

Prof. dr hab. Ludmiła Żylińska
Zakład Neurochemii Molekularnej
Katedra Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny
ul. Mazowiecka 6/8
92-215 Łódź

Łódź, 25. 04. 2022

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Matysiaka
p.t. „Rola receptora P2X7 w biologii glejaka”

Purynergiczny receptor P2X7 jest trimerycznym, kationowym kanałem jonowym obecnym w błonie plazmatycznej i aktywowanym przez pozakomórkowe ATP. Otwarcie kanału powoduje napływ Ca^{2+} i Na^+ oraz wypływ K^+ . Receptor P2X7 występuje dość powszechnie w różnych typach komórek zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych, ale jego rola - szczególnie w tych ostatnich - budzi wiele kontrowersji. P2X7 może bowiem działać jako duży por membranowy, a także może przesyłać sygnał zależny od ATP bez tworzenia kanału, co w zależności od typu komórek może indukować zróżnicowaną odpowiedź. Aktywność P2X7 w komórkach somatycznych jest dość dobrze poznana, choć można zaobserwować wzrastające zainteresowanie tym receptorem - aktualnie w bazie Pubmed dostępnych jest ponad 3800 artykułów, zaś w ciągu ostatnich 5 lat opublikowano ich ponad 1200. Warto odnotować, że szereg doniesień wskazuje na istotny udział receptora P2X7 w biologii nowotworów, szczególnie w guzach glejaka. Jest to najczęstszy i najbardziej śmiertelny typ złośliwego nowotworu w OUN i charakteryzuje się niestety bardzo złym rokowaniem.

Temat ten stał się podstawą badań naukowych mgr. Damiana Matysiaka, który postanowił przeprowadzić wieloaspektową charakterystykę receptora P2X7 obejmującą także analizę funkcjonalną w rozwoju i progresji glejaka. Do realizacji tego celu Doktorant wybrał szereg modeli nowotworowych - ludzkie linie komórkowe U-87, U-251, U-138 oraz szczurzą C6. Część doświadczeń w cyklu badań *in vivo* przeprowadzono na myszach szczepu C57/BL6J, którym indukowano rozwój guzów nowotworowych poprzez podskórne wszczepienie komórek glejaka C6.

Rozprawa mgr. Damiana Matysiaka jest klasyczną dysertacją obejmującą 168 stron. Na 33 stronach wstępu przedstawiono teoretyczne podstawy zagadnienia badawczego, opisujące dotychczas dostępne informacje dotyczące klasyfikacji receptorów purynergicznych, identyfikacji i analizy molekularnej receptora P2X7, jego strukturę i funkcje w komórkach prawidłowych, a także szeroko omówiono rolę w procesach nowotworowych w różnych tkankach. To przejrzyste wprowadzenie uzupełnione rycinami oraz tabelami wystarczająco uzasadnia celowość podjęcia tematu przez Doktoranta.

Kolejnych 20 stron rozprawy opisuje metodykę zastosowaną w pracy, a warto podkreślić, że korzystano z najnowszych technik w zakresie biologii molekularnej, mikroskopii konfokalnej, oznaczeń biochemicznych, technik fluorescencyjnych, analiz cytometrycznych oraz metod immunologicznych. Następny rozdział, przedstawiający wyniki, na 42 stronach dokumentuje rezultaty uzyskane trakcie pracy. Badania Doktoranta obejmowały zasadniczo 2 kierunki. Pierwszy, to szereg analiz przeprowadzonych na nowotworowych liniach komórkowych, drugi zaś, to prace prowadzone *in vivo* na myszach z indukowanym guzem glejaka. Na załączonych 39 rycinach oraz wykresach przedstawiono kolejne etapy badań, z których do najistotniejszych obserwacji należy zaliczyć:

- wykazanie ekspresji wszystkich receptorów z rodziny P2 w badanych ludzkich liniach komórkowych glejaków, w tym również receptora P2X7,
- prokancerogenną aktywność funkcjonalną tegoż receptora w poszczególnych liniach glejaków, przy czym większość analiz dotyczyła komórek glejaka C6,
- wykazanie potencjalnego udziału *in vivo* receptora P2X7 we wzroście i przerzutach guzów nowotworowych, a także wpływu na szereg procesów związanych z progresją nowotworową.

Wielce przydatne do osiągnięcia celów badawczych było zastosowanie specyficznego agonisty receptora P2X7 - BzATP oraz siRNA w doświadczeniach *in vitro* na linii C6, co pozwoliło wykazać udział receptora w intensyfikacji metabolizmu komórkowego z jednoczesnym wzrostem ilości białek CD133, HSPA1, HSPA5 i zmianie aktywności kinaz Akt i p38 regulujących cykl komórkowy. Ponadto aktywacja receptora P2X7 promowała adhezję komórek, depolaryzację mitochondriów i zwiększała produkcję reaktywnych form tlenu.

Zastosowanie natomiast w badaniach prowadzonych *in vivo* specyficznego inhibitora - BBG pozwoliło na potwierdzenie głównej hipotezy, wskazującej na udział P2X7 w rozwoju glejaka C6 poprzez kształtowanie mikrośrodowiska guza, modulację odpowiedzi immunologicznej oraz regulację ekspresji markerów stanu zapalnego. Blokowanie aktywności receptora zmniejszało uwalnianie ATP oraz hamowało szlaki sygnalizacyjne promujące przeżywanie komórek nowotworowych. Zmieniał się także profil ekspresji białek związanych z progresją nowotworu takich, jak CD133, HSPA1, HSPA5, Akt, p38, NOS-2 oraz N-kadheryny, wimentyny i β -kateniny, 3 białek związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym.

Szczególnie interesująco została poprowadzona dyskusja otrzymanych wyników opisana na 21 stronach, którą muszę przyznać czytałam z dużym zaciekawieniem. W toku prac Autor uzyskał wiele kontrowersyjnych obserwacji, jednak godna podziwu jest systematyczna i dogłębna analiza każdej z nich, w oparciu o dostępną literaturę. Zastanawiam się tylko, czy wszystkie pozycje literaturowe (406) zebrane na 25 stronach faktycznie należało zacytować. Ponadto z treści dyskusji wynika, iż Doktorant jest bardzo dobrze wprowadzony w temat i doskonale zna literaturę dotyczącą dość szerokiego i skomplikowanego zagadnienia, jakim jest biologia glejaka. Przy tak dużej wiedzy wartym podkreślenia jest dość ostrożne i wyważone wnioskowanie płynące z otrzymanych wyników. Myślę, że taka dociekliwość w wyjaśnianiu nieoczekiwanych wyników oraz próby

znalezienia obiektywnej odpowiedzi stanowią bardzo dobrze rokujące cechy młodego naukowca.

Z obowiązku recenzentki muszę wspomnieć o kilku zauważonych nieścisłościach oraz uwagach do rozprawy, a mianowicie:

1. Uwaga ogólna dotycząca stylu:

- Autor ma wyraźną awersję do akapitów, choć jest to wygodna i powszechnie stosowana forma oddzielania wątków czy tematów,
- zrozumienie tekstu bywało czasem trudne, ze względu nadaktywną interpunkcję,
- zauważyłam tendencję do nadmiernego stosowania pewnych zwrotów, np. „co więcej” chociażby we Wstępie zostało użyte 28 razy,
- nieprawidłowe sformułowanie „wolne jony wapnia” - jony wapnia są zawsze wolne.

2. W wykazie skrótów:

- Autor stosuje podwójną nomenklaturę dla ATP i pochodnych: trójfosforan lub trifosforan,
- oxATP to chyba nie jest jednak nadjodan.

3. Wstęp:

- (str. 22) witamina A to nie jest kwas retinodiowy; retinoidy to cała grupa substancji, do których należą m.in. formy witaminy A – retinol, retinol i kwas retinowy,
- (str.31) kwas arachidonowy nie jest substratem dla syntezy cyklooksygenazy, tylko cyklooksygenaza produkuje prostaglandyny z kwasu arachidonowego.

4. Metodyka/Wyniki

- brak informacji o użytej linii LW-229 (pojawia się na str.82),
- (str. 64) podany jest wzór na oznaczanie potencjału redukcyjnego glutationu, i.e. proporcji GSH/GSSG, stosowanego często jako wskaźnik poziomu produkcji RFT przez mitochondria. Natomiast w Roz.4.34 przedstawiono oznaczenia GSSG/GSH,
- (str.89,90) typy kolagenu przyjęto zapisywać cyframi rzymskimi; warto może byłoby oprócz adhezji zbadać migrację komórek?
- w Metodach brak opisu oznaczania kaspazy 3 oraz markerów autofagii (roz. 4.24)
- ryc.4.28 -4.31 brak oceny statystycznej

Przy tak bogatym zestawie wyników o niezwykle istotnym znaczeniu nie tylko poznawczym, lecz potencjalnie użytecznym diagnostycznie, powyższe uwagi dotyczące niezbyt zręcznych sformułowań stylistycznych, błędów napotkanych w tekście oraz pozostałe komentarze są natury edytorskiej i nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Jeśli bowiem Doktorant chciał przedstawić przesłanki, że warto się zająć receptorem P2X7, to w pełni się to udało.



Podsumowując, w mojej ocenie mgr Damian Matysiński podjął bardzo ciekawy i ważny temat, zrealizował postawione sobie cele badawcze, a zastosowanie różnorodnych technik świadczy o znakomitym opanowaniu warsztatu badawczego. Sposób analizy wyników, wnioskowanie oraz przedstawione hipotezy świadczą o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630), dlatego z przyjemnością przedstawiam wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Damiana Matysińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Zylus

Kraków, 27.04.2022



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział
Biochemii,
Biofizyki i
Biotechnologii

prof. dr hab.
Jarosław Czyż

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Matyśniaka pt.:
„Rola receptora P2X7 w biologii glejaka”

Promocja i progresja nowotworów, w tym glejaka (wielopostaciowego) regulowana jest przez złożony system interakcji między komórkami nowotworowymi i ich mikrośrodowiskiem (niszą). Interakcje te zachodzą za pośrednictwem mediatorów o charakterze fizycznym i chemicznym należących do kilku przynajmniej kategorii i działających na różnych dystansach (zarówno w czasie, jak i w przestrzeni). Elementem kluczowym dla komunikacji komórek z ich mikrośrodowiskiem jest tzw. kompleks powierzchniowy komórek, czyli konglomerat receptorów i białek efektorowych strukturalnie i funkcjonalnie związanych z błoną komórkową i cytoszkieletarnym korteksem podbłonowym. Stanowi on dla komórek „okno na świat”, pozwalając na wysyłanie i odbiór różnorodnych bodźców z i do komórki. Mimo, że sporo już wiadomo o zaangażowaniu białek kompleksu powierzchniowego w rozwoju nowotworów, w tym glejaka, nasza wiedza na ten temat jest wciąż fragmentaryczna. Dotyczy to w szczególności receptorów nukleotydowych, co związane jest z pleiotropowością ich aktywności i funkcji w komórkach, a także złożonością mechanizmów kontroli ich aktywności. Rozprawa doktorska Pana Damiana Matyśniaka obejmuje nowe, dotychczas niepoznane aspekty funkcji białka P2X7 i jego znaczenia biologicznego, jako jednego z elementów kompleksu powierzchniowego komórek glejaka, i jego roli w regulacji fenotypu, lekooporności i złośliwości komórek glejaka. Biorąc pod uwagę znaczenie glejaka, jako problemu społecznego i terapeutycznego oraz poznaną i potencjalną rolę receptorów nukleotydowych w biologii glejaka, dobór tematyki pracy należy uznać za w pełni uzasadniony i wpisujący się w aktualne trendy badawcze.

Rozprawa ma rozkład i objętość typowe dla tego typu prac; choć jest stosunkowo obszerna, ponieważ liczy ona aż 168 stron. Zawiera 44 ryciny oraz kilka tabel. Rozprawę rozpoczynają dobrze skomponowane i syntetyczne w formie streszczenia w języku polskim i angielskim, po których następuje spis treści i lista skrótów, a kończy bardzo obszerna bibliografia licząca ok. 380 pozycji (zarówno oryginalnych prac doświadczalnych, jak i artykułów przeglądowych). Rozprawa została napisana dobrą, żywą i przystępną polszczyzną, ryciny są czytelne przez co całość jest łatwa w odbiorze. Z drugiej

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 6146

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

strony zwraca uwagę stosunkowo duża liczba błędów literowych i interpunkcyjnych, która wykracza ponad wartości średnie dla tego typu opracowań. Usterki te nie mają jednak większego wpływu na ogólnie pozytywny odbiór estetyki całości pracy.

32-stronicowy Wstęp rozprawy rozpoczyna się od dywagacji Autora na temat znaczenia nukleotydów w świecie żywym, w które wpisał on autorską kompilację teorii dotyczących początków życia na Ziemi i ewolucji receptorów nukleotydowych. Te efektowne i wciągające rozważania stanowią tło dla bardziej szczegółowego opisu rodziny receptorów nukleotydowych i w pełni już detalicznego omówienia struktury, wariantów i mechanizmów aktywacji/deaktywacji receptora P2X7. Kolejne części Wstępu zostały poświęcone zagadnieniom związanym z funkcją receptora P2X7. W szczególności dotyczą one roli P2X7 w regulacji struktury i funkcji barierowej błony komórkowej. Po tym następuje opis zaangażowania tego białka w regulację fizjologii całej komórki, w tym cyklu komórkowego, apoptozy i wydzielania komórkowego (związanego m.in. ze stanem zapalnym). Rozdział ten spuentowany został opisem zagadnień odnoszących się bezpośrednio do tematu pracy, a przede wszystkim szczegółowym odniesieniem do roli P2X7 w regulacji fizjologii komórek nowotworowych. Ta część rozprawy zawiera spory ładunek informacyjny, dodatkowo wspomagany kilkoma ilustratywnymi rycinami. Ja już wspomniałem, zaczyna się bardzo efektownie, choć pod koniec Autor jakby tracił narracyjny impet, a opis zaangażowania P2X7 w rozwój nowotworów mógłby być bardziej syntetyczny. Przygotowując Wstęp rozprawy Autor nie ustrzegł się też pewnych nieścisłości. Na przykład odnosząc się do paneksyny-1 (Pan1; str. 27), uznał on to białko za kanał, podczas gdy kanał transmembranowy zbudowany z Panx1 jest heksa- lub oktametrem. Ponadto diagram opisujący tworzenie porów przez P2X7 ułatwiłby percepcję tego fragmentu tekstu. Jednak dobór faktów i rozłożenie akcentów w tej części rozprawy wskazuje, że Doktorant swobodnie porusza się w tematyce związanej z rozprawą, a sam Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w szczegółowe cele pracy, co razem składa się na jednoznacznie pozytywną ocenę tej części rozprawy.

Po sprecyzowaniu Celów pracy, Doktorant opisał metodykę przeprowadzonych doświadczeń. Spektrum wykorzystanych w pracy i opisanych w rozdziale Materiały i Metody technik doświadczalnych jest szerokie: od analizy żywotności, aktywności metabolicznej, proliferacji komórek i integralności ich błon, przez bardziej szczegółowe analizy mechanizmów śmierci komórkowej, szybkości adhezji, intensywności fali wapniowych i statusu mitochondriów oraz przepływów ATP po, z natury rzeczy skomplikowane, czaso- i materiałochłonne analizy in vivo. Dodatkowo badania in vivo rozszerzone zostały o niestandardowy pakiet analiz funkcjonalnego statusu guzów, w tym statusu metabolicznego, obecności komórek macierzystych i potencjału metastatycznego guzów. Użycie tak szerokiego wachlarza wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Doktoranta, a warstwa metodyczna rozprawy zasługuje na bardzo wysoką ocenę.

Wysoko też oceniam przesłanie, treść i formę rozdziałów, w których zostały opisane wyniki przeprowadzonych w ramach rozprawy doświadczeń. Na tę część rozprawy składają się 3 zasadnicze bloki tematyczne. W pierwszym z nich opisane zostały wyniki badań poziomów białka P2X7 w komórkach

kilku modelowych linii glejaka. Jednoznacznie wykazały one, że o ile ekspresja tego białka jest dość powszechna w komórkach glejaka, o tyle tylko w komórkach niektórych linii (w tym linii C6) białko to jest w pełni funkcjonalne. Z jednej strony pokazuje to heterogenność komórek glejaka i niejednoznaczność biologicznego znaczenia białka P2X7. Z drugiej zaś definiuje komórki C6, jako model komórkowy dogodny dla analiz funkcji P2X7 w rozwoju nowotworów.

W kolejnej części opisu wyników Autor skoncentrował się głównie na wpływie białka P2X7 na fenotyp komórek C6. Wykorzystując modulatory chemiczne tego białka (BzATP i BBG) oraz techniki wyciszania jego ekspresji z wykorzystaniem siRNA udało się m.in. stwierdzić zaangażowanie tego białka w regulację szybkości ekspansji, inwazyjności i lekooporności komórek C6, które skorelowane jest z ich zdolnością do generowania komórek CD133⁺ i aktywacją szlaków zależnych m.in. od Akt i p38. W kontekście możliwych zastosowań klinicznych modulatorów aktywność P2X7, obiecujące było też wykazanie wpływu hamowania funkcji tego białka na status fizjologiczny mitochondriów. Wyniki te, udokumentowane w wszechstronny sposób, są wewnątrznie spójne i nie wzbudzają wątpliwości. Z drugiej strony zamieszczenie na Rycinie 4.8 zdjęć o wyższej rozdzielczości, ew. uzupełnionych o analizy struktury cytoszkieletu, pomogłoby w ocenie zmian morfologii i szybkości adhezji komórek. W pracy brakuje też bardziej bezpośrednich analiz proliferacji komórek. Wykorzystane techniki, w tym analizy wbudowywania bis-benzimidu i pomiaru ilości białek wyznakowanym fioletem krystalicznym dają pośrednie wyniki, których korelacja z liczbą komórek nie jest oczywista i może być zaburzona np. przez hipertrofię komórek lub/i blok G₂/M. Krzywe wzrostu komórek rozwiązałyby w sposób prosty ten problem. Ponadto niektóre sformułowania wydają się niezręczne, np. określenie „wyniki istotne statystycznie”. Statystycznie istotne mogą być różnice między próbką a kontrolą.

Całość opisu wyników została spuentowana opisem rezultatów badań *in vivo*. Autor w przekonujący sposób wykazał, że zahamowanie aktywności P2X7 obniża potencjał neoplastyczny komórek linii C6, mierzony m.in. kinetyką wzrostu masy guzów, ich obrazami histopatologicznymi i poziomami markerów inwazyjności komórek. Również tutaj nie ustrzegł się on paru nieścisłości, np. koneksyna (Cx43) raczej kojarzy się ze złączami szczelinowymi, niż „ściślymi” (str. 100). Z drugiej strony należy docenić bardzo wszechstronne podejście metodyczne do oceny próbek biologicznych, które przełożyło się na wszechstronny opis konsekwencji działania P2X7 *in vivo*. Oceniając formę całości opisu wyników warto na koniec zauważyć, że jest on z jednej strony zwięzły, a z drugiej przystępny; generalnie łatwo dało się uchwycić ciągi przyczynowo-skutkowe, którymi Autor kierował się wykonując kolejne doświadczenia.

Reasumując, wartość metodyczną i merytoryczną eksperymentalnej części pracy należy ocenić wysoko, a sposób opisu wyników pracy świadczy o bardzo dobrej orientacji Autora w zagadnieniach będących jej przedmiotem. Wagę uzyskanych wyników dodatkowo potwierdzają wątki interpretacyjne, które znalazły opis w liczącej 22 strony Dyskusji otrzymanych wyników. Jej struktura została oparta o podstawowe cele pracy, które wraz z najważniejszymi obserwacjami poczynionymi w trakcie pracy, stanowią podstawę kilku podrozdziałów. Ten zabieg znacząco ułatwił lekturę tej części pracy już choćby

dlatego, że najwyraźniej aktualne dane literaturowe na ten temat dalekie są od jednoznaczności. Uzyskane przez Autora wyniki jasno wskazują na rolę P2X7 w regulacji fenotypu komórek C6 zarówno in vitro, jak i in vivo. Regulacja ta zachodzić może na różnych poziomach, w tym związanych z regulacją proliferacji komórek, ich podatności na apoptozę, zmianami inwazyjności i lekooporności. Z drugiej strony, lektura tej części pracy nasunęła mi kilka pytań, do których chciałbym, aby Autor odniósł się w czasie obrony:

- czy obserwowane zmiany statusu funkcjonalnego mitochondriów wynikają z indukcji stresu oksydacyjnego czy są one pochodną aktywacji szlaków zależnych od ROS? Innymi słowy: na ile mamy tu do czynienia z rzeczywistym stresem a na ile z „fizjologiczną” aktywacją szlaków zależnych od ROS?

- skąd bierze się stosunkowo wysoka reaktywność komórek U-251 na Kn-62, u których jednocześnie stwierdzono bardzo niskie poziomy P2X7?

- czy w swoich badaniach Autor obserwował bardziej trwale zmiany fenotypu komórek, np. po usunięciu inhibitorów/aktywatorów P2X7? Mogłyby one wskazywać na udział P2X7 w adaptacyjnych reakcjach komórek linii C6, które prowadzą do zmiany wzoru rozwoju guzów zbudowanych z tych komórek in vivo w wyniku działania inhibitorów ich funkcji kanałowej;

- czy obraz histopatologiczny guzów rozwijających się w myszach „kontrolnych” (jak również spadek poziomów P2X7 po zadziałaniu inhibitora) może sugerować, że obecność P2X7 może wspomagać mikroewolucję (selekcję) komórek o wyższej inwazyjności, a hamowanie aktywności tego białka daje efekt odwrotny?

Pytania te mają wymiar wyłącznie uzupełniający i nie umniejszają wagi wyników uzyskanych przez Autora. Wykorzystując wszechstronne i wzajemnie komplementarne techniki biologii komórkowej i molekularnej in vitro i in vivo, Autor rozprawy wykazał/potwierdził kluczową rolę receptora P2X7 w promocji i progresji glejaka. Niezależnie od szeregu pytań, które wciąż wymagają odpowiedzi, uważam że badania podjęte w ramach rozprawy i uzyskane wyniki tworzą przyczynek do głębszego poznania molekularnych mechanizmów rządzących komunikacją komórek glejaka z mikrośrodowiskiem, ich lekoopornością i inwazyjnością komórek glejaka. Ze względu na swoją lokalizację i „nie-nabłonkowe” pochodzenie glejaki cechują się odmiennym od innych nowotworów przebiegiem rozwoju i zestawem mechanizmów promocji i progresji. Ekspansja glejaków obserwowana jest prawie wyłącznie w obrębie otaczającej tkanki nerwowej, a ich umiejscowienie utrudnia lub wręcz uniemożliwia ich całkowitą chirurgiczną resekcję. Przez to średni czas przeżycia pacjenta od rozpoznania u niego glejaka pozostaje od wielu lat praktycznie niezmienny. Badania opisane w rozprawie wpisują się w wysiłki na rzecz opracowania nowych strategii wspomagających tradycyjne metody leczenia nowotworów mózgu. Jako takie, są one kluczowe zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona do oceny praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie wniosek

o dopuszczenie Pana mgr Damiana Matysiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na potencjalne znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, wszechstronność wykorzystanych technik doświadczalnych, a także fakt opublikowania danych zawartych w rozprawie w dwóch publikacjach doświadczalnych, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

(Jarosław Czyż)



Kraków 4.05.2022

Prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa
Zakład Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
e-mail: nalepa@if-pan.krakow.pl

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr DAMIANA MATYŚNIAKA

pt. „Rola receptora P2X7 w biologii glejaka”

wykonanej w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN,
pod kierunkiem promotora – dr hab. Pawła Pomorskiego, prof. IBD PAN
oraz opieką promotora pomocniczego – dr Viry Chumak

Przedmiot rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pana mgr Damiana Matyśniaka opisuje wyniki badań, których bezpośrednim celem była analiza ekspresji i ocena funkcji jonotropowego receptora nukleotydowego, P2X7, w trzech liniach komórkowych glejaków ludzi (U-138, U-251, LN-229) oraz w jednej linii komórkowej glejaka szczura (C6). Występowanie receptora P2X7 jest szeroko rozpowszechnione, jego obecność obserwuje się w komórkach różnych gatunków, gdzie odgrywa rolę w wielu ważnych fizjologicznych procesach, między innymi w regulacji stanu zapalnego, w procesach bólowych oraz indukcji śmierci komórkowej. Receptor ten występuje dość powszechnie w układzie nerwowym, zarówno na komórkach nerwowych jak i komórkach glejowych. Jest zaangażowany w stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, w których procesy zapalne odgrywają zasadniczą rolę, jak na przykład w stwardnieniu rozsianym. Pod względem strukturalnym / molekularnym, receptor P2X7 zaliczany jest do kationowych kanałów jonowych, którego aktywacja przez naturalny ligand – zewnątrzkomórkowy ATP, umożliwia napływ jonów wapnia do komórki. Taka funkcja P2X7 oraz znaczenie ATP i



jonów wapnia dla funkcji życiowych i metabolizmu komórki uzasadniają z jednej strony „wszędobylstwo” tego receptora, a z drugiej są powodem dla którego P2X7 znajduje się w kręgu zainteresowania badaczy reprezentujących różne dyscypliny naukowe. Białko P2X7 występuje także w komórkach nowotworowych, jednak jego wpływ na progresję nowotworów, jak Doktorant słusznie zauważa, nie jest jednoznacznie określony w literaturze dotyczącej tego zagadnienia, gdzie opisywano zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ aktywności P2X7 na rozwój nowotworów. W świetle powyższych danych, z uwagi na istnienie rozbieżności oraz fakt, że w przypadku glejaka wielopostaciowego funkcja receptora P2X7 jest wciąż słabo poznana, tematyka pracy wydaje się jak najbardziej aktualna. Doktorant podjął się wykonania dogłębnej analizy roli receptora P2X7 w glejaku wielopostaciowym w warunkach *in vitro* i *in vivo*, i podjęcie tego tematu zostało dobrze uzasadnione. Ponadto, oceniana rozprawa doktorska dotyczy zagadnienia niezwykle ważnego nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale także potencjalnego praktycznego / medycznego wykorzystania uzyskanych wyników do opracowywania różnych modeli badawczych gliomy, które mogą znaleźć zastosowanie w prognozowaniu efektywności terapii, przy ocenie oporności bądź podatności na leki przeciwnowotworowe.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 168 stron ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz liczący 29 stron Wstęp, zawierający 5 głównych podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po Wstępie, jako osobny rozdział Doktorant zamieścił założenia, cel główny oraz cele szczegółowe rozprawy, a następnie opis materiałów i metod, podzielony na 16 głównych podrozdziałów (20 stron). Wyniki, liczące 42 strony podzielone zostały na 34 podrozdziały, z których 18 dotyczy opisu wyników badań *in vitro* wykonanych na liniach komórkowych glejaków, a 16, badań określonych przez Autora jako *in vivo*. Te ostatnie, w mojej opinii, należałoby raczej określić jako eksperymenty *ex vivo* ponieważ obejmują wyniki badań z wykorzystaniem tkanki guza, którego wzrost był wprawdzie wyindukowany *in vivo* u myszy, ale po uśmierceniu zwierzęcia guz był wyizolowany i przeznaczony do dalszych badań. Następująca po tym rozdziale Dyskusja obejmująca 21 stron i podzielona na 10 mniejszych podrozdziałów omawia najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Praca doktorska pana mgr Damiana Matysiaka kończy się



syntetycznym podsumowaniem i wnioskami, rozdziałem obejmującym spis piśmiennictwa oraz wykazem publikacji Doktoranta, w których częściowo zostały już opublikowane wyniki przedstawione w ocenianej dysertacji. Na podkreślenie zasługuje fakt dużej liczności pozycji piśmiennictwa cytowanego w rozprawie. Wprawdzie Autor ich nie ponumerował, ale przy średniej 16 prac / stronę A4 i 25 stronach, które ten rozdział zajmuje, łatwo można wyliczyć iloczyn = 400 zacytowanych prac, co jest wynikiem niezbyt często spotykanym w rozprawach doktorskich.

Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy jest napisany w sposób przystępny i interesujący, równocześnie omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia celów rozprawy jak i uzyskanych wyników. Pierwszy podrozdział zatytułowany „*ATP jako jedna z ważniejszych cząsteczek w historii życia*” nawiązuje do prehistorii początków życia na ziemi i roli jaką odegrało ATP już we wczesnych stadiach ewolucji organizmów żywych. W kolejnych podrozdziałach została omówiona w sposób szczegółowy rodzina receptorów nukleotydowych składająca się z podrodziny P1 do której należą receptory stymulowane przez adenozyne oraz podrodziny P2 grupującej dwie zróżnicowane podrodziny receptorów nukleotydowych, metabotropowe receptory P2Y oraz receptory P2X, pełniące rolę kanałów jonowych. Obok budowy receptorów poszczególnych podrodzin omówiono także szlaki sygnalizacyjne uruchamiane w komórce w konsekwencji stymulacji receptorów wszystkich podrodzin. Szczególną uwagę poświęcono receptorowi P2X7, omawiając między innymi strukturę kodującego go genu, strukturę białkową i modyfikacje potranslacyjne jakim ten receptor może podlegać oraz proces regulacji jego aktywności. Dwa obszerne podrozdziały Wstępu opisują kolejno funkcję i fizjologię receptora P2X7 w komórkach prawidłowych oraz receptor P2X7 w komórkach nowotworowych różnego typu nowotworów. Rozdział Wstępu zawiera ponadto 4 ryciny przedstawiające kolejno schemat sygnalizacji nukleotydowej w komórce, kladogram pokrewieństwa receptorów z rodziny P2X, w postaci drzewa filogenetycznego, strukturę funkcjonalnego trimery P2X7 oraz graficzne przedstawienie możliwych wariantów alternatywnego składania tego receptora.. Zostały zamieszczone także dwie tabele przedstawiające zestawienia aktywności agonistów i efektywności antagonistów receptora P2X7 obserwowane w zależności od badanego gatunku.



W mojej opinii lektura Wstępu bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia opisywane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej. Mam tutaj tylko dwie drobne uwagi, które z obowiązku recenzenta przedstawiam:

1. w legendzie do Tabeli 1.1 (str. 27) użyto dość niefortunne sformułowanie „IC50 oznacza medialne stężenie inhibitora...”, które dla mnie bardziej kojarzy się z mediami niż ze średnią wartością z pomiarów.
2. użyty na str. 31 termin „alarmina”, który jest pojęciem nie do końca precyzyjnym, powinien być krótko objaśniony w użytym kontekście.

Cele rozprawy zostały jasno sprecyzowane i zamieszczone jako osobny rozdział. Jako główny cel pracy Doktorant postawił sobie „zbadanie roli receptora P2X7 w komórkach szczurzego i ludzkiego glejaka wielopostaciowego w modelu *in vitro* i *in vivo*.” Dodatkowo sformułowano 6 zadań badawczych, które wskazują cele szczegółowe i dobrze odzwierciedlają kierunki badań podjętych w dalszej części dysertacji. Pierwsze trzy zadania, ukierunkowane na eksperymenty *in vitro* dotyczyły (i) analiz ekspresji genów kodujących receptory nukleotydowe z rodziny P2 w glejakach wielopostaciowych, (ii) funkcjonalności receptora P2X7 oraz jego wpływu na fenotyp komórek glejaków wielopostaciowych oraz (iii) analizy sygnału wapniowego i wybranych ścieżek sygnałowych w komórkach szczurzego glejaka C6 po obniżeniu ekspresji receptora z wykorzystaniem małego interferującego RNA. Kolejne 3 zadania miały na celu (iv) analizę mechanizmu agresywności szczurzego glejaka C6 w modelu *in vivo*, (v) analizę ścieżek sygnałowych zaangażowanych w zwiększoną przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego oraz (vi) analizę wpływu receptora P2X7 na mikrośrodowisko guza. Tak jak już powyżej wspomniałam, uważam, że bardziej adekwatne (niż *in vivo*) określenie do tej części badań, a przynajmniej do zadań nr (v) i (vi), to eksperymenty *ex vivo* lub *post in vivo*.

Materiały i Metody – stanowią obszerny rozdział zawierający opisy użytych modeli badawczych i wszystkich zastosowanych metod, w tym prowadzenia hodowli linii komórkowych, procedur wszczepiania guzów u myszy, metod pracy z kwasami nukleinowymi i białkami, metody wyciszania genów przy pomocy siRNA i technik transfekcji komórek, analizy histologicznej i technik obrazowania komórek. Opisano szereg testów służących do oceny procesów życiowych komórki, w tym pomiar sygnału wapniowego, wyznaczanie tempa podziałów komórkowych, analizę przeżywalności i śmiertelności komórek i innych licznych zastosowanych technik biochemicznych, będących wieloetapowymi procedurami. Nie jest moim zamiarem wymienianie wszystkich tych



metod, ale zdecydowanie należy podkreślić ich różnorodność i kompleksowość. W tym rozdziale zamieszczono także 4 tabele pokazujące sekwencje nukleotydowe użytych starterów w reakcji RT-PCR, przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe do immunodetekcji analizowanych białek i wykaz przeciwciał stosowanych w immunofluorescencji oraz cytometrii przepływowej. Rozdział został napisany w sposób systematyczny i wystarczająco dokładny, aby wykazać bardzo dobre opanowanie przez Doktoranta bogatego warsztatu metodycznego. Zastosowane procedury wymagały dużego nakładu pracy ze względu na stopień skomplikowania i czasochłonność. Doktorant prawidłowo wybrał i opisał metody statystyczne, których zastosowanie umożliwiło odpowiednią analizę danych i uzyskanie wiarygodnych wyników. Nie mam krytycznych uwag do tego rozdziału. Recenzowaną pracę oceniam wysoko pod względem metodycznym.

Wyniki są najobszerniejszym rozdziałem rozprawy. Uzyskane wyniki przedstawiono na 39., często złożonych rycinach, z których część stanowią zdjęcia analiz białek metodą western blot, zdjęcia z mikroskopu konfokalnego i wykresy obrazujące populacje komórkowe analizowane cytometrycznie. Ryciny cechuje przejrzysta konstrukcja, są prawidłowo i wystarczająco szczegółowo opisane. Rozprawa doktorska dostarczyła wielu interesujących informacji. Pierwsza część rozdziału opisuje wyniki uzyskane z doświadczeń na komórkach glejaków. Doktorant w pierwszej kolejności zbadał ekspresję mRNA genów kodujących receptory rodziny P2 i wykazał obecność transkryptów wszystkich receptorów z podrodzin P2X i P2Y w badanych ludzkich liniach glejaka wielopostaciowego. We wszystkich badanych liniach wykryto także białko receptora P2X7, równocześnie obserwując, że ilości transkryptów i białka receptorowego były zróżnicowane w poszczególnych liniach komórkowych glejaka, co jak proponuje autor rozprawy, może być związane, między innymi, ze stopniem złośliwości guza z którego wyprowadzono linie komórkowe. Kolejnym etapem analiz była próba scharakteryzowania funkcji receptora P2X7 w badanych liniach glejaka wielopostaciowego. W pierwszej kolejności Doktorant zbadał wpływ stymulacji receptora P2X7 syntetycznym agonistą – BzATP na pojawienie się sygnału wapniowego w komórkach szczurzego glejaka C6 oraz ludzkich linii U-251 i U-138 i stwierdził różnice w intensywności sygnału wapniowego w badanych liniach. Analizując ten wynik Doktorant postuluje, że różnice w odpowiedzi wapniowej dwóch ludzkich linii glejaka mogą świadczyć o wstępowaniu alternatywnych wariantów składowania w genach kodujących P2X7, które w sposób zróżnicowany odpowiadają za intensywność sygnału wapniowego. Zasadność tego postulatu została poparta danymi z cytowanego



piśmiennictwa wskazującymi, że w komórkach linii U-138 występuje tylko jeden wariant składania - P2X7B. Oprócz aktywności kanałowej w komórkach glejaków, zbadano również tworzenie przez białko receptora P2X7 pora w błonie i stwierdzono zwiększone wnikanie jodku propidyny po stymulacji receptora P2X7 w komórkach glejaka C6 szczura oraz ludzkim glejaku U-251. W kolejnym etapie analizowano wpływ aktywacji receptora P2X7 na śmierć komórek glejaków. Analiza morfologiczna, wyniki testu dehydrogenazy mleczanowej oraz cytometryczna ocena apoptozy wskazały na brak aktywności proapoptotycznej receptora P2X7 w badanych komórkach. Natomiast aktywacja P2X7 prowadziła do stymulacji proliferacji komórek glejaka C6. Ten ostatni wynik przyczynił się do podjęcia przez Doktoranta badań nad wpływem aktywacji lub zahamowania receptora P2X7 na przeżywalność komórek podczas terapii opartej na lekach cytostatycznych (takich jak karmustyna). Zastosowanie kombinacji leku cytostatycznego oraz inhibitora P2X7 powodowało spadek liczby komórek i ten efekt był silniejszy niż obserwowany po rozłącznym podaniu cytostatyku lub inhibitora P2X7. W kolejnym etapie badań dotyczących efektów stymulacji tego receptora, Doktorant wykazał że P2X7 odgrywa także rolę w regulacji aktywności metabolicznej glejaka C6 oraz wpływa na produkcję wolnych rodników i stan mitochondriów. Spośród innych interesujących wyników, należy wymienić opisanie wpływu receptora P2X7 na aktywację ścieżek sygnałowych kinaz AKT i p38, białek szoku cieplnego oraz markerów nowotworowych komórek macierzystych. Ponadto, analiza funkcji receptora P2X7 została poszerzona o opisanie jego roli w procesie adhezji komórek glejaka C6 do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wpływie na wydzielanie ATP do pożywki hodowlanej. Należy zauważyć, że ta ostatnia obserwacja może być przydatna i wykorzystana przy planowaniu eksperymentów dotyczących oceny efektów aktywacji różnych receptorów z rodziny P2X.

W pozostałych częściach Wyników Doktorant skupił się na badaniach funkcji receptora P2X7 w procesie wzrostu i przerzutach guzów nowotworowych, analizując aktywność ścieżek sygnałowych, które wykryto w modelu komórkowym. Po pierwsze stwierdził, że receptor P2X7 wpływa na wzrost i przerzuty guzów nowotworowych, gdyż podanie zwierzętom inhibitora receptora P2X7, BBG (Briliant Blue G), w okolicy miejsca wszczepienia komórek glejaka C6 wpływało znacząco na zmniejszenie powstających guzów nowotworowych. Po drugie, w wyizolowanych guzach potwierdzono możliwość regulacji przez receptor P2X7 (*in vivo* / *ex vivo*) ścieżek sygnałowych AKT, p38, białek szoku cieplnego oraz markerów nowotworowych komórek macierzystych. Stwierdzono, że



aktywacja P2X7 wpływa na markery przejścia epitelialno-mezenchymalnego, a także ma znaczenie dla mikrośrodowisku guza i wpływa na potencjał redox *in vivo*.

Mam jednak tutaj pytanie dotyczące ostatniej części wyników. Badając wpływ receptora P2X7 na równowagę oksydoredukcyjną w guzie, pokazano (na ryc. 4.39) wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7 (przez jego inhibitor) na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w guzach kontrolnych oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7. Czy niewielki (7 %) spadek aktywności SOD (zaznaczony na rycinie jako różnica statystycznie znamienne) może mieć zdaniem autora fizjologiczne znaczenie / fizjologiczne konsekwencje? Prosiłabym tutaj o komentarz, którego zabrakło mi w tekście rozprawy.

Dyskusja. Sposób poprowadzenia dyskusji rozprawy doktorskiej pokazuje, iż mgr Damian Matyśniak posiada dużą wiedzę i zdolność trafnego podsumowania własnych wyników na tle istniejącej wiedzy. Uzyskane wyniki dostarczają licznych dowodów na regulację rozwoju glejaka wielopostaciowego przez receptor nukleotydowy P2X7 w szczurzych i ludzkich modelach komórkowych. Wyniki mają nowatorski charakter i wnoszą do nauki istotne wartości. Pomimo dużej ilości wyników Dyskusja jest dobrze osadzona w uzyskanych danych. Zarówno przy czytaniu Dyskusji jak i całej dysertacji można zauważyć utrzymywanie przez Doktoranta dyscypliny logistycznej, którą określiłabym jako dyscyplinę „przyczynowo – skutkową”, zastosowaną przy pisaniu rozprawy, co spowodowało, że czytanie tekstu dysertacji było dla mnie nie tylko obowiązkiem, ale także przyjemnością. Rozprawa została zakończona podsumowaniem i wnioskami, wskazującymi wyraźnie iż cele rozprawy zostały osiągnięte. Ponadto, zgadzam się ze stwierdzeniem Doktoranta, że w przedstawionej rozprawie „po raz pierwszy usystematyzowano wyniki wskazujące na promujący wpływ receptora na proliferację komórek glejaka *in vitro* i jednocześnie pokazano korelację ze wzrostem guzów nowotworowych *in vivo*.”

Ocena edytorskiej strony rozprawy: Oceniana rozprawa ma dopracowaną szatę graficzną i, co warto podkreślić, w całości jest opracowana bardzo starannie. Tekst rozprawy został napisany w sposób klarowny, i nie budzi zastrzeżeń pod względem poprawności językowej. Doktorantowi udało się zdecydowanie uniknąć większej liczby błędów edytorskich, chociaż pojedyncze jednak zauważyłam: w legendzie ryciny 4.39 figuruje powtórzenie słowa „...zahamowania receptora aktywności receptora P2X7”; z kolei zdanie na str. 88 u dołu,



zostało niezręcznie sformułowane („Aby uniknąć korzystania z agonistów i antagonistów, wykorzystano obniżenie ilości receptora P2X7 z wykorzystaniem małego interferującego RNA.)).

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Damiana Matyśniaka oceniam wysoko. Przeprowadzone doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane. Rozprawa zawiera interesujące wyniki, które noszą cechy odkryć naukowych. Doktorant wykazał się odpowiednią wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych. Poprawny styl i logiczny układ dysertacji, odpowiednio cytowana literatura, sposób przedstawienia i omówienia wyników wskazują na dobre opanowanie przez Doktoranta warsztatu pracy naukowej. Przytoczone powyżej nieliczne niedopatrzenia edytorskie nie mają wpływu na wartość naukową ocenianej rozprawy i nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny. Ponadto wyniki stanowiące podstawę rozprawy zostały już częściowo opublikowane w dwóch pracach (w *Acta Biochimica Polonica* oraz w *Purinergic Signalling*), w których Doktorant jest pierwszym autorem.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Rola receptora P2X7 w biologii glejaka” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Damiana Matyśniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość pracy, której wyniki zostały już opublikowane w renomowanych czasopismach, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Irena Nalepa