

**mgr Damian Matysiński**

## **„Rola receptora P2X7 w biologii glejaka”**

### **Streszczenie**

P2X7 to jonotropowy receptor nukleotydowy, stymulowany przez zewnątrzkomórkowe ATP, który działa jako kanał przepuszczalny dla kationów. Receptor ten może również tworzyć duży por błonowy, którego powstanie powoduje śmierć komórki. Receptor P2X7 kontroluje wiele fizjologicznych i patologicznych procesów komórkowych, a jego podwyższona ekspresja jest często związana z progresją nowotworu. Ponieważ nukleotydy są ważnymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi w ośrodkowym układzie nerwowym, P2X7 odgrywa również ważną, ale niejednoznaczną rolę w biologii glejaka. Celem niniejszych badań było zbadanie ekspresji i funkcji receptora P2X7 w trzech liniach komórkowych glejaków ludzi (U-138, U-251, LN-229) oraz jednej linii komórkowej glejaka szczura (C6). Pomimo iż transkrypty i białko receptora P2X7 były wykrywane we wszystkich wymienionych wyżej liniach, zaobserwowano znaczące różnice ich ilości w zależności od linii komórkowej. W linii komórkowej U-138 receptor wydawał się być nieaktywny, podczas gdy w komórkach linii U-251 oraz w komórkach linii C6 jego aktywacja powodowała pojawienie się sygnału wapniowego i tworzenie pora w błonie komórkowej. Pomimo tworzenia pora komórkowego, żywotność badanych komórek po podaniu specyficznego agonisty P2X7 – BzATP – nie uległa zmianie w przypadku linii U-138 i U-251. Co więcej, w linii C6 zaobserwowano zwiększenie intensywności metabolizmu komórkowego czemu towarzyszył wzrost ilości białek CD133, HSPA1, HSPA5, a także fosforylacji kinaz wpływających na postęp cyklu komórkowego: Akt oraz p38 MAPK. Wykazano również, że aktywacja receptora P2X7 promowała adhezję komórek, depolaryzację mitochondriów i nadprodukcję reaktywnych form tlenu w komórkach linii C6 w warunkach *in vitro*.

Zbadano też, wpływ receptora P2X7, na wzrost guzów glejaka C6 w warunkach *in vivo*. Wyniki, uzyskane w tych badaniach potwierdziły dane otrzymane *in vitro*. Podawanie zwierzętom inhibitora P2X7 – BBG – skutecznie hamowało rozwój guzów nowotworowych C6, zmniejszało uwalnianie ATP oraz wywierało hamujący wpływ na szlaki sygnałowe, sprzyjające przeżywaniu komórek nowotworowych. Zanotowano obniżenie ilości białek, które są związane z promowaniem agresywnego fenotypu nowotworu (CD133, HSPA1, HSPA5, Akt, p38 MAPK, NOS-2) oraz białek związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym (N-kadheryna, wimentyna,  $\beta$ -katenina). Wykazano, że receptor P2X7 może być zaangażowany w kształtowanie mikrośrodowiska guza glejaka poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej oraz regulację ekspresji markerów stanu zapalnego.

Przedstawione wyniki znacząco poszerzają wiedzę na temat roli receptora nukleotydowego P2X7 w rozwoju glejaka. Po raz pierwszy usystematyzowano wyniki wskazujące na promujący wpływ receptora na podziały komórek glejaka *in vitro* i jednocześnie pokazano korelację ze wzrostem guzów nowotworowych *in vivo*. Co więcej, zostały zbadane wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe, które pozwoliły wytłumaczyć molekularne mechanizmy działania receptora P2X7 w komórkach glejaka oraz wpływ tego receptora na odpowiedź układu odpornościowego w trakcie rozwoju nowotworu.

## Abstract

P2X7 is an ionotropic nucleotide receptor that acts as a cation permeable channel upon ATP stimulation. This receptor can also form a large transmembrane pore or transmit an ATP-dependent signal without creating a channel at all. P2X7 receptors control many physiological and pathological cellular processes, and their increased expression is often associated with tumor progression. Since nucleotides are important signaling molecules in the central nervous system, P2X7 also plays an important but ambiguous role in glioblastoma biology. Therefore, our research aimed to investigate the expression and function of the P2X7 receptor in three human glioblastoma cell lines (U-138, U-251, LN-229) and in one rat glioma cell line (C6). Although the receptor mRNA and protein were detected in all the studied cells, we found profound differences in their level. In U-138 human cell line, the receptor seemed to be inactive, while in U-251 human and C6 rat cell line its activation resulted in calcium influx and large pore formation. The viability of studied cells upon the administration of specific P2X7 agonist – BzATP – was not affected for U-138 and U-251, whereas for C6 cells a stimulatory effect was observed. This process is accompanied by an increase of pro-survival proteins expression (CD133, HSPA1, HSPA5) as well as an increase in phosphorylation of kinases influencing the progress of the cell cycle (Akt and p38 MAPK). It was also shown that P2X7 activation promoted cell adhesion, mitochondria depolarization, and overproduction of reactive oxygen species in C6 cells *in vitro*.

The effect of the P2X7 receptor on the growth of C6 glioma tumors *in vivo* was also investigated. These results are in the line with the majority of the data obtained *in vitro*. The administration of BBG, a P2X7 inhibitor, effectively inhibited growth of the tumor mass and tumor development, reduced the amount of ATP with a simultaneous decrease of cancer-associated pro-survival protein expression. A decreased level of negative prognostic cancer markers (CD133, HSPA1, HSPA5, Akt, p38 MAPK, NOS-2) and proteins related to the epithelial-mesenchymal transition (N-cadherin, vimentin,  $\beta$ -catenin) were noted. It has also been shown that the P2X7 receptor may be involved in shaping the glioblastoma tumor microenvironment by modulating the immune response and regulating the level of inflammatory markers.

These data bring some new insight into P2X7 influence on the biology of glioma. For the first time, the results showing the receptor-promoting effect on the proliferation of glioma cells *in vitro* were shown in correlation with the growth of neoplastic tumors *in vivo*. Moreover, the cell signaling pathways were investigated to elucidate the molecular mechanisms activated by P2X7 receptor in glioblastoma cells as well as the receptor engagement in shaping of glioma tumor microenvironment through modulation of inflammation marker profile.