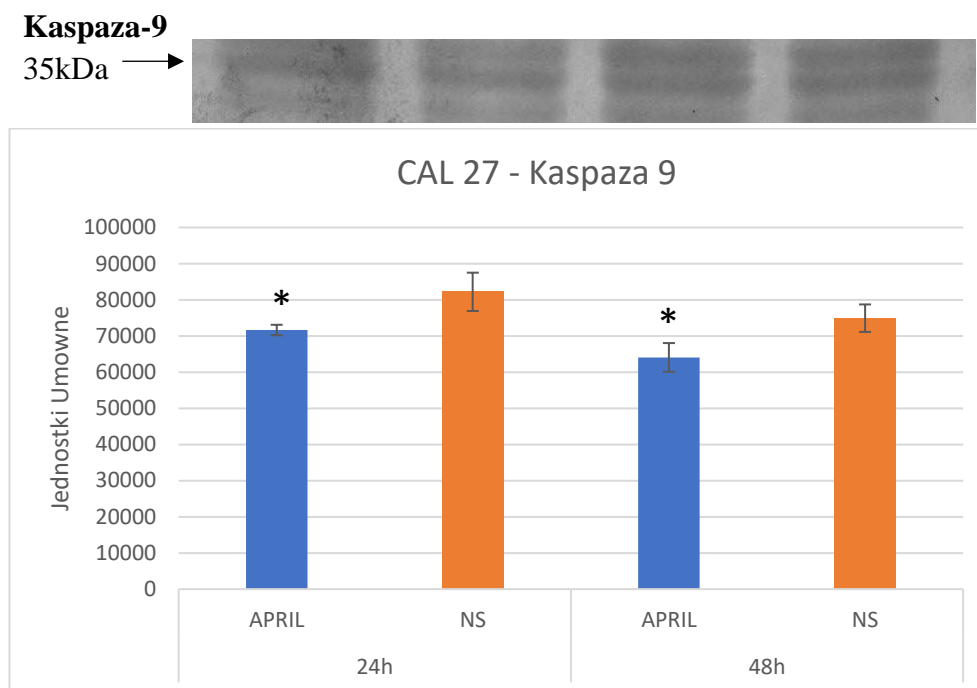
Ekspresja kaspazy-9 w komórkach linii FaDu była obniżona pod wpływem stymulacji rhAPRIL po 48-godzinnej inkubacji w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL (**Ryc. 35**). Nie obserwowano takich różnic w przypadku hodowli 24-godzinnej.



Rycina 35 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

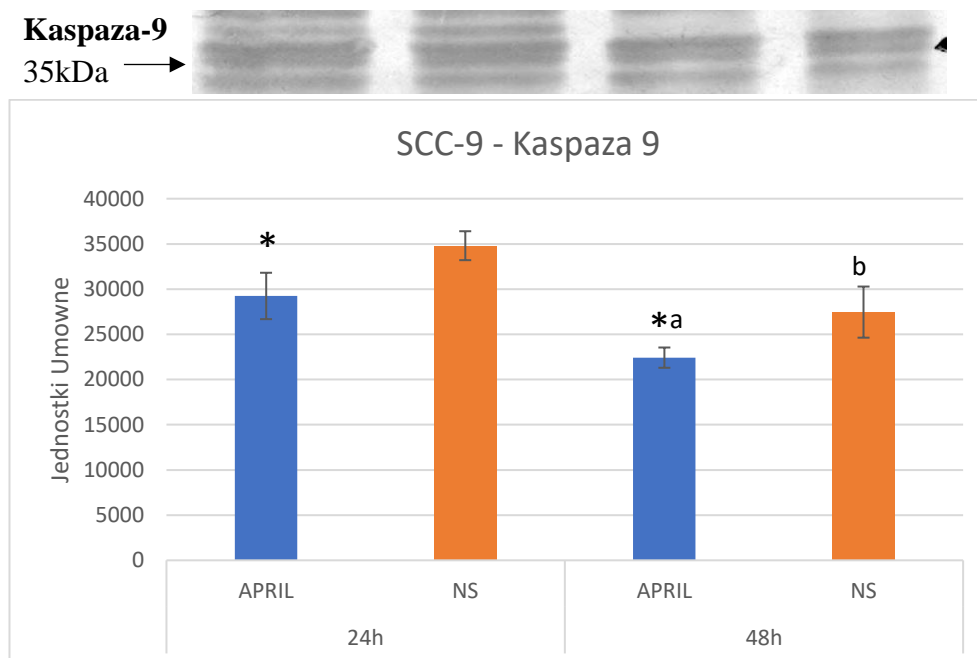
W komórkach linii CAL 27 zaobserwowano obniżenie ekspresji kaspazy-9 w komórkach inkubowanych z rhAPRIL, w porównaniu do komórek bez obecności rhAPRIL w obu wariantach czasowych eksperymentu (**Ryc. 36**).



Rycina 36 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

W linii SCC-9 zaobserwowano istotne różnice w ekspresji kaspazy-9. Uległa ona obniżeniu po 24- i 48-godzinnej inkubacji komórek z rhAPRIL. Dodatkowo komórki ekspymowały mniej kaspazy-9 po dłuższej inkubacji zarówno w komórkach inkubowanych z rhAPRIL, jak i bez rhAPRIL (**Ryc. 37**).



Rycina 37 Ocena ekspresji kaspazy-9 w komórkach linii SCC-9.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

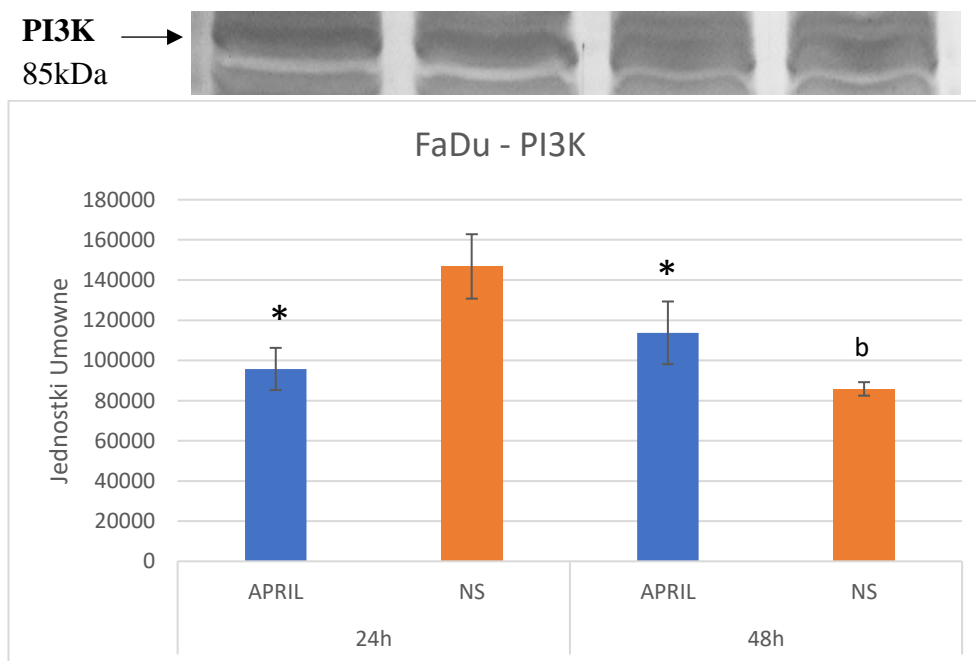
^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

6. Ocena ekspresji białek szlaku PI3K/Akt/surwiwina metodą Western blot

Zaobserwowano, że ekspresja białek PI3K, Akt i surwiwiny zmienia się w obu zakresach czasowych inkubacji, co może sugerować, że różne szlaki sygnalizacyjne są inicjowane przez rhAPRIL.

6.1. Białko PI3K

PI3K ulega obniżeniu po 24-godzinnej inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do komórek bez rhAPRIL. Następnie, po upływie 48 godzin, ekspresja tego białka w komórkach FaDu po inkubacji z rhAPRIL ulega podwyższaniu w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Dodatkowo stwierdzono, że komórki po 48-godzinnej inkubacji niestymulowane komórki ekspresywały znacznie mniej białka PI3K niż w 24-godzinnej inkubacji (**Ryc. 38**).

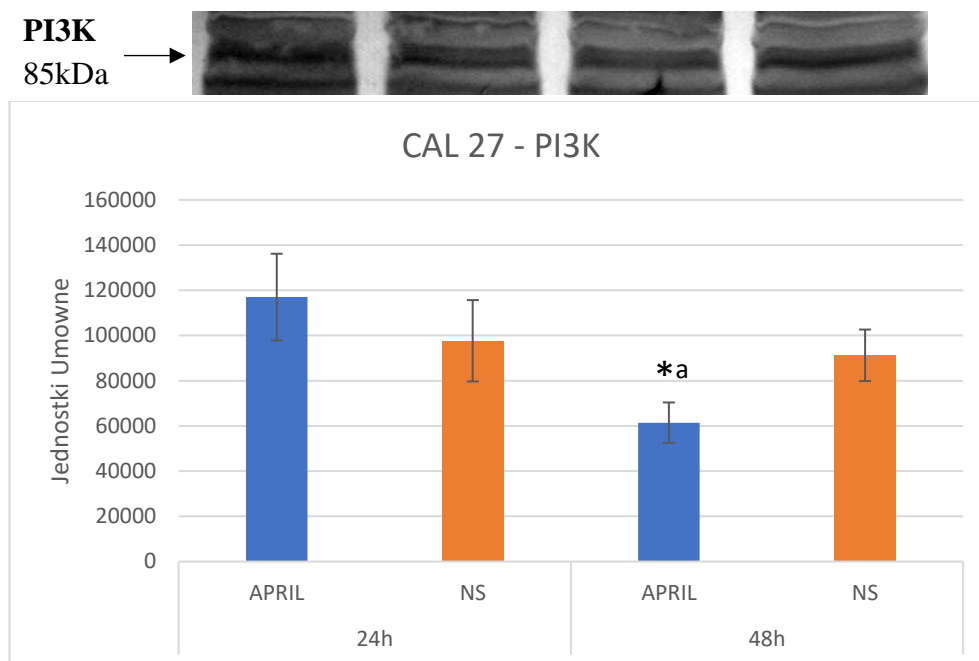


Rycina 38 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

W komórkach linii CAL 27 zaobserwowano istotnie niższą ekspresję PI3K po 48 godzinach w odniesieniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL i była ona istotnie niższa w porównaniu do komórek inkubowanych przez 24 godziny. Natomiast, 24-godzinna inkubacja spowodowała wzrost ekspresji PI3K w komórkach CAL 27, ale nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (**Ryc. 39**).

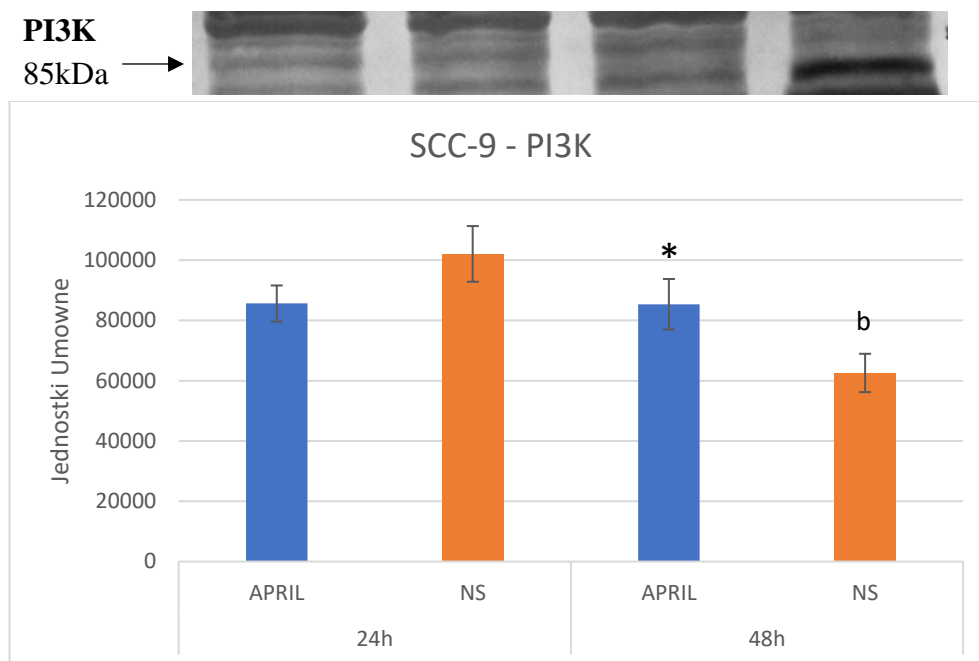


Rycina 39 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

W komórkach linii SCC-9 wykazano podwyższony poziom ekspresji PI3K po stymulacji rhAPRIL w wariacie 48-godzinnym. Jednocześnie zaobserwowano niższą ekspresję PI3K w komórkach po 24-godzinnej inkubacji oraz obniżenie ekspresji tego białka w komórkach inkubowanych bez rhAPRIL w czasie 48 godzin inkubacji w porównaniu do 24 godzin (Ryc. 40).



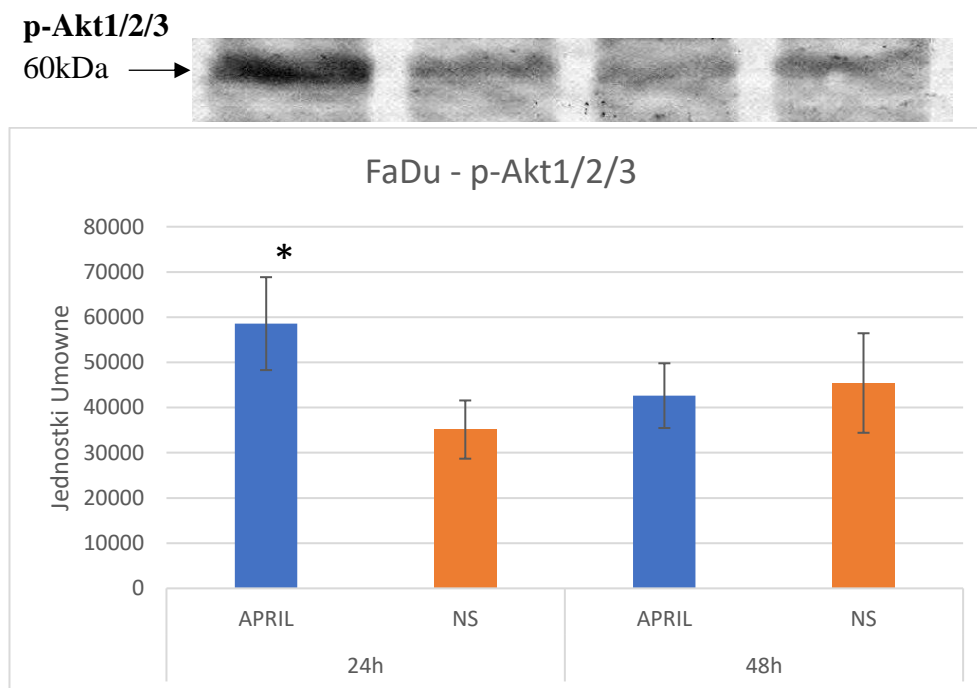
Rycina 40 Ocena ekspresji PI3K w komórkach linii SCC-9.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

6.2. Białko p-Akt1/2/3

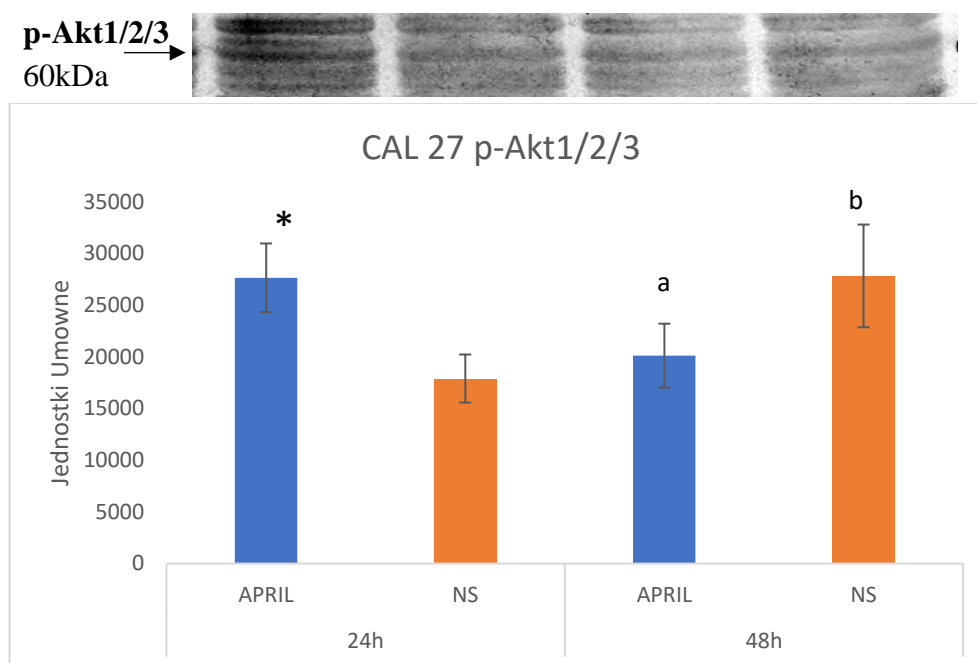
Ekspresja białka p-Akt w komórkach linii FaDu była wyższa po dobowej ekspozycji na rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Nie obserwowano takich różnic w komórkach poddanych 48-godzinnej inkubacji (**Ryc. 41**).



Rycina 41 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

W komórkach linii CAL 27, podobnie jak w FaDu, zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji białka p-Akt po 24-godzinnej inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Natomiast po 48 godzinach inkubacji ekspresja p-Akt1/2/3 była niższa w komórkach inkubowanych z rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL, ale różnica nie była istotna statystycznie (**Ryc. 42**).



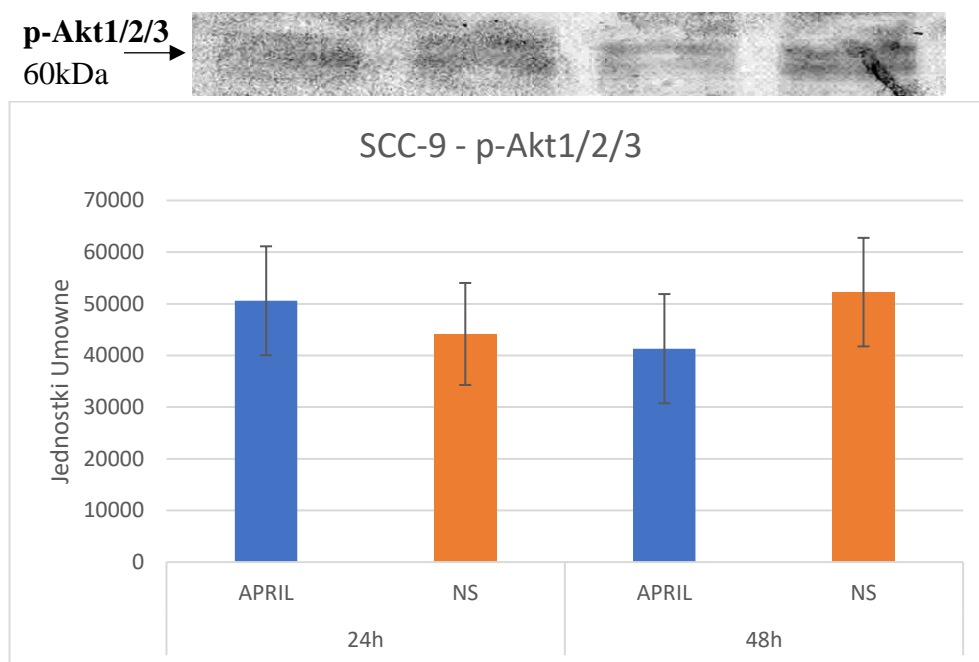
Rycina 42 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^a – różnica istotna statystycznie między komórkami stymulowanymi rhAPRIL 24h i 48h ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

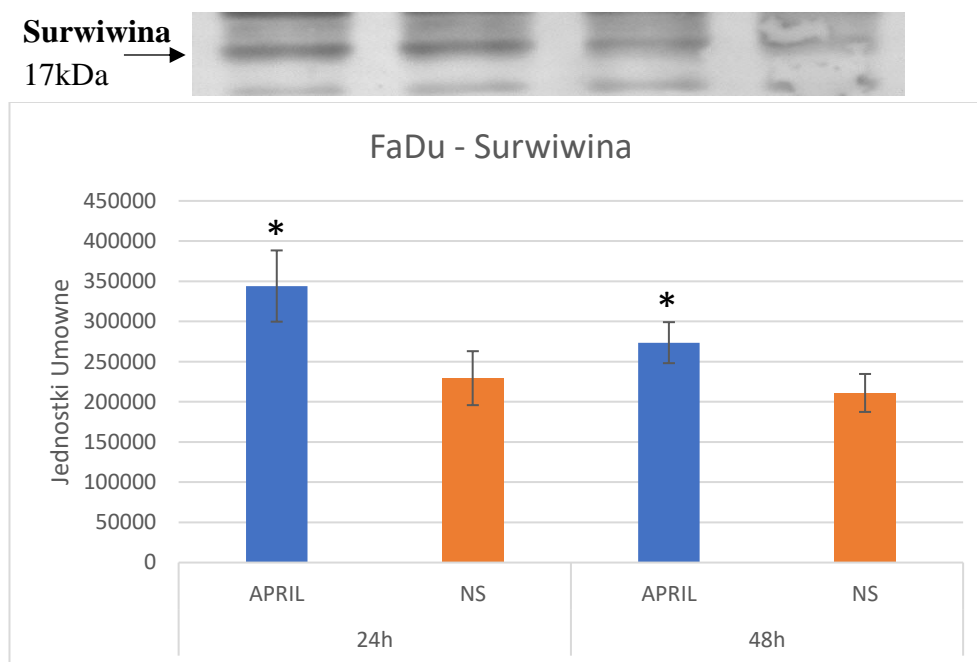
W linii SCC-9, podobnie jak w pozostałych liniach, zaobserwowano tendencję wzrostową ekspresji białka p-Akt1/2/3 po 24 godzinach inkubacji z rhAPRIL i niższą po 48 godzinach inkubacji, przy czym nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (**Ryc. 43**).



Rycina 43 Ocena ekspresji p-Akt1/2/3 w komórkach linii SCC-9.

6.3. Białko surwiwina

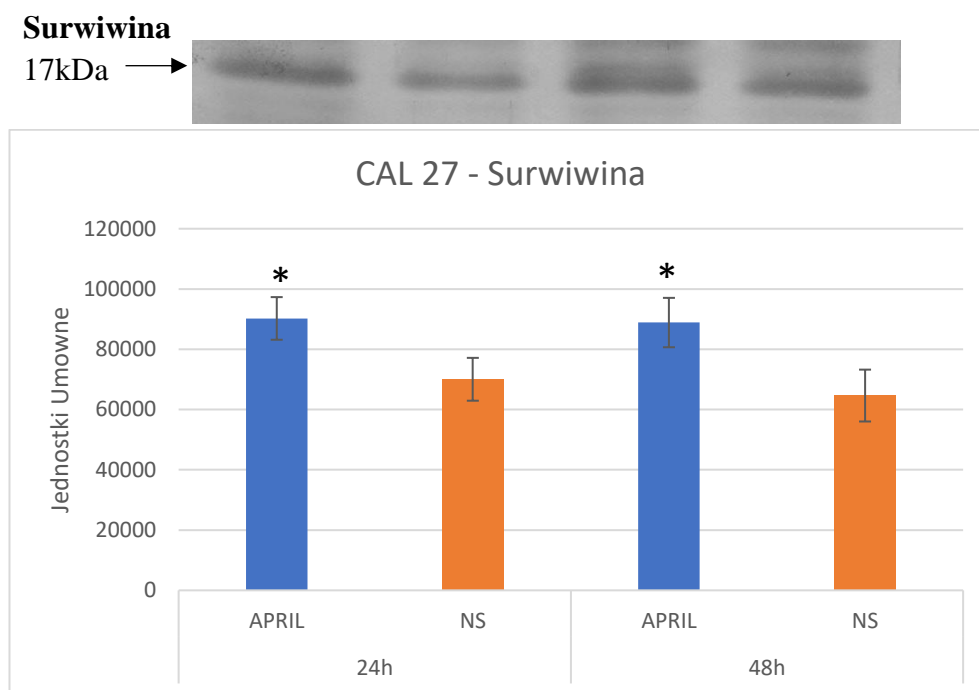
Wzrost ekspresji surwiwiny był ściśle związany z obecnością rhAPRIL. Zarówno w wariacie 24-godzinnym, jak i 48-godzinnym inkubacji komórek FaDu stwierdzono znaczący wzrost ekspresji tego białka w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL (**Ryc. 44**).



Rycina 44 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii FaDu.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

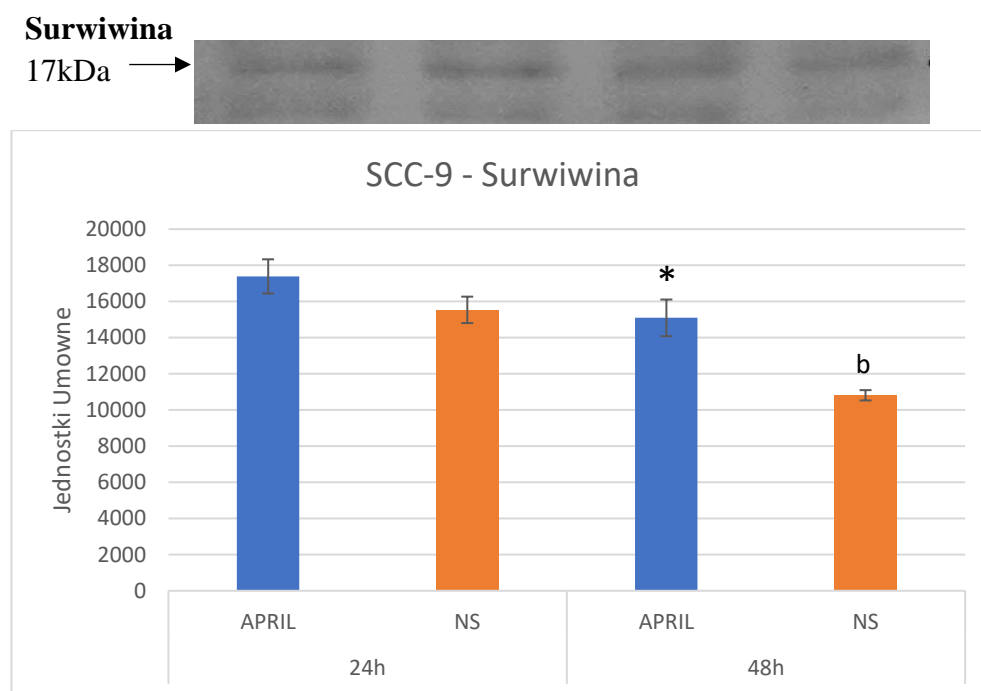
W komórkach linii CAL 27 zaobserwowano podobny kierunek zmian ekspresji surwiwiny, jak w linii FaDu. Komórki inkubowane z rhAPRIL wykazywały wyższą ekspresję tego białka w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL w obu zakresach czasowych (**Ryc. 45**).



Rycina 45 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii CAL 27.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

Oceniając ekspresję surwiwiny w komórkach linii SCC-9 zaobserwowano znaczący jej wzrost w komórkach inkubowanych z rhAPRIL przez 48 godzin, w odniesieniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL w tym samym czasie. Dodatkowo po 48 godzinach w komórkach inkubowanych bez rhAPRIL zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji surwiwiny w porównaniu do komórek inkubowanych w krótszym czasie (**Ryc. 46**).



Rycina 46 Ocena ekspresji surwiwiny w komórkach linii SCC-9.

* – różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi rhAPRIL ($p < 0,005$)

^b – różnica istotna statystycznie między komórkami niestymulowanymi 24h i 48h ($p < 0,005$)

V. Dyskusja

Wiele danych wskazuje na istotną rolę cząsteczki APRIL w rozwoju nowotworów, zarówno hematologicznych, jak i guzów litych. Obserwowane zależności pomiędzy obecnością APRIL a postępem choroby wskazują, że może on być wykorzystywany jako potencjalny marker prognostyczny [30,132,133].

Szereg badań nad rolą białka APRIL w procesach nowotworowych dotyczyło nowotworów układu krwiotwórczego i krwi. W wielu przypadkach wskazano APRIL jako cząsteczkę promującą proliferację komórek nowotworowych, wykazano m. in. wzrost proliferacji komórek nowotworowych w ostrych białaczkach limfoblastycznej oraz szpikowej [134,135]. Dostępne dane wskazują na znaczny wzrost stężeń cząsteczki APRIL w surowicy krwi pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową (B-CLL) [136]. Zaobserwowano również, że ekspresja APRIL jest znacznie podwyższona w niektórych chłoniakach o wysokiej złośliwości, takich jak DLBCL (chłoniak rozlany z dużych limfocytów B) i BL (chłoniak Burkitta) [137].

Liczne badania potwierdziły także wzrost poziomu APRIL w surowicy chorych na nowotwory narządów litych. Badania Ding i wsp. wykazały zwiększone stężenie APRIL w surowicy krwi u chorych z nowotworem jelita grubego, co korelowało z zaawansowaniem choroby. Ponadto stwierdzono, że pomiar stężenia APRIL w surowicy krwi tych pacjentów może różnicować stadium I i II ze stadium III i IV choroby [138]. W dotychczasowych badaniach nad nowotworami piersi, żołądka, pęcherza moczowego, jajnika, płuc również obserwowano korelacje między zaawansowaniem nowotworu a ekspresją APRIL w tkance guza oraz stężeniem w surowicy krwi. W większości przypadków obserwowano także związek między poziomem APRIL a występowaniem przerzutów [36,139–142].

Potwierdzeniem przydatności oznaczania cząsteczki APRIL w diagnostyce nowotworów jest ścisła zależność pomiędzy APRIL a klasycznymi markerami nowotworowymi. Przykładem są wyniki Wang i wsp., które wykazały, że wzrastające stężenie APRIL w surowicy pacjentów z rakiem trzustki pozostawało w ścisłej zależności ze stężeniami markerów takich jak: CEA i CA19-9 [143].

W nielicznych badaniach dotyczących nowotworów głowy i szyi zaobserwowano udział APRIL w rozwoju tych nowotworów. Mhaweck-Fauceglia i wsp. zaobserwowali, że 53% zmian w tkankach guzów było APRIL-dodatnie. Ponadto, 36% zmian nowotworowych

zawierało również komórki nowotworowe wytwarzające APRIL, jednak proces ten nie był jednorodny, a raczej skupiony w określonych strefach zmian nowotworowych [141]. W badaniach nad rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej (OSCC) również wykazano wysokie stężenia cząsteczki APRIL surowicy krwi w zaawansowanym stadium choroby. Poszukując źródła tej cząsteczki zaobserwowano u tych chorych zwiększoną ekspresję i uwalnianie cząsteczki APRIL przez leukocyty towarzyszące komórkom nowotworowym w mikrośrodowisku guza, a także we krwi obwodowej, do których należą neutrofile [139]. Obserwowane zwiększone uwalnianie APRIL przez te komórki wraz z progresją choroby sugeruje, że w połączeniu ze zwiększoną ich liczbą może być ważnym markerem zaawansowania w przebiegu OSCC.

Istnieje szereg dowodów potwierdzających, że poza leukocytami znaczącym źródłem cząsteczki APRIL są komórki nowotworowe. Przykładem są komórki nowotworowe w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), w których stwierdzono wysoką ekspresję mRNA BAFF i APRIL oraz ich receptorów w grupie pacjentów bez wdrożonego leczenia [144]. Wykazano także obecność APRIL w komórkach guzów litych, takich jak rak piersi, rak żołądka, rak pęcherza moczowego czy rak jajnika [140,141,145]. Dzięki uwalnianiu APRIL, komórki nowotworowe mogą regulować na drodze para-, a także autokrynnej proces apoptozy oraz proliferację. Wydzielanie i autokrynne działanie APRIL w przypadku komórek raka piersi stwierdzili w swoich badaniach Pelekanou i wsp. [37].

W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazałam, że działanie rhAPRIL na komórki HNSCC linii FaDu, CAL 27 i SCC-9 powodowało znaczący wzrost ich proliferacji, co potwierdza pro-nowotworowe właściwości APRIL. Obserwowana proliferacja badanych linii nowotworowych istotnie wzrastała zarówno podczas 24-, jak i 48-godzinnej hodowli. Interesujący jest fakt, że efekt indukowany przez APRIL był silniejszy wraz z dłuższym czasem inkubacji. Obserwacja ta może sugerować uwalnianie i autokrynne działanie tej cząsteczki przez komórki nowotworowe badanych linii. Potwierdzeniem może być wzrost proliferacji także w przypadku komórek inkubowanych bez rhAPRIL.

Interesującą obserwacją było stwierdzenie podobnego, silnego działania rhAPRIL na komórki raka płaskonabłonkowego języka linii CAL 27 i SCC-9, na co wskazuje wysoki wzrost odsetka komórek proliferujących w obecności rhAPRIL po 48 godzinach inkubacji. Podobny kierunek zmian obserwowano w komórkach raka dolnego gardła linii FaDu, ale różnice między komórkami stymulowanymi i niestymulowanymi były mniej znaczące. Sugeruje to wyraźnie odmienną wrażliwość badanych linii komórkowych na rhAPRIL, zależną prawdopodobnie od źródłowej lokalizacji tych komórek. Przyczyną obserwowanych

różnic mogą być też inne fazy cyklu komórkowego, w których znajdują się poszczególne linie komórkowe eksponowane na rhAPRIL.

Badanie proliferacji komórek nowotworowych ma szczególne znaczenie w ocenie zachowania guza. Jest to parametr ściśle powiązany ze stopniem zaawansowania, prognozowaniem i czasem przeżycia pacjentów [146]. Zatem nadekspresja APRIL, wynikająca z uwalniania tej cząsteczki przez komórki nowotworowe oraz leukocyty w mikrośrodowisku guza wydaje się być zdecydowanie niekorzystna, ponieważ może skutkować progresją choroby.

Kluczową rolę w rozwoju nowotworów poza proliferacją pełni regulacja przeżycia komórek na drodze apoptozy. W badanych liniach komórkowych widoczna jest narastająca wraz z czasem inkubacji tendencja do obniżenia intensywności apoptozy w obecności rhAPRIL. We wszystkich badanych liniach komórkowych inkubowanych z rhAPRIL obniżenie odsetka komórek zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie apoptozy potwierdza promujący wpływ APRIL na rozwój nowotworów. Wspólną cechą wszystkich badanych linii komórkowych w odpowiedzi na obecność rhAPRIL jest istotne obniżenie apoptozy po 48-godzinnej inkubacji.

Największe nasilenie procesu apoptozy obserwowano w komórkach linii SCC-9, słabsze w linii FaDu i najslabsze w linii CAL 27. Podobnie, efekt działania rhAPRIL na proces apoptozy był najbardziej znaczący w komórkach SCC-9 i mniej znaczący w komórkach FaDu i CAL 27.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przeciwieństwie do pozostałych linii komórki CAL 27 wyróżniały się wyższym odsetkiem komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy w 48-godzinnym eksperymencie porównaniu do eksperymentu 24-godzinnego.

Przedstawione wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają pro-nowotworowe działanie rhAPRIL nie tylko poprzez nasiloną proliferację badanych linii komórkowych, ale także poprzez efekt hamujący ich apoptozę.

Wyniki te są zgodne z obserwacjami dotyczącymi innych nowotworów. Badania Zhang i wsp. wykazały, że nadekspresja APRIL sprzyjała też proliferacji, migracji i inwazji komórek raka żołądka oraz zmniejszała apoptozę, podczas gdy zablokowanie APRIL tłumilo te procesy [147]. Potwierdzeniem pro-nowotworowej roli cząsteczki APRIL są także rezultaty badań Wang i wsp. wskazujące, że jej brak powoduje zatrzymanie cyklu

komórkowego i apoptozę komórek raka jelita grubego przez blokowanie drogi sygnałowej TGF β 1/ERK [148].

Innym przykładem anty-apoptotycznego działania APRIL są badania, które wykazały, że APRIL wspólnie z BAFF hamuje apoptozę komórek B w chłoniakach nieziarniczych (NHL) wykorzystując do tego zarówno szlaki autokrynne, jak i parakrynne. W komórkach B NHL aktywują one m. in. NF- κ B oraz zmieniają relacje między białkami nadrodziny Bcl-2, sprzyjając przeżywalności tych komórek [149].

Wyniki przedstawione przez zespół Tai i wsp. dowiodły, że również w komórkach szpiczaka mnogiego (MM) cząsteczka APRIL poza stymulacją cyklu komórkowego, hamuje także proces apoptozy. Ponadto, w badaniach tych stwierdzono indukcję anty-apoptotycznych MCL1 i BCL2 należących do nadrodziny BCL-2, poprzez aktywację wiązania APRIL z receptorem BCMA, natomiast nie dotyczyło to białka Bcl-xL [150].

Belnoue i wsp. badając cząsteczkę APRIL zaobserwowali, że wiąże się ona preferencyjnie z proteoglikanem siarczanu heparyny na powierzchni komórek plazmatycznych (PC) CD138⁺ i zwiększa ekspresję białka anty-apoptotycznego Bcl-X_L [69]. Inne badania wskazały, że ekspozycja komórek NHL na egzogenny APRIL upośledzała ich apoptozę, zwiększając aktywację NF- κ B i regulację Bcl-2 i Bcl-xL oraz obniżając ekspresję Bax [151]. U pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym również wykazano wzrost ekspresji białek anty-apoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL w tkance nowotworowej, co może być spowodowane m. in. obecnością APRIL w mikrośrodowisku guza [141,152–154]. Ponadto, w komórkach OSCC zaobserwowano obniżenie ilości pro-apoptotycznego białka Bax w tkance guza, a 5-letnie przeżycie pacjentów wiązano z wysoką ekspresją białka Bak [155].

Wobec powyższych danych celowe wydaje się oznaczanie ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych w komórkach badanych linii nowotworowych w odpowiedzi na rhAPRIL, co może się przyczynić do wyjaśnienia anty-apoptotycznego mechanizmu działania tej cząsteczki.

Ekspresja białek pro-apoptotycznych była wyraźnie obniżona po inkubacji komórek w obecności rhAPRIL. W komórkach linii FaDu i CAL 27 zmiany ekspresji białka Bak były zbliżone do siebie. Białko Bak było wykazywało niższą ekspresję w komórkach inkubowanych z rhAPRIL, w obu przedziałach czasowych eksperymentu. Zaskakujący jest natomiast fakt, że 48-godzinna inkubacja komórek FaDu i CAL 27 prowadziła do bardziej nasilonej apoptozy w porównaniu do 24-godzinnej hodowli, przy czym nie obserwowano

takiej tendencji w komórkach SCC-9. Jakkolwiek, uzyskane wyniki sugerują, że zmiany ekspresji białka Bak mogą być jedną z przyczyn upośledzonej apoptozy w tych komórkach.

Mniej znaczące zmiany dotyczyły drugiego pro-apoptotycznego białka Bax. Jego ekspresja w liniach FaDu i CAL 27 pod wpływem rhAPRIL była obniżona w krótszym eksperymencie. Po dłuższej inkubacji z rhAPRIL obserwowano nawet tendencję wzrostową ekspresji tego białka w komórkach FaDu. W przypadku komórek linii SCC-9 nie wykazano istotnych zmian w ekspresji białka Bax.

Różnice w ekspresji białek pro-apoptotycznych między badanymi liniami komórkowymi, mogą wskazywać na inną wrażliwość badanych białek i odmienny mechanizm działania APRIL na komórki nowotworowe. Może to także sugerować udział innych białek drogi mitochondrialnej w odpowiedzi na APRIL.

Znaczące zmiany dotyczyły anty-apoptotycznego białka Bcl-2. Wzrost ekspresji w liniach FaDu, CAL 27 i SCC-9 był istotny po dłuższej inkubacji z rhAPRIL, a w przypadku CAL 27 również w krótszym eksperymencie. Świadczy to o znaczącym udziale tego białka w obniżeniu zdolności do apoptozy w badanych liniach inkubowanych z rhAPRIL. Podobne zmiany dotyczyły anty-apoptotycznego białka Bcl-xL. Efekt działania rhAPRIL był wyraźny w następstwie 48-godzinnej inkubacji komórek FaDu i CAL 27.

Istotnym elementem procesu apoptozy jest kaspaza-3, która po aktywacji przez kaspazę-8 lub kaspazę-9 rozszczepia wiele innych funkcjonalnie krytycznych białek w komórce, prowadząc do apoptozy [156]. Potwierdzeniem roli kaspazy-3 w procesie apoptozy jest fakt, że jej zwiększona aktywność jest uważana za oznakę apoptozy i pozytywny wskaźnik skuteczności w leczeniu raka [157].

Ostatnie badania przedstawiły bardziej skomplikowany obraz kaspazy-3 w procesie nowotworowym. Jedno z ostatnich badań pokazuje, że kaspaza-3 może promować niestabilność genetyczną i proces karcynogenezy po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące [158]. Według coraz częściej pojawiających się sygnałów ze świata nauki, kaspaza-3 może także promować indukowany stresem (niedotlenienie, kwasica, nadprodukcja wolnych rodników) wzrost komórek nowotworowych, migrację komórek, inwazyjność, a także proces neoangiogenezy [159,160].

Według wyników badań własnych zmiany w ekspresji kaspazy-3 wydają się mniej znaczące. Ekspresja kaspazy-3 zmniejsza się pod wpływem 24-godzinnego działania rhAPRIL na komórki linii FaDu i CAL 27, bez istotnego wpływu na komórki SCC-9.

Zaskakujący jest fakt, że po 48 godzinach inkubacji z rhAPRIL w komórkach CAL 27 nastąpił wzrost ekspresji kaspazy-3, który jednak nie był istotny statystycznie. Obserwacja ta sugeruje konieczność dalszych badań nad działaniem APRIL na kaspazę-3 w komórkach nowotworowych.

Natomiast, wyraźne zmiany obserwowano w przypadku kaspazy-9, która jest kluczową proteazą w wewnętrznej ścieżce apoptozy [161]. Przeprowadzone badania wykazały, że we wszystkich liniach, w obu wariantach czasowych eksperymentu ekspresja kaspazy-9 była niższa po inkubacji z rhAPRIL. Jedynie w komórkach FaDu po 24 godzinach inkubacji nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie, ale trend spadkowy był zachowany i zgodny ze zmianami w pozostałych liniach komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę APRIL w regulacji apoptozy poprzez wpływ na ekspresję kaspazy-9.

Przyczyną obserwowanych odrębności w proliferacji i apoptozie badanych linii komórkowych może być zaangażowanie różnych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych w indukcji tych procesów. Aktualne badania nad wewnątrzkomórkową sygnalizacją inicjowaną przez cząsteczkę APRIL w komórkach nowotworowych wskazują na zaangażowanie kilku szlaków. W komórkach guzów litych wykazano, że APRIL aktywuje szlak kinaz JNK1/2, a następnie ERK1/2 [162]. Stwierdzono, że ekspresja APRIL indukuje fosforylację ERK1/2, przy jednoczesnej nadekspresji kinazy MAPK, których aktywacja sprzyja przeżyciu i nasila proliferację komórek nowotworowych [163].

Jak wykazano w komórkach nowotworów krwi, inaczej niż w guzach litych, APRIL łączy się z TACI i promuje np. wzrost komórek B chłoniaka grudkowego (FL) oraz stymuluje cykliny D1 poprzez aktywację mTOR indukowaną przez PI3K/Akt [164].

W przeprowadzonych badaniach oznaczona została ekspresja białek szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt, jako prawdopodobnej drogi wpływającej na regulację apoptozy i proliferacji komórek nowotworowych. W dwóch liniach, FaDu i SCC-9, aktywność PI3K była znacząco wyższa po 48 godzinach inkubacji. Wyniki te są zgodne z nasiloną proliferacją i upośledzoną apoptozą tych komórek, co wyraźnie wskazuje na udział kinazy PI3K w regulacji tych procesów pod wpływem rhAPRIL.

Zaskakujące wyniki uzyskano w przypadku kinazy p-Akt 1/2/3. Odwrotnie do PI3K, ekspresja p-Akt1/2/3 w komórkach FaDu i SCC-9 w obecności rhAPRIL osiągała wyższe wartości w hodowli 24-godzinnej i niższe w hodowli 48-godzinnej.

Natomiast w komórkach CAL 27 obserwowano podobny kierunek zarówno w ekspresji PI3K, jak i p-Akt1/2/3. Komórki linii CAL 27 inaczej niż pozostałe wyrażały ekspresję białka PI3K. Po 24 godzinach inkubacji z rhAPRIL ekspresja PI3K była wyższa, choć nieistotnie statystycznie, natomiast po 48 godzinach tej samej inkubacji ekspresja PI3K znacząco się obniżyła. Podobnie, ekspresja białka p-Akt1/2/3 po 48-godzinnej inkubacji CAL 27 z rhAPRIL obniżyła się w stosunku do komórek inkubowanych krócej, a w komórkach bez rhAPRIL wzrosła w porównaniu do tych samych komórek po 24 godzinach.

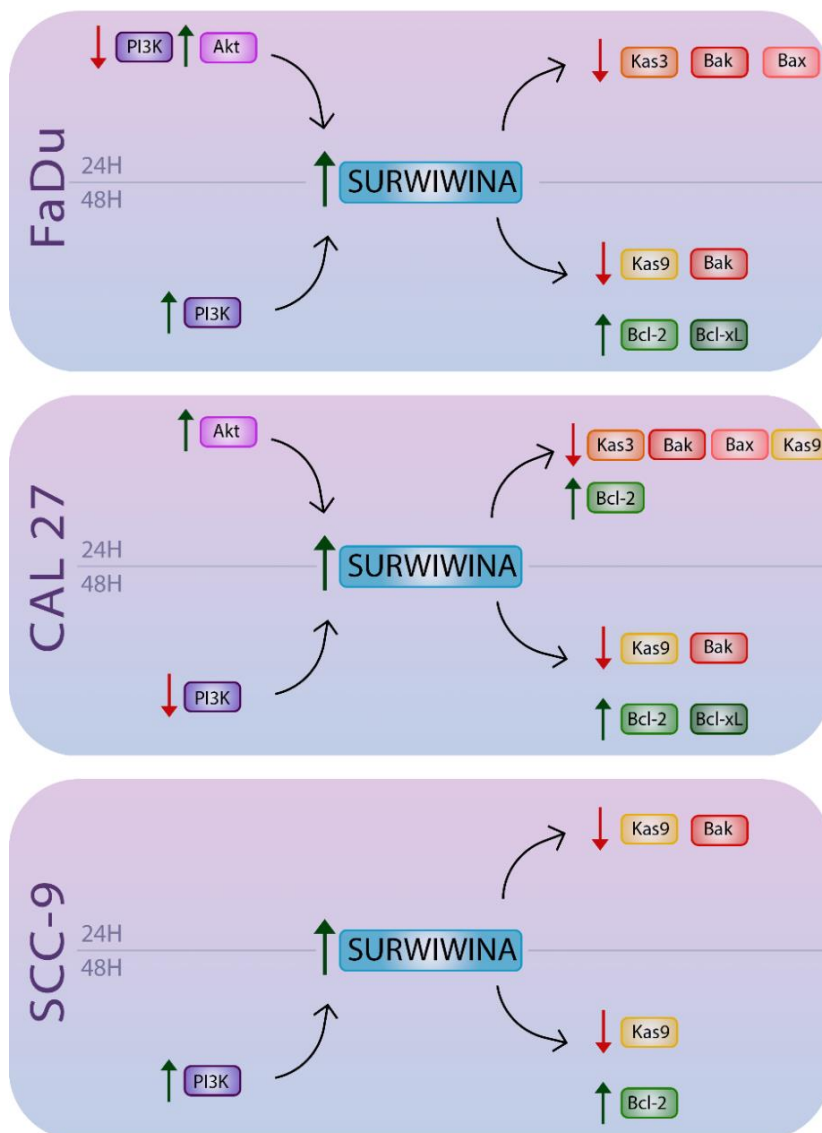
Różnice w ekspresji białek szlaku PI3K/Akt dotyczące głównie p-Akt1/2/3 w badanych liniach komórkowych sugerują, że APRIL może angażować inne białka aktywujące tę kinazę w poszczególnych komórkach. Większość badań wskazuje na PI3K jako aktywatora białka Akt. Natomiast w przeprowadzonych badaniach ekspresja białka Akt była wysoka już po 24-godzinnej inkubacji z rhAPRIL, co w przypadku FaDu i SCC-9 może wskazywać na dodatkowe źródło aktywacji tego białka, poza PI3K. Jednym z aktywatorów PI3K może być surwiwina, która jak wskazują niektóre badania może aktywować kinazę PI3K [165]. Inne badania wykazały, że ekspresja surwiwiny regulowana jest m. in. przez szlak PI3K/AKT [166]. Stwierdzono, że aktywacja PI3K/Akt prowadzi do wzrostu ekspresji surwiwiny indukowanej przez GM-CSF, Ang-1, VEGF. Istnieje zatem pętla sprzężenia zwrotnego, łącząca ekspresję surwiwiny z PI3K/Akt w komórkach nowotworowych [165].

W świetle uzyskanych wyników prawdopodobne wydaje się, aby po 24-godzinnej inkubacji, aktywowany Akt prowadził do wzrostu ekspresji surwiwiny, która po dłuższej stymulacji indukuje w komórce ekspresję PI3K. Zaktywowany po 48 godzinach inkubacji PI3K może zwrotnie pobudzać ekspresję surwiwiny, co prowadzi do kolejnego wzrostu jej ekspresji.

Według dostępnych danych surwiwina wykazuje wysoką ekspresję w komórkach nowotworowych m. in. w komórkach linii HNSCC i pełni rolę w regulacji apoptozy [167]. Jest białkiem należącym do IAP (ang. *inhibitor of apoptosis*), którego brak zaburza podziały komórkowe, prowadząc do śmierci komórek. Wykazano, że jej ekspresja obecna jest w dużej liczbie nowotworów złośliwych [168]. Surwiwina w znacznym stopniu oddziałuje na oba szlaki apoptozy, zależny od mitochondriów oraz szlak receptorowy. Zakłóca ona przetwarzanie kaspazy-9, głównego inicjatora wewnętrznego szlaku apoptozy oraz wiąże rozszczepioną kaspazę-3 lub -7, hamując ich funkcję [169].

Wykazano zaangażowanie surwiwiny w rozwoju raka jamy ustnej, a jej nadekspresja w zmianach przedrakowych sugeruje rolę we wczesnych etapach karcynogenezy OSCC [22, 23]. Zwiększoną ekspresję surwiwiny stwierdzono w OSCC o wysokim stopniu złośliwości, co wskazuje na jej udział w oporności na apoptozę, w odpowiedzi na leczenie [172].

Potwierdzają to dane wskazujące, że surwiwina w nowotworach wiąże się z opornością na apoptozę, powstawaniem przerzutów czy omijaniem punktów kontrolnych cyklu komórkowego, w związku powyższym wpływa ona na proces proliferacji komórek nowotworowych [165]. Wyniki badań własnych jednoznacznie wskazują na wzrost ekspresji surwiwiny we wszystkich ocenianych liniach komórkowych po inkubacji z rhAPRIL. Istotnie wyższa ekspresja surwiwiny następowała już po 24 godzinach, z wyjątkiem linii SCC-9 i utrzymywała się po 48 godzinach we wszystkich liniach. Wyniki te wskazują, że surwiwina i efekty jej działania mogą być ważnym etapem aktywacji szlaku prowadzącego do stymulacji procesu proliferacji i hamowania apoptozy obserwowanego we wszystkich badanych liniach komórkowych (Rycina).



Rycina 47 Zmiany w ekspresji białek pro- i anti-apoptotycznych, kaspaz oraz białek szlaku PI3K/p-Akt1/2/3/surwiwina w komórkach linii FaDu, CAL 27 i SCC-9.

Akt - p-Akt1/2/3; Kas3 - kaspaza-3; Kas9 - kaspaza-9; ↑ - wzrost ekspresji; ↓ - obniżenie ekspresji

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają pro-nowotworowy efekt działania cząsteczki rhAPRIL, i po raz pierwszy dowodzą bezpośredniego wpływu na komórki raka płaskonabłonkowego HNSCC linii FaDu, CAL 27 i SCC-9. Efekt ten cechuje dwójakiego rodzaju działanie, z jednej strony stymulujące ich proliferację, z drugiej hamujące proces apoptozy.

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że w obecności rhAPRIL dochodzi do nasilenia proliferacji wszystkich badanych linii komórkowych, niezależnie od pochodzenia. Zmiany te były związane ze wzrostem ekspresji surwiwiny, co sugeruje istotną rolę tego białka w procesie namnażania komórek nowotworowych HNSCC linii FaDu, CAL 27 i SCC-9.

W przypadku pozostałych białek sygnałowych, kinaz PI3K/Akt, zmiany w ich ekspresji nie pozwalają na jednoznaczną ocenę ich aktywności w przeprowadzonym eksperymencie.

Istotnym aspektem pro-nowotworowego działania rhAPRIL, jest także udowodniony w przedstawionych badaniach efekt anty-apoptotyczny, prowadzący do upośledzenia procesu apoptozy we wszystkich ocenianych liniach komórkowych. Zmiany w intensywności apoptozy, związane ze wzrastającą ekspresją surwiwiny, którą cechuje znana aktywność hamująca apoptozę, podkreślają znaczenie tego białka w odpowiedzi na APRIL. Jak wykazały przeprowadzone badania, mechanizm obniżonej apoptozy komórek FaDu, CAL 27, jak i SCC-9, w odpowiedzi na rhAPRIL jest związany ze zmianami w ekspresji pro- i anty-apoptotycznych białek nadrodziny Bcl-2 oraz kaspazy-3 i kaspazy-9. Upośledzona ekspresja białek pro-apoptotycznych i kaspaz z jednocześnie wysokim poziomem białek anty-apoptotycznych wydaje się w istotny sposób wpływać na obniżenie apoptozy w badanych komórkach.

Mechanizm indukcji sygnału anty-apoptotycznego, związanego z ekspresją białek Bcl-2 jest wyraźnie jednokierunkowy w przypadku linii CAL 27 i wydaje się zależny od stanu aktywacji kinaz PI3K oraz pAkt1/2/3. Ekspresja zarówno białek pro-, jak i anty-apoptotycznych, ocenianych kaspaz oraz badanych kinaz wykazywała ten sam kierunek zmian. W pozostałych liniach komórkowych FaDu i SCC-9 zmiany w ekspresji białek apoptotycznych i kinaz PI3K oraz Akt nie są jednokierunkowe, co sugeruje zaangażowanie innych szlaków sygnałowych w tych komórkach. Obserwacje te wskazują, że dalsze, poszerzone badania w tym zakresie pozwolą na bardziej szczegółowe poznanie mechanizmów działania cząsteczki APRIL na te linie komórkowe.

Spośród badanych linii, komórki SCC-9 i CAL 27 wykazywały podobną, podwyższoną aktywność proliferacyjną w odpowiedzi na rhAPRIL. Biorąc jednocześnie pod uwagę wyniki dotyczące procesu apoptozy w komórkach SCC-9, można przypuszczać, że komórki tej linii są najbardziej wrażliwe na działanie cząsteczki APRIL. Obserwacja ta może w przyszłości przyczynić się do opracowania skutecznych metod regulacji ekspresji cząsteczki APRIL i stać się celem terapii wspomagającej raka płaskonabłonkowego jamy ustnej o tej lokalizacji.

Obserwowane różnice między liniami komórkowymi dotyczące ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych, kaspaz oraz białek szlaku PI3K/Akt/Surwiwina skłaniają do dalszych badań nad efektami działania APRIL na różne linie nowotworowe, w celu dokładnego poznania biologicznej roli tej cząsteczki w procesie nowotworowym.

VI. Wnioski

1. Wzrost proliferacji oraz upośledzenie apoptozy w odpowiedzi na rhAPRIL wskazuje na bezpośrednie pro-nowotworowe działanie cząsteczki APRIL na komórki HNSCC linii FaDu, CAL 27 i SCC-9.
2. Największą wrażliwość na działanie rhAPRIL wykazują komórki linii SCC-9, co potwierdzają wyniki dotyczące zarówno proliferacji, jak i apoptozy tych komórek.
3. Mechanizm hamowania apoptozy w badanych liniach komórkowych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL zależny jest w znacznym stopniu od zmian ekspresji pro- i anty-apoptotycznych białek nadrodziny Bcl-2 drogi mitochondrialnej oraz kaspaz.
4. Różnice w ekspresji badanych białek pro- i anty-apoptotycznych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL między badanymi liniami wskazują na zaangażowanie także innych, niż badane, białek drogi mitochondrialnej.
5. Kluczowym białkiem odpowiedzialnym za nasiloną proliferację i upośledzoną apoptozę badanych linii komórkowych HNSCC w odpowiedzi na rhAPRIL jest Surwiwina
6. Spośród badanych linii, komórki CAL 27 odpowiadają na rhAPRIL poprzez szlak PI3K/Akt/Surwiwina.
7. Różnice w ekspresji białek szlaku PI3K/Akt w komórkach linii FaDu i SCC-9 wskazują na aktywację innych dróg sygnalizacyjnych w odpowiedzi na rhAPRIL.

VII. Streszczenie w języku polskim

Białko APRIL jest członkiem nadrodziny TNF, który fizjologicznie prowadzi do szybszego dojrzewania granulocytów i komórek plazmatycznych w szpiku oraz ich wyrzutu na obwód. W odróżnieniu od wielu innych ligandów nadrodziny TNF może stymulować wzrost komórek różnych linii nowotworowych.

Komórki nowotworowe nie wykazują ekspresji podstawowych receptorów dla APRIL: TACI oraz BCMA, jednak na ich powierzchni znajdują się proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG), z którymi APRIL wiąże się bezpośrednio. Dotychczasowe badania wykazały ekspresję cząsteczki APRIL w tkankach nowotworowych różnego pochodzenia oraz w komórkach zaangażowanych w regulację rozwoju nowotworów.

Nowotwory w obrębie głowy i szyi (HNC), wśród których ponad 90% stanowią raki płaskonabłonkowe (HNSCC), należą do najczęściej występujących na świecie. Dostępne dane dotyczące wpływu APRIL na komórki raków płaskonabłonkowych głowy i szyi są nieliczne i niejednoznaczne.

Celem badań była ocena wpływu rekombinowanej cząsteczki APRIL (rhAPRIL) na procesy proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych wybranych linii HNSCC oraz zweryfikowanie aktywności białek pro- i anty-apoptotycznych, a także roli szlaku PI3K/p-Akt/surwiwina w tych komórkach.

Do oceny proliferacji wykorzystano test MTT, apoptozę oznaczano metodą cytometrii przepływową, a ekspresję białek badano metodą Western blot.

W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazałam bezpośrednie działanie rhAPRIL na komórki linii FaDu, CAL 27 i SCC-9, wyrażające się znaczącym wzrostem ich proliferacji oraz upośledzeniem procesu apoptozy, co potwierdza pro-nowotworową aktywność tej cząsteczki. Największą wrażliwość na działanie rhAPRIL wykazują komórki linii SCC-9, co potwierdzają wyniki dotyczące zarówno proliferacji, jak i apoptozy tych komórek.

Mechanizm hamowania apoptozy w badanych liniach komórkowych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL zależy w znacznym stopniu od zmian ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych nadrodziny Bcl-2 drogi mitochondrialnej oraz kaspaz. Różnice w ekspresji badanych białek pro- i anty-apoptotycznych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL między badanymi liniami wskazują na zaangażowanie także innych, niż badane, białek drogi mitochondrialnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że kluczowym białkiem odpowiedzialnym za nasiloną proliferację i upośledzoną apoptozę badanych linii komórkowych HNSCC w odpowiedzi na rhAPRIL jest surwiwina.

Analizując zachowanie się białek wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego wykazano, że spośród badanych linii, tylko komórki CAL 27 odpowiadają na rhAPRIL poprzez szlak PI3K/Akt/Surwiwina. W pozostałych komórkach, linii FaDu i SCC-9, aktywacji ulegają prawdopodobnie inne drogi sygnałowe.

Istotny wpływ APRIL na proces apoptozy i proliferacji komórek nowotworowych linii HNSCC obserwowany w przeprowadzonych badaniach może zostać w przyszłości wykorzystany w celu doskonalenia terapii w leczeniu nowotworów HNSCC, w oparciu o regulację ekspresji tej cząsteczki.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

The APRIL protein belongs to the TNF superfamily and physiologically leads to faster maturation of granulocytes and plasma cells in the bone marrow and their ejection to the periphery. Unlike many other ligands of the TNF superfamily, it can stimulate the growth of cells of various tumor lines.

Cancer cells do not express the basic receptors of APRIL: TACI and BCMA. On their surface there are heparan sulfate proteoglycans (HSPG), to which APRIL binds. Previous studies have shown that the expression of the APRIL molecule in cancer tissues of various origins and in cells involved in regulating of cancer development.

Head and neck cancers (HNCs), of which more than 90% are squamous cell carcinomas (HNSCCs), are among the most common in the world.

Available data on the effect of APRIL on head and neck squamous cell carcinoma cells are scarce and inconclusive.

The aim of the study was to assess the effect of the recombinant APRIL molecule (rhAPRIL) on the processes of proliferation and apoptosis of cancer cells of selected HNSCC lines and to verify the activity of pro- and anti-apoptotic proteins, as well as the role of the PI3K/p-Akt/survivin pathway in these cells.

The MTT assay was used to assess proliferation, apoptosis was determined by flow cytometry, and protein expression was assessed by Western blot.

In the conducted studies, I demonstrated for the first time the direct effect of rhAPRIL on cells of the FaDu, CAL 27 and SCC-9 lines, expressed in a significant increase in their proliferation and impairment of the apoptosis process, which confirms the pro-cancer activity of this molecule. SCC-9 cells are the most sensitive to the action of rhAPRIL, which is confirmed by the results regarding both proliferation and apoptosis of these cells.

The mechanism of apoptosis inhibition in the tested cell lines in response to rhAPRIL depends to a large extent on changes in the expression of pro- and anti-apoptotic proteins that belong to the Bcl-2 superfamily of the mitochondrial pathway and caspases.

Differences in the expression of the tested pro- and anti-apoptotic proteins in response to the action of rhAPRIL between the tested lines indicate the involvement of other than the tested proteins of the mitochondrial pathway.

The results obtained indicate that the key protein responsible for increased proliferation and impaired apoptosis of the tested HNSCC cell lines in response to rhAPRIL is Survivin.

Analyzing the behavior of proteins of the intracellular signaling pathway, it was shown that among the tested lines, only CAL 27 cells respond to rhAPRIL through the PI3K/Akt/Surwiwin pathway. In the remaining cells, the FaDu and SCC-9 lines, other signaling pathways are probably activated.

The significant effect of APRIL on the process of apoptosis and proliferation of HNSCC tumor cells observed in the conducted studies may be used in the future to improve anticancer therapy in the treatment of HNSCC tumors, based on the regulation of the expression of this molecule.

IX. Piśmiennictwo

- [1] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487–501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00237-9).
- [2] Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:147–68. <https://doi.org/10.1038/nrd3930>.
- [3] Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiological Reviews* 2019;99:115–60. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2017>.
- [4] Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2002;27:19–26. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01995-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01995-8).
- [5] MacEwan DJ. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 2002;135:855–75. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704549>.
- [6] Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:453–72. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>.
- [7] Kucka K, Wajant H. Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:615141. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.615141>.
- [8] Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:193–209. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(03\)00021-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(03)00021-2).
- [9] Ferrao R, Wu H. Helical assembly in the death domain (DD) superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 2012;22:241–7. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.02.006>.
- [10] Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting Protein (TRIP): A Novel Component of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)- and CD30-TRAF Signaling Complexes That Inhibits TRAF2-mediated NF- κ B Activation. *J Exp Med* 1997;185:1275–86.
- [11] Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000;12:611–20. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80212-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80212-5).
- [12] Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:193–209. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(03\)00021-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(03)00021-2).
- [13] Deng M, Loughran PA, Zhang L, Scott MJ, Billiar TR. Shedding of the tumor necrosis factor (TNF) receptor from the surface of hepatocytes during sepsis limits inflammation through cGMP signaling. *Sci Signal* 2015;8:ra11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005548>.

- [14] Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4845–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4845>.
- [15] Wallach D. The Tumor Necrosis Factor Family: Family Conventions and Private Idiosyncrasies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10:a028431. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028431>.
- [16] Figgett WA, Vincent FB, Saulep-Easton D, Mackay F. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation. *Semin Immunol* 2014;26:191–202. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.06.001>.
- [17] Villa-Morales M, Fernández-Piqueras J. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:85–101. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.628937>.
- [18] Sfrikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun* 2010;11:180–210. <https://doi.org/10.1159/000289205>.
- [19] Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014;5:511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00511>.
- [20] Burjanadze M, Matthes T, McKee T, Passweg J, Huard B. In situ detection of APRIL-rich niches for plasma-cell survival and their contribution to B-cell lymphoma development. *Histol Histopathol* 2009;24:1061–6. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1061>.
- [21] Tang T, Cheng X, Truong B, Sun L, Yang X, Wang H. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacol Ther* 2021;219:107709. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107709>.
- [22] Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* 2018;101:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>.
- [23] Winkles JA. The TWEAK–Fn14 cytokine–receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008;7:411. <https://doi.org/10.1038/nrd2488>.
- [24] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, Zhai Y, Su J, Chen SF, et al. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J Immunol* 2000;164:4105–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4105>.
- [25] Fitzgerald KA, O’Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. APRIL. In: Fitzgerald KA, O’Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE, editors. *The Cytokine FactsBook and Webfacts* (Second Edition), London: Academic Press; 2001, p. 148–9. <https://doi.org/10.1016/B978-012155142-1/50028-2>.
- [26] Matthes T, Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber M-L, Krause K-H, Donze O, Passweg J, et al. Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand

(APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* 2011;118:1838–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332940>.

- [27] Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *The Journal of Experimental Medicine* 1998;188:1185–90.
- [28] López-Fraga M, Fernández R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep* 2001;2:945–51. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve198>.
- [29] Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006;18:263–75. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.04.006>.
- [30] Hardenberg G, Planelles L, Schwarte CM, van Bostelen L, Le Huong T, Hahne M, et al. Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner. *Eur J Immunol* 2007;37:2900–11. <https://doi.org/10.1002/eji.200737210>.
- [31] Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 2011;13:170–80. <https://doi.org/10.1038/ni.2194>.
- [32] Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 2011;12:151–9. <https://doi.org/10.1038/ni.1981>.
- [33] Alexaki V-I, Pelekanou V, Notas G, Venihaki M, Kampa M, Dessirier V, et al. B-cell maturation antigen (BCMA) activation exerts specific proinflammatory effects in normal human keratinocytes and is preferentially expressed in inflammatory skin pathologies. *Endocrinology* 2012;153:739–49. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1504>.
- [34] Barone F, Patel P, Sanderson JD, Spencer J. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. *Mucosal Immunol* 2009;2:495–503. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.106>.
- [35] Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* 2008;118:2887–95. <https://doi.org/10.1172/JCI33760>.
- [36] Bat-Erdene U, Quan E, Chan K, Lee B-M, Matook W, Lee K-Y, et al. Neutrophil TLR4 and PKR are targets of breast cancer cell glycosaminoglycans and effectors of glycosaminoglycan-induced APRIL secretion. *Oncogenesis* 2018;7:45. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0058-2>.
- [37] Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, Darivianaki K, Sanidas E, Tsiftsis DD, et al. Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC Cancer* 2008;8:76. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-76>.

- [38] Nowacka KH, Jabłońska E. Role of the APRIL molecule in solid tumors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.08.001>.
- [39] Rennert P, Schneider P, Cachero TG, Thompson J, Trabach L, Hertig S, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 2000;192:1677–84. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1677>.
- [40] Wang F, Chen L, Ni H, Wang G, Ding W, Cong H, et al. APRIL depletion induces cell cycle arrest and apoptosis through blocking TGF- β 1/ERK signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2013;383:179–89. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1766-8>.
- [41] Day ES, Cachero TG, Qian F, Sun Y, Wen D, Pelletier M, et al. Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 2005;44:1919–31. <https://doi.org/10.1021/bi048227k>.
- [42] Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 2003;112:286–97. <https://doi.org/10.1172/JCI18025>.
- [43] Mantchev GT, Cortesão CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ. TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J Immunol* 2007;179:2282–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2282>.
- [44] Castigli E, Wilson SA, Elkhail A, Ozcan E, Garibyan L, Geha RS. Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007;120:885–91. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.012>.
- [45] Madry C, Laabi Y, Callebaut I, Roussel J, Hatzoglou A, Le Coniat M, et al. The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int Immunol* 1998;10:1693–702. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.11.1693>.
- [46] Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 2001;108:169–73. <https://doi.org/10.1172/JCI13530>.
- [47] Ren Z, Spaargaren M, Pals ST. Syndecan-1 and stromal heparan sulfate proteoglycans: key moderators of plasma cell biology and myeloma pathogenesis. *Blood* 2021;137:1713–8. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008188>.
- [48] Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC. Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br J Cancer* 2001;85:1094–8. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2054>.
- [49] Knelson EH, Nee JC, Blobel GC. Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem Sci* 2014;39:277–88. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.001>.
- [50] Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2011;15:1013–31. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x>.

- [51] Nikolova V, Koo C-Y, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, et al. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2009;30:397–407. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp001>.
- [52] Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner Q-G, Cachero TG, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* 2005;201:1375–83. <https://doi.org/10.1084/jem.20042309>.
- [53] Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals ST, Hahne M, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ* 2005;12:637–48. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401647>.
- [54] Moreaux J, Veyrune J-L, De Vos J, Klein B. APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. *BMC Cancer* 2009;9:83. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-83>.
- [55] Peperzak V, Vikström I, Walker J, Glaser SP, LePage M, Coquery CM, et al. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol* 2013;14:290–7. <https://doi.org/10.1038/ni.2527>.
- [56] Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam K-P, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 2008;180:3655–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3655>.
- [57] Cornelis R, Hahne S, Taddeo A, Petkau G, Malko D, Durek P, et al. Stromal Cell-Contact Dependent PI3K and APRIL Induced NF- κ B Signaling Prevent Mitochondrial- and ER Stress Induced Death of Memory Plasma Cells. *Cell Rep* 2020;32:107982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107982>.
- [58] De Pasquale V, Pavone LM. Heparan Sulfate Proteoglycan Signaling in Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2020;21:6588. <https://doi.org/10.3390/ijms21186588>.
- [59] Takahara M, Nagato T, Nozaki Y, Kumai T, Katada A, Hayashi T, et al. A proliferation-inducing ligand (APRIL) induced hyper-production of IgA from tonsillar mononuclear cells in patients with IgA nephropathy. *Cell Immunol* 2019;341:103925. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103925>.
- [60] Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol* 2007;37:110–8. <https://doi.org/10.1002/eji.200636623>.
- [61] Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* 2003;18:279–88. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00025-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00025-6).
- [62] Tsuji S, Cortesão C, Bram RJ, Platt JL, Cascalho M. TACI deficiency impairs sustained Blimp-1 expression in B cells decreasing long-lived plasma cells in the bone marrow. *Blood* 2011;118:5832–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-353961>.

- [63] Tsuji S, Stein L, Kamada N, Nuñez G, Bram R, Vallance BA, et al. TACI deficiency enhances antibody avidity and clearance of an intestinal pathogen. *J Clin Invest* 2014;124:4857–66. <https://doi.org/10.1172/JCI74428>.
- [64] Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJA, Runyon S, Yan M, Yin J, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 2005;280:7218–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411714200>.
- [65] Garcia-Carmona Y, Cols M, Ting AT, Radigan L, Yuk FJ, Zhang L, et al. Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI. *Blood* 2015;125:1749–58. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-575845>.
- [66] Garcia-Carmona Y, Ting AT, Radigan L, Athuluri Divakar SK, Chavez J, Meffre E, et al. TACI Isoforms Regulate Ligand Binding and Receptor Function. *Front Immunol* 2018;9:2125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02125>.
- [67] Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, et al. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 2007;448:929–33. <https://doi.org/10.1038/nature06033>.
- [68] Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 2002;3:822–9. <https://doi.org/10.1038/ni829>.
- [69] Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat A-F, Bossen C, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 2008;111:2755–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110858>.
- [70] Jo HA, Han SS, Lee S, Kim JY, Yang SH, Lee H, et al. The association of tumor necrosis factor superfamily 13 with recurrence of immunoglobulin A nephropathy in living related kidney transplantation. *BMC Nephrology* 2019;20:33. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1222-4>.
- [71] Makita Y, Suzuki H, Kano T, Takahata A, Julian BA, Novak J, et al. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2020;97:340–9. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.08.022>.
- [72] Muto M, Manfroi B, Suzuki H, Joh K, Nagai M, Wakai S, et al. Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:1227–38. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016050496>.
- [73] Nakayamada S, Tanaka Y. BAFF- and APRIL-targeted therapy in systemic autoimmune diseases. *Inflamm Regen* 2016;36:6. <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0015-4>.
- [74] Chu VT, Enghard P, Schürer S, Steinhauser G, Rudolph B, Riemekasten G, et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:2083–93. <https://doi.org/10.1002/art.24628>.

- [75] Baert L, Manfroi B, Casez O, Sturm N, Huard B. The role of APRIL - A proliferation inducing ligand - In autoimmune diseases and expectations from its targeting. *Journal of Autoimmunity* 2018;95:179–90. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.016>.
- [76] Koyama T, Tsukamoto H, Masumoto K, Himeji D, Hayashi K, Harada M, et al. A novel polymorphism of the human APRIL gene is associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:980–5. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg270>.
- [77] Lee YH, Ota F, Kim-Howard X, Kaufman KM, Nath SK. APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1274–6. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem093>.
- [78] Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiamong S, et al. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R252. <https://doi.org/10.1186/ar4095>.
- [79] Fuchs Y, Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* 2011;147:742–58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>.
- [80] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- [81] Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;322:1536–8.
- [82] Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555–6. <https://doi.org/10.1038/284555a0>.
- [83] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
- [84] Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009;23:1625–37. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>.
- [85] Pobezinskaya YL, Liu Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle* 2012;11:871–6. <https://doi.org/10.4161/cc.11.5.19300>.
- [86] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 2016;8:603–19. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>.
- [87] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807:735–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.03.010>.
- [88] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 2017;24:1380–9. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
- [89] Ho P, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J* 2005;272:5436–53. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04966.x>.

- [90] Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007;14:56–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402028>.
- [91] Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020;1867:118688. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>.
- [92] Doseff A, Parihar A. Caspase-3 regulation in apoptosis, immune function and beyond., 2020.
- [93] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
- [94] Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* 2019;10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>.
- [95] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;500:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.190>.
- [96] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25:65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>.
- [97] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39:615–47. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00252-3](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00252-3).
- [98] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H-C, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006;8:1348–58. <https://doi.org/10.1038/ncb1499>.
- [99] Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 2008;455:1076–81. <https://doi.org/10.1038/nature07396>.
- [100] Golla C, Bilal M, Dwucet A, Bader N, Anthonymuthu J, Heiland T, et al. Photodynamic Therapy Combined with Bcl-2/Bcl-xL Inhibition Increases the Noxa/Mcl-1 Ratio Independent of Usp9X and Synergistically Enhances Apoptosis in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2021;13:4123. <https://doi.org/10.3390/cancers13164123>.
- [101] Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life (Basel)* 2022;12:256. <https://doi.org/10.3390/life12020256>.
- [102] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2006;1757:639–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.016>.
- [103] Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* 2014;127:2135–44. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>.
- [104] Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2015;35:S25–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>.

- [105] Warburg O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 1924;12:1131–7. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>.
- [106] Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–9. <https://doi.org/10.1038/nrc1478>.
- [107] Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6223–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700690104>.
- [108] Mankoff DA, Eary JF, Link JM, Muzi M, Rajendran JG, Spence AM, et al. Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* 2007;13:3460–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0074>.
- [109] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437–43. <https://doi.org/10.1038/nature04871>.
- [110] Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:299–310. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9064-0>.
- [111] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007;109:3812–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035972>.
- [112] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009;324:1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- [113] Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, et al. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* 2005;24:4165–73. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208622>.
- [114] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009;324:1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- [115] Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov* 2015;5:1024–39. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>.
- [116] Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;16:393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>.
- [117] Mathieu J, Zhou W, Xing Y, Sperber H, Ferreccio A, Agoston Z, et al. Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014;14:592–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.012>.

- [118] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144:1941–53. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
- [119] Jung K, Narwal M, Min SY, Keam B, Kang H. Squamous cell carcinoma of head and neck: what internists should know. *Korean J Intern Med* 2020;35:1031–44. <https://doi.org/10.3904/kjim.2020.078>.
- [120] Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD, et al. High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer* 2014;135:1653–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.28811>.
- [121] Sy F, Jw L, Kc C. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Clinical Oncology* 2016;5. <https://doi.org/10.21037/cco.2016.03.07>.
- [122] Mj W, G D, Em R, Wh W, A van Z, Sj W, et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 2018;124. <https://doi.org/10.1002/cncr.31385>.
- [123] Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70:9969–78. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1712>.
- [124] Pai SI, Westra WH. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annu Rev Pathol* 2009;4:49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>.
- [125] Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.
- [126] Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol* 2020;235:65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.28963>.
- [127] Faber A, Barth C, Hörmann K, Kassner S, Schultz JD, Sommer U, et al. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2011;26:321–6. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1322>.
- [128] Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* 2010;289:151–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.010>.
- [129] Bell RB, Leidner RS, Crittenden MR, Curti BD, Feng Z, Montler R, et al. OX40 signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Overcoming immunosuppression in the tumor microenvironment. *Oral Oncol* 2016;52:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.11.009>.
- [130] Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res* 2017;23:141–9. <https://doi.org/10.12659/msmbr.903910>.

- [131] Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, O'Sullivan B, Mason MD, Asamura H, et al., editors. *TNM klasyfikacja nowotworów złośliwych*. Wydanie zaktualizowane. Gdańsk: Via Medica; 2017.
- [132] Xian H, Zhang H, Zhu H, Wang X, Tang X, Mao Y, et al. High APRIL expression correlates with unfavourable survival of gastrointestinal stromal tumour. *Pathology* 2014;46:617–22. <https://doi.org/10.1097/PAT.000000000000162>.
- [133] Sawicka-Powierza J, Jablonska E, Kloczko J, Piszcz J, Garley M, Ratajczk-Wrona W. Evaluation of TNF superfamily molecules release by neutrophils and B leukemic cells of patients with chronic B - cell lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2011;58:45–50.
- [134] Sun B, Xia Z, Cai F, Wang P, Xu M, Wu Y. APRIL is Involved in the Proliferation and Metastasis of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2018;40:588. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001198>.
- [135] Bolkun L, Grubczak K, Schneider G, Zembko P, Radzikowska U, Singh P, et al. Involvement of BAFF and APRIL in Resistance to Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia. *J Cancer* 2016;7:1979–83. <https://doi.org/10.7150/jca.15966>.
- [136] Sawicka-Powierza J, Jablonska E, Kloczko J, Piszcz J, Garley M, Ratajczk-Wrona W. Evaluation of TNF superfamily molecules release by neutrophils and B leukemic cells of patients with chronic B - cell lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2011;58:45–50.
- [137] Schwaller J, Schneider P, Mhaweck-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, et al. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 2007;109:331–8. <https://doi.org/10.1073/blood-2006-02-001800>.
- [138] Ding W, Wang J, Wang F, Wang G, Wu Q, Ju S, et al. Serum sAPRIL: a potential tumor-associated biomarker to colorectal cancer. *Clin Biochem* 2013;46:1590–4. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.008>.
- [139] Jabłońska E, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Antonowicz B, Dziemiańczyk-Pakieła D, et al. A proliferation-inducing ligand (APRIL) in neutrophils of patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur Cytokine Netw* 2012;23:93–100. <https://doi.org/10.1684/ecn.2012.0311>.
- [140] Zhi X, Tao J, Xiang G, Cao H, Liu Z, Yang K, et al. APRIL induces cisplatin resistance in gastric cancer cells via activation of the NF- κ B pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:571–85. <https://doi.org/10.1159/000369720>.
- [141] Mhaweck-Fauceglia P, Allal A, Odunsi K, Andrews C, Herrmann FR, Huard B. Role of the tumour necrosis family ligand APRIL in solid tumour development: Retrospective studies in bladder, ovarian and head and neck carcinomas. *Eur J Cancer* 2008;44:2097–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.07.007>.
- [142] Qian Z, Qingshan C, Chun J, Huijun Z, Feng L, Qiang W, et al. High expression of TNFSF13 in tumor cells and fibroblasts is associated with poor prognosis in non-small

cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2014;141:226–33. <https://doi.org/10.1309/AJCP4JP8BZOMHEAW>.

- [143] Wang F, Chen L, Ding W, Wang G, Wu Y, Wang J, et al. Serum APRIL, a potential tumor marker in pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1715–9. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.608>.
- [144] Sun B, Li L, Xu M, Wang X, Wang F, Ni H. Significance of BAFF/APRIL Expression and Their Receptors in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2016;38:167–72. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000549>.
- [145] García-Castro A, Zonca M, Florindo-Pinheiro D, Carvalho-Pinto CE, Cordero A, Gutiérrez del Fernando B, et al. APRIL promotes breast tumor growth and metastasis and is associated with aggressive basal breast cancer. *Carcinogenesis* 2015;36:574–84. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv020>.
- [146] De Moraes M, Monteiro Maia CAD, Freitas RDA. Cell proliferation markers in oral squamous cell carcinoma. *J Mol Biomark Diagn* 2012;01. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.S2-006>.
- [147] Zhang Q, Ni Y, Zhi X, Wang J, Li Z, Tang J, et al. Involvement of APRIL in *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147:1685–97. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03574-x>.
- [148] Wang F, Chen L, Ni H, Wang G, Ding W, Cong H, et al. APRIL depletion induces cell cycle arrest and apoptosis through blocking TGF- β 1/ERK signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2013;383:179–89. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1766-8>.
- [149] He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004;172:3268–79.
- [150] Tai Y-T, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood* 2016;127:3225–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-691162>.
- [151] Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb J-P. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2006;118:281–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02377.x>.
- [152] Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković LJ, Tepavcević Z, Jurišić V, et al. Bcl-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1095:19–25. <https://doi.org/10.1196/annals.1397.003>.
- [153] Pallavi N, Nalabolu GRK, Hiremath SKS. Bcl-2 and c-Myc expression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study to assess tumor progression. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018;22:325–31. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_197_18.

- [154] Zhang K, Jiao K, Xing Z, Zhang L, Yang J, Xie X, et al. Bcl-xL overexpression and its association with the progress of tongue carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:7360–77.
- [155] Alam M, Kashyap T, Mishra P, Panda AK, Nagini S, Mishra R. Role and regulation of proapoptotic Bax in oral squamous cell carcinoma and drug resistance. *Head Neck* 2019;41:185–97. <https://doi.org/10.1002/hed.25471>.
- [156] Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, Kroemer G. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 2016;44:221–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020>.
- [157] Flanagan L, Meyer M, Fay J, Curry S, Bacon O, Duesmann H, et al. Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell Death Dis* 2016;7:e2087–e2087. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.7>.
- [158] Liu X, He Y, Li F, Huang Q, Kato TA, Hall RP, et al. Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Mol Cell* 2015;58:284–96. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.003>.
- [159] Mukai M, Kusama T, Hamanaka Y, Koga T, Endo H, Tatsuta M, et al. Cross talk between apoptosis and invasion signaling in cancer cells through caspase-3 activation. *Cancer Res* 2005;65:9121–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4344>.
- [160] Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z, et al. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Lett* 2017;385:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.042>.
- [161] Kim B, Srivastava SK, Kim S-H. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19:113–27. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.961425>.
- [162] García-Castro A, Zonca M, Florindo-Pinheiro D, Carvalho-Pinto CE, Cordero A, Gutiérrez del Burgo B, et al. APRIL promotes breast tumor growth and metastasis and is associated with aggressive basal breast cancer. *Carcinogenesis* 2015;36:574–84. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv020>.
- [163] Wang H, Wu C, Wan S, Zhang H, Zhou S, Liu G. Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin β 1 expression and the ERK1/2 signaling pathway. *Toxicology* 2013;308:104–12. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.03.015>.
- [164] Gupta M, Dillon SR, Ziesmer SC, Feldman AL, Witzig TE, Ansell SM, et al. A proliferation-inducing ligand mediates follicular lymphoma B-cell proliferation and cyclin D1 expression through phosphatidylinositol 3-kinase-regulated mammalian target of rapamycin activation. *Blood* 2009;113:5206–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179762>.
- [165] Sandra F, Khosravi-Far R. Ser81 Survivin Induced Protein Kinase A (PKA)-dependent Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Activity. *The Indonesian Biomedical Journal* 2014;6:157–62. <https://doi.org/10.18585/inabj.v6i3.28>.

- [166] Zhao P, Meng Q, Liu L-Z, You Y-P, Liu N, Jiang B-H. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:219–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.165>.
- [167] Khan Z, Khan N, Tiwari RP, Patro IK, Prasad GBKS, Bisen PS. Down-regulation of survivin by oxaliplatin diminishes radioresistance of head and neck squamous carcinoma cells. *Radiother Oncol* 2010;96:267–73. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.06.005>.
- [168] Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 2015;141:389–97. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.159250>.
- [169] Khan Z, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013;1836:123–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.002>.
- [170] Lauxen IS, Oliveira MG, Rados PV, Lingen MW, Nör JE, Sant’ana Filho M. Immunoprofiling of oral squamous cell carcinomas reveals high p63 and survivin expression. *Oral Dis* 2014;20:e76-80. <https://doi.org/10.1111/odi.12136>.
- [171] Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GBKS, Shrivastava BR, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009;31:1039–48. <https://doi.org/10.1002/hed.21071>.
- [172] Deo PN, Deshmukh R. Expression of survivin in dysplasia and different grades of oral squamous cell carcinoma. *Translational Research in Oral Oncology* 2017;2:2057178X17710147. <https://doi.org/10.1177/2057178X17710147>.