

Damian Matyśniak

Rola receptora P2X7 w biologii glejaka

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
dr hab. Paweł Pomorski, profesor Instytutu
Biologii Doświadczalnej PAN
PROMOTOR POMOCNICZY:
dr Vira Chumak

Warszawa, 2022

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisany Damian Matysiński wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt. „*Rola receptora P2X7 w biologii glejaka*” przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku.

Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

- 1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (*Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych*, kolekcja: *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe*) znajdującym się pod adresem: <https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription/121>
- 2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności zeskanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia

Podpis

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. Znotowano obniżenie ilości białek, które są związane z promowaniem agresywnego fenotypu nowotworu (CD133, HSPA1, HSPA5, Akt, p38 MAPK, NOS-2) oraz białek związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (N-kadheryna, wimentyna, β -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, β -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.

1	WSTĘP	13
1.1	ATP JAKO JEDNA Z WAŻNIEJSZYCH CZĄSTECZEK W HISTORII ŻYCIA	14
1.2	RECEPTORY NUKLEOTYDOWE	15
1.2.1	<i>Rodzina P1</i>	16
1.2.2	<i>Rodzina P2</i>	18
1.2.2.1	Receptory P2Y	18
1.2.3	<i>Rodzina P2X</i>	20
1.3	RECEPTOR P2X7	21
1.3.1	<i>Struktura genu kodującego P2X7</i>	22
1.3.2	<i>Struktura białkowa receptora P2X7</i>	23
1.3.3	<i>Modyfikacje potranslacyjne receptora P2X7</i>	24
1.3.4	<i>Warianty składania białka P2X7</i>	25
1.3.5	<i>Aktywacja receptora P2X7</i>	26
1.3.6	<i>Zahamowanie aktywności receptora P2X7</i>	28
1.4	FUNKCJE I FIZJOLOGIA RECEPTORA P2X7 W KOMÓRKACH PRAWIDŁOWYCH	30
1.4.1	<i>Regulacja wydzielania interleukiny do środowiska zewnątrzkomórkowego</i> 30	
1.4.2	<i>Rola receptora P2X7 w innych drogach prozapalnych</i>	31
1.4.3	<i>Stymulacja wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz azotu</i>	32
1.4.4	<i>Tworzenie pora komórkowego</i>	32
1.4.5	<i>Wpływ aktywacji receptora P2X7 na reorganizację błony komórkowej</i>	33
1.4.6	<i>Regulacja śmierci komórkowej</i>	34
1.4.7	<i>Stymulacja podziałów komórkowych</i>	35
1.5	RECEPTOR P2X7 W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH	35
1.5.1	<i>P2X7 w nowotworze prostaty</i>	36
1.5.2	<i>Receptor P2X7 w nowotworach kości</i>	36
1.5.3	<i>P2X7 w nowotworach skóry</i>	37
1.5.4	<i>P2X7 w nowotworach trzustki</i>	37
1.5.5	<i>Receptor P2X7 w raku piersi</i>	38
1.5.6	<i>Receptor P2X7 w nowotworach układu pokarmowego</i>	39
1.5.7	<i>P2X7 w nowotworach płuc</i>	39
1.5.8	<i>P2X7 w nowotworach krwi</i>	40
1.5.9	<i>P2X7 w raku szyjki macicy</i>	40
1.5.10	<i>P2X7 w raku jajnika</i>	41
1.5.11	<i>P2X7 w neuroblastomie</i>	41
1.5.12	<i>P2X7 w glejaku wielopostaciowym</i>	42
2	ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	46
3	MATERIAŁY I METODY	48
3.1	HODOWLA KOMÓRKOWA	49
3.1.1	<i>Krioprezervacja i ponowne wprowadzanie komórek do hodowli</i>	49
3.1.2	<i>Obniżenie ilości białka receptora P2X7 z wykorzystaniem krótkiego interferującego RNA</i>	50
3.2	METODY PRACY Z KWASAMI NUKLEINOWYMI	51
3.2.1	<i>Izolacja totalnego RNA z komórek</i>	51
3.2.2	<i>Przygotowanie biblioteki cDNA</i>	51
3.2.3	<i>Reakcja PCR i elektroforetyczny rozdział produktów</i>	52
3.3	METODY PRACY Z BIAŁKAMI	53
3.3.1	<i>Przygotowanie lizatów komórkowych oraz homogenatów tkankowych</i>	53

3.3.2	<i>Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórkowych</i>	54
3.3.3	<i>Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym</i>	55
3.3.4	<i>Immunodetekcja białek na membranie nitrocelulozowej (Western Blotting)</i> 55	
3.4	POMIAR SYGNAŁU WAPNIOWEGO PO STYMULACJI RECEPTORA P2X7	57
3.5	DETEKCJA KOMÓRKOWEGO PORA – ANALIZA WNIKANIA JODKU PROPIDYNY	57
3.6	WYZNACZENIE TEMPA PODZIAŁÓW KOMÓRKOWYCH PO OBNIŻENIU ILOŚCI RECEPTORA P2X7	58
3.7	ANALIZA ADHEZJI KOMÓRKOWEJ DO MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ.....	58
3.8	POMIAR AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ KOMÓREK GLEJAKA C6 PO INKUBACJI Z LEKAMI STOSOWANYMI W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ	59
3.9	POMIAR AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ KOMÓREK Z WYKORZYSTANIEM TESTU MTS	59
3.10	ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK GLEJAKÓW PO TRAKTOWANIU LEKAMI CYTOSTATYCZNYMI.....	59
3.11	ANALIZA ŚMIERTELNOŚCI KOMÓREK PRZEZ UWALNIANIE DEHYDROGENAZY MLECZANOWEJ (LDH).....	60
3.12	BARWIENIE MITOCHONDRIÓW Z WYKORZYSTANIEM SONDY MITOTRACKER CMX ROS.....	60
3.13	ANALIZY CYTOMETRYCZNE	61
3.13.1	<i>Detekcja komórek apoptotycznych - test łączenia aneksyny V i wnikania jodku propidyny</i>	61
3.13.2	<i>Analiza wytwarzania wolnych rodników z wykorzystaniem sondy DCF- DA</i> 61	
3.13.3	<i>Analiza potencjału błony mitochondrialnej z wykorzystaniem sondy JC-1</i> 62	
3.14	OZNACZANIE STĘŻENIA UWOLNIONEGO ATP W POŻYWCE ORAZ W GUZIE NOWOTWOROWYM.....	62
3.15	DOŚWIADCZENIA <i>IN VIVO</i>	63
3.15.1	<i>Wprowadzanie podskórne guzów nowotworowych oraz dawkowanie inhibitora receptora P2X7 – BBG</i>	63
3.15.2	<i>Izolacja surowicy mysiej</i>	64
3.15.3	<i>Pomiar stężenia glutationu całkowitego oraz jego utlenionej formy w guzach</i> 64	
3.15.4	<i>Pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej</i>	65
3.15.5	<i>Oznaczenie aktywności metaloproteiny 2 w guzie</i>	65
3.15.6	<i>Immunofluorescencyjna detekcja receptora P2X7 w guzie</i>	66
3.15.7	<i>Barwienia histopatologiczne guza hematoksyliną i eozyną</i>	66
3.15.8	<i>Analiza markerów powierzchniowych komórek guza z wykorzystaniem cytometrii przepływowej</i>	67
3.15.9	<i>Analiza cytokin prozapalnych z wykorzystaniem macierzy typu dot-blot</i> 68	
3.16	ANALIZA STATYSTYCZNA	68
4	WYNIKI	69
4.1	ANALIZA EKSPRESJI TRANSKRYPTÓW RECEPTORÓW Z RODZINY P2X W KOMÓRKACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO	70
4.2	ANALIZA EKSPRESJI TRANSKRYPTÓW RECEPTORÓW Z RODZINY P2Y W KOMÓRKACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO	71
4.3	ANALIZA OBECNOŚCI BIAŁKA RECEPTORA P2X7 W KOMÓRKACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO.....	72

4.4	ANALIZA SYGNAŁU WAPNIOWEGO PO POBUDZENIU KOMÓREK GLEJAKÓW PRZEZ SYNTETYCZNEGO AGONISTĘ P2X7 (BzATP).....	72
4.5	ANALIZA FORMOWANIA PORA KOMÓRKOWEGO.....	73
4.6	BADANIE ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ PO STYMULACJI RECEPTORA P2X7	74
4.7	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA MORFOLOGIĘ KOMÓREK GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO.....	78
4.8	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA AKTYWNOŚĆ METABOLICZNĄ KOMÓREK GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO.....	78
4.9	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA INTENSYWNOŚĆ PODZIAŁÓW KOMÓREK GLEJAKA C6	79
4.10	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA PRZEŻYWAŁNOŚĆ KOMÓREK GLEJAKA C6 PODCZAS INKUBACJI Z LEKAMI CYTOSTATYCZNYMI	80
4.11	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA EFEKTYWNOŚĆ LEKÓW CYTOSTATYCZNYCH W KOMÓRKACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO CZŁOWIEKA.....	82
4.12	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA AKTYWACJE BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH ORAZ ŚCIEŻEK SYGNAŁOWYCH WPLYWAJĄCYCH POZYTYWNE NA PROLIFERACJĘ.....	85
4.13	WYDZIELANIE ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO ATP PO STYMULACJI RECEPTORA P2X7	86
4.14	WPLYW OBNIŻENIA ILOŚCI BIAŁKA P2X7 NA SYGNAŁ WAPNIOWY PO STYMULACJI BzATP	87
4.15	WPLYW OBNIŻENIA ILOŚCI RECEPTORA P2X7 NA PROLIFERACJĘ DŁUGOTERMINOWĄ KOMÓREK GLEJAKA C6.....	88
4.16	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA ADHERENTNOŚĆ KOMÓREK GLEJAKA DO WYBRANYCH SKŁADNIKÓW MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ.....	89
4.17	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA WYTWARZANIE WOLNYCH RODNIKÓW TLENOWYCH	92
4.18	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA POLARYZACJĘ MITOCHONDRIÓW	94
4.19	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA ROZWÓJ GLEJAKA C6 <i>IN VIVO</i>	97
4.20	WPLYW BBG NA SYNTEZĘ BIAŁKA P2X7 W GUZACH NOWOTWOROWYCH.....	97
4.21	ANALIZA AKTYWNOŚCI METALOPROTEINAZY 2 W GUZACH NOWOTWOROWYCH	98
4.22	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA BIAŁKA ADHEZYJNE W GUZACH GLEJAKA C6..	100
4.23	ANALIZA HISTOPATOLOGICZNA GUZÓW GLEJAKA C6 IMPLANTOWANYCH DO MYSZY	100
4.24	BADANIE RODZAJÓW ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ W GUZACH GLEJAKA C6 PO INHIBICJI RECEPTORA P2X7	101
4.25	ANALIZA ILOŚCI BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO W GUZACH GLEJAKA C6.....	102
4.26	WPLYW ZAHAMOWANIA AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA FOSFORYLACJĘ KINAZ P38 ORAZ AKT W GUZACH GLEJAKA C6.....	104
4.27	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA ILOŚĆ WYKRYWANEGO MARKERA NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH CD133	105
4.28	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA PRODUKCJĘ CYTOKIN PROZAPALNYCH W SUROWICY.....	106
4.29	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA PRODUKCJĘ CYTOKIN PROZAPALNYCH W GUZIE NOWOTWOROWYM.....	107
4.30	WPLYW P2X7 NA ILOŚĆ INDUKOWALNEJ SYNTAZY TLENKU AZOTU W GUZACH NOWOTWOROWYCH.....	108
4.31	WPLYW AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA FRAKCJĘ KOMÓREK FOXP3 POZYTYWNYCH W GUZIE NOWOTWOROWYM.....	108

4.32	WPLYW INHIBICJI RECEPTORA P2X7 NA FRAKCJE KOMÓREK CD68 POZYTYWNYCH	109
4.33	WPLYW OBNIŻENIA AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA ZAWARTOŚĆ ATP W GUZIE NOWOTWOROWYM.....	110
4.34	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA RÓWNOWAGĘ OKSYDOREDUKCYJNĄ W GUZIE – POMIAR UTLENIONEGO GLUTATIONU ORAZ AKTYWNOŚCI DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ.....	111
5	DYSKUSJA	113
5.1	ANALIZA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH RECEPTORY NUKLEOTYDOWE W KOMÓRKACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO	114
5.2	EKSPRESJA I FUNKCJONALNOŚĆ RECEPTORA P2X7 W LUDZKICH LINIACH GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO.....	115
5.3	WPLYW AKTYWACJI RECEPTORA P2X7 NA ŚMIERĆ KOMÓREK GLEJAKÓW	118
5.4	WPLYW AKTYWACJI RECEPTORA P2X7 NA INTENSYWNOŚĆ PODZIAŁÓW KOMÓREK GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO.....	119
5.5	WPLYW AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO PO TRAKTOWANIU LEKAMI CYTOSTATYCZNYMI	120
5.6	BADANIE WPLYWU AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA PRZEKAZYWANIE SYGNAŁÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W MODELU GLEJAKA C6 <i>IN VITRO</i>	124
5.7	WPLYW AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA ROZWÓJ I ZŁOŚLIWOŚĆ GLEJAKA C6 <i>IN VIVO</i>	126
5.8	WPLYW RECEPTORA P2X7 NA ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE ZWIĘKSZAJĄCE PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK W GUZACH GLEJAKA C6	130
5.9	WPLYW AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA MIKROŚRODOWISKO GUZA.....	132
5.10	WPLYW AKTYWNOŚCI RECEPTORA P2X7 NA WYTWARZANIE WOLNYCH RODNIKÓW TLENOWYCH W GUZACH GLEJAKA C6	134
6	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	136
7	LITERATURA.....	139

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADP - adenozyno-5'-difosforan

AMP - adenozyno-5'-monofosforan

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

ATP γ S - adenozyno 5-(γ -tio) trójfosforan

BBG – *ang. Brilliant Blue G* – błękit brylantowy

BCNU - karmustyna

BSA - *ang. bovine serum albumin* - albumina z surowicy bydłej

BzATP - 2',3'-O-(4-benzoylo-benzoyl)adenozyno 5'-trójfosforan

cAMP - *ang. cyclic adenosine monophosphate* - cykliczny adenozyno-3',5'
monofosforan

CARD - *ang. caspase activation and recruitment domains* – domena przyłączająca i
aktywująca kaspazy

DAG – *ang. diacylglycerol* - 1,2-diacyloglicerol

DMEM - *ang. Dulbecco's modified eagle medium* - pożywka hodowlana

EDTA - *ang. ethylenediaminetetraacetic acid* - kwas wersenowy

EGF – *ang. epidermal growth factor* – czynnik wzrostu naskórka

FBS - *ang. fetal bovine serum* - surowica płodowa bydłęca

EGFR - *ang. epidermal growth factor receptor* - receptor nabłonkowego czynnika
wzrostu

EMT – *ang. epithelial-mesenchymal transition* – przejście epithelialno - mezenchymalne

GPCR – *ang. G-protein-coupled receptors* – receptory sprzężone z białkiem G

GTP – guanozyno-5'-trifosforan

HIF-1 - *ang. hypoxia-inducible factor 1* – czynnik indukowany hipoksją 1

HRP - *ang. horseradish peroxidase* - peroksydaza chrzanowa

HSP – *ang. heat shock proteins* – białka szoku cieplnego

IP₃ - 1,4,5-trifosforan inozytolu

IP₃R - *ang. inositol trisphosphate receptor* – receptor inozytolotrójfosforanu

LBP - *ang. lipopolysaccharide binding protein* – białko wiążące lipopolisacharyd

LPS – lipopolisacharyd

MAPK - *ang. mitogen-activated protein kinase* - kinazy aktywowane mitogenami

MCP-1 - *ang. monocyte chemotactic protein 1* - białko chemotaktyczne monocytów 1

MIP-1 - *ang. macrophage inflammatory protein 1* – białko zapalne makrofagów 1

miRNA – *ang. microRNA* – mikroRNA

NF- κ B - *ang. nuclear factor kappa B* - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B

oxATP - *ang. oxidized ATP* – nadjodan ATP

PAMP – *ang. pathogen-associated molecular patterns* – wzorce molekularne związane z patogenami

PBS - *ang. phosphate buffer saline* - sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PIP2 - *ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* - bisfosforan fosfatydyloinozytolu

PKC - *ang. protein kinase C* – kinaza białkowa C

PLC β - *ang. phospholipase C* – fosfolipaza C

PLD - *ang. phospholipase D* – fosfolipaza D

PPADS - kwas (fosforan pirydoksalu-6-azofenylo-2',4'-disulfonowy)

ROS – *ang. reactive oxygen species* – reaktywne formy tlenu

SOCE - *ang. store operated calcium entry* – pojemnościowy napływ wapnia

SDS - *ang. sodium dodecyl sulfate* - sól sodowa siarczanu dodecylu

siRNA – *ang. small interfering RNA* – małe interferujące RNA

RT-PCR - *ang. reverse transcription polymerase chain reaction* - reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą

TBS - *ang. Tris buffer saline* - sól fizjologiczna buforowana Tris

TBS-T - *ang. Tris buffer saline with Triton X-100* - sól fizjologiczna buforowana Tris z detergentem Triton X-100

TLR4 - *ang. toll-like receptor 4* – receptor toll podobny 4

TMZ – temozlomid

TNF-R1 - *ang. tumor necrosis factor receptor 1* – receptor czynnika martwicy nowotworu

Tris - *ang. Tris(hydroxymethyl)aminomethane* - Tris(hydroksymetylo)aminometan

TGF- β - *ang. transforming growth factor β* – transformujący czynnik wzrostu β

UTP - urydyno-5' -trifosforan

VEGF – *ang. vascular endothelial growth factor* - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

WB – Western Blot

1 WSTEP

1.1 ATP jako jedna z ważniejszych cząsteczek w historii życia

ATP jest najbardziej rozpowszechnioną cząsteczką stanowiącą źródło energii chemicznej w procesach metabolicznych. Nukleotyd ten znajdziemy we wszystkich komórkach zwierząt, roślin oraz mikroorganizmów. Jest stale produkowany i zużywany w większości procesów komórkowych, poczynając od syntezy innych nukleotydów przez syntezę kwasów nukleinowych po transport substancji do i z wnętrza komórki oraz generowanie siły mechanicznej. Cząsteczki ATP zużywane są również tam, gdzie reakcje syntezy chemicznej wymagają wkładu energii lub gdzie procesy regulacyjne wymagają nieodwracalności termodynamicznej reakcji im towarzyszących. Szacunkowo ludzki organizm w ciągu doby zużywa tyle ATP, ile waży. Stężenie ATP wewnątrz komórki jest wypadkową procesów syntezy nowych cząsteczek ATP oraz jego hydrolizy i stężenie tego nukleotydu jest silnie związane z aktywnością metaboliczną komórki. Zwykle w komórkach ssaków wartość ta wynosi około od 3-5 mM (Jones, 1986; Gorman i wsp., 2007), i jest o wiele rzędów wielkości większa niż w przestrzeni międzykomórkowej, gdzie wynosi 1-10 nM (Giuliani i wsp., 2019).

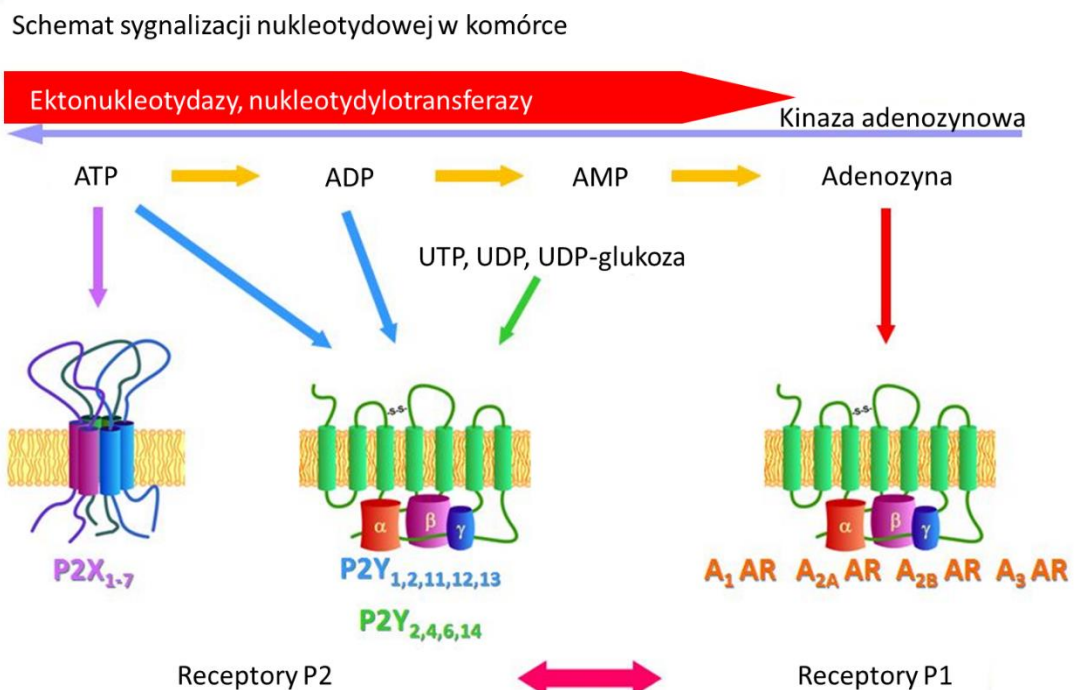
Aby w pełni zrozumieć kluczową rolę ATP w rozwoju życia na ziemi należy się cofnąć do początków ewolucji procesów energetycznych i przekazywania informacji z wykorzystaniem kodu genetycznego. To właśnie w tych procesach kluczową rolę odgrywały pierwsze nukleotydy. Nieorganiczne fosforany były podstawowymi związkami budulcowymi w rozwoju życia na ziemi. Pochodzenie tych związków na ziemi jest zagadkowe, jedną z postulowanych teorii jest pozaziemskie pochodzenie fosforanów na przykład z meteorytów uderzających w powierzchnię ziemi na wczesnym etapie rozwoju planety (Bryant i wsp., 2013). Bez tych związków niemożliwe byłoby powstanie istniejących do dziś i pełniących kluczową funkcję w przekazywaniu informacji genetycznej RNA i DNA. Wraz z rozwojem życia podstawowe formy przekazywania informacji zmieniały się, na początku występowały tylko długie, samoreplikujące się łańcuchy RNA, w których nukleotydy pełniły głównie budulcową rolę. Jednak, gdy pojawiły się pierwsze prymitywne komórki, a główną rolę nośnika kodu genetycznego przejęło DNA, nukleotydy zaczęły pełnić rolę energetyczną (Bada, 2004). Na przestrzeni wieków wyłoniły się tylko dwie cząsteczki energetyczne – GTP - występujące tylko w niektórych rodzajach reakcji, oraz ATP – powszechnie występujące w prawie każdej reakcji zachodzącej w organizmie żywym. Powszechność ATP w organizmach żywych może być związane z większą energią swobodną hydrolizy niż GTP,

co spowodowało spopularyzowanie tej cząsteczki w się pierwszych organizmów prokariotycznych (Denton, 2009; Bazil i wsp., 2010). Pomimo dużych zalet wykorzystania ATP jako nośnika energii, cząsteczka ta posiada poważną wadę. Nie jest możliwe przeprowadzanie reakcji z wykorzystaniem ATP w środowisku o dużym, stężeniu jonów wapnia. Wynika to z właściwości chemicznych tej cząsteczki. Wapń łączy się z ATP powodując powstanie nierozpuszczalnych soli, niemożliwych do wykorzystania przez organizmy żywe. Spowodowało to problem, gdy na ziemi, w praoceanie znacząco podniosło się stężenie jonów wapnia (Kazmierczak i wsp., 2013). Wtedy organizmy żywe u których ATP pełniło kluczową rolę energetyczną musiały wytworzyć system błon, ochraniających wnętrze komórki przed niekorzystnym środowiskiem oraz system skomplikowanych białek na powierzchni tych błon, które miały utrzymywać niskie stężenie jonów wapnia wewnątrz komórki poprzez aktywne wypompowywanie z wykorzystaniem ATP. Podsumowując ATP jest potrzebne do utrzymania stałego stężenia jonów wapnia w komórce, aby ATP mogło być w nim swobodnie produkowane i hydrolizowane. Ta zależność sprawiła, że ATP i wolne jony wapnia stały się jednymi z najbardziej podstawowych cząsteczek sygnałowych, już we wczesnych stadiach ewolucji organizmów żywych (Berridge i wsp., 2003; Clapham, 2007).

1.2 Receptory nukleotydydowe

Pierwsze wzmianki o tym, że ATP oprócz funkcji energetycznej, może pełnić funkcję neurotransmitera pojawiły się w roku 1972. Burnstock w swoich badaniach wskazał, że jelita oraz pęcherz świnki morskiej, poddane działaniu zewnątrzkomórkowego ATP skurczą się w sposób niezależny od znanych neurotransmiterów. Początkowo do idei sygnalizacji nukleotydydowej świat naukowy odnosił się sceptycznie. Wynikało to z wcześniejszych badań skoncentrowanych głównie na wewnątrzkomórkowych procesach związanych z funkcjami energetycznymi ATP (Gillespie 1934; Lippman 1941; Meyerhof 1951; Lo i wsp., 1968). Niechęć środowisk wynikała również z wyników pomiarów stężenia ATP w środowisku zewnątrzkomórkowym (1-10 nM na zewnątrz komórki, 3-5mM w cytoplazmie) oraz wielkością i ładunkiem cząsteczki, które nie pozwalają swobodnie przenikać przez błonę komórkową (Chaudry 1982). W 1976 roku Burnstock na podstawie badań farmakologicznych zdefiniował białka, które uczestniczyły w odpowiedzi komórki na zewnątrzkomórkowe ATP i nazwał je receptorami

purynergicznymi. W toku dalszych badań farmakologicznych i molekularnych podzielił receptory nukleotydydowe na dwie grupy. P1 stymulowane przez adenozyne oraz P2 stymulowane przez ATP i ADP. Dalsze badania przeprowadzone w pracowni Burnstocka doprowadziły do podziału rodziny P2 na receptory metabotropowe - P2Y oraz jonotropowe - P2X (Burnstock i Kennedy 1985; Burnstock i Alexei 2012) (Rycina 1.1). Co więcej badania konwersji nukleotydydów po podaniu ich do środowiska zewnątrzkomórkowego, spowodowały odkrycie na powierzchni błony enzymów hydrolizujących nukleotydy i obraz sygnalizacji nukleotydydowej stał się bardziej pełny i różnicowany (Ziganshin i wsp., 1994; Lazarowski i wsp., 2000).



Rycina 1.1. Schematyczne przedstawienie sygnalizacji nukleotydydowej w komórce żywej. Na ATP, ADP i UTP odpowiadają receptory z rodziny P2, natomiast na adenozyne receptory z rodziny P1. Stężenie nukleotydydów w środowisku zewnątrzkomórkowym regulowane jest przez ektonukleazy, które hydrolizują nukleotydy z bardziej złożonych na prostsze oraz kinazę adenozynową, która z prostych nukleotydydów tworzy bardziej złożone. (zmodyfikowano według <https://sites.google.com/a/unicam.it/diego-dalben/activities-and-collaborations>).

1.2.1 Rodzina P1

Rodzina P1 grupuje receptory stymulowane przez adenozyne. Są to receptory metabotropowe, czyli takie, których pobudzenie zewnątrzkomórkowe powoduje inicjację reakcji metabolicznych w cytoplazmie (Schmidt i wsp., 2007). Należą one do różnorodnej

grupy receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR: G-protein coupled receptors). Receptory te zbudowane są z siedmiu domen transbłonowych. Domeny transbłonowe mają budowę α -helisy i składają się z 20-25 reszt hydrofobowych aminokwasów. Miejscem wiązania się liganda są domeny tworzące tzw. „kieszęń”, zanurzone w błonie komórkowej. Połączenia między domenami stanowią trzy pętle zewnątrzkomórkowe i trzy cytoplazmatyczne różnej wielkości. Koniec aminowy białka receptorowego umieszczony jest po stronie zewnętrznej komórki i może ulegać licznym modyfikacjom potranslacyjnym. Koniec karboksylowy zlokalizowany jest po stronie wewnątrzkomórkowej i zawiera sekwencje aminokwasowe, które mogą ulegać fosforylacji. Białka G wiążą się z receptorem pod stronie wewnątrzkomórkowej, w obrębie trzeciej pętli. Receptory z rodziny P1 możemy podzielić na cztery podtypy: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Homologia pomiędzy poszczególnymi podtypami wynosi około 50% (Fredholm 2000). Receptor A₁ wiąże się z białkami G_{i/o}, natomiast receptor A_{2A} z białkiem G_s. Aktywacja receptora A₁ powoduje zmniejszenie aktywności cyklazy adenylowej i stymuluje aktywność fosfolipazy C poprzez którą następuje zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie (Schulte i Fredholm 2000; Schulte i Fredholm 2003). Aktywacja receptora A_{2A}, zwiększa aktywność cyklazy adenylowej i aktywuje ścieżki sygnałowe związane z kinazami MAP (Baraldi i wsp., 2008; Chen i wsp., 2013). Receptor A_{2B} łączy się z białkami G_sG_{q/11}, a receptor A₃ z białkami G_iG_{q/11}. Aktywacja A_{2A} zwiększa aktywność cyklazy adenylowej, stymuluje aktywność fosfolipazy C oraz aktywuje kinazy MAP (Bader i wsp., 2017; Sun i Huang 2016). Stymulowanie receptora A₃ zmniejsza aktywność cyklazy adenylowej, aktywuje fosfolipazę C przez co, tak jak w przypadku receptora A₁, zwiększa stężenie jonów wapnia w komórce. Tak jak wszystkie wyżej wymienione receptory, A₃ może stymulować aktywność kinaz MAP (Borea i wsp., 2015, Fishman i wsp., 2002). Receptory A₁ i A_{2A} mogą zostać podbudzone przez niskie stężenie adenozyiny, natomiast aktywacja receptorów A_{2B} i A₃ jest związana z występowaniem wysokich stężeń adenozyiny w środowisku zewnątrzkomórkowym (Borea i wsp., 2018). Receptory z rodziny P1 jest szeroko rozpowszechnione w organizmach żywych i pełnią ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy oraz w stanach patologicznych.

1.2.2 Rodzina P2

Rodzina receptorów P2 grupuje dwie zupełnie różne podrodziny receptorów nukleotydotowych: metabotropowe receptory P2Y oraz receptory P2X pełniące rolę kanałów jonowych. Zaklasyfikowanie tych podrodziny receptorów do wspólnej rodziny P2 jest związane z historycznym podziałem, opartym na cechach farmakologicznym, a nie mechanizmie działania, którego wówczas nie znano. Pod względem ligandów, które je aktywują receptory P2X i P2Y są podobne. Natomiast pod względem mechanizmu działania receptory P2Y i P2X są zupełnie różne.

1.2.2.1 Receptory P2Y

Rodzina P2Y grupuje receptory metabotropowe aktywowane przez zewnątrzkomórkowe pochodne ATP i UTP. Pod względem budowy molekularnej i mechanizmów przekazywania wewnątrzkomórkowego sygnału wykazują podobieństwo do receptorów adenozywonych P1.

Rodzina receptorów P2Y to jedna z najliczniejszych grup receptorów nukleotydotowych. Do tej pory odkryto aż 8 różnych wariantów tych białek: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14 (von Kügelgen, i Hoffmann 2016). W rodzinie tej występują również tak zwane receptory sieroce – receptory zbliżone sekwencją do danej rodziny, ale bez znanego liganda (Murakami i wsp., 2008). Przykładem takiego receptora był receptor P2Y14 (Abbracchio i wsp., 2003). Jest to najbardziej zróżnicowana grupa receptorów nukleotydotowych różnica w sekwencji pomiędzy poszczególnymi typami wynosi od 21% do 57%.

Receptory te zbudowane są z 7 domen transbłonowych, miejsce wiązania się ligandu znajduje się w utworzonej przez domeny TM3, TM6 i TM7 „kieszceń” w błonie komórkowej. Powinowactwo nukleotydotów do tego regionu związane jest z dodatnio naładowanymi aminokwasami, które wykazują oddziaływania elektrostatyczne z resztami fosforanowymi w nukleotydach. Za przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki odpowiadają trójpodjednostkowe (α, β, γ) białka G. Podjednostka α posiada domenę wiążącą GTP oraz pełni rolę GTPazy, czyli może przeprowadzić hydrolizę GTP do GDP. Gdy do podjednostki α przyłączone jest GDP, to jest ona związana z pozostałymi białkami kompleksu (β, γ) i pozostaje w formie nieaktywnej, przyłączonej do receptora. Jednak gdy do receptora zwiąże się agonista, następuje zmiana konformacyjna receptora i białka G. Powoduje to uwolnienie GDP, a następnie przyłączenie GTP do podjednostki

α . Tak zmieniona podjednostka α odłącza się od kompleksu białek β i γ i aktywuje kaskadę sygnalizacyjnych procesów w komórce. Aktywność białka G utrzymuje się tak długo jak do podjednostki przyłączone jest GTP. Gdy w wyniku hydrolizy GTP powstaje GDP wszystkie trzy podjednostki łączą się w nieaktywne białko G, przyłączone do receptora (Aittaleb i wsp., 2010; Barańska, 2014).

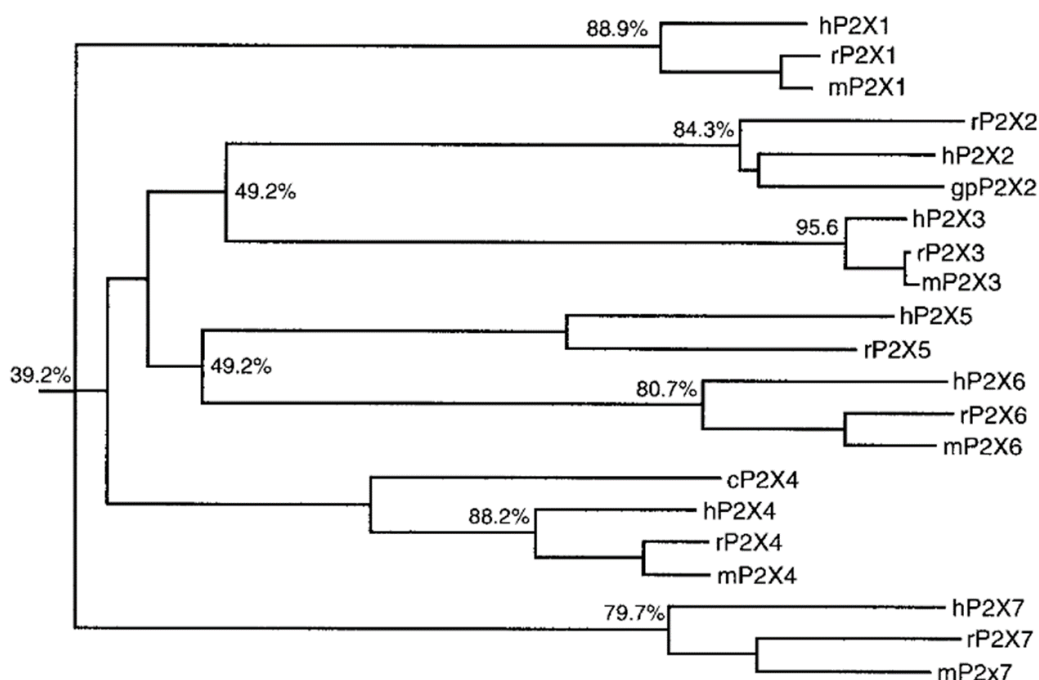
Zgodnie z drzewem filogenetycznym stworzonym na podstawie różnic w sekwencjach genów, receptory P2Y możemy podzielić na dwie grupy. Do pierwszej należą receptory P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, a do drugiej P2Y12, P2Y13, P2Y14 (Schöneberg i wsp., 2007; Barańska i wsp., 2014). Receptory pierwszej grupy są związane z białkami $G_{q/11}$. Ich stymulacja powoduje przekazanie sygnału przez białko G_q i aktywację fosfolipazy C typu beta ($PLC\beta$). Aktywacja tego enzymu prowadzi do hydrolizy zamieszczonego w błonie komórkowej fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bifosforanu (PIP_2). W wyniku hydrolizy powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: trisfosforan inozytoli (IP_3) i 1,2-diacyloglicerol (DAG) (Wypych i Barańska, 2020). Rozpuszczalny w wodzie IP_3 dyfunduje z błony plazmatycznej do cytoplazmy, a następnie przyłącza się do receptorów trisfosforanu inozytoli (IP_3R) na powierzchni siateczki śródplazmatycznej. Receptory te pełnią rolę kanałów jonowych, które mogą spowodować uwolnienie jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej, w efekcie czego dochodzi do podwyższenia stężenia wapnia w cytoplazmie, a następnie, w wyniku spadku stężenia jonów wapnia w siateczce śródplazmatycznej, dochodzi do otwarcia niezależnych od napięcia kanałów wapniowych w błonie komórkowej (Berridge 1993; Taylor i Thorn 2001). Proces ten powoduje zwiększenie stężenia wolnych jonów wapnia w komórce poprzez napływ jonów z przestrzeni międzykomórkowej. Ten proces wtórnego napływu wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, następujący po opróżnieniu zasobów wapnia w siateczce śródplazmatycznej nosi nazwę pojemnościowego napływu wapnia (w języku angielskim przyjęła się nazwa SOCE – Store Operated Calcium Entry) (Hogan i Rao, 2016). Drugi z wtórnych przekaźników, powstałych w wyniku aktywności $PLC\beta$, DAG pozostaje w błonie komórkowej i aktywuje kinazę białkową C (PKC). Aktywna PKC może wywierać hamujący efekt na sam receptor oraz na PLC, hamując hydrolizę PIP_2 i zmniejszając siłę sygnału wapniowego. Dodatkowo aktywacją PKC prowadzi do zwiększenia aktywności fosfolipazy D (PLD) oraz szlaku kinaz MAP (Wypych i Barańska, 2020). Podsumowując aktywacja receptorów P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 prowadzi do mobilizacji jonów wapnia w komórce. Trzeba jednak pamiętać, że receptory GPCR nie wykazują stuprocentowej specyficzności co do wiązanych

podjednostek α białek G i tak w przypadku receptora P2Y₁₁ może nastąpić alternatywna aktywacja związana z połączeniem się białkiem G_s, która prowadzi do zwiększenia aktywności cykazy adenylowej, a w konsekwencji do podwyższenia stężenia cAMP w komórce (Kennedy, 2017). Powinowactwo białek G, może również zostać zmienione po wejściu receptorów P2Y w kompleks z innymi białkami błonowymi. Przykładem jest kompleks integryny $\alpha_v\beta_5$ z receptorem P2Y₂, w tych warunkach receptor może oddziaływać z białkiem G₀, aktywując transdukcję sygnału przez białko Rac 1. Co więcej zmiana konformacyjna receptora P2Y₂, poprzez integrynę $\alpha_v\beta_5$, powoduje transdukcję sygnału poprzez białko G₁₂ oraz kinazę ROCK (Kłopocka i wsp., 2013). Należące do drugiej grupy, receptory P2Y₁₂, P2Y₁₃ i P2Y₁₄, zmniejszają stężenie cAMP w komórce poprzez zahamowanie aktywności cykazy adenylanowej. W receptorach tych transdukcja sygnału do wnętrza komórki odbywa się za pośrednictwem białka G_{i/o}.

1.2.3 Rodzina P2X

Receptory z rodziny P2X to białka zupełnie niespokrewnione z receptorami P2Y. Receptory P2X są nieselektywnymi kanałami jonowymi, które otwierają się po stymulacji ATP lub innymi syntetycznymi agonistami (North, 2016), powodując przepływ prądu jonowego i depolaryzację błony komórkowej. Takie receptory nazywamy receptorami jonotropowymi. Receptory te nie są monomerami. Aby receptor mógł prawidłowo pełnić swoją funkcję musi powstać wielocząsteczkowy, oligomeryczny kompleks białkowy, który tworzy kanał jonowy w błonie komórkowej. Receptory te mogą być zarówno homo- jak i heterooligomerami. Funkcjonalny receptor P2X składa się zwykle z trzech podjednostek z których powstaje kanał jonowy (Ralevic i Burnstock, 1998). Podjednostka receptora P2X składa się z dwóch regionów transbłonowych (TM1 i TM2), wewnątrzkomórkowych końców – karboksylowego i aminowego oraz zewnątrzkomórkowej pętli, która może podlegać wielu modyfikacjom potraslacyjnym. Domena transbłonowa TM1 jest zaangażowana w regulację przewodnictwa przez kanał natomiast domena TM2 bierze kluczowy udział w formowaniu kanału jonowego (Khakh i wsp., 2001). W zewnątrzkomórkowej pętli zlokalizowane są miejsca wiązania ATP oraz antagonistów i allosterycznych regulatorów (Ennion i wsp., 2000; Rassendren i wsp., 2000; Garcia-Guzman i wsp., 1997; Clarke i wsp., 2000). Do tej pory odkryto siedem genów kodujących podjednostki receptorów z rodziny P2X. Oznaczono je numerami od

1 do 7 (North 2002). Podobieństwo pomiędzy białkami z tej rodziny wynosi od 30 do 50 procent w zależności od receptora (Rycina 1.2). Receptory rodziny P2X są szeroko rozpowszechnione w liniach komórkowych oraz tkankach organizmów ssaków (Burnstock i Knight 2004; Burnstock, 2007).



Rycina 1.2. Kladogram pokrewieństwa receptorów z rodziny P2X, w postaci drzewa filogenetycznego. Procentowe wartości przedstawiają stopień podobieństwa w łańcuchach aminokwasowych pomiędzy poszczególnymi receptorami. Skróty oznaczają kolejno: h –białko receptora człowieka, r –białko receptora szczura, m –białko receptora myszy, gp – białko receptora kawy domowej, c –białko receptora kury. (Zmodyfikowano wg. North i Surprenant, 2000)

1.3 Receptor P2X7

Na tle rodziny P2X wyróżnia się szczególny receptor – P2X7. Pierwsze doniesienia o tym receptorze datuje się na rok 1980 gdy Cockcroft i Gomperts zaobserwowali zwiększone wydzielanie histaminy przez komórki tuczne szczura po stymulacji dużymi stężeniami zewnątrzkomórkowego ATP. W roku 1986 Gordon na podstawie danych z analiz farmakokinetycznych wysunął teorie istnienia nowego receptora P2Z, który może być aktywowany niskimi dawkami syntetycznych agonistów lub wysokimi stężeniami ATP, w porównaniu do innych receptorów nukleotydocowych. Dodatkowo stymulacja receptora P2Z powodowała masywną depolaryzację błony oraz powstanie w błonie komórkowej pora przepuszczalnego dla cząsteczek wielkości powyżej 900 kDa (Coutinho-Silva i wsp.,

1996; Ferrari i wsp., 1996). Identyfikacja nowego receptora nastąpiła w roku 1998, kiedy grupa badawcza Surprenant przeprowadziła udane klonowanie szczurzego genu kodującego P2X7 i wprowadzenie go do komórek ludzkich komórek HEK293. Od ukazania się powyższej pracy rozpoczęły się badania tego typu receptora w kolejnych gatunkach zwierząt. Receptor zaklasyfikowano do rodziny P2X.

1.3.1 Struktura genu kodującego P2X7

Gen kodujący receptor P2X7 powszechnie występuje u ssaków (Donnelly-Roberts i wsp., 2009). Gen kodujący receptor P2X7 człowieka (hP2X7) zlokalizowany jest na chromosomie 12 w locus q24. Gen ten zbudowany jest z 53733 par zasad, na które składa się 13 eksonów (Buell i wsp., 1998). Te 13 eksonów może tworzyć 9 różnych wariantów składania genu różniących się długością powstającego mRNA oraz strukturą kodowanego białka (zostaną one omówione w dalszej części pracy). Gen P2X7 jest szeroko rozpowszechniony wśród innych modelowych gatunków zwierząt laboratoryjnych: gryzoni (szczur, mysz, kawia domowa), płazów (żaba szponiasta) oraz naczelnych (makak królewski). Gen kodujący receptor P2X7 myszy zlokalizowany jest na chromosomie 5 w locus 62.5 cM. Struktura genu receptora u myszy wykazuje 81% podobieństwa do genu człowieka kodującego ten receptor (Chessell i wsp., 1998). Gen kodujący białko P2X7 szczura zlokalizowany jest na chromosomie 12 w locus q16 i wykazuje 80% homologii do genu człowieka (Surprenant i wsp., 1996). Gen *P2X7* u wszystkich do tej pory zbadanych gatunków zbudowany jest z 13 eksonów. Regulacja transkrypcji genu P2X7 może się odbywać z udziałem promotorów i wzmacniaczy transkrypcji, microRNA oraz długiego kodującego RNA (Long Coding RNA).

Do tej pory zbadano strukturę promotorów człowieka i myszy. Region promotorowy genu P2X7 człowieka jest zlokalizowany pomiędzy nukleotydami -158 do +38 otaczających region rozpoczęcia transkrypcji (Zhou i wsp., 2009). Dodatkowo transkrypcja genu P2X7 człowieka może być regulowana przez nieznane wzmacniacze transkrypcji w miejscach +222 - +323 oraz +401 - +573 poprzez hipermetylacje cytozyny (Zhou i wsp., 2009). Region promotorowy genu kodującego receptor P2X7 myszy zlokalizowano pomiędzy nukleotydami -249 do +17 otaczającymi miejsce startu transkrypcji (García-Huerta i wsp., 2012). Dodatkowo w genie myszy zidentyfikowano wzmacniacze transkrypcji odpowiadające na pobudzenie przez kwas retinoidowy (Witamina A) (Hashimoto-Hill i wsp., 2017; Heiss i wsp., 2008). Co ciekawe w badaniach nad receptorem P2X7 człowieka zaobserwowano efekt zupełnie odwrotny. Podanie kwasu retinoidowego

powodowało obniżenie ilości receptora P2X7 w komórkach pochodzenia neuronalnego u człowieka (Orellano i wsp., 2010; Wu i wsp., 2009).

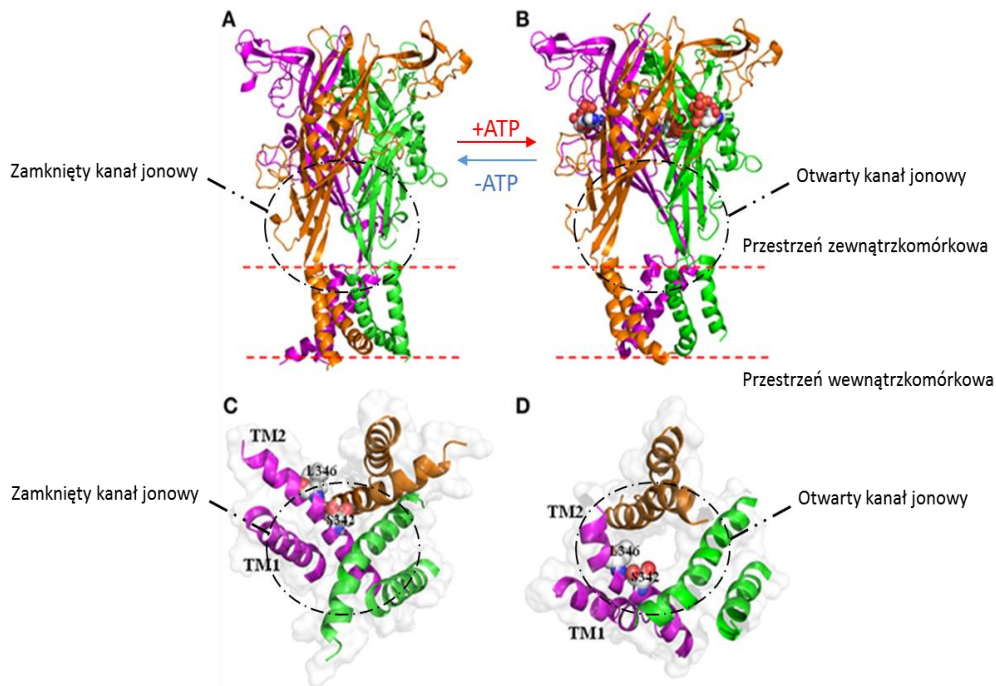
Poziom mRNA receptora P2X7 może być również skutecznie regulowany przez cząsteczki miRNA (microRNA). Cząsteczka miR-186 może obniżyć poziom transkryptu P2X7 w komórkach podocytów w nerkach (Sha i wsp., 2015). U myszy cząsteczka miR-150 obniża z kolei ilość receptora P2X7 w nabłonku płuc regulując jednocześnie poziom wydzielania surfaktantów przez te komórki (Weng i wsp. 2012). Co więcej cząsteczka miR-150 może wpływać kardioprotekcyjnie na kardiomiocyty w mysim modelu niedokrwienia serca (Tang i wsp., 2015), działając poprzez regulację apoptozy uszkodzonych komórek. Regulacja ilości P2X7 przez cząsteczki microRNA jest możliwa również w komórkach nowotworowych. Cząsteczki miR-150, miR-186, miR-21 obniżające poziom transkryptu P2X7 są nadprodukowane w nowotworach piersi, szyjki macicy, pęcherza moczowego i płuc (Zhou i wsp., 2008; Huang i wsp., 2013; Boldrini i wsp., 2015).

Ostatnią znaną możliwością regulacji poziomu transkrypcji genu P2X7 jest regulacja poprzez długie niekodujące RNA (long-noncoding RNA, lncRNA). Krótkie interferujące RNA komplementarne do lncRNA NONRATT021972 obniża ilość receptora P2X7 w wielu patologicznych stanach takich jak ból neuropatyczny (Liu i wsp., 2016), niedotlenienie mięśnia sercowego (Tu i wsp., 2016; Zou i wsp., 2016), oraz w stresie metabolicznym (Li i wsp., 2016; Xu i wsp., 2016). siRNA komplementarne do lncRNA uc.48+ obniża ilość receptora P2X7 w neuronach szczurów chorujących na cukrzycę (Wu i wsp., 2016).

1.3.2 Struktura białkowa receptora P2X7

Funkcjonalny receptor P2X7, tak jak wszystkie receptory z rodziny P2X, zbudowany jest przynajmniej z trzech podjednostek kodowanych przez gen *P2RX7* (Rycina 1.3). Podjednostka receptora P2X7 zbudowana jest z 595 aminokwasów. W strukturze podjednostki można wyróżnić dwie domeny transbłonowe, pętlę zewnątrzkomórkową (która zawiera miejsca wiązania się ATP) oraz wewnątrzkomórkowe końce - aminowy i karboksylowy. Koniec aminowy reguluje przepływ jonów wapnia przez kanał jonowy oraz odpowiada za aktywację kinaz sygnałowych (Amstrup i Novak, 2003; Liang i wsp., 2015). Koniec karboksylowy w receptorze P2X7 jest zdecydowanie dłuższy niż w innych receptorach z rodziny P2X. Postuluje się część ta jest odpowiedzialna za oligomeryzację oraz tworzenie się pora błonowego (Smart i wsp., 2003; Costa-Junior i wsp., 2011). Co

więcej na końcu karboksylowym znajduje się również miejsce wiązania dla lipopolisacharydu, co świadczy o ważnej roli tego receptora w regulacji procesów zapalnych (Denlinger i wsp., 2001; Leiva-Salcedo i wsp., 2011). Dodatkowo koniec karboksylowy zawiera domeny mogące oddziaływać z innymi białkami (Surprenant i wsp., 1996).



Rycina 1.3. Struktura funkcjonalnego trimeru P2X7. A, C Receptor P2X7 w stanie niepopobudzonym z zamkniętym kanałem jonowym. B i D Receptor P2X7 pobudzony przez zewnątrzkomórkowe ATP z otwartym kanałem jonowym (Zmodyfikowano wg. Wei 2016).

1.3.3 Modyfikacje potranslacyjne receptora P2X7

Białko receptora P2X7 może ulegać wielu modyfikacjom potranslacyjnym, takich jak N-glikozylacja, palmitylacja, fosforylacja/defosforylacja oraz ADP-rybozylacja.

Na końcu karboksylowym receptora znajduje się kilka domniemanych miejsc, w których może zachodzić fosforylacja (Y382-384). Badania zmian fosforylacji tego regionu w komórkach mikrogleju człowieka wykazały znaczącą rolę tego receptora w regulacji bólu oraz tolerancji na opioidy (Leduc-Pessah i wsp., 2017). Interesującym faktem jest to, że modyfikacja ta nie wpływała w żaden sposób na zdolność przepuszczania jonów przez kanał receptora P2X7. Karboksylowy koniec receptora P2X7 może również ulegać palmitylacji. Modyfikacja ta jest powiązana z interakcjami między receptorem a błoną komórkową. Ukierunkowana mutageneza miejsca palmitylacji wpływała na obecność receptora w błonie komórkowej. Komórki ze zmutowanym wariantem receptora P2X7,

niezdolnym do palmitylacji, miały obniżoną ilość tego receptora w błonie komórkowej, natomiast dużą ilość w retikulum endoplazmatycznym (Gonnord i wsp., 2009).

Rejonem które ulega N-glikozylacji jest z kolei pętla zewnątrzkomórkowa. Znajduje się tam pięć miejsc, które mogą ulegać tej modyfikacji: N187, N202, N213, N241, N284. Schemat glikozylacji może różnić się w zależności od rodzaju tkanki (Lenertz i wsp., 2010). N-glikozylacja oprócz wpływu na poziom receptora w komórkach, powoduje również zmiany w transdukcji sygnału wewnątrz komórki. Ukierunkowana mutageneza w miejscu N187 powodowała zablokowanie modyfikacji tego miejsca, a w rezultacie zmniejszoną aktywność receptora P2X7 (Di Virgilio i wsp., 2018).

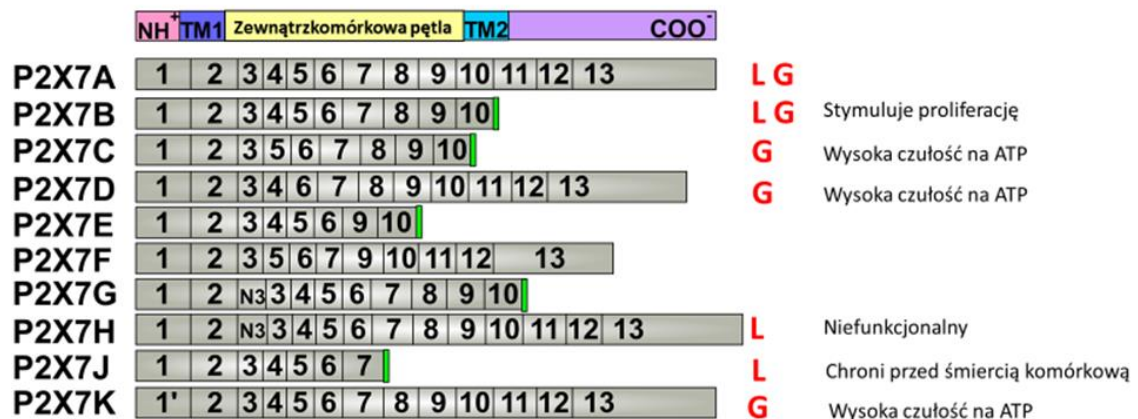
Ostania znana modyfikacja postranslacyjną, jaką może być poddany receptor P2X7 jest ADP-rybozylacja. Modyfikacja ta powoduje alternatywną aktywację P2X7 poprzez imitowanie przyłączenia ATP w miejsce aktywne. Enzymy ART2.1 oraz ART2.2 rybozylują receptor P2X7 w pozycji R125, w hipotetycznym miejscu wiązania się ATP, co powoduje jego trwałą aktywację oraz zmniejszenie powinowactwa do zewnątrzkomórkowego ATP (Adriouch i wsp., 2001; Adriouch i wsp., 2008). Modyfikacja ta została zaobserwowana tylko u gryzoni, gdyż w tkankach człowieka nie występują enzymy ART2.1 i ART2.2 potrzebne do przeprowadzenia tego procesu (Haag i wsp., 1994).

1.3.4 Warianty składania białka P2X7

Do tej pory zidentyfikowano 9 wariantów składania genów kodujących ludzki receptor P2X7 (Rycina 1.4). Gen tworzący pełną i prawidłowo zbudowaną podjednostkę receptora oznaczono symbolem P2X7A, natomiast kolejne warianty, wynikające z alternatywnego składania, nazwano kolejnymi literami alfabetu od B do J. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że tylko 3 spośród skróconych wariantów białka mogą tworzyć podjednostki receptora. Są to kolejno: P2X7B, P2X7H i P2X7J (Feng i wsp., 2006; Adinolfi i wsp., 2010; Giuliani i wsp., 2014). Izoforma P2X7B charakteryzuje się, w porównaniu do izoformy P2X7A, krótkim fragmentem karboksylowym. Izoforma ta, o długości 364 aminokwasów, tworzy funkcjonalny kanał jonowy, który z powodu skróconego fragmentu karboksylowego nie może uformować funkcjonalnego pora w błonie komórkowej, a długotrwała stymulacja P2X7B, nie prowadzi do śmierci komórek. Co więcej, obecność tej izoformy może powodować intensyfikację proliferacji poprzez stymulację czynnika transkrypcyjnego NFAT1 przez jony wapnia (Adinolfi i wsp., 2010). Kolejna izoforma - P2XH o długości 274 aminokwasów, tworzy niefunkcjonalny kanał

jonowy (Cheewatrakoolpong i wsp., 2005). Ostatni z wykrytych na poziomie białka izofrom recetora to izoforma P2X7J. Zbudowana jest z 258 aminokwasów i potrafi tworzyć, razem z izoformą P2X7A, нефункционалне heterotrimery. Taki heterotrimer zwiększał oporność komórek nowotworu szyjki macicy na zewnątrzkomórkowe ATP, nie powodując śmierci komórkowej (Feng i wsp., 2006).

U gryzoni wykryto cztery warianty składania dla genu kodującego podjednostkę P2X7 (P2X7B, P2X7C, P2X7D, P2X7K). Izoformy P2X7B i P2X7D potrafią tworzyć heterodimery z izoformą P2X7A, zmniejszając aktywność tak zbudowanego receptora P2X7. Izoforma P2X7K zbudowana jest z 592 aminokwasów, która gdy utworzy receptor P2X7 charakteryzuje się większym powinowactwem do ATP niż receptor zbudowany z podjednostek izoformy P2X7A (Schwarz i wsp., 2012).



L – wariant wykryty u ludzi **G** – wariant wykryty u gryzoni
| Kodon stop

Rycina 1.4. Graficzne przedstawienie możliwych wariantów alternatywnego składania receptora P2X7 (zmodyfikowano wg. Andrejew i wsp., 2020).

1.3.5 Aktywacja receptora P2X7

Receptor P2X7 tak jak wszystkie receptory tej grupy aktywuje się po stymulacji zewnątrzkomórkowym ATP. Jednak w porównaniu do innych receptorów P2X, stężenie liganda musi być wyższe, około od 50 μ M do 2,5 mM. Stężenie efektywnie aktywujące receptor jest różne w zależności od gatunku organizmu, z którego pochodzi (Surprenant

i wsp., 1996; Rassendren i wsp., 1997; Bradley i wsp., 2011; Roman i wsp., 2009; Fonfira i wsp., 2008).

Receptor P2X7 może być również aktywowany przez syntetyczne analogi ATP, takie jak 2(3)-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP (BzATP) oraz adenozylo 5-(γ -tio) trójfosforan (ATP γ S). BzATP wykazuje około 10 razy większe powinowactwo do receptora P2X7, niż ATP. Wyjątkiem jest receptor P2X7 pochodzący z komórek kawii domowej (Fonfira i wsp., 2008), w tym przypadku BzATP aktywował receptor P2X7 nieznacznie silniej niż ATP. ATP γ S aktywuje P2X7 pochodzący z myszy, szczura, psa i człowieka jednak poziom aktywacji jest znacząco słabszy w porównaniu do BzATP i ATP (Donnelly-Roberts i wsp., 2009; Spildrejorde i wsp., 2014) (Tabela 1.1).

Gatunek	Identyczność sekwencji (%)	EC ₅₀ (μ M)		
		ATP	BzATP	ATP γ S
Człowiek	100	96	5	>100
Makak królewski	96	800	58	Brak danych
Pies	85	1148	21	Brak danych
Szczur	80	85	4	>1000
Mysz (BALB/c)	80	200	60	>1000
Mysz (C57BL/6)	80	162	36	>1000
Kawia domowa	77	603	>200	Brak danych

Tabela 1.1. Zestawienie aktywności agonistów receptora P2X7 w zależności od gatunku, oraz stosowanego agonisty. EC₅₀ oznacza medialne stężenie efektywne wyrażone w mikromolach (Na podstawie Bartlett i wsp., 2014).

Ciekawą i odmienną ścieżką aktywacji P2X7 jest jego stymulacja zależna od lipopolisacharydów z bakterii gram-ujemnych (LPS). Wprowadzenie do wnętrza komórki konstruktu genetycznego, powodującego produkcję LPS-u w cytoplazmie stymuluje kaspazę 11, która aktywując, poprzez cięcie, kanał panneksynę-1. Powoduje to zwiększone uwalnianie ATP do środowiska zewnątrzkomórkowego i aktywację P2X7 (Yang i wsp., 2015). Co więcej postuluje się, że LPS może wpływać na zwiększenie czułości receptora P2X7 na zewnątrzkomórkowe ATP, poprzez przyłączenie do domeny wiążącej LPS w tymże receptorze i zmiany konformacyjne (Denlinger i wsp., 2001).

Istnieją doniesienia wskazujące na pozytywną rolę katelicydyn w regulacji aktywności receptora P2X7. Należący do tej rodziny antybakteryjny peptyd LL-37 aktywował receptor P2X7, powodując dojrzewanie i uwolnienie IL-1 β (Elssner i wsp., 2004). Badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze, wskazują jednak, że LL-37 nie

aktywuje receptora P2X7 bezpośrednio, tylko działa jako czynnik zwiększający czułość na ATP (Pochet i wsp., 2006; Tomasing i wsp., 2008), poprzez modulację allosteryczną. W podobny sposób mogą regulować aktywność P2X7, liczne substancje takie jak: tenidap (Sanz i wsp., 1998), polimyksyna B (Ferrari i wsp., 2004), klemastyna (Nörenberg i wsp., 2011), iwermetyna (Nörenberg i wsp., 2012) oraz ginsenozydy (Helliwell i wsp., 2015).

1.3.6 Zahamowanie aktywności receptora P2X7

W trakcie intensywnych badań nad receptorem P2X7 odkryto wiele związków chemicznych, mogących hamować jego aktywność (Tabela 1.2). Każdy z tych antagonistów różni się powinowactwem do receptora, mechanizmem działania oraz specyficznością gatunkową.

Pierwsze generacje inhibitorów P2X7 były silnie niespecyficzne, oprócz zahamowania aktywności, P2X7 blokowały również inne receptory z rodziny P2 (Gever i wsp., 2006). Przykładem takich inhibitorów jest PPADS (Lambrecht i wsp., 1992; Valera i wsp., 1994) i suramina (Urbanek i wsp., 1990) które, blokowały również inne receptory z rodziny: P2X, P2Y oraz P1. Zdecydowanie bardziej specyficznym inhibitorem P2X7 pierwszej generacji było oxATP (Murgia i wsp., 1993), które przyłącza się w nieodwracalny sposób do receptora P2X7. Jednak dalsze badania wykazały, że nie jest to idealny antagonist. Oprócz nieodwracalnej inhibicji spowodowanej przez kowalencyjne zmiany struktury białkowej, oxATP może również hamować aktywność receptorów P2X2 oraz P2X3 (Evans i wsp., 1995).

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych w użyciu inhibitorów P2X7 pierwszej generacji, jest Błękit brylantowy G (BBG) (Soltoff i wsp., 1989; Jiang i wsp., 2000). Inhibitor ten wykazuje największe powinowactwo do szczurzego receptora P2X7, blokując go przy nanomolarnych stężeniach. Jest to stosunkowo tani i nietoksyczny inhibitor, jednak należy wspomnieć, że nie jest pozbawiony wad. BBG może hamować aktywność innych receptorów P2X takich jak: P2X1, P2X2, P2X3 oraz P2X4 (Jiang i wsp., 2000). Co więcej istnieją doniesienia o inhibicji paneksyny-1 przez BBG (Qiu i

Dahl, 2009; Dahl i wsp., 2013). Warto też wspomnieć, że BBG jest barwnikiem, co w niektórych zastosowaniach może powodować problemy.

Wraz z rozwojem nowych metod przesiewowych oraz poznaniu dokładnej struktury białkowej receptora P2X7, pojawiły się inhibitory drugiej generacji. Ich pojawienie się było wynikiem zainteresowania przemysłu farmaceutycznego, które było skutkiem stwierdzenia ważnej roli receptora P2X7 w regulacji stanu zapalnego (Virgillio i wsp., 2017) i bólu neuropatycznego (Zhang i wsp., 2020). Inhibitory P2X7 pierwszej generacji, były głównie, oparte na badaniach *in vitro* i jak się okazało, często nie nadawały się do zastosowania *in vivo*. Było to spowodowane szybką degradacją inhibitora po podaniu do organizmu zwierzęcia oraz słabymi właściwościami farmakokinetycznymi (Bartlett i wsp., 2014). Inhibitory nowej generacji charakteryzują się zwiększoną efektywnością, w stosunku do pierwszej generacji oraz większą biodostępnością w układzie *in vivo* (Nelson i wsp., 2006; Michel i wsp., 2007; Broom i wsp., 2008; Honore i wsp., 2009; Letavic i wsp., 2013; Pupovac i wsp., 2013).

Gatunek	IC50 (µM)								
	PPADS	BBG	Reactive Blue	KN-62	A438079	A740003	AZ10606120	AZ11645373	JNJ-47965567
Człowiek	1,2	1,9	5,4	0,2	0,9	0,09	0,003	0,05	0,005
Makak królewski	Brak danych	Brak danych	Brak danych	0,1	0,3	Brak danych	0,004	0,02	0,003
Pies	Brak danych	0,05	Brak danych	0,01	3,9	Brak danych	0,06	0,04	0,005
Szczur	1,2	0,6	2,8	>100	0,1	0,1	0,03	>20	0,063
Mysz (BALB/c)	4,9	0,2	21	0,2	0,6	0,7	0,6	1,6	0,03
Mysz (C57BL/6)	40	0,5	18	0,6	0,6	1,7	0,6	1,6	0,03
Kawia domowa	0,2	0,02	Brak danych	0,1	Brak danych	Brak danych	Brak danych	1,2	Brak danych

Tabela 1.2. Zestawienie efektywności antagonistów receptora P2X7 w zależności od gatunku, oraz stosowanego antagonisty. Cztery pierwsze od lewej to inhibitory pierwszej generacji, cztery następne to inhibitory drugiej generacji. IC₅₀ oznacza medialne stężenie inhibitora wyrażone w mikromolach (na postawie Bartlett i wsp., 2014).

Alternatywą dla inhibitorów w postaci małych cząsteczek chemicznych są monoklonalne przeciwciała oraz nanociała skierowane przeciwko receptorowi P2X7. Podanie

przeciwciała anti-P2X7 zmniejszało stan zapalny w mysim modelu wrzodziejącego zapalenia jelit (Kurashima i wsp., 2012). Zastosowanie nanociał skierowanych przeciwko P2X7 zmniejszało z kolei kontaktowy wyprysk alergiczny w mysim modelu *in vivo* (Danquah i wsp., 2016). Przeciwciała anti-P2X7 mogą się również łączyć z krótkimi lub niefunkcjonalnymi izoformami receptora (Barden i wsp., 2003). Zastosowanie przeciwciała anti-P2X7 zmniejszało aktywność receptora P2X7 w komórkach mysiego czerniaka B16, powodując redukcję wielkości guza (Gilbert i wsp., 2017).

Na inhibicję receptora P2X7 może wpływać również zewnątrzkomórkowe stężenie jonów. Wysokie stężenie jonów magnezu Mg^{2+} obniża intensywność sygnału wapniowego po stymulacji przez ATP, w komórkach szczurzych i ludzkich (Rassendren i wsp., 1997). Dalsze badania tego fenomenu wykazały wpływ innych jonów, takich jak wapń, cynk, miedź, na aktywność P2X7. Znaczący wpływ na aktywność miało też stężenie jonów wodorowych (pH) (Virginio i wsp., 1997).

1.4 Funkcje i fizjologia receptora P2X7 w komórkach prawidłowych

1.4.1 Regulacja wydzielania interleukiny do środowiska zewnątrzkomórkowego

Jedną z najbardziej intensywnie badanych, molekularnych funkcji receptora P2X7 jest udział w rozwoju stanów zapalnych, a dokładniej formowaniu inflamasomu NLPR3, a następnie w dojrzewaniu i uwalnianiu interleukiny 1β do środowiska zewnętrznego przez makrofagi oraz inne komórki układu odpornościowego (Gudipaty i wsp., 2003; He i wsp., 2013). Wydzielanie interleukiny do środowiska zewnątrzkomórkowego odbywa się dwuetapowo. W pierwszym etapie następuje synteza pro-interleukiny 1β oraz składników inflamasomu NLPR3 przez stymulację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynniki te aktywują się gdy komórka zostanie poddana działaniu specyficznych wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP). Przykładem takiego wzorca jest LPS, który łącząc z białkiem wiążącym LPS (LBP) oraz białkiem CD14, tworzy kompleksy aktywujące czwarty receptor toll podobny (TLR4). W drugim etapie następuje składanie inflamasomu, aktywacja kaspazy 1 oraz uwolnienie i dojrzewanie interleukiny 1β . Zewnątrzkomórkowe ATP aktywuje, znajdujący się na zewnętrznej błonie komórek układu odpornościowego receptor P2X7, który działając jako nieselektywny kanał jonowy powoduje wniknięcie, zgodnie z gradientem stężeń, jonów wapnia (Ca^{2+}) oraz sodu (Na^{+}) do wnętrza komórki. Jednocześnie zgodnie z gradientem stężeń, z komórki uwalniają się jony potasu (K^{+}) i to zjawisko jest kluczowe w produkcji interleukiny 1β

(Perregaux i wsp., 1998; Muñoz-Planillo i wsp., 2013). Nagły spadek stężenia potasu w komórce powoduje aktywację kaspazy 1 (Kahlenberg i Dubyak, 2004). Do nadprodukowanego w pierwszym etapie, białka NLPR3, przyłącza się cząsteczka adaptorowa ASC, która posiada domenę rekrutującą kaspazy (CARD). Domena ta umożliwia wzmożoną aktywację kaspazy 1 poprzez cięcie pro-kaspazy. Aktywna kaspaza prowadzi proteolityczne cięcie niedojrzałej formy IL-1 β z formy o masie 35 kDa do formy aktywnej o masie 18 kDa (Gross i wsp., 2011). Tak zmieniona cytokina zostaje uwolniona na zewnątrz komórki, powodując indukcję stanu zapalnego.

Interleukina 1 β jest jedną z najlepiej zbadanych interleukin prozapalnych, bierze czynny udział w obronie komórki przed patogenami oraz w wielu chorobach metabolicznych, autoimmunologicznych oraz nowotworowych (Dinarello 1994; Macarthur i wsp., 2004; Dinarello, 2018). Proces ten następuje po stymulacji różnymi alarminami.

Doświadczenia z myszami pozbawionymi genu kodującego receptor P2X7, wykazały jego kluczową rolę w formowaniu inflamasomu NLPR3 (Solle i wsp., 2001). Myszy te wykazywały obniżoną ilość produkowanej IL-1 β oraz IL-6 po stymulacji przez ATP, co może świadczyć o roli receptora P2X7 w odpowiedzi prozapalnej.

1.4.2 Rola receptora P2X7 w innych drogach prozapalnych

Receptor P2X7 jest zaangażowany w wydzielanie do środowiska zewnątrzkomórkowego prostaglandyn. W mysich makrofagach stymulacja receptora P2X7 powoduje wydzielenie prostaglandyny E₂, tromboksany B₂ oraz leukotreiny B₄ (Barbera-Cremades i wsp., 2012). Aktywowany P2X7 może wpływać również na hydrolizę kwasu arachidonowego, który jest substratem dla syntezy cyklooksygenazy, prostaglandyny E₂, które pełnią ważną rolę w stanie zapalnym, gorączce i bólu (El Ouaaliti i wsp., 2012). Co więcej aktywację P2X7 obserwuje się w uszkodzonych tkankach, w których rozpoczyna się naciek zapalny. Stymulowanie przez zewnątrzkomórkowe ATP, mysich komórek Kupffera indukowało nekrotyczną śmierć tych komórek oraz uwolnienie dużych ilości prostaglandyny E₂ oraz IL-1 β (Toki i wsp., 2009). Powyższe badania wskazują na P2X7 jako ciekawy cel w leczeniu stanu zapalnego, który mógłby być alternatywą dla inhibitorów cyklooksygenazy (Barbera-Cremades i wsp., 2012).

1.4.3 Stymulacja wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz azotu

Reaktywne formy tlenu są stałym elementem sygnalizacyjnym w komórce żywej. Enzymy łańcucha oddechowego, występującego w każdej aktywnie metabolizującej komórce, prowadząc fosforylację oksydacyjną, wytwarzają duże ilości reaktywnych form tlenu oraz azotu (Hoffman i Brookes, 2009), redukowanych przez systemy antyoksydacyjne (Bae i wsp., 2011). Reaktywne formy tlenu produkowane przez makrofagi i mikroglej pełnią rolę ochronną przed inwazją drobnoustrojów.

W wielu stanach patologicznych takich jak nowotwory czy choroby metaboliczne poziom wolnych rodników jest zdecydowanie wyższy niż w komórkach prawidłowych (Liou i Storz, 2010; Alfadda i Sallam, 2012; Galadari i wsp., 2014). Sygnalizacja nukleotydowa może stymulować produkcję reaktywnych form tlenu. Receptor P2X7 w komórkach mikrogleju i makrofagów wpływał na fosforylację oksydazy NADPH, powodując zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu. Molekularny mechanizm tej aktywacji jest niejasny, z danych literaturowych wiadomo jednak, że oksydazy NADPH mogą być aktywowane przez wiele ścieżek związanych z sygnalizacją wapniową na przykład: przez kinazę białkową C, kinazy aktywowane mitogenami p38 i ERK1/2 oraz kinazę 3-fosfoatydyloinozytolu (Guerra i wsp., 2007; Martel-Gallegos i wsp., 2009).

Zaobserwowano, że ciągła stymulacja receptora P2X7 przez niskie stężenia ATP nie powoduje śmierci komórkowej, a zwiększa polaryzację błony mitochondrialnej poprzez podniesione stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, a co za tym idzie również w mitochondriach. Wapń ten wpływał na fosforylację oksydacyjną, która stymulowała metabolizm komórkowy oraz wpływała na przeżywalność komórek w warunkach pozbawienia glukozy (Adinolfi i wsp., 2005; Amoroso i wsp., 2012).

1.4.4 Tworzenie pora komórkowego

Wyjątkową właściwością receptora P2X7, odróżniając go od innych receptorów z rodziny P2X jest jego dualistyczna natura. Oprócz nieselektywnego kanału kationowego, aktywowany P2X7 może, indukować powstanie błonowego pora, którego otwarcie, prowadzi do wnikania dużych cząsteczek (powyżej 900 kDa) oraz śmierci komórki (Surprenant i wsp., 1996; Rassendren i wsp., 1997). Wraz z długotrwałą stymulacją agonistami P2X7 zwiększa się przenikanie do wnętrza komórki organicznych kationów, np. N-metyl-D-glukaminy (Jiang i wsp., 2005), która jest zdecydowanie większa niż jony wapnia, potasu czy sodu. Czas tworzenia się pora jest różny i zależy od wielu czynników

takich jak: rodzaj linii komórkowej, wariant składania białka tworzącego receptor P2X7 oraz agonista jakim jest stymulowany.

Do tej pory przedstawiono dwa potencjalne mechanizmy tworzenia się pora komórkowego po stymulacji receptora P2X7. Pierwszy związany jest z białkiem, które wchodzi bezpośrednio w interakcję z receptorem P2X7 – Panneksyną-1. Istnieje wiele dowodów wskazujących na kluczową rolę tego białka w formowaniu pora komórkowego (Suadiciani i wsp., 2012; Monif i wsp., 2009;). Eksperymenty z użyciem małego interferującego RNA, komplementarnego do genu kodującego Panneksynę-1 wykazały, że obniżenie ilości tego białka w liniach komórkowych THP-1, 1321 N1 i J774 znacząco hamowało wnikanie dużych fluorescencyjnych cząsteczek po stymulacji receptora P2X7 (Pelegriń i Surprenant 2006; Locovei i wsp., 2007; Iglesias i wsp., 2009). Co więcej wiarygodność tej teorii potwierdzają eksperymenty z wykorzystaniem techniki koimmunoprecypitacji, w których wykazano bezpośrednią interakcję receptora P2X7 z Panneksyną-1 (Li i wsp., 2011; Poornima i wsp., 2012).

Doświadczenia z wykorzystaniem mysich makrofagów z usuniętym genem kodującym Panneksynę-1, sugerują istnienie innych mechanizmów. Komórki te pomimo braku Panneksyny-1 nie wykazywały zmniejszenia efektywności wnikania barwników do wnętrza komórki (Qu i wsp., 2011; Lemaire i wsp., 2011).

Co więcej, w komórkach HEK293 ze stałą, zwiększoną ilością receptora P2X7 zaobserwowano wnikanie tylko kationowych barwników takich jak Yo-Pro-1 oraz bromku etydyny. W mysich makrofagach zaobserwowano wnikanie barwników kationowych poprzez por, natomiast barwniki anionowe wnikaly poprzez dyfuzję (Schachter i wsp., 2008; Cankurtaran-Sayar 2009).

1.4.5 Wpływ aktywacji receptora P2X7 na reorganizację błony komórkowej

Receptor P2X7 jest jednym z wielu białek zaangażowanych w reorganizację struktury błony komórkowej. Mechanizm tych zmian jest słabo poznany, jednak stymulacja niektórych rodzajów komórek zewnątrzkomórkowym ATP powoduje powstanie licznych pęcherzyków i wybruszeń w błonie komórkowej w krótkim czasie od podania agonisty (MacKenzie i wsp., 2001). Postuluje się że białkami odpowiedzialnymi za zmiany w błonie komórkowej jest kinaza ROCK I (Morelli i wsp., 2003), białko szoku cieplnego HSP90, które jest negatywnym regulatorem powstawania zmian w błonie komórkowej (Adinolfi i wsp., 2003), oraz białko EMP2 (Wilson i wsp., 2002). EMP2 wchodzi bezpośrednio w interakcję z końcem karboksylowym receptora P2X7, co może

wskazywać na powiązanie pomiędzy zmianami struktury błony komórkowej, a powstawaniem pora komórkowego po stymulacji receptora P2X7. Powstawanie pęcherzyków w błonie komórkowej nie jest związane tylko ze stresem komórkowym. Receptor P2X7 jest również zaangażowany w reorganizację błony komórkowej w komórkach leukocytów, w celu migracji przez naczynia krwionośne oraz macierz pozakomórkową (Qu i wsp., 2009). Co więcej, pojawienie się pęcherzyków w błonie komórkowej, po stymulacji receptora P2X7, jest pierwszym krokiem w powstawaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Qu i wsp., 2009).

1.4.6 Regulacja śmierci komórkowej

Jako że na końcu karboksylowym receptora P2X7 znajduje się domena podobna do domeny śmierci w receptorze czynnika martwicy nowotworów (TNF-R1), która jest zaangażowana w indukcję apoptozy, nie jest zaskakujące, że receptor ten bierze udział w regulacji śmierci komórkowej (Zanovello i wsp., 1990, Chow i wsp., 1997; Denlinger i wsp., 2001). Początkowo myślano, że aktywacja tego receptora prowadzi głównie do śmierci nekrotycznej (Virgilio i wsp., 1989). Jednak dalsze badania wykazały, że P2X7 jest zaangażowany w inne rodzaje śmierci komórkowej. W literaturze możemy spotkać informacje o indukcji: pyroptozy (Yang i wsp., 2015), nekroptozy (Dubyak, 2012) oraz autofagii (Young i wsp., 2015). Istnieją nawet udokumentowane przypadki na występowanie charakterystycznych markerów różnych rodzajów śmierci komórkowej w obrębie jednej komórki. W mysich limfocytach stymulowanych przez ATP, najpierw zaobserwowano obkurczenie się komórek co jest charakterystyczne dla śmierci apoptotycznej, by po kilku minutach, traktowane komórki się rozpadły jak podczas śmierci nekrotycznej (Taylor i wsp., 2008).

Zdolność do aktywacji śmierci komórkowej jest zależna od wariantu składania receptora. Aktywacja wariantu receptora P2X7B nie powoduje śmierci komórkowej w transfekowanych komórkach HEK293 (Adinolfi i wsp., 2010).

Receptor P2X7 w znacznej większości nie powoduje indukcji śmierci apoptotycznej. Najczęstszym rodzajem śmierci komórkowej jest w przypadku aktywacji receptora P2X7 nekroza. Co więcej aktywacja receptora nie zawsze prowadzi do jakiegokolwiek śmierci komórkowej. Zależy to od rodzaju komórek oraz izoforny receptora (Virgilio i wsp., 2017).

1.4.7 Stymulacja podziałów komórkowych

Jak wspomniano we wcześniejszym podrozdziale, przez długi czas receptor P2X7 był uznany jako czynnik prowadzący do śmierci komórkowej (Virgilio i wsp., 2017). Jednak intensywne badania na różnych liniach komórkowych oraz z kolejnymi wariantami składowania receptora wykazały, że receptor ten może pełnić zupełnie inną rolę. Pierwsze doświadczenia z limfocytami transfekowanymi przejściowo genem receptora P2X7 wykazały zwiększoną proliferację tych komórek po stymulacji przez ATP (Baricordi i wsp., 1999). W komórkach limfocytów T aktywacja receptora P2X7 stymulowała autokrynną wydzielanie ATP do środowiska oraz interleukiny drugiej. IL-2 stymulowała aktywację czynników transkrypcyjnych w limfocytach T co w efekcie zwiększało ich intensywność proliferacji w myszach szczepu BBALB/c (Yip i wsp., 2009). Badania nad alternatywnymi wariantami składowania receptora wykazały, że pozbawiona fragmentu z końca karboksylowego, krótsza izoforma P2X7B może wpływać na zwiększenie intensywności proliferacji (Adinolfi i wsp., 2005; Adinolfi i wsp., 2010). Eksperymenty przeprowadzone z komórkami mikrogleju wykazały znaczącą rolę receptora P2X7 w stymulacji proliferacji. Zahamowanie aktywności P2X7 przez inhibitory lub wyprowadzanie linii komórkowej ze zmutowanym wariantem receptora (G345Y) obniżały w znaczącym stopniu intensywność proliferacji mikrogleju (Bianco i wsp., 2006; Monif i wsp., 2009; Monif i wsp., 2010).

1.5 Receptor P2X7 w komórkach nowotworowych

Receptor P2X7, jest również powszechny w komórkach nowotworowych jak i w komórkach somatycznych. Stres związany z hipoksją wewnątrz guza oraz śmierć komórek nowotworowych na skutek chemioterapii lub radioterapii (Martins i wsp., 2009; Lecciso i wsp., 2017) mogą wpływać na zwiększone uwalnianie ATP do środowiska. Dodatkowo, obecność specyficznych białek takich jak transportery SLC29A1, SLC29A2 oraz transportery nukleozydów SLC28A1-A3 mogą znacząco wpływać na zwiększone stężenie ATP w środowisku guza (Gray i wsp., 2004; Young i wsp., 2013). Obserwowany efekt zwiększonego stężenia zewnątrzkomórkowych nukleotydów zależy jednak od rodzaju tkanki z jakiej pochodzi nowotwór. Dlatego należy nieco bardziej szczegółowo opisać jak różna może być odpowiedź receptora P2X7 w zależności od kontekstu tkankowego.

1.5.1 P2X7 w nowotworze prostaty

Rozwijający się nowotwór prostaty w porównaniu do tkanki prawidłowej charakteryzuje się wysoką ekspresją mRNA kodującego receptor P2X7 (Ravenna i wsp., 2009). W badaniach przeprowadzonych metodami immunohistochemicznymi, z wykorzystaniem fragmentów pooperacyjnych guzów prostaty ze 116 różnych przypadków, wykazano wysoką ilość receptora P2X7 (Slater i wsp., 2004a.). Co więcej wysoka ilość tego białka była skorelowana z wysoką ekspresją antygenu gruczołu krokowego, który jest znanym i powszechnie używanym markerem złośliwości nowotworów prostaty (Slater i wsp., 2005). Doniesienia te wskazują, że ilość receptora P2X7 mogłaby być wykorzystywana jako negatywny czynnik prognostyczny w rozwoju tego typu nowotworów. Zauważono również, że poziom receptora P2X7 koreluje z poziomem receptorów wspierających podziały komórkowe takich jak: receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) oraz receptor estrogenowy alfa ($ER\alpha$), co może wskazywać na znaczącą rolę P2X7 w sprzyjaniu powstawania bardziej złośliwego charakteru guza (Ravenna i wsp., 2009). Również funkcjonalne badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych raka prostaty wykazały zwiększoną agresywność i inwazyjność tych linii po stymulacji receptora P2X7 przez zewnątrzkomórkowe ATP (Ghalali i wsp., 2014; Qiu i wsp., 2014).

1.5.2 Receptor P2X7 w nowotworach kości

Wysoka ilość receptora P2X7 została wykryta w wielu typach nowotworów układu kostnego. W kostniakomięsakach, mięsaku Ewinga i włókniaku chrzęstnośluzowatym wykryto podwyższoną ilość receptora P2X7 w porównaniu do tkanek niezmiennych nowotworowo (Gartland i ws., 2001, Alqallaf i wsp., 2009; Liu i wsp., 2010). Linie komórkowe pochodzące z układu kostnego charakteryzują się dużą różnorodnością izoform receptora P2X7. Komórki linii SaOs-2 wykazują ekspresję funkcjonalnego receptora P2X7, zdolnego do tworzenia pora w błonie komórkowej. Stymulacja ATP i BzATP powoduje zwiększoną śmierć komórkową (Gartland i ws., 2001). Z kolei w linii HOS, podanie do medium hodowlanego zewnątrzkomórkowego ATP nie powodowało śmierci komórkowej, tylko zwiększało intensywność podziałów komórkowych (Liu i wsp., 2010)).

1.5.3 P2X7 w nowotworach skóry

Immunodetekcja białka receptora P2X7 w biopsyjnym materiale tkankowym pochodzącym od pacjentów chorujących na nowotwory skóry wykazały podwyższoną ilość tego receptora, w porównaniu do tkanek prawidłowych. Podwyższoną syntezę tego receptora zaobserwowano również w komórkach prawidłowych keratynocytów otaczających guz (Slater i wsp., 2003; White i wsp., 2005). Zarówno w liniach komórkowych pochodzenia zwierzęcego jak i pochodzących od człowieka, można odnaleźć podwyższoną ilość receptora P2X7. W spontanicznym, mysim czerniaku B16 poziom syntezy receptora P2X7, może wpływać na przeżywalność komórek nowotworu po radioterapii. Zastosowanie kombinacji radioterapii i inhibitorów receptora P2X7 znacząco wpływało na zwiększoną wydajność leczenia (Tanamachi i wsp., 2017). W badaniach przeprowadzonych w innej grupie badawczej, już samo podanie inhibitorów receptora P2X7 znacząco hamowało rozwój guzów nowotworowych pochodzących z mysiego czerniaka B16 (Adinolfi i wsp., 2012). Co ciekawe w czerniaku B16 występuje, prawdopodobnie izoforma A receptora P2X7, gdyż stymulacja przez zewnątrzkomórkowe ATP, powoduje powstanie komórkowego pora, jednak nie wpływa on znacząco na śmierć komórkową (Tanamachi i wsp., 2017). Badania komórek czerniaka człowieka, zawartych w macierzy NCI-60 wykazały, że podwyższona ekspresja mRNA kodującego receptor P2X7, jest charakterystyczną cechą wspólną dla wszystkich komórek czerniaków (Shankavaram i wsp., 2009; Reinhold i wsp., 2012). Co więcej, zarówno w linii ludzkiego czerniaka A375, tak jak w mysiej linii B16, głównym wariantem receptora P2X7 jest ta zdolna do tworzenia pora w błonie komórkowej (White i wsp., 2005).

1.5.4 P2X7 w nowotworach trzustki

Zwiększona ekspresja mRNA kodującego receptor P2X7 została wykryta u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki oraz nowotworem trzustki (Kunzli i wsp., 2007). Białko receptora P2X7 również jest wykrywane w liniach komórkowych pochodzących z nowotworów trzustki (Giannuzzo i wsp., 2015). Doświadczenia z wykorzystaniem linii komórkowych raka trzustki człowieka wykazały różnorodność obecnych w nich izoform receptora P2X7. W badanych liniach mogły występować razem, pełna izoforma - P2X7 A oraz izoforma skrócona - P2X7 B. Komórki traktowane zewnątrzkomórkowym ATP miały obniżony indeks mitotyczny oraz zwiększone pobieranie jodku propidyny co świadczy o otwarciu komórkowego pora i wprowadzeniu komórek na drogę śmierci

komórkowej (Giannuzzo i wsp., 2015). Pomimo tych jednoznacznych wyników, komórki te charakteryzowały się zwiększoną ruchliwością i inwazyjnością. Ta sama grupa badawcza wykazała wpływ receptora P2X7 na inwazyjność tych komórek *in vivo*, w ortotopowym modelu raka trzustki (Giannuzzo i wsp., 2016). Podanie inhibitora receptora P2X7 znacząco zmniejszało objętość guza oraz redukowało związane z nowotworem zmiany fibrotyczne trzustki.

1.5.5 Receptor P2X7 w raku piersi

Rola receptora P2X7 w nowotworach piersi jest dużo bardziej złożona niż przypadki opisane powyżej i pełna niejasności. Część badaczy wskazuje na zmniejszoną syntezę P2X7 w gruczolakoraku zrazikowym oraz gruczolakoraku przewodowym w porównaniu do tkanek prawidłowych (Li i wsp., 2009). Co więcej badania z wykorzystaniem cząsteczek mikro RNA (miR-150), regulujących syntezę białka P2X7 wykazały, że takie obniżenie poziomu receptora P2X7 może wpływać pozytywnie na rozwój nowotworów piersi. Linie komórkowe inkubowane z cząsteczkami miR-150, wykazywały zwiększoną agresywność i inwazyjność, wraz z obniżeniem poziomu białka P2X7. Te same wyniki uzyskano w doświadczeniach *in vivo*, podanie inhibitorów miR-150, zwiększało syntezę białka P2X7, a przez to zmniejszały agresywność guzów w ortotopowym modelu raka piersi (Huang i wsp., 2013). W kontrze stoją badania przeprowadzone przez Tan w roku 2015, w których wykazano zwiększoną produkcję białka P2X7 w komórkach nowotworowych, w porównaniu do komórek prawidłowych. Co więcej doświadczenia z wykorzystaniem małego interferującego RNA, wykazały że zahamowanie syntezy receptora może wpływać negatywnie na proliferację komórek linii MCF-7. Oprócz tego obniżenie poziomu P2X7 inicjowało apoptozę w tej linii. W tych badaniach wykazano również dodatnią korelację pomiędzy ilością receptora P2X7, a ilością receptora estrogenów (Tan i wsp., 2015). Rozbieżność w badaniach poziomu receptora P2X7 w tkankach prawidłowych i nowotworowych może być związana z wariantami tego białka. Zastosowanie przeciwciała wykrywającego koniec karboksylowy białka nie wykryje wariantów skróconych receptora. Badania z wykorzystaniem przeciwciała wykrywającego fragment zewnątrzkomórkowy, wykazały zwiększony poziom receptora P2X7, w porównaniu do tkanek prawidłowych (Slater i wsp., 2004b). Powyższe przykłady pokazują jak bardzo skomplikowane mogą być układy receptorów w komórkach nowotworowych i jak bardzo podczas badań należy używać metod

wykrywających możliwe alternatywne warianty składania transkryptów kodujących receptor P2X7.

Poziom receptora P2X7 w nowotworze piersi może być również powiązany z niekorzystnymi warunkami środowiskowymi występującymi w guzie. Warunki obniżonego poziomu tlenu wpływały na zwiększenie syntezy mRNA i białka receptora P2X7 (Tafani i wsp., 2010).

1.5.6 Receptor P2X7 w nowotworach układu pokarmowego

W prawidłowym, niezmiennym patologicznie żołądku poziom syntezy receptora P2X7 utrzymuje się na niskim poziomie. Wraz z pojawieniem się zmian nowotworowych poziom tego białka rośnie. Co więcej poziom syntezy P2X7 jest skorelowany ze stadiem rozwoju nowotworu. Im bardziej złośliwy guz na późniejszym poziomie rozwoju, tym większy jest poziom receptora P2X7. Powyższe wyniki sugerują, że receptor P2X7 może być nowym czynnikiem prognostycznym dla określenia złośliwości nowotworu żołądka oraz szacowanego czasu przeżycia chorego (Calik i wsp., 2020).

Bardziej skomplikowana ekspresja występuje w nowotworach jelita grubego. Analiza fragmentów pooperacyjnych pochodzących z 97 pacjentów chorujących na nowotwór jelita grubego wykazała zróżnicowany poziom syntezy receptora P2X7 w porównaniu do tkanek prawidłowych. Co więcej pacjenci z wysokim poziomem receptora P2X7 żyli zdecydowanie krócej w porównaniu do pacjentów z niskim poziomem syntezy receptora P2X7 (Zhang i wsp., 2019). W nowotworach jelita grubego wykryto różne warianty receptora P2X7, te funkcjonalne tworzące por komórkowy oraz krótsze, pozbawione tej funkcji (Barden i wsp., 2014). Podobny wzór ekspresji receptora P2X7 występuje w liniach komórkowych. Linie HT-29 oraz Colo-205 charakteryzują się występowaniem krótszych izoform receptora P2X7, pozbawionych możliwości tworzenia pora komórkowego (Barden i wsp., 2009), natomiast linie HCT8, Caco-2 oraz MCA38 charakteryzują się występowaniem pełnej formy receptora P2X7 tworzącą por komórkowy (Coutinho-Silva i wsp., 2005; Künzli i wsp., 2011; Bian i wsp., 2013).

1.5.7 P2X7 w nowotworach płuc

Transkrypty kodujące receptor P2X7 znaleziono u 26 pacjentów chorujących na niedrobnokomórkowego raka płuca. Co ciekawe w tych samych badaniach u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc nie wykryto żadnych transkryptów P2X7, co może wskazywać na związek tego receptora z nowotworzeniem. Co więcej największa

ekspresja mRNA kodującego P2X7 występowała w przerzutujących komórkach nowotworowych (Schmid i wsp., 2015). Receptor P2X7 występuje również w liniach nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuca A549, PC-9 oraz H-292 (Takai i wsp., 2012; Takai i wsp., 2014), a nie występuje zupełnie w komórkach prawidłowych oskrzeli Beas-2B (Takai i wsp., 2014). W komórkach linii H-292 obniżenie poziomu receptora P2X7, zmniejszało powodowaną przez transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) przebudowę cytoszkieletu aktynowego i migrację (Takai i wsp., 2014).

1.5.8 P2X7 w nowotworach krwi

P2X7 jest również szeroko rozpowszechniony w różnych rodzajach białaczek, jednak brakuje jednolitego wzorca funkcji tego receptora. W komórkach ostrej erytroleukemii myszy (MEL), receptor P2X7 charakteryzuje się tworzeniem funkcjonalnego pora komórkowego, który prowadzi do śmierci (Constantinescu i wsp., 2010). Poziom receptora P2X7 jest również podwyższony w białaczkach dziecięcych (Chong i wsp., 2009). P2X7 wykrywano również u pacjentów chorych na ostrą białaczkę mieloblastyczną oraz ostrą białaczkę limfoblastyczną (Zhang i wsp., 2004). Co więcej podwyższony poziom receptora P2X7 w komórkach pobranych od chorych na ostrą białaczkę mieloblastyczną korelował z krótszym czasem przeżycia pacjentów. Receptor P2X7 został wykryty również w komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej. W tej chorobie poziom receptora P2X7 był skorelowany z nasileniem choroby (Adinolfi i wsp., 2002). Inne badania dotyczące przewlekłej białaczki limfatycznej wykazały występowanie dwóch wariantów receptora P2X7 w tych komórkach. Obok pełnego receptora tworzącego pora komórkowy, komórki te charakteryzowały się występowaniem formy skróconej receptora P2X7, nietworzącego pora komórkowego (Gu i wsp., 2000).

1.5.9 P2X7 w raku szyjki macicy

W raku płaskonabłonkowym szyjki macicy, badanie metodą immunodetekcji wariantów receptora P2X7 nietworzących pora komórkowego, wykazało podwyższony poziom tego białka w porównaniu do tkanek prawidłowych (Barden i wsp., 2014). Co więcej badania innej grupy badawczej wykazały obniżony poziom pełnej długości wariantu receptora P2X7, przy czym poziom obniżenia korelował ze stopniem rozwoju nowotworu (Li i wsp., 2007). Istnieją również doniesienia wskazujące na występowanie różnych izoform receptora P2X7 jednocześnie w komórkach raka szyjki macicy, gdzie alternatywny

wariant składania receptora P2X₇ może tworzyć niefunkcjonalne triemy z wariantem P2X_{7A} (Feng i wsp., 2006).

1.5.10 P2X₇ w raku jajnika

Immunodetekcja poziomu receptora P2X₇ wykazała wysoki poziom tego receptora u pacjentek z rakiem jajnika oraz u zdrowych dawców tkanek. Poziom receptora w tkankach zdrowych i zmienionych chorobowo nie różnił się znacząco. Co ciekawe, w tych samych badaniach, linie komórkowe pochodzące od pacjentek z nowotworem jajnika SKOV-3 oraz CAOV-3 wykazywały podwyższony poziom receptora oraz zwiększona intensywność proliferacji po stymulacji receptora P2X₇ przez ATP i BzATP (Vázquez-Cuevas i wsp., 2014). Badania innej grupy badawczej wykazały, że w materiale biopsyjnym, pochodzącym od pacjentek chorujących na raka jajnika występują równocześnie: wariant receptora P2X₇ tworzący por komórkowy oraz krótsze warianty nie posiadające tej zdolności (Gilbert i wsp., 2019).

1.5.11 P2X₇ w neuroblastomie

Badania z wykorzystaniem guzów pochodzących od pacjentów chorujących na neuroblastomę wykazano wysoki poziom syntezy białka P2X₇, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby. Dostępne komercyjnie linie komórkowe również charakteryzują się występowaniem białka P2X₇ (Raffaghello i wsp., 2006). Co więcej stymulacja komórek neuroblastomy przez zewnątrzkomórkowe ATP, nie powodowała śmierci komórkowej, lecz intensyfikację podziałów komórkowych oraz zwiększone wydzielanie substancji P. Może to sugerować, że w komórkach neuroblastomy znajduje się krótszy wariant receptora P2X₇, który nie powoduje śmierci komórkowej poprzez tworzenie pora w błonie (Raffaghello i wsp., 2006). Badania innej grupy badawczej wykazały silną ekspresję mRNA kodującego receptor P2X₇ w próbkach pochodzących od 131 pacjentów chorujących na neuroblastomę (Amoroso i wsp., 2015). Wykazano również, że istnieje korelacja pomiędzy wysoką ekspresją genu kodującego P2X₇, a czasem przeżycia pacjentów. Badania z wykorzystaniem komórek linii ACN wykazały, że obniżenie poziomu receptora P2X₇ z wykorzystaniem małego interferującego mRNA, zmniejszało fosforylację kinazy AKT (*in vivo* i *in vitro*) oraz poziom unaczynienia guzach nowotworowych *in vivo* (Amoroso i wsp., 2015).

1.5.12 P2X7 w glejaku wielopostaciowym

Glejak wielopostaciowy jest najczęstszym i najbardziej złośliwym nowotworem pierwotnym mózgu u dorosłych. Guzy te charakteryzują się największym stopniem złośliwości, częstymi nawrotami choroby, gwałtownym rozrostem oraz niszczeniem przylegających do guza tkanek. Średnia długość życia człowieka, u którego zdiagnozowano glejaka wielopostaciowego wynosi od kilku miesięcy do dwóch lat po postawieniu diagnozy (Kleihues i wsp., 2002; Wen i Kesari, 2008). Wysoka śmiertelność wynika nie tylko ze złośliwości guza, ale również trudnego leczenia i diagnostyki. Jako że stosowane leki muszą przenikać barierę krew-mózg by dotrzeć do ogniska choroby, chemioterapia jest ograniczona do kilku chemoterapeutyków podawanych doustnie np. Temozolomidu (Bush i wsp., 2017). Również radioterapia nie zawsze odnosi pozytywne skutki. Wynika to z występującej u pacjentów różnej oporności na promieniowanie jonizujące oraz z silnie hipoksyjnego charakteru glejaka wielopostaciowego, który utrudnia działanie radioterapii (Amberger-Murphy, 2009). Najczęściej stosowaną strategią leczenia, która zapewnia najdłuższy czas wolny od choroby oraz poprawę życia pacjenta, jest chirurgiczne usunięcie guza wraz z otaczającymi go tkankami (Gliński i wsp., 2006). Jednakże z powodu skłonności do tworzenia komórkowych nacieków całkowite usunięcie guza jest niemal niemożliwe, a pozostawione resztki guza powodują w niedługim czasie wznowienie choroby.

Receptor P2X7 jest, obok innych receptorów nukleotydowych, szeroko rozpowszechniony we wszystkich komórkach tworzących tkankę mózgową (Collo i wsp., 1997; Duan i Neary, 2006; Yu i wsp., 2008; Jimenez-Mateos i wsp., 2019). Nic więc dziwnego, że receptor ten jest również zaangażowany w wiele stanów patologicznych w mózgu, w tym i w glejaku wielopostaciowym. Receptor P2X7 występuje w niemal wszystkich modelach komórkowych glejaka wielopostaciowego jednak jego rola w rozwoju tej choroby jest niejasna. Analiza poziomu białka oraz ekspresji genu kodującego P2X7 wykazała obniżony poziom receptora P2X7 w glejaku, w porównaniu do prawidłowego mózgu. Ten fenomen autorzy tłumaczyli metylacją genu kodującego P2X7 (Liu i wsp., 2017).

W badaniach z wykorzystaniem mysiej linii glejaka wielopostaciowego GL261 wykazano rolę tego receptora w zwiększeniu podatności na śmierć komórkową oraz w zmniejszaniu oporności na radioterapię. Obniżenie ilości receptora P2X7 wykorzystaniem małego interferującego RNA, nie zmniejszało wielkości guzów w

modelu *in vivo*. Jednak guzy z obniżoną ilością tego receptora, były istotnie mniej podatne na radioterapię (Gehring i wsp., 2015). Podobne wyniki wskazujące na pozytywną rolę receptora P2X7 na stymulację śmierci komórkowej w warunkach *in vitro* wykazała Tamajusuku. Komórki mysiego glejaka GL261, stymulowane przez zewnątrzkomórkowe ATP, ginęły poprzez nekrozę (Tamajusuku i wsp., 2010). Co więcej w komórkach tej linii, receptor P2X7 jest prawdopodobnie funkcjonalny i jego aktywacja powoduje powstanie sygnału wapniowego oraz pora komórkowego prowadzącego do śmierci komórki. Badania przeprowadzone przez grupę Stronga, wykazały wzrost sygnału wapniowego po stymulacji przez zewnątrzkomórkowe ATP. Przeprowadzenie stymulacji receptora w pożywce z obniżoną zawartością jonów wapnia zmniejszyło znacząco ilość odpowiadających komórek, co więcej dodanie inhibitora receptora P2X7 – oxATP również obniżało ilość odpowiadających komórek (Strong i wsp., 2018). Zatem w przypadku mysiego modelu glejaka GL261, receptor P2X7 pełni rolę receptora regulującego śmierć komórkową i stymulacja przez zewnątrzkomórkowe ATP może wzmacniać działanie przeciwnowotworowe w terapii.

Zdecydowanie więcej niejasności co do funkcji receptora P2X7, występuje w szczurzych w komórkach glejaka wielopostaciowego. Badania z wykorzystaniem apyrazy, enzymu hydrolizującego ATP, wykazały że podanie jej w okolice wszczepionego guza glejaka C6 zmniejszyło jego objętość. Co więcej skutki inhibicji guza była zbliżona do efektów uzyskanych w grupie zwierząt leczonych temozolomidem (Morrone i wsp., 2006). Niejasna pozostaje za to funkcjonalność receptora P2X7 w komórkach glejaka C6 w warunkach *in vitro*. Część badaczy uważa że sygnał wapniowy pojawiający się po podaniu ATP lub BzATP pochodzi ze stymulacji receptora P2X7 oraz, że stymulacja tego receptora wpływa na zwiększoną agresywność komórek glejaka C6 oraz na ekspresję tego receptora (Wei i wsp., 2008). Również badania przeprowadzone w naszej grupie badawczej wykazały pojawienie się sygnału wapniowego po stymulacji przez BzATP, oraz zwiększoną intensywność proliferacji, bez śladów śmierci komórkowej (Matysiak i wsp., 2020). Z drugiej strony badania z sygnału wapniowego w glejaku C6 wykazały również możliwość stymulacji receptora P2Y2 przez BzATP oraz brak powstawania komórkowego pora po stymulacji receptora P2X7 (Supłat-Wypych i wsp., 2010). Inne grupy badawcze wskazują kanał jonowy TRPM7 jako źródło sygnału wapniowego po podaniu BzATP w komórkach glejaka C6 (Nörenberg i wsp., 2016). Należy jednak zauważyć że do tej pory nie wykonano żadnych badań z użyciem małego interferującego

RNA lub innych metod inżynierii genetycznej, która mogłaby pomóc zbadać aktywność P2X7 w tych komórkach, w warunkach *in vitro*.

Badania *in vivo* z wykorzystaniem szczurzego glejaka C6 wskazują na jednoznaczną i znaczącą rolę receptora P2X7 w regulowaniu agresywności guza. Podawanie szczurom z wprowadzonym glejakiem C6, inhibitora tego receptora (BBG), zmniejszało znacząco rozmiar guzów oraz ilość naciekającego mikrogleju na guz (Ryu i wsp., 2011). Co więcej wykazano również wpływ receptora P2X7 na wydzielanie białka zapalnego makrofagów (MIP-1 α), które może sprzyjać rekrutacji mikrogleju i wspieraniu agresywności glejaka C6 (Fang i wsp., 2011). W literaturze pojawiło się jednak również doniesienie o hamującym wpływie receptora P2X7 na rozwój glejaka C6. W badaniach przeprowadzonych przez Fang i współpracowników wykazano że inhibicja receptora P2X7 zwiększa rozmiar guza oraz powoduje zwiększenie ekspresji receptora P2Y2, czynnika indukowanego przez hipoksję (HIF-1 α) oraz czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF).

Podobnie skomplikowana jest ekspresja i funkcja receptora P2X7 w komórkach glejaków człowieka. Receptor P2X7 występuje w prawie wszystkich badanych liniach glejaka wielopostaciowego (Ji i wsp., 2018; Bergamin i wsp., 2019; Matysniak i wsp., 2020) oraz tkankach pochodzących od pacjentów (Ziberi i wsp., 2020). Jednak funkcjonalność tego receptora różni się w zależności od linii komórkowej. Wszystkie grupy badawcze pracujące nad tym zagadnieniem jednoznacznie wskazują na brak śmierci komórkowej w hodowlach ludzkich glejaków (Ji i wsp., 2018; Bergamin i wsp., 2019; Matysniak i wsp., 2020). Jednak na tym spójność wyników między grupami się kończy. Ji i współpracownicy wykazali że stymulacja receptora P2X7 przez agonistę – BzATP wpływa pozytywnie na proliferację komórek ludzkich glejaków. Jednak badania innych grup nie potwierdzają tych doniesień (Bergamin i wsp., 2019; Matysniak i wsp., 2020). Zahamowanie aktywności receptora P2X7 wpływało na wielkość guzów w modelu *in vivo* ludzkiego glejaka U-138 (Bergamin i wsp., 2019). Również w modelu ludzkiego glejaka U-251 zablokowanie aktywności receptora P2X7 wpływało hamująco na proliferację komórek oraz wydzielanie czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Co więcej inhibicja wzrostu komórek na skutek podania inhibitora P2X7 dawała taki sam rezultat w hamowaniu proliferacji jak traktowanie komórek temozolomidem (Drill i wsp., 2020; Kan i wsp., 2020).

Zewnątrzkomórkowe ATP może również wpływać na rozwój sferoidów *in vitro* oraz na populację komórek macierzystych glejaka. ATP podane do pożywki hodowlanej obniżało

poziom markerów komórek macierzystych oraz zmniejszało wielkość sferoidów ludzkich glejaków *in vitro* (Ledur i wsp., 2012). Jednak badania z wykorzystaniem komórek macierzystych glejaków, wyizolowanych od pacjentów wykazały stymulującą rolę receptora P2X7 na rozwój komórek macierzystych oraz na obecność markerów przejścia epithelialno mezenchymalnego (EMT), które wpływają na zwiększoną migrację komórek (Ziberi i wsp., 2020). Co więcej w pracy tej po raz pierwszy wykazano istnienie różnych wariantów alternatywnego składania receptora P2X7.

Istnieją również doniesienia o hamującym wpływie receptora P2X7 na ludzkiego glejaka M059J, wrażliwego na radioterapię. Napromienienie komórek wpływało na zwiększoną syntezę receptora P2X7 w tych komórkach, oraz zwiększało liczbę komórek wchodzących na drogę śmierci komórkowej (Gehring i wsp., 2012).

Reasumując, z badań nad rolą receptora P2X7 wyłania się niejednorodny obraz. Receptor ten wydaje się być zaangażowany w wiele funkcji komórkowych, jednak aby w pełni zrozumieć jaka jest jego rola w glejaku wielopostaciowym, potrzebne jest więcej dogłębnych badań, które wskażą molekularne interakcje receptora i mechanizmy działania na konkretne ścieżki przekazywania sygnałów w komórce.

2 ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Receptor P2X7 jest jednym z najintensywniej badanych receptorów nukleotydowych z rodziny P2X. Receptor ten jest szeroko rozpowszechniony w komórkach różnych gatunków oraz bierze udział w wielu ważnych fizjologicznych procesach takich jak: wydzielanie interleukin, regulacja stanu zapalnego, indukcja bólu, indukcji śmierci komórkowej. Istnieją również doniesienia o regulującym wpływie receptora P2X7 na rozwój i wzrost takich nowotworów jak: rak prostaty, rak szyjki macicy, rak płuc oraz neuroblastomy. Jednak w przypadku glejaka wielopostaciowego rola receptora P2X7 jest wciąż słabo poznana.

Wcześniejsze badania przeprowadzone w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego wykazały, że receptor P2X7 w komórkach glejaka C6 szczura jest niefunkcyjny, a obserwowany sygnał wapniowy pochodzi z stymulacji receptora P2Y2 przez syntetycznego agonistę BzATP. Jednak wyniki te stoją w pewniej kontrze do badań uzyskanych w modelu *in vivo* przez inne grupy badawcze.

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli receptora P2X7 w komórkach szczurzego i ludzkiego glejaka wielopostaciowego w modelu *in vitro* i *in vivo*.

Zamierzony cel realizowano poprzez wykonywanie zadań badawczych:

- Analiza ekspresji genów kodujących receptory nukleotydowe z rodziny P2 w glejakach wielopostaciowych
- Analiza funkcjonalności receptora P2X7 oraz jego wpływu na fenotyp komórek glejaków wielopostaciowych
- Analiza sygnału wapniowego w komórkach szczurzego glejaka C6 po obniżeniu ekspresji receptora z wykorzystaniem małego interferującego RNA oraz zmian w ścieżkach sygnałowych *in vitro*
- Analiza mechanizmu agresywności szczurzego glejaka C6 w modelu *in vivo*
- Analiza ścieżek sygnałowych zaangażowanych w zwiększoną przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego
- Analiza wpływu receptora P2X7 na mikrośrodowisko guza

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowla komórkowa

Linie komórkowe pochodzące z człowieka: U-87 (ECAC), U-251 (ECAC), U-138 (DSMZ) oraz linię komórkową szczura C6 (ATCC) hodowano w inkubatorze (Thermo Scientific Heraeus) w temperaturze 37°C oraz atmosferze zawierającej 5% CO₂ oraz 95% wilgotności względnej.

Linie komórkowe hodowano na pożywce DMEM o wysokiej zawartości glukozy (4,5 g/L) (Lonza) suplementowanej bydlęcą surowicą płodową (Gibco) w końcowym stężeniu 10%. Komórki hodowano na naczyniach hodowlanych z zmodyfikowanego plastiku, przystosowanego do hodowli komórkowych (Sarsted).

Morfologię i zagęszczenie hodowanych komórek rutynowo oceniano z wykorzystaniem mikroskopu odwróconego (Nikon) wyposażonego w kontrast fazowy. Gdy hodowane komórki osiągnęły 80% zagęszczenia były pasażowane w celu uniknięcia niekorzystnych zmian w parametrach linii komórkowej.

W celu oderwania komórek od podłoża hodowlanego wykorzystywano roztwór 0,05 % trypsyny z 0,02 % EDTA (Gibco). Z naczynia hodowlanego usuwano starą pożywkę hodowlaną, a następnie przepłukiwano komórki roztworem trypsyny z EDTA. Następnie komórki poddawano trawieniu struktur adhezyjnych w 3 ml trypsyny przez 3 minuty w inkubatorze, w temperaturze 37°C. Po oderwaniu się komórek od podłoża, natychmiast neutralizowano trypsynę poprzez podanie nadmiaru pożywki hodowlanej zawierającej 10% surowicy płodowej bydlęcej.

Liczbę komórek oraz ich żywotność oceniano z wykorzystaniem licznika komórek TC20™ Automated Cell Counter (Biorad) po barwieniu błękitem trypanu (Biorad). Hodowane linie komórkowe były rutynowo sprawdzane na obecność bakterii z rodziny *Mycoplasma sp.* z wykorzystaniem komercyjnego zestawu PCR Mycoplasma Detection Kit (Applied Biological Materials) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta.

3.1.1 Krioprezerwacja i ponowne wprowadzanie komórek do hodowli

Świeżo zakupione linie były hodowane do osiągnięcia odpowiedniego poziomu zagęszczenia (około 80%), a następnie były przenoszone do banku komórkowego w celu zmniejszenia niekorzystnych zmian w fenotypie linii komórkowej w wyniku długotrwałej hodowli. Komórki hodowanych linii glejaka wielopostaciowego odrywano od podłoża z wykorzystaniem trypsyny. Następnie trypsynę neutralizowano trzykrotnym nadmiarem kompletnej pożywki wzrostowej. Zawiesinę komórek następnie wirowano przez dwie

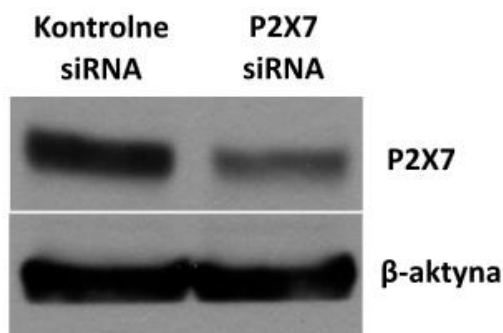
minuty z prędkością 500 x g, usuwano pożywkę z nad osadu a ten zawieszano w mieszaninie kompletnej pożywki hodowlanej (20%), płodowej surowicy bydlęcej (70%) i DMSO (10%). Zawiesinę komórek przenoszono do probówki odpornej na działanie niskich temperatur (Sarsted) i wstępnie schładzano w temperaturze -20°C przez około 2h. Tak przygotowane komórki przenoszono do -80°C na 24 h. Po tym czasie przenoszono je do banku komórkowego, gdzie w oparach ciekłego azotu można je było długotrwale przechowywać w temperaturze -196°C.

W celu ponownego wprowadzenia komórek do hodowli, komórki wyjmowano z banku i szybko ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury 37°C. Gdy zawartość krioprobówki się rozmroziła, medium z komórkami przenoszono do 8 ml pożywki hodowlanej zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej w celu jak największego rozcieńczenia DMSO. Następnie zawiesinę komórek wirowano przez dwie minuty z prędkością 500 x g i hodowano według procedury opisanej powyżej.

3.1.2 Obniżenie ilości białka receptora P2X7 z wykorzystaniem krótkiego interferującego RNA

Przed procedura komórki były wysiewane w liczbie 1×10^5 na płytkę o średnicy 3,5 cm. Następnie inkubowano je przez 24 h w pożywce bez płodowej surowicy bydlęcej, zastąpionej przez suplement N2 z dodatkiem 10 ng/ml naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Po tym czasie komórki inkubowano przez 72 godziny mieszaniną siRNA z czynnikiem transfekcyjnym TRANSit-X2 (Mirus Bio, USA). Jako kontrolę wykorzystano siRNA niekomplementarne do genów znajdujących się w komórkach ssaczy. Po 72 godzinach inkubacji pożywkę zmieniano na nie zawierającą siRNA i inkubowano przez 24 godziny. Obniżenie ilości receptora P2X7 sprawdzano metodą hybrydyzacji białek Western Blot. Komórki w których potwierdzono obniżenie ilości receptora wykorzystywano do dalszych eksperymentów. Po 72 godzinach inkubacji komórek glejaka C6 z czynnikiem tansfekcyjnym i siRNA, zaobserwowano około 50% obniżenie ilości wykrywanego białka P2X7 w porównaniu do komórek transfekowanych

niewyciszającym, kontrolnym siRNA (Rycina 3.1). Ten stopień obniżenia ilości wykrywanego P2X7 został uznany za satysfakcjonujący do dalszych eksperymentów.



Rycina 3.1. Reprezentatywny Western Blot, przedstawiający ilość białka P2X7 po 72 godzinach od transfekcji komórek małym interferującym RNA, komplementarnym do receptora P2X7.

3.2 Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.2.1 Izolacja totalnego RNA z komórek

W celu izolacji totalnego RNA z materiału komórkowego i tkankowego wykorzystano komercyjny zestaw GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx). Komórki wysiewano na szalkę o średnicy 6 cm w ilości 1×10^6 i hodowano je do momentu aż konfluencja komórek osiągnęła około 80% powierzchni szalki. Następnie komórki dwukrotnie płukano PBS i izolowano z nich RNA zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Do usunięcia zanieczyszczenia genomowym DNA wykorzystano trawienie deoksyrybonukleazą I (EURx). Po izolacji RNA zawieszano w sterylnej wodzie wolnej od rybonukleaz (Eurx) i wykonywano metodą spektrofotometryczną pomiar stężenia oraz jakości wyizolowanego RNA. W tym celu z wykorzystaniem spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) mierzono absorbancję próbki, używając światła o długości fali 260 nm i 280 nm. Czystość próbki określano na podstawie współczynnika A_{260}/A_{280} , gdy współczynnik ten był równy bądź wyższy 2, próbkę uznawano za czystą i przeprowadzano dalsze procedury.

3.2.2 Przygotowanie biblioteki cDNA

Do syntezy cDNA wykorzystano 1 μ g wyizolowanego totalnego RNA oraz zestawu do odwrotnej transkrypcji smART First Strand cDNA Synthesis kit (EURx), zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszanina reakcyjna (20 μ l) składała się z: 1 μ g RNA, 200 ng starterów, 100 μ M dNTP Mix, 25 U inhibitora RNAazy, oraz 200 U polimerazy smART,

całość mieszaniny dopełniała woda wolna od RNAz do objętości 20 μ l. Jako startery dla reakcji odwrotnej transkrypcji użyto losowych heksamerów DNA.

Reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzana była w termocyklerze MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) z wykorzystaniem następującego protokołu: inkubacja przez 10 minut w temperaturze 25°C, a następnie przez 50 minut w temperaturze 50°C. Po zakończeniu reakcji otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze 4°C.

3.2.3 Reakcja PCR i elektroforetyczny rozdział produktów

Przygotowaną w powyższym procesie bibliotekę cDNA wykorzystywano w reakcji PCR, mającej na celu wykryć transkrypty receptorów z rodziny P2. Do reakcji wykorzystywano 2 μ l uzyskanego cDNA. Do inicjacji reakcji PCR korzystano z syntetycznych oligonukleotydów (Genomed) komplementarnych do sekwencji z genów kodujących receptory z rodziny P2X oraz rodziny P2Y (Tabela 3.1). Mieszanina reakcyjna (20 μ l) składała się z następujących odczynników: bufor reakcyjny, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP Mix, 0,5 μ M starterów i 1U polimerazy Gold Taq Polymerase (Syngen Biotech). Reakcja PCR przeprowadzana była w termocyklerze MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) z wykorzystaniem następującego protokołu: wstępna denaturacja 95°C przez 5 minut, następnie 45 cykli: denaturacji w 95°C przez minutę, hybrydyzacja w 55-60°C przez minutę, elongacja DNA w 72°C przez minutę. Ostatni cykl elongacji DNA był dłuższy - trwał 10 minut. Produkty reakcji PCR były rozdzielane i oczyszczane z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym. Rozdział następował w 1,5% żelu agarozowym przygotowanym w buforze TBE (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃). Do wizualizacji DNA wykorzystano nietoksyczny barwnik wiążący się z DNA – SERVA DNA Stain G (SERVA Electrophoresis GmbH). Żele były wizualizowane z wykorzystaniem urządzenia G: Box Chemi HR16 BioImaging System (Syngene).

Receptor nukleotydowy	Sekwencja nukleotydowa 5'>3'	Długość produktu (pary zasad)
P2X1	F: CACATCTACACCCCAAGCACACA R: TCATTCCCTTTATTGTACTCCACCCGT	256
P2X2	F: GTGGTGTGCATCGGGGTCATT R: TGAAGTTGTAGCCTGACGAG	129
P2X3	F: GGAAACCTCCTTCCCAAC R: AAAATCCTGCCCCGCAA	123
P2X4	F: GGAATATCCTTCCCAACATCA R: CTCCACGGCCATGTCCT	140
P2X5	F: GCCTAGAAGACAGTTCCCAGGAGG R: ACACAGATCCGTTCCCCTTCT	168
P2X6	F: AAAGCAACCGCCAACTCTGT R: GCAAGTGGGTGTCAGAAC	163
P2X7	F: GGACTTCACAGATTTGTCC R: TGGCTTCAGTAAGGACTCT	492
P2Y1	F: CTTGGTGCTGATTCTGGGCTG R: GCTCGGGAGAGTCTCCTTCTG	326
P2Y2	F: CCGCTCGCTGGACCTCAGCTG R: CTCACTGCTGCCAACACATC	258
P2Y4	F: CGCTGCCCACCCTCATCTAC R: CCGAGTGGTGTGCATGGCACAG	310
P2Y6	F: AACCTTGCTCTGGCTGACCTG R: GCAGGCACTGGGTTGTCACG	282
P2Y11	F: GAGGCCTGCATCAAGTGTCTG R: ACGTTGAGCACCCGCATGATG	259
P2Y12	F: ACCGGTCATACGTAAGAACGAG R: GCAGAATTGGGGCACTTCAGC	306

Tabela 3.1. Lista syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji genów kodujących receptory z rodziny P2. W tabeli przedstawiono również przewidywanie długości produktów reakcji PCR.

3.3 Metody pracy z białkami

3.3.1 Przygotowanie lizatów komórkowych oraz homogenatów tkankowych

W celu uzyskania lizatów z hodowli komórkowej glejaków, komórki wysiewano na płytkę 3,5 cm w liczbie 1×10^6 komórek. Gdy komórki przykleiły się do podłoża, pożywkę zmieniano na DMEM z suplementem N2 oraz 10 ng/ml EFG. Po 24 godzinach komórki traktowano 100 μ M BzATP, natomiast komórki kontrolne inkubowano w pożywce

DMEM bez dodatku BzATP. Po 24 godzinach hodowli, komórki płukano dwukrotnie w PBS o temperaturze 4°C w celu usunięcia pożywki hodowlanej. Następnie komórki zawieszano w 100 µl buforu RIPA zawierającym: 50 nM Tris-HCl, 150 nM NaCl, 0,5% deoksycholenu sodu, 0,1% SDS, 1% detergentu Nonidet P-40; 50 mM NaF oraz mieszanki inhibitorów proteaz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) i fosfataz (PhosSTOP™, Roche). Komórki zeskrobywano z podłoża i przenoszono do buforu. Następnie tak otrzymaną mieszaninę przenoszono do probówek i inkubowano na lodzie przez około 20 minut, mieszając próbkę co 5 minut. Po inkubacji lizaty komórkowe wirowano (12000 x g) przez 20 minut w temperaturze 4°C, a nadsącz przenoszono do świeżych probówek. W otrzymanych lizatach oznaczano stężenie białka. Następnie lizaty zawieszano w 5x stężonym buforze Laemmliego (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 4% SDS, 4% β-merkaptioetanol, 0,0125% błękit bromofenolowy) w stosunku objętościowym 4 części lizatu do 1 części buforu tak aby otrzymać próbki o określonym stężeniu.

Jako, że guzy nowotworowe były traktowane BBG, który jest barwnikiem silnie wiążącym się z białkami i barwił homogenat z guzów na niebiesko, nie było możliwości wykonania spektrofotometrycznego pomiaru stężenia białka w próbkach. Dlatego guzy nowotworowe były homogenizowane w dziesięciu objętościach buforu do homogenizacji (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% Triton-X100, 150 mM NaCl, 5% glicerol, inhibitor proteaz cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail i fosfataz PhosSTOP™), względem masy tkanki. Dezintegrację guzów wykonano na homogenizatorze nożowym (Polytron). Noże przed rozpoczęciem homogenizacji były schładzane do temperatury około -20°C, a cała procedura dezintegracji tkanki była przeprowadzana na lodzie. Na koniec, otrzymane homogenaty zawieszano w 5x stężonym buforze Laemmliego w stosunku objętościowym 4 części homogenatu do 1 części buforu.

3.3.2 Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórkowych

W celu oznaczenia stężenia białka w lizatach wykorzystywano metodę Bardforda z wykorzystaniem odczynnika Protein Assay (Biorad), zgodnie z zaleceniami producenta. Pomiar absorbancji próbek wykonywano przy długości fali 595 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan). Stężenie białka w lizatach określano względem krzywej wzorcowej, wyznaczonej za pomocą roztworów BSA o znanym stężeniu. Każdy pomiar białka wykonano w dwóch powtórzeniach technicznych.

3.3.3 Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym

W celu rozdzielania białek w zależności od masy, przeprowadzono elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Lizaty komórkowe rozdzielano z wykorzystaniem żelu zagęszczającego oraz 8% żelu rozdzielającego. Homogenaty pochodzące z guzów nowotworowych rozdzielano na komercyjnych żelach gradientowych (gradient od 4% do 15%), firmy Biorad. W celu denaturacji struktur białkowych wyższego rzędu, przed nałożeniem próbek na żele, lizaty oraz homogenaty inkubowano przez 5 minut w temperaturze 100°C. Na żel w przypadku lizatów komórkowych nakładano 35 µg białka, natomiast w przypadku homogenatów z guzów nowotworowych nakładano po 5 µl próbki. W celu identyfikacji wielkości białek, oprócz próbek, do żelu wprowadzono jeszcze wzorzec masy cząsteczkowej Perfect Tricolor Protein Ladder (Eurx). Elektroforezę wykonano w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) w buforze o do elektroforezy (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyny, 0,1% SDS). Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 80 V do momentu ukazania się wszystkich wartości markera masy.

3.3.4 Immunodetekcja białek na membranie nitrocelulozowej (Western Blotting)

Po przeprowadzonej elektroforezie, wykonywano transfer białek na membranę nitrocelulozową o porach 0,45 µm. Półsuchy transfer przeprowadzano z wykorzystaniem systemu do transferu Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad). Czas transferu wynosił 10 minut przy natężeniu prądu 1,5 A. W celu sprawdzenia poprawności wykonanego transferu membranę barwiono roztworem Ponceau S (Sigma), skanowano, a następnie płukano w buforze o składzie 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, pH 7,4 (TTBS) do pełnego odbarwienia czerwonego zabarwienia. Błonę nitrocelulozową inkubowano przez około godzinę w temperaturze pokojowej w TTBS z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka lub 5% albuminy z bydlęcej surowicy (BSA). Po zablokowaniu miejsc mogących niespecyficznie wiązać przeciwciała, błony nitrocelulozowe inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi w temperaturze 4°C (Tabela 3.2), przez około 16 godzin. Następnie membrany płukano trzykrotnie, w buforze TTBS w celu odpłukania nieprzyłączonych przeciwciał pierwszorzędowych i inkubowano z przeciwciałem, II-rzędowym sprzężonym z enzymem – peroksydazą chrzanową (HRP) przez około godzinę (Tabela 3.3). Po inkubacji membranę płukano trzykrotnie w buforze TTBS i inkubowano przez 2 minuty w roztworze substratów do chemiluminescencji

(Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermofisher). Reakcję świetlną HRP z substratem wizualizowano z wykorzystaniem kliszy fotograficznej (Fuji film, Carestream).

Antygen	Numer katalogowy	Pochodzenie	Rozcieńczenie
Anty- β -tubulina	T8328	Mysie monoklonalne	1:10000
Anty- β -catenina	sc-133240	Mysie monoklonalne	1:1000
Anty-CD133 (Prominin-1)	C9493	Królicze poliklonalne	1:100
Anty-CD133 (Prominin-1)	ab19898	Królicze poliklonalne	1:100
Anty-Kaspaza-3	9662	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-konneksyna 43	sc-13558	Mysie monoklonalne	1:1000
Anty-HSPA1	ADI-SPA-810-F	Mysie monoklonalne	1:1000
Anty-HSPA5/GRP78	ab21685	Królicze poliklonalne	1:5000
Anty-HSP90	ADI-SPA-830	Mysie monoklonalne	1:3000
Anty-N-kadheryna	sc-393933	Mysie monoklonalne	1:1000
Anty-NOS2	sc-7271	Mysie monoklonalne	1:1000
Anty-HSC-70	sc-7298	Mysie monoklonalne	1:2000
Anty-Fosfo-Akt (Ser473)	9271	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-Akt	9272	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-Fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	9211	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-p38 MAPK	9212	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-vimentyna	sc-373717	Mysie monoklonalne	1:2000
Anty- β -Aktyna skoniugowana z HRP	A3854	Mysie monoklonalne	1:10000
Anty-P2X7	APR-004	Królicze poliklonalne	1:200
Anty-NGF	ab68151	Królicze poliklonalne	1:500
Anty-LC3A/B	4108	Królicze poliklonalne	1:1000
Anty-Atg16L1	8089	Królicze poliklonalne	1:1000

Tabela 3.2. Lista przeciwciał pierwszorzędowych zastosowanych w immunodetekcji metodą Western Blot

Antygen	Antygen	Numer katalogowy	Pochodzenie	Rozcieńczenie
Przeciwciało kozie, poliklonalne skoniugowane z HRP	IgG mysie	12-349	Kozie poliklonalne	1:10000
Przeciwciało kozie poliklonalne, skoniugowane z HRP	IgG królicze	12-348	Kozie poliklonalne	1:10000

Tabela 3.3. Lista przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z HRP zastosowanych w metodzie Western Blot.

3.4 Pomiar sygnału wapniowego po stymulacji receptora P2X7

Komórki w liczbie 1×10^4 były wysiewane na prostokątnym, sterylnym szkiełku nakrywkowym. Następnie po 24 godzinach od wysiania do komórek podawano roztwór sondy Fura 2 AM w pożywce bez surowicy i inkubowano przez około godzinę w warunkach standardowych. Po inkubacji komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem o składzie: 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM Na₂HPO₄, 25 mM HEPES, 130 mM NaCl, 1 mM pirogronianu, 5 mM D-glukozy, and 0.1 mM CaCl₂ i o pH 7.4. Następnie szkiełka z wysianymi komórkami przenoszono do kwarcowej kuwety w buforze z wysoką zawartością wapnia (2 mM CaCl₂) i wkładano do komory pomiarowej spektrofluorymetru RF5001PC. Podczas pomiaru mierzona była intensywność fluorescencji o długości fali 510 nm po wzbudzeniu falami o długości 340 nm i 380 nm.

3.5 Detekcja komórkowego pora – analiza wnikania jodku propidyny

Komórki wysiewano na szalkę 3,5 cm w liczbie 1×10^3 . Gdy komórki zaadherowały do podłoża, zmieniano pożywkę hodowlaną z DMEM zawierającej 10% surowicy płodowej bydlęcej, na DMEM suplementowany N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po około 24 godzinach inkubacji w pożywce bez surowicy, komórki odrywano od podłoża i płukano dwukrotnie w PBS. Po przepłukaniu komórki ponownie liczone i do doświadczenia zawieszano 1×10^3 komórek w czystej pożywce hodowlanej DMEM. Tak przygotowane komórki traktowano mieszaniną 100 μM BzATP i 1 mg/ml jodku propidyny (Sigma) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki płukano w PBS i lizowano w 100 μl wody dejonizowanej w celu zniszczenia ciągłości błony komórkowej i uwolnienia

wchłoniętego jodku propidyny. Fluorescencję próbki mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M1000 PRO (Tecan Trading AG) (wzbudzenie 488 nm, emisja 617 nm).

3.6 Wyznaczenie tempa podziałów komórkowych po obniżeniu ilości receptora P2X7

Komórki glejaka C6, transfekowano małym interferencyjnym RNA komplementarnym do genu P2X7, a następnie, po potwierdzeniu obniżenia poziomu białka, wysiewano na płytkę 96 dołkową w liczbie 1×10^4 na dołek. Następnie po przyklejeniu się komórek do podłoża inkubowano w pożywce hodowlanej suplementowanej N2 oraz 10 ng/ml EGF kolejno przez 24, 48, 72 godziny. Przy każdym punkcie czasowym wykonywano test aktywności metabolicznej MTS (Promega) w celu określenia liczby aktywnych metabolicznie komórek. Test wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Absorbancję fali światła o długości 490 nm mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.7 Analiza adhezji komórkowej do macierzy zewnątrzkomórkowej

Przed rozpoczęciem testu, pojedyncze dołki na płytce 96 dołkowej, pokrywano roztworem kolagenu I (50 $\mu\text{g/ml}$), kolagenu IV (50 $\mu\text{g/ml}$) oraz fibronektyny (10 $\mu\text{g/ml}$) i inkubowano w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po tym czasie z płytek usuwano roztwory z zawierające składniki macierzy zewnątrzkomórkowej i płukano dwukrotnie PBS. Tak przygotowane płytki suszono w komorze laminarnej przez około godzinę. Po wyschnięciu wysiewano na nie komórki glejaka C6 w liczbie 1×10^4 na dołek. Przed wysianiem, komórki dobrze mieszano oraz przepuszczano przez igłę o rozmiarze 24 G w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Komórki zlepione w agregaty mogłyby zafałszować wynik. Następnie komórki wysiewano i inkubowano z 100 μM BzATP, 100 nM BBG lub mieszaniną 100 μM BzATP i 100 nM BBG. Komórki inkubowano przez około 20 minut, a następnie płytkę płukano dwukrotnie PBS w celu usunięcia komórek, które nie przyczepiły się do podłoża. Komórki, które zostały na płytce utrwalano poprzez inkubację w metanolu o temperaturze -20°C przez 20 minut. Następnie komórki barwiono 0,1% roztworem fioletu krystalicznego przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wybarwieniu utrwalonych komórek, płukano je trzykrotnie w wodzie, w celu odpłukania

nadmiaru barwnika i suszono przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po wyschnięciu zabarwione komórki rozpuszczano w 100 μ l 10% kwasu octowego i mierzono poziom absorbancji roztworu dla fali o długości 570 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.8 Pomiar aktywności metabolicznej komórek glejaka C6 po inkubacji z lekami stosowanymi w terapii przeciwnowotworowej

Komórki glejaka C6 wysiewano na płytkę 96 dołków w liczbie 1×10^4 na dołek. Następnie, gdy komórki się przykleiły do podłoża, zmieniano pożywkę hodowlaną na wzbogaconą suplementem N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po 24 godzinach komórki traktowano 200 μ M karmustyny oraz takiego samego stężenia karmustyny i 100 μ M BzATP przez 24h. Po tym czasie ilość aktywnych metabolicznie komórek mierzono z wykorzystaniem testu MTS (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancję fali światła o długości 490 nm mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.9 Pomiar aktywności metabolicznej komórek z wykorzystaniem testu MTS

Komórki wysiewano na płytkę 96 dołków w liczbie 1×10^4 na dołek dla komórek glejaka szczura C6 i 1×10^3 dla komórek glejaków człowieka U-251 i U-138. Gdy komórki przykleiły się do podłoża pożywkę hodowlaną zmieniano z zawierającej 10% płodowej surowicy bydlęcej na pożywkę zawierającą suplement N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po około 24 godzinach inkubacji komórki traktowano 100 μ M BzATP, mieszaniną 100 μ M BzATP i 100 nM BBG, oraz samym 100 nM BBG przez 24 godziny. Po tym czasie wykonywano test aktywności metabolicznej MTS (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Poziomą absorbancję fali światła o długości 490 nm mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.10 Analiza przeżywalności komórek glejaków po traktowaniu lekami cytostatycznymi

Komórki wysiewano na płytkę 96 dołków w liczbie 1×10^4 na dołek dla komórek glejaka szczura C6 i 1×10^3 dla komórek glejaków człowieka U-251, U-138 i LN-229. Następnie,

gdy komórki się przykleiły do podłoża, zmieniano pożywkę hodowlaną na wzbogaconą suplementem N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po 24 godzinach komórki traktowano 200 μ M karmustyny lub 600 μ M temozolomidu oraz takiego samego stężenia karmustyny i temozolomidu z 100 nM BBG lub 2 μ M Kn-62 przez 24h. Po tym czasie pożywkę usuwano, a pozostałe na płytce komórki utrwalano zimnym metanolem przez 20 minut w temperaturze -20°C . Następnie usuwano metanol, a płytkę suszono przez około godzinę w temperaturze pokojowej. Utrwalone komórki barwiono 0,1% roztworem fioletu krystalicznego przez 10 minut. Następnie barwnik usuwano, a komórki płukano trzykrotnie w wodzie z kranu w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Po wyschnięciu wybarwione komórki rozpuszczano w 100 μ l kwasu octowego o stężeniu 10%, aż do pełnego rozpuszczenia, następnie mierzono absorbancję fali światła o długości 570 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.11 Analiza śmiertelności komórek przez uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Komórki glejaków człowieka (U-251 i U-138) wysiewano w liczbie 1×10^3 na dołek, na płytkę 96 dołkową. Komórki glejaka szczura C6 wysiewano w liczbie 1×10^4 na dołek płytki 96 dołkowej. Po przyklejeniu się komórek do podłoża, zmieniano pożywkę hodowlaną ze standardowego DMEM z 10% na DMEM z suplementem N2 i 10 ng/ml EGF i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie komórki glejaków traktowano 100 μ M BzATP przez 24 godziny. Poziom uwolnionej dehydrogenazy mleczanowej w pożywce hodowlanej, świadczącej o śmierci komórek mierzono z wykorzystaniem zestawu CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancję przy długości fali 490 nm, mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG).

3.12 Barwienie mitochondriów z wykorzystaniem sondy Mitotracker CMX Ros

Komórki w ilości 1×10^4 były wysiewane na okrągłym, sterylnym szkiełku nakrywkowym. Następnie po przyczepieniu się komórek do podłoża zmieniano na pożywkę bez bydlęcej surowicy płodowej z dodatkiem suplementem N2 i 10 ng EGF. Po 24 godzinach inkubacji w pożywce bez surowicy komórki traktowano 100 μ M BzATP

przez godzinę. Następnie szkiełka z komórkami płukano dwukrotnie i inkubowano w 500 nM roztworze roboczym sondy MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher Scientific) przez pół godziny. Po wybarwieniu komórki płukano dwukrotnie w PBS w celu wypłukania nieprzyłączonego barwnika. Tak przygotowane komórki obrazowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780.

3.13 Analizy cytometryczne

3.13.1 Detekcja komórek apoptotycznych - test łączenia aneksyny V i wnikania jodku propidyny

Komórki glejaków były wysiewane w liczbie 5×10^3 komórek na dołek płytki sześciodołkowej. Po przyklejeniu się komórek do podłoża, komórki inkubowano przez 24 godziny w pożywce hodowlanej pozbawionej surowicy z dodatkiem suplementu N2 oraz 10 ng/ml EGF. Następnie do hodowli komórek dodawano na 24 godziny 100 μ M roztwór BzATP. Jako kontrolę pozytywną, mającą zbadać poprawność wykonanego doświadczenia wykorzystano komórki linii Jurkat, które charakteryzują się łatwym wchodzeniem na drogę apoptotycznej śmierci komórkowej. W celu wywołania takiej śmierci traktowano komórki przez 30 sekund promieniowaniem UV-C. Po inkubacji komórki były trypsynizowane w celu oderwania od podłoża hodowlanego i płukane w PBS. Następnie zostały przeniesione do próbek i znakowane z wykorzystaniem jodku propidyny oraz aneksyny V sprzężonej z FITC, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu (Sigma-Aldrich). Po zakończeniu inkubacji, komórki były dwukrotnie płukane w PBS, w celu usunięcia niezwiązanych barwników. Tak przygotowane komórki były liczone przy użyciu cytometru Guava® easyCyte (analiza w kanałach Green dla aneksyny i Yellow dla jodku propidyny).

3.13.2 Analiza wytwarzania wolnych rodników z wykorzystaniem sondy DCF-DA

Komórki wysiewano na płytkę sześciodołkową w liczbie 1×10^5 na dołek. Po przyklejeniu się komórek do podłoża pożywkę zmieniano na pożywkę bezsurowiczą wzbogaconą suplementem N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po 24 godzinach od wysiania komórki traktowano 100 μ M roztworem BzATP przez godzinę. Następnie komórki odklejano od podłoża z wykorzystaniem trypsyny i inkubowano przez pół godziny w 10 μ M roztworze sondy DCF-DA w pożywce DMEM pozbawionej czerwieni fenolowej. Po inkubacji zawiesinę

komórek wirowano przez 2 minuty 500 x g, a następnie po usunięciu pożywki znad komórek płukano dwukrotnie w PBS. Następnie komórki zawieszano w 200 ul buforu i otrzymaną mieszaninę przenoszono na płytkę 96 dołkową. Analizę cytometryczną wykonywano z wykorzystaniem cytometru kapilarnego Guava easyCyte. Fluorescencja sondy DCF-DA była wzbudzana laserem 488 nm, emisja była odczytywana w kanale Green. Podczas analizy zbierano sygnał z minimum 1×10^4 komórek.

3.13.3 Analiza potencjału błony mitochondrialnej z wykorzystaniem sondy JC-1

Komórki wysiewano na płytkę sześciodołkową w liczbie 1×10^5 na dołek. Po przyklejeniu się komórek do podłoża pożywkę zmieniano na pożywkę pozbawioną surowicy, z dodatkiem suplementu N2 oraz 10 ng/ml EGF. Po 24 godzinach od wysiania komórki traktowano 100 μ M roztworem BzATP, przez godzinę. Następnie komórki odklejano od podłoża i inkubowano przez 15 minut w 1 μ M roztworze sondy JC-1 w pożywce DMEM pozbawionej czerwieni fenolowej w temperaturze 37°C. Po inkubacji zawiesinę komórek wirowano przez 2 minuty w 500 x g, a następnie po usunięciu pożywki znad komórek płukano dwukrotnie w PBS. Następnie komórki zawieszano w 200 ul buforu i przenoszono na płytkę 96 dołkową. Analizę cytometryczną wykonywano z wykorzystaniem cytometru kapilarnego Guava easyCyte. Fluorescencyjna sonda JC-1 była wzbudzana laserem 488 nm, emisja była odczytywana w kanale Green oraz Yellow. Podczas analizy zbierano przynajmniej 1×10^4 komórek. Aktywność błony mitochondrialnej mierzono poprzez wyliczenie stosunku sygnału w kanale czerwonym (Yellow) do zielonego (Green).

3.14 Oznaczanie stężenia uwolnionego ATP w pożywce oraz w guzie nowotworowym

W celu pomiaru stężenia ATP w pożywce hodowlanej i homogenatach z guzów nowotworowych wykorzystywano komercyjny zestaw ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurements (Promega). Zestaw ten wykrywa ATP poprzez wykorzystanie reakcji emisji światła o długości fali 560 nm przez lucyferynę podczas reakcji utleniania, katalizowanej przez lucyferazę, która wymaga hydrolizy ATP. W celu zbadania stężenia zewnątrzkomórkowego ATP wydzielanego do pożywki hodowlanej komórki linii C6 w liczbie 1×10^5 wysiewano na szalkę o średnicy 3,5 cm. Gdy komórki przykleiły się do podłoża pożywkę hodowlaną zmieniano na DMEM z

dotatkami suplementu N2 i 10 ng/ml EGF. Po 24 godzinach inkubacji do pożywki dodawano 100 μ M BzATP lub kombinację 100 μ M BzATP z 100 nM BBG lub tylko 100 nM BBG. Po następnych 24 godzinach inkubacji, zbierano pożywkę hodowlaną do analizy. Przed rozpoczęciem pomiaru próbki wirowano przez 10 minut w 500 x g by usunąć martwe komórki z pożywki. Martwe komórki mogłyby rozpraszać lub pochłaniać światło i zaburzyć pomiar. Do pożywki dodawano następnie taką samą objętość 4% kwasu trichlorooctowego (TCA) w celu denaturacji białek. Do otrzymanego roztworu dodawano 0,42% błękitu bromofenolowy w celu wskazania poziomu pH w roztworze, a następnie miareczkowano roztworem 1M Tris o pH 10 aż do neutralizacji roztworu. Następnie próbki dokładnie mieszano i wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C z prędkością 12000 x g. Nadsącz rozcieńczano 100 razy i mierzono ilość ATP z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurements (Promega) według zaleceń producenta. Intensywność luminescencji mierzona była z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M1000 PRO (Tecan).

Guzy nowotworowe były homogenizowane w buforze (25 mM Tris-HCl; 150 mM KCl; 2 mM EDTA; 0.1% EDTA; 10 mM KH_2PO_4 ; 0.1 mM MgCl_2 ; pH 7.4) w stosunku masowym 1 do 9, na homogenizatorze nożowym (Polytron) na lodzie. Następnie za pomocą 4% kwasu trichlorooctowego wytrącono białka w homogenacie. Następnie, tak jak przy pomiarze stężenia ATP w pożywce, próbkę neutralizowano 1M Tris o pH 10 i wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C z prędkością 12000 x g. Tak przygotowany nadsącz rozcieńczano 100 razy i mierzono ilość ATP z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurements (Promega) według zaleceń producenta. Intensywność luminescencji mierzona była z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M1000 PRO (Tecan).

3.15 Doświadczenia *in vivo*

3.15.1 Wprowadzanie podskórne guzów nowotworowych oraz dawkowanie inhibitora receptora P2X7 – BBG

Trzymiesięczne samce myszy szczepu C57/BL6J hodowane były w standardowych warunkach w Instytucie Biologii Komórki, Narodowej Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie. Zgodę na przeprowadzenie doświadczeń wydała Lokalna Komisja Etyczna przy Instytucie Biologii Komórki, Narodowej Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie.

W celu zaindukowania rozwoju guzów nowotworowych wykonano podskórne wszczepienie 1×10^6 komórek glejaka C6, zawieszonych w 100 μ l Matrigelu (Corning) w prawy bok myszy. Gdy guzy osiągnęły około 100 mm³ (10 dnia od zaszczepienia guzów), myszy podzielono na grupy, tak aby średnia wielkość guzów w grupie kontrolnej i traktowanej miała taką samą wartość przed rozpoczęciem podawania inhibitora. Zwierzętom w grupie kontrolnej podawano PBS, natomiast zwierzętom w grupie badanej podawano co 48 godzin inhibitor receptora P2X7 – BBG, w dawce 100 mg/kg masy ciała. W trakcie eksperymentu przeprowadzono 4 podania tak, że skumulowana dawka inhibitora wynosiła 400 mg/kg masy ciała myszy.

Po zakończeniu podań myszy poddano eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych poprzedzoną narkozą w izofluranie. Guzy zostały wyizolowane podczas sekcji i zważone. Dodatkowo w celu wykorzystania w innych procedurach pobrano również krew obwodową, poprzez punkcję z serca.

3.15.2 Izolacja surowicy mysiej

Pobrana podczas sekcji myszy krew była przenoszona do probówki i inkubowana przez 30 minut w temperaturze 37°C w celu wytworzenia skrzepu. Następnie krew wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy 2000 x g aby usunąć skrzep. Po wirowaniu nadsącz (surowica) była przenoszona do nowych probówek i przechowywana w -80°C.

3.15.3 Pomiar stężenia glutationu całkowitego oraz jego utlenionej formy w guzach

Do określenia całkowitego stężenia glutationu oraz stężenia jego utlenionej formy wykorzystano komercyjny zestaw Glutathione Colorimetric Detection Kit (Invitrogene). Fragmenty guzów o masie 10 mg były dezintegrowane z wykorzystaniem homogenizatora nożowego (Polytron) w 100 μ l PBS, na lodzie. Do tak pozyskanych próbek dodawano 250 μ l 1,5% TCA i inkubowano przez 10 minut, także na lodzie, a następnie wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 12000 x g. Mieszaninę reakcyjną wykonywano zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Absorbancję fali światła o długości 405 nm mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M1000 PRO plate reader (Tecan Trading AG). Stosunek glutationu całkowitego (GSH) do glutatnionu utlenionego (GSSG) został obliczony według następującego wzoru:

$$\text{stosunek GSH/GSSG}_{\text{kontrola}} = (2 \times \text{gssg}_{\text{kontrola}} / (\text{gsh}_{\text{kontrola}} + (2 \times \text{gssg}_{\text{kontrola}}))) \times 100\%$$

$$\text{stosunek GSH/GSSG}_{\text{traktowane}} = \frac{(2 \times \text{gssg}_{\text{traktowane}} / (\text{gsh}_{\text{traktowane}} + (2 \times \text{gssg}_{\text{traktowane}}))) \times 100\%}{100\%}$$

3.15.4 Pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) został wykonany z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (BioVision). Fragmenty guzów o masie 10 mg były homogenizowane na lodzie w buforze (0.1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% Triton X-100, 10 mM DTT, 0,1 mg/ml PMSF) z wykorzystaniem homogenizatora nożowego (Polytron). Następnie próbki były wirowane przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 12000 x g. Pomiar aktywności SOD wykonano poprzez pomiar absorbancji fali świetlnej o długości 450 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite M1000 PRO plate reader (Tecan Trading AG). Aktywność SOD została wyliczona na podstawie następującego wzoru:

$$\text{aktywność SOD (\%)} = \frac{((\text{kontrola}_1 - \text{kontrola}_3) - (\text{próba badana} - \text{kontrola}_2)) / (\text{kontrola}_1 - \text{kontrola}_3)}{1} \times 100\%$$

3.15.5 Oznaczanie aktywności metaloproteinazy 2 w guzie

Świeżo izolowane guzy nowotworowe glejaka C6 zostały zdeintegrowane tak jak w przy procedurze Western Blot w nieredukującym buforze (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerolu, 0,01% błękitu bromofenolowego) w celu zachowania aktywności metaloproteinaz. Następnie tkankę dezintegrowano z wykorzystaniem homogenizatora nożowego (Polytron). Po wytworzeniu homogenatu rozdzielano białka w 7,5% żelu akrylamidowym zawierającym 10% SDS oraz 4 mg/ml żelatyny. Elektroforeza przebiegała w obecności markera wielkości białek (EURx). Po zakończeniu elektroforezy żel był dwukrotnie płukany w buforze (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 2,5% Triton X-100, pH 7.5). Następnie żel inkubowano przez noc w temperaturze 37°C w buforze zapewniającym aktywność enzymów proteolitycznych (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 1% Triton X-100, pH 7.5). Po inkubacji żel był barwiony roztworem Coomassie Brilliant Blue G przez około 15 minut. Aktywna metaloproteinaza w miejscu działania zostawiała obszary pozbawione żelatyny, których barwnik nie barwił. Następnie żel skanowano, a aktywność metaloproteinazy wyliczano poprzez stosunek intensywności prążka niedojrzałej do formy aktywnej.

3.15.6 Immunofluorescencyjna detekcja receptora P2X7 w guzie

Wyizolowane guzy nowotworowe były natychmiast utrwalane w 4% paraformaldehydzie (PFA) (Santa Cruz Biotechnology) w 4°C przez 24 godziny. Następnie utrwalone tkanki były inkubowane przez noc w 30% roztworze sacharozy i mrożone w izopentanie schłodzonym w oparach ciekłego azotu. Zamrożone guzy były krojone z wykorzystaniem kriostatu Leica CM 1950 (Leica Biosystems) na skrawki o grubości 20 µm. Następnie otrzymane skrawki były utrwalane z wykorzystaniem 4% PFA w temperaturze 4°C przez 10 minut. Następnie, przeprowadzono permabilizację tkanki z wykorzystaniem detergentu. W tym celu skrawki inkubowano w PBS zawierającym 0,05% Triton X-100 (PBS-T) przez 30 minut. Następnie blokowano miejsca niespecyficznego wiązania białek z wykorzystaniem roztworu 5% końskiego serum w PBS-T przez godzinę. Po inkubacji z serum, skrawki płukano trzykrotnie w PBS-T i inkubowano przez noc z przeciwciałem Anti-P2X7 w 4°C (rozcieńczenia przeciwciał w Tabeli 4). Następnego dnia skrawki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym przeciw IgG królika, sprzężonym z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 488 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po znakowaniu preparaty zamykano z wykorzystaniem mieszanki do zamykania preparatów Vectashield mounting medium z DAPI (Vector Laboratories). Preparaty wizualizowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780 z obiektywem olejowym planapochromatycznym o powiększeniu 63x, o aperurze numerycznej 1.4.

3.15.7 Barwienia histopatologiczne guza hematoksyliną i eozyną

Do przeprowadzenia analizy histopatologicznej guzy nowotworowe były utrwalane w 4% PFA przez 24 godziny w 4°C (Santa Cruz Biotechnology), a następnie przeprowadzone przez standardowy szereg alkoholowy i parafinowy w celu odwodnienia tkanki i uformowania bloczków. Otrzymane bloczki parafinowe krojono na skrawki grubości 2 µm z wykorzystaniem mikrotomu Leica HistoCore (Leica Biosystems). Tak przygotowane skrawki przenoszono na szkiełko podstawowe i barwiono hematoksyliną/eozyną według standardowej procedury (Feldman i Wolfe, 2014).

3.15.8 Analiza markerów powierzchniowych komórek guza z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Guzy nowotworowe były izolowane i inkubowane w roztworze kolagenazy w pożywce hodowlanej DMEM (2 mg/ml) w 37°C, przez około godzinę, a następnie dezintegrowane z wykorzystaniem urządzenia gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec), które pozwala na rozdzielenie tkanek, bez uszkodzenia komórek. Zawiesina komórek była płukana dwa razy w buforze PBS w celu opłukania kolagenazy. Następnie komórki inkubowano przez pół godziny w PBS zawierającym 1% BSA w celu zablokowania epitopów, do których mogłyby niespecyficznie przyłączać się przeciwciała. Następnie komórki płukano trzykrotnie w PBS i inkubowano z przeciwciałami Anty-CD68 i Anty-FOXP3+ sprzężonymi z fluorochromami (patrz tabela 3.4) rozpuszczonymi w 1% roztworze BSA w PBS, według zaleceń producenta. W celu wyeliminowania niespecyficznego sygnału, zastosowano kontrole izotypowe, odpowiednie dla każdego z wykorzystanych przeciwciał (Tabela 3.4). Po inkubacji próbki były płukane trzykrotnie w PBS i analizowane z wykorzystaniem cytometru Guava® easyCyte 8HT Benchtop Flow Cytometer (Merck Millipore).

Antygen	Numer katalogowy	Pochodzenie	Zastosowanie/rozcieńczenie
Anty-P2X7	APR-004	Królicze poliklonalne	Barwienie IF/1:200
Goat Anty-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488	A32731	Kozie poliklonalne	Barwienie IF/ 1:200
APC Anty-mouse CD68 Antibody	137007	Mysie monoklonalne	Cytometria przepływowa/0.06 µg na milion komórek
APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	400511	Szczurze monoklonalne	Cytometria przepływowa/0.06 µg na milion komórek
Alexa Fluor® 488 Anty-mouse FOXP3 Antibody	126405	Mysie monoklonalne	Cytometria przepływowa/0.25 µg na milion komórek
Alexa Fluor® 488 Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	400625	Szczurze monoklonalne	Cytometria przepływowa/0.25 µg na milion komórek

Tabela 3.4 Lista przeciwciał stosowanych w immunofluorescencji oraz cytometrii przepływowej

3.15.9 Analiza cytokin prozapalnych z wykorzystaniem macierzy typu dot-blot

W celu zbadania cytokin wydzielanych do surowicy oraz w mikrośrodowisku guza nowotworowego, wykorzystano komercyjne zestawy macierzy typu dot-blot. W celu oznaczenia cytokin w surowicy, rozcieńczano ją w zawartym w zestawie buforze do lizy w stosunku objętościowym 1 do 1000.

W celu analizy cytokin w mikrośrodowisku guza, guzy homogenizowano w dostarczonym przez producenta zestawu, buforze do lizy suplementowanym inhibitorem preteaz cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Następnie inkubację próbek oraz wizualizację danych wykonano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Wykryte sygnały pochodzące od białek były wizualizowane na kliszy fotograficznej, które były następnie skanowane i analizowane za pomocą dodatku do programu ImageJ - Protein Array Analyzer Plug-In stworzonym przez Gilles Carpentier.

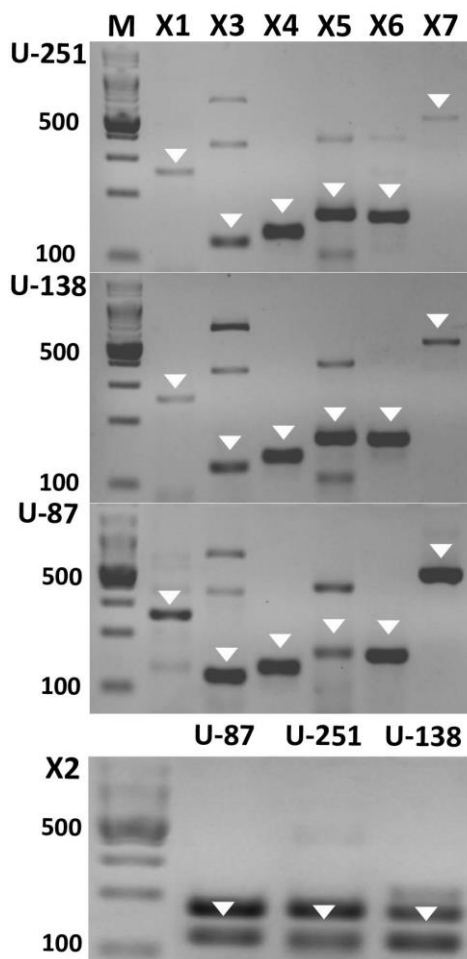
3.16 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w pracy to średnie arytmetyczne wartości uzyskanych z pojedynczych powtórzeń biologicznych lub średnie powtórzeń biologicznych znormalizowane do kontroli. Dodatkowo na wykresach zaznaczono wąsy odchyłeń standardowych. Analiza statystyczna została wykonana na surowych danych z wykorzystaniem programu Sigma-Plot 12.3 (Systat Software Inc). W celu określenia istotności statystycznej pomiędzy grupami kontrolnymi i traktowanymi stosowano sparowany Test-T lub jednoczynnikową ANOVA dla powtórzeń z testem typu post-hoc Bonferroniego lub Duncana. Normalność rozkładu sprawdzano z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka lub Levene'a. Wynik uznawano za istotny statystycznie, gdy $p < 0,05$. Na wykresach stosowano następujące oznaczenia przedziałów istotności: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Do analizy i opracowania wyników wykorzystano programy: Microsoft Excel, ImageJ, GIMP oraz Zeiss ZEN Software.

4 WYNIKI

4.1 Analiza ekspresji transkryptów receptorów z rodziny P2X w komórkach glejaka wielopostaciowego

Aby możliwe było przeprowadzenie badań roli receptora P2X7 w glejaku wielopostaciowym, należało zbadać występowanie receptorów nukleotydowych z rodziny P2X w tych komórkach. Było to konieczne gdyż wszystkie te receptory odpowiadają na zewnątrzkomórkowe ATP. Aby nie powodować pobudzenia wielu receptorów na raz, należało wybrać jak najbardziej specyficznego agonistę. Do detekcji ekspresji genów receptorów z rodziny P2X wykorzystano technikę reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją. Przeanalizowano ekspresję wszystkich genów receptorów z rodziny P2X. W badaniu tym pominięto linie C6, gdyż w danych



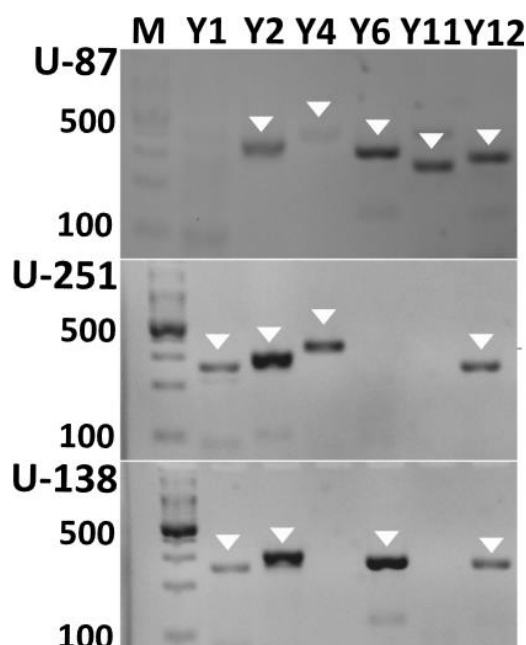
Rycina 4.1. Receptory z rodziny P2X w liniach komórkowych glejaków wielopostaciowych. Białymi strzałkami oznaczono specyficzny produkt reakcji PCR. Skrótem M oznaczono molekularny wzór masy, symbole oznaczają kolejno X1 – P2X1, X2 – P2X2, X3 – P2X3, X4 – P2X4, X5 – P2X5, X6 – P2X6, X7 – P2X7. Wizualizacja receptora P2X2 odbyła się osobno na innym żelu, ponieważ zostały wypełnione wszystkie studzienki. Rycina przedstawia reprezentatywny żel z trzech powtórzeń biologicznych.

literaturowych można znaleźć informacje o ekspresji genów receptorów z rodziny P2X w tej linii komórkowej (Braganhol i wsp., 2009). W badanych liniach komórkowych ludzkich glejaków wielopostaciowych U-87, U-251, U-138, wykryto obecność mRNA wszystkich receptorów z rodziny P2X (Rycina 4.1).

4.2 Analiza ekspresji transkryptów receptorów z rodziny P2Y w komórkach glejaka wielopostaciowego

Jako że na zewnątrzkomórkowe ATP odpowiadają również receptory z rodziny P2Y, należało w zbadanych liniach wykryć obecność receptorów należących do tej rodziny. Tak jak poprzednio w badaniu tym pominięto linię C6, gdyż w danych literaturowych można znaleźć informacje o ekspresji genów receptorów z rodziny P2Y (Braganhol i wsp., 2009). Linie ludzkich glejaków wykazywały różnice w obecności mRNA receptorów z rodziny P2Y.

W linii U-87 wykryto transkrypty receptorów P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 oraz P2Y12. W linii U-251 wykryto transkrypty dla receptorów P2Y1, P2Y2, P2Y4 oraz P2Y12. Natomiast w linii komórkowej U-138 wykryto transkrypty dla receptorów P2Y1, P2Y2, P2Y6 oraz P2Y12 (Rycina 4.2).

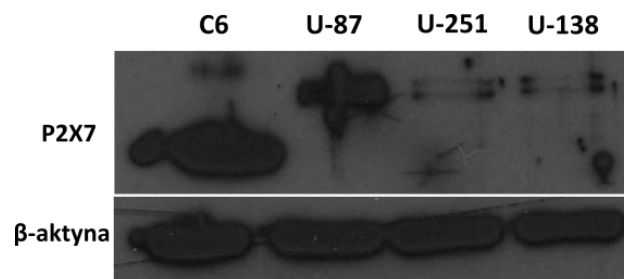


Rycina 4.2. Receptory z rodziny P2Y w liniach komórkowych glejaków wielopostaciowych. Białymi strzałkami oznaczono specyficzny produkt reakcji PCR. Skrótem M oznaczono molekularny wzór masy, symbole oznaczają kolejno Y1 – P2Y1, Y2 – P2Y2, Y4 – P2Y4, Y6 – P2Y6, Y11 – P2Y11, Y12 – P2Y12. Rycina przedstawia reprezentatywny żel z trzech powtórzeń biologicznych.

4.3 Analiza obecności białka receptora P2X7 w komórkach glejaka wielopostaciowego

Po wykryciu transkryptów receptora P2X7 w komórkach glejaka wielopostaciowego, przeprowadzono analizę Western Blot w celu zbadania korelacji pomiędzy ilością transkryptów, a ilością białka w komórkach.

We wszystkich badanych komórkach glejaka wielopostaciowego wykryto białko receptora P2X7 (Rycina 4.3). Ilość znajdowanego białka zależała od linii komórkowej. Najwięcej receptora P2X7 wykryto w lizatach z glejaka C6 szczura. Dużą ilością receptora charakteryzowała się również linia U-87. Ilość białka receptora P2X7 była znacząco niższa w komórkach linii U-251 i U-138. Linią o najmniejszej ilości wykrywanego białka P2X7 była linia U-251.

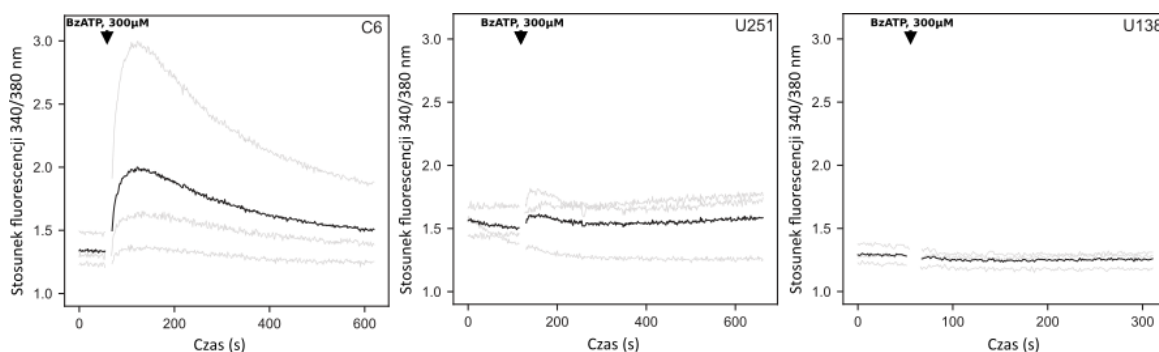


Rycina 4.3. Ilość białka receptora P2X7 w różnych liniach ludzkich glejaków wielopostaciowych (U-251, U-138) oraz szczurzego glejaka C6. Na rycinie przedstawiono reprezentatywny wynik z 3 niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.4 Analiza sygnału wapniowego po pobudzeniu komórek glejaków przez syntetycznego agonistę P2X7 (BzATP)

Następnym krokiem po wykryciu białka receptora P2X7, było sprawdzenie funkcjonalności tego receptora. W tym celu komórki glejaka wielopostaciowego stymulowano syntetycznym agonistą receptora P2X7 – BzATP. Intensywność odpowiedzi wapniowej, która odpowiada stężeniu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, mierzono przy użyciu fluorescencyjnej sondy wapniowej Fura-2 (Rycina 4.4).

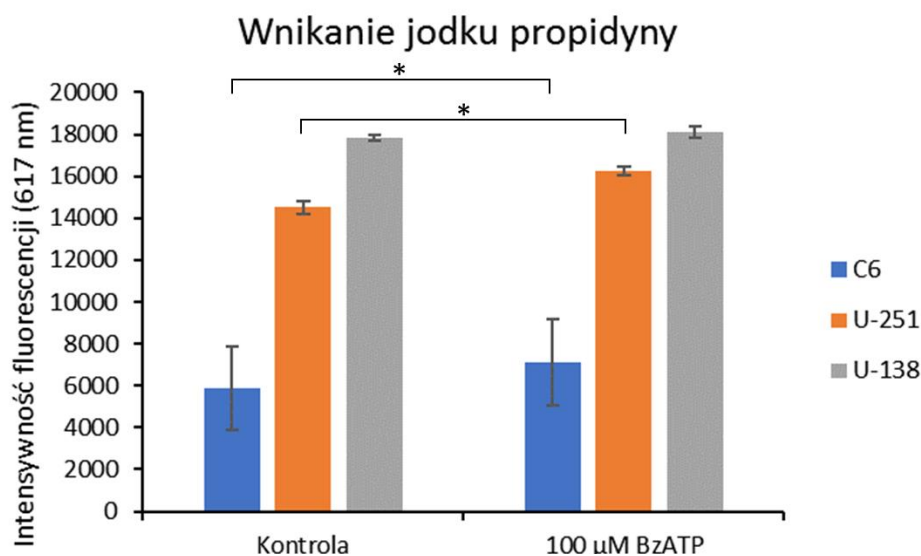
Najintensywniejszy sygnał wapniowy obserwowany był w komórkach glejaka C6 szczura, komórki te również odpowiadały za każdym razem na stymulację. Znacząco słabszy sygnał wapniowy wykazywały komórki ludzkiego glejaka U-251. Co więcej, komórki nie zawsze odpowiadały na pobudzenie. Natomiast linia U-138 nigdy nie wykazywała odpowiedzi wapniowej po stymulacji przez BzATP.



Rycina 4.4. Analiza intensywności sygnału wapniowego, po stymulacji receptora P2X7, komórkach ludzkich glejaków wielopostaciowych (U-251, U-138) oraz szczurzego glejaka C6. Czarna strzałka w górnej części wykresu wskazuje na czas rozpoczęcia stymulacji, poprzez dodanie agonisty receptora – BzATP. Szare linie przedstawiają pojedyncze powtórzenia biologiczne, czarna linia pokazuje uśredniony poziom sygnału z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.5 Analiza formowania pora komórkowego

Po wykryciu receptora P2X7 w komórkach glejaka wielopostaciowego należało, oprócz wykrycia obecności sygnału wapniowego, zbadać możliwość formowania komórkowego pora, przez który do wnętrza komórki mogą wnikać duże cząsteczki takie jak jodek propidyny. Wnikanie jodku propidyny po stymulacji przez BzATP zaobserwowano tylko w dwóch liniach komórkowych: glejaku szczura C6 i glejaku człowieka U-251 (Rycina 4.5). Pomiar na linii U-138 nie wykazywały wnikania jodku propidyny po stymulacji BzATP. Należy jednak dodać, że w przypadku linii komórkowych C6 i U-251 efektywność wnikania była bardzo niska i wynosiła odpowiednio 24% oraz 12%. Otrzymane różnice były istotne statystycznie.



Rycina 4.5. Analiza napływu jodku propidyny do wnętrza komórki poprzez błonowy por w komórkach linii glejaków ludzi (U-251 i U-138) oraz glejaka szczura C6. Wykres przedstawia uśrednioną wartość z czterech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną wyliczono testem t-Studenta. Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy $p < 0,05$ (*).

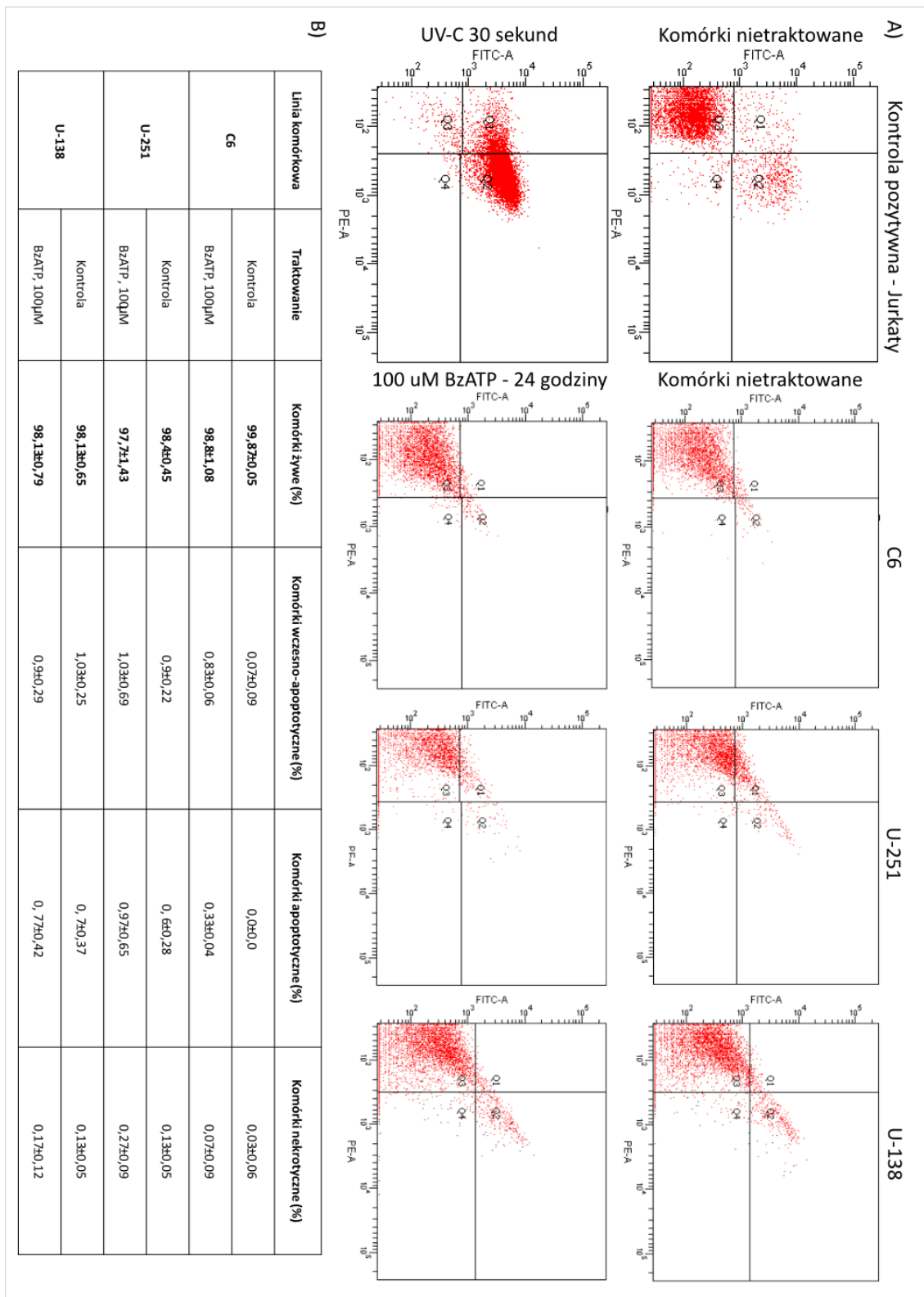
4.6 Badanie śmierci komórkowej po stymulacji receptora P2X7

Według danych literaturowych, aktywacja receptora P2X7 może prowadzić do śmierci komórki poprzez masowy napływ wapnia do cytoplazmy lub poprzez otwarcie dużego pora komórkowego. Jako że w dwóch liniach obserwowano zwiększone wnikanie jodku propidyny do wnętrza komórki, należało zbadać wpływ aktywacji P2X7 na występowanie śmierci komórkowej. W tym celu przeprowadzono dwa niezależne testy wykrywające komórki wprowadzone na drogę apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórkowej.

Pierwsza analiza, to cytometryczne oznaczenie apoptotycznych/nekrotycznych komórek z wykorzystaniem aneksyny piątej (marker apoptozy) oraz jodku propidyny w celu detekcji komórek nekrotycznych. Jako kontrolę pozytywną, mającą sprawdzić, czy test został wykonany poprawnie, wykorzystano komórki ludzkiej białaczki z dużych ziarnistych limfocytów T, linię Jurkat. Komórki te wykazują się wysoką czułością na szkodliwe czynniki środowiskowe, które aktywują proapoptocyczne ścieżki śmierci komórkowej. Aby wprowadzić komórki kontrolne w stan apoptozy, komórki Jurakt były traktowane przez 30 sekund promieniowaniem UV-C.

Po wykonaniu kontroli pozytywnej na komórkach linii Jurkat przeprowadzono badania na liniach glejaka wielopostaciowego (Rycina 4.6). W żadnej z badanych linii glejaka nie zaobserwowano zwiększonych populacji komórek pozytywnie wybarwionych aneksyną

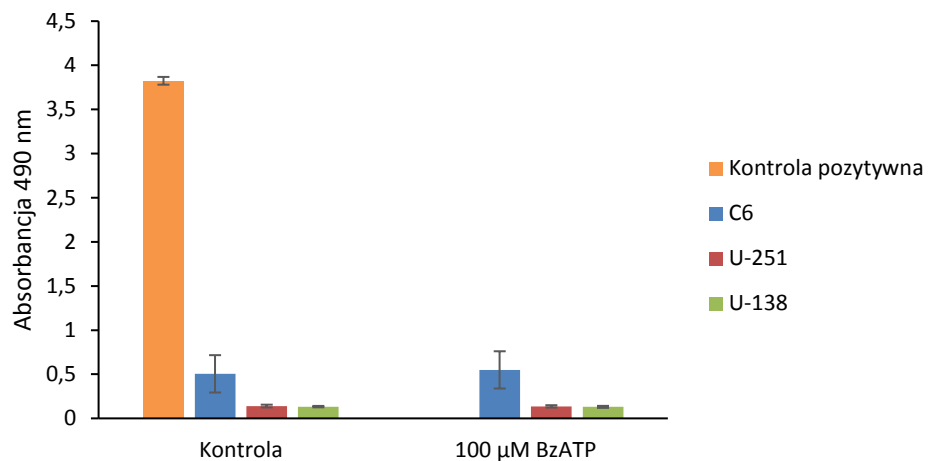
piątą. Nie wykryto również komórek wybarwionych jodkiem propidyny co świadczy o braku apoptozy w każdej badanej linii.



Rycina 4.6. Analiza cytometryczna śmierci komórkowej z wykorzystaniem zestawu wykrywającego aneksynę V i jodek propidyny. A) Reprezentatywne wykresy przedstawiające wybarwione populacje. Komórki linii Jurkat, traktowane przez 30 sekund promieniowaniem UV-C to kontrola pozytywna przedstawiająca komórki w trakcie apoptotycznej śmierci. Wykresy C6, U-251 i U-138 przedstawiają populacje komórek traktowanych agonistą receptora P2X7 – BzATP. B) Tabela przedstawiająca uśrednione wartości liczbowe z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek żywych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Bonferroni. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ wzg. % komórek żywych (*).

W celu wykluczenia gwałtownej śmierci komórkowej polegającej na rozpadzie komórki, takich jak nekroza i pyroptoza przeprowadzono dodatkowo test aktywności dehydrogenazy mleczanowej uwalnianej do pożywki hodowlanej. Jako kontrolę pozytywną, potwierdzającą prawidłowe działanie zestawu, wykorzystano wyizolowaną z krowiego serca dehydrogenzę mleczanową. W komórkach linii glejaka wielopostaciowego nie zaobserwowano zwiększonej aktywności tego enzymu po stymulacji BzATP, co świadczy o braku śmierci komórkowej opartej na gwałtownym rozpadzie komórek (Rycina 4.7). Podsumowując przeprowadzone na dwóch niezależnie działających testach badania wykazały brak apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórkowej w liniach glejaka wielopostaciowego po stymulacji receptora P2X7.

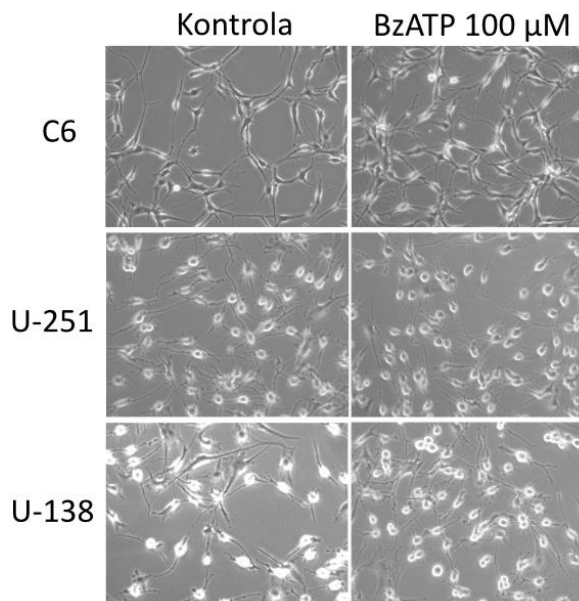
Aktywność uwalnianej dehydrogenazy mleczanowej (LDH)



Rycina 4.7. Aktywność uwalnianej dehydrogenazy mleczanowej po 24 godzinach stymulacji receptora P2X7. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano czystą dehydrogenazę mleczanową wyizolowaną z serca wołowego. W żadnych z badanych linii glejaków nie wykryto podwyższonego uwalniania dehydrogenazy do pożywki hodowlanej. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Bonferroniego. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ wzg. Kontrola (*).

4.7 Wpływ receptora P2X7 na morfologię komórek glejaka wielopostaciowego

Jako że aktywacja receptora P2X7 może prowadzić do zmiany w organizacji szkieletu aktynowego oraz do powstawania pęcherzyków na powierzchni błony komórkowej, zbadano morfologię komórek po stymulacji przez BzATP. Dwudziestoczworgodzinna stymulacja przez BzATP nie wpływała w znaczący sposób na morfologię badanych komórek glejaka wielopostaciowego (Rycina 4.8).

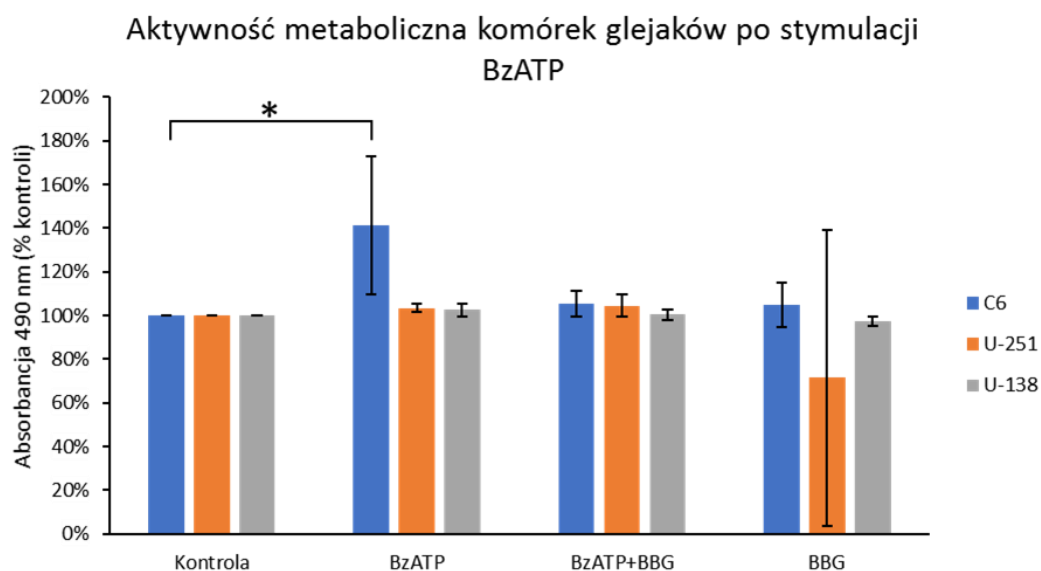


Rycina 4.8. Reprezentatywny obraz zmian morfologicznych w komórkach glejaka ludzi (U-251 i U-138) oraz glejaka C6 szczura po 24 godzinach stymulacji przez 100 μ M BzATP. Stymulacja receptora P2X7 nie wpływa na zmiany morfologiczne komórek glejaka.

4.8 Wpływ receptora P2X7 na aktywność metaboliczną komórek glejaka wielopostaciowego

Po stwierdzeniu braku śmierci komórkowej po stymulacji receptora P2X7 postanowiono, zbadać wpływ tego receptora na aktywność metaboliczną komórek. W tym celu wykonano test MTS, który polega na przetwarzaniu przez żywe i aktywne metabolicznie komórki bezbarwnego substratu do barwnego formazanu. Linie glejaka wielopostaciowego ludzi nie wykazywały statystycznie istotnego wzrostu aktywności metabolicznej po stymulacji receptora P2X7. Również podanie specyficznego inhibitora BBG nie powodowało istotnie statystycznego obniżenia aktywności metabolicznej komórek (Rycina 4.9).

Jedyną linią, która odpowiadała zwiększeniu aktywności metabolicznej była linia glejaka szczura C6. Podanie BzATP, w sposób istotny statystycznie, zwiększało o 38% aktywność metaboliczną w tych komórkach. Co więcej, podanie antagonisty całkowicie kompensowało podanie agonisty, powodując obniżenie aktywności metabolicznej do poziomu kontroli. Podanie samego inhibitora nie obniżało w znaczący sposób aktywności metabolicznej komórek glejaka C6 (Rycina 4.9).

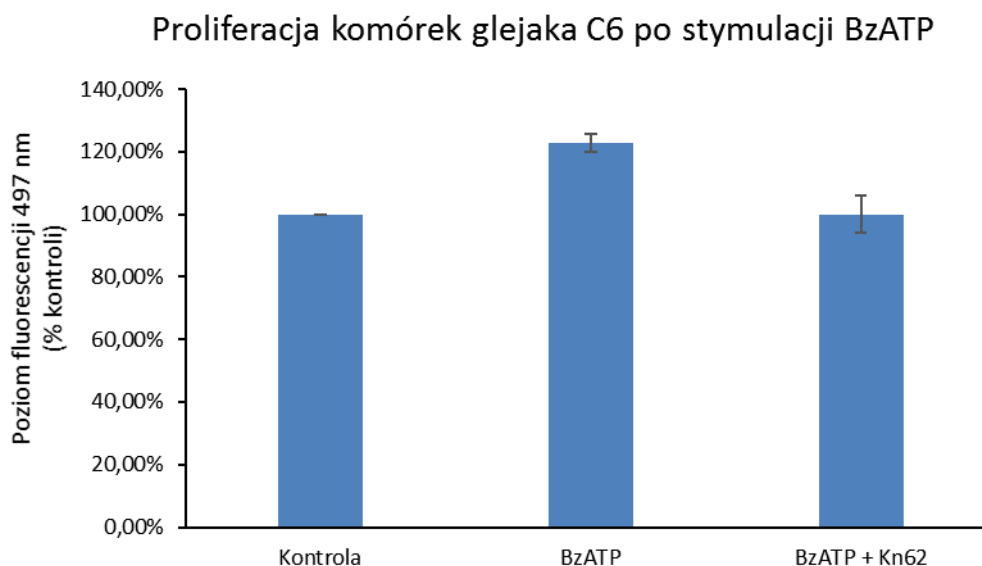


Rycina 4.9. Aktywność metaboliczna komórek glejaków ludzi (U-251, U-138) oraz glejaka szczura C6, po podaniu agonistów i antagonistów receptora P2X7. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Bonferroniego. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ wzg. Kontrola (*).

4.9 Wpływ receptora P2X7 na intensywność podziałów komórek glejaka C6

Po potwierdzeniu wpływu aktywacji receptora P2X7 na aktywność metaboliczną glejaka szczura C6 należało potwierdzić czy obserwowany efekt jest związany tylko z rosnącą aktywnością metaboliczną, czy aktywacja receptora P2X7 jest związaną z przyspieszonymi podziałami komórek. W tym celu przeprowadzono test, który polegał na zliczaniu intensywności wybarwionych jąder komórkowych przez fluorescencyjny barwnik Hoechst 33342. Jako że Hoechst 33342 jest barwnikiem fluorescencyjnym, który działa po wzbudzeniu światłem, a specyficzny inhibitor BBG może absorbować fale świetlne zastosowano inny inhibitor – Kn62. W komórkach traktowanych BzATP przez 24 godziny zaobserwowano podwyższenie intensywności fluorescencji o 20%, co może

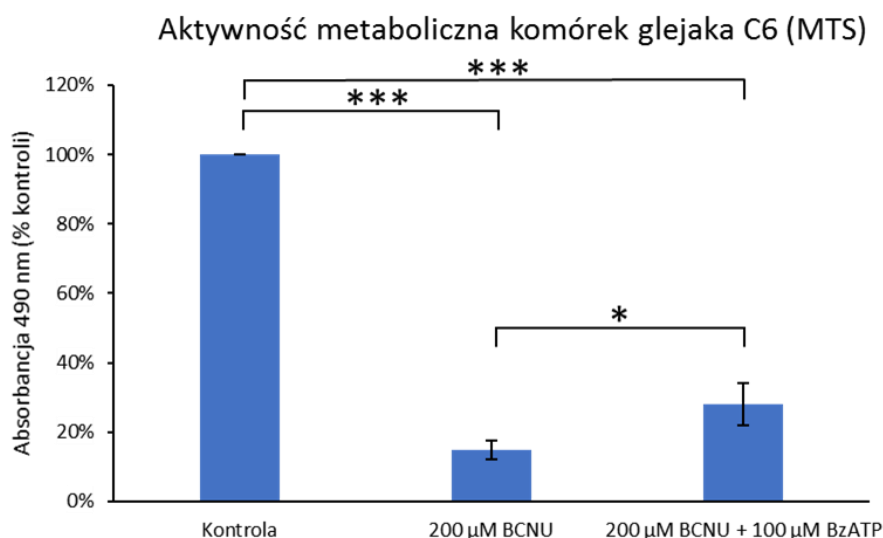
świadczyć o większej liczbie jąder komórkowych – czyli intensyfikacji podziału komórek. Współtraktowanie BzATP i Kn62 obniżało intensywność fluorescencji do poziomu kontrolnego (Rycina 4.10).



Rycina 4.10. Intensywność podziału komórek glejaka szczura C6 po 24 godzinach stymulacji receptora P2X7. Wykres przedstawia dane z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.10 Wpływ receptora P2X7 na przeżywalność komórek glejaka C6 podczas inkubacji z lekami cytostatycznymi

Po potwierdzeniu możliwego wpływu receptora P2X7 na aktywność metaboliczną i proliferację komórek glejaka C6, logicznym wydało się zbadanie wpływu tego receptora na efekt inkubacji komórek linii C6 z lekami o działaniu cytostatycznym. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że komórki glejaka C6 są wrażliwe na traktowanie karmustyną (BCNU), która powoduje spadek aktywności metabolicznej o około 85% w porównaniu do komórek kontrolnych. Współinkubacja z agonistą receptora P2X7 osłabiała działanie karmustyny powodując zmniejszenie spadku aktywności metabolicznej do 72% w porównaniu do kontroli. Wszystkie otrzymane wyniki były istotne statystycznie (Rycina 4.11).

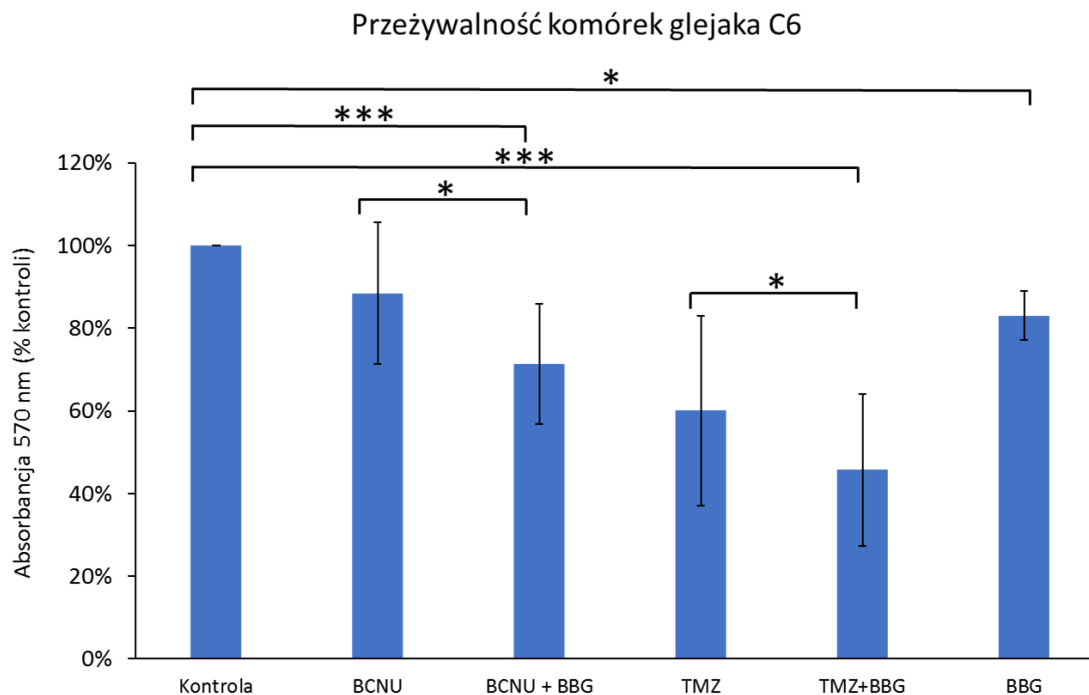


Rycina 4.11. Aktywność metaboliczna komórek glejaka C6 szczura po 24 godzinach inkubacji z karmustyną (200μM) oraz z agonistą receptora P2X7 (100μM). Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Duncana. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Oprócz stymulacji receptora P2X7, przeprowadzono również współinkubację z inhibitorem receptora P2X7 – BBG, karmustyną oraz temozolomidem przez 24 godziny. Jako że test MTS, mierzy aktywność metaboliczną komórek, która w przypadku stosowania leków cytostatycznych może się zmieniać bez zmiany liczby komórek, postanowiono zmierzyć liczbę komórek przez barwienie fioletem krystalicznym.

Traktowanie komórek glejaka C6 karmustyną powodowało obniżenie liczby wybarwionych komórek w stosunku do kontroli o 12%. Otrzymany wynik nie był istotny statystycznie. Współinkubacja komórek z BCNU oraz inhibitorem receptora P2X7 – BBG zwiększała efektywność karmustyny i obniżała liczbę wybarwionych komórek o 29% w stosunku do kontroli, oraz o 17% w stosunku do traktowania samą karmustyną. Otrzymane różnice były istotne statystycznie. Również temozolomid obniżał liczbę wybarwionych komórek w stosunku do kontroli o 40%, jednak otrzymana różnica nie była istotna statystycznie. Współinkubacja temozolomidu z BBG, zwiększała efektywność przeciwnowotworową temozolomidu o 55% w porównaniu do kontroli oraz o 15% w porównaniu do komórek traktowanych samym lekiem. Otrzymane wyniki były istotne statystycznie. Co ciekawe traktowanie samym BBG również obniżało liczbę

wybarwionych komórek, o 17% w porównaniu do kontroli. Otrzymany wynik był istotny statystycznie (Rycina 4.12).



Rycina 4.12. Przeżywalność komórek glejaka C6 po 24 godzinach traktowania lekami cytostatycznymi – karmustyną (200 μ M), temozolomidem (600 μ M) oraz kombinacjami z inhibitorem receptora P2X7 – BBG (100 nM). Wykres przedstawia dane skumulowane z sześciu, niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem wszystkich grup obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Duncana. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

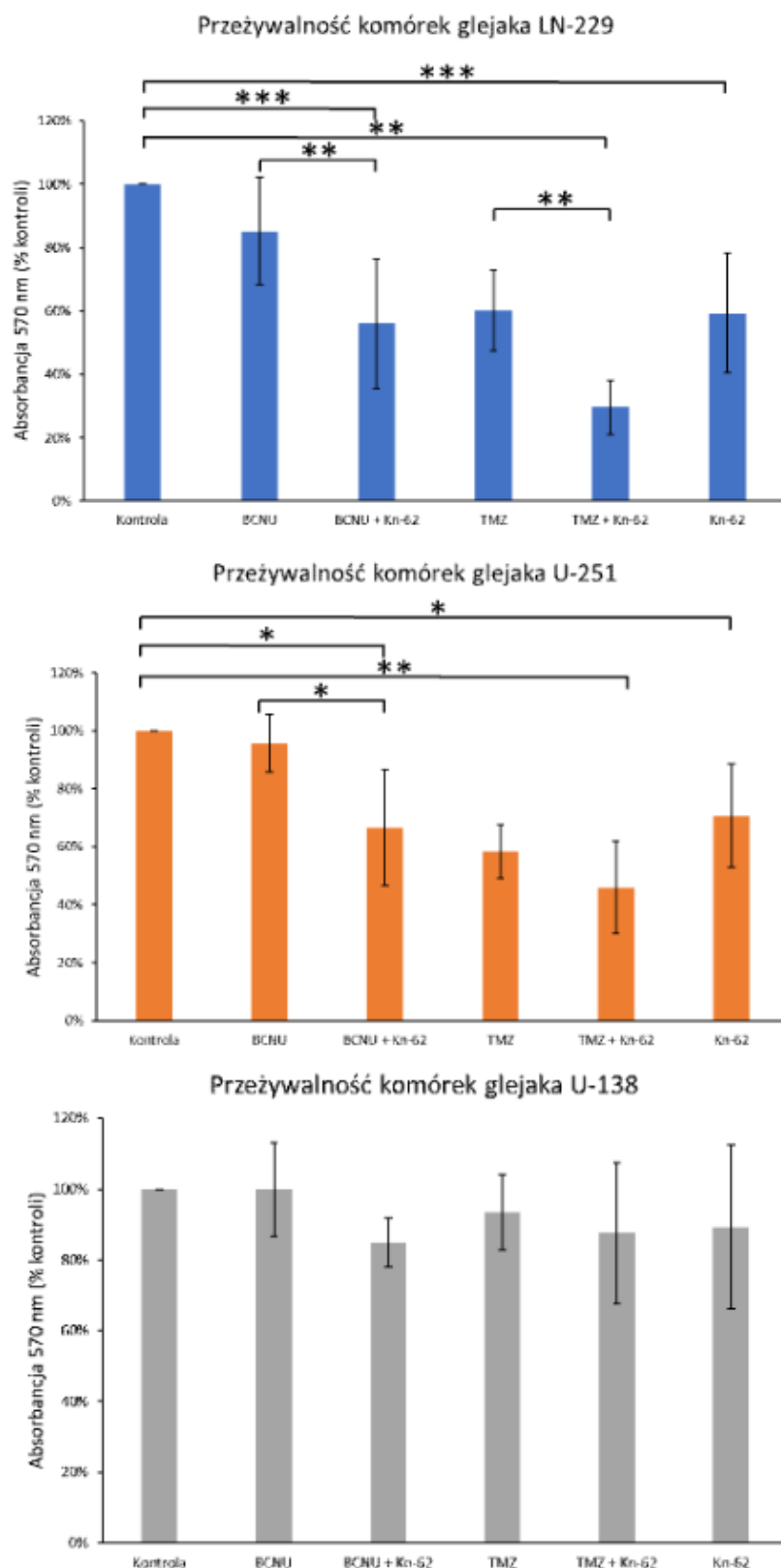
4.11 Wpływ receptora P2X7 na efektywność leków cytostatycznych w komórkach glejaka wielopostaciowego człowieka

Zwiększenie efektywności leków przeciwnowotworowych po współinkubacji z inhibitorem receptora P2X7, w komórkach glejaka C6, sprawiło, że postanowiono przeprowadzić analogiczne badania z wykorzystaniem linii komórkowych ludzkich glejaków wielopostaciowych – LN-229, U-251 oraz U-138. Jako inhibitor zastosowano Kn-62, bardziej specyficzny dla ludzkiego wariantu receptora P2X7 niż BBG. Tak jak w przypadku badań na linii C6, test metaboliczny MTS, zastąpiono barwieniem komórek fioletem krystalicznym. W linii komórkowej LN-229 traktowanie komórek karmustyną obniżało liczbę wybarwionych komórek o 15% w porównaniu do komórek kontrolnych. Otrzymana różnica nie była istotna statystycznie. Współinkubacja karmustyny z inhibitorem Kn-62 obniżała liczbę wybarwionych komórek o 46% w porównaniu do kontroli oraz o 29% w porównaniu do komórek traktowanych samą karmustyną. Oba wyniki były istotne statystycznie. Traktowanie komórek linii LN-229 temozolomidem

obniżało ilość wybarwionych komórek o 40% w porównaniu do komórek kontrolnych, jednak otrzymany wynik nie był istotny statystycznie. Traktowanie komórek mieszaniną cytostatyku z inhibitorem receptora P2X7 – Kn-62 zwiększało efektywność terapii temozolomidem. Było to kolejno 71% w porównaniu do kontroli oraz o 31% w porównaniu do komórek traktowanych samym temozolomidem, różnice te były istotne statystycznie. Traktowanie komórek linii LN-229, samym inhibitorem receptora P2X7, obniżało liczbę wybarwionych komórek o 41% w porównaniu do komórek kontrolnych. Otrzymany wynik był istotny statystycznie.

Podobne wyniki otrzymano w testach z wykorzystaniem linii glejaka U-251. Traktowanie komórek karmustyną obniżało liczbę wybarwionych komórek o 5% w porównaniu do komórek kontrolnych. Efektywność karmustyny została zwiększona przez współinkubację z Kn-62 o 34% w porównaniu do kontroli oraz o 37% w porównaniu do komórek traktowanych samą karmustyną. Otrzymane różnice były istotne statystycznie. Traktowanie komórek linii U-251 powodowało obniżenie liczby wybarwionych komórek o 42% w porównaniu do komórek kontrolnych, jednak otrzymany wynik nie był istotny statystycznie. Kombinacja cytostatyku z inhibitorem zwiększała efektywność terapii temozolomidem o 55% w porównaniu do kontroli oraz o 13% w porównaniu do komórek traktowanych samym temozolomidem. Różnica pomiędzy kombinacją a kontrolą była istotna statystycznie. Również sam inhibitor wywoływał istotne statystycznie obniżenie liczby wybarwionych komórek o 30% w porównaniu do kontroli.

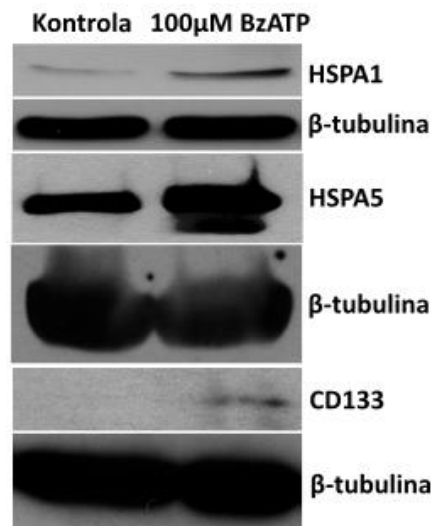
W linii U-138, traktowanie komórek karmustyną powodowało, nieistotne statystycznie, obniżenie wybarwionych komórek o 1% w porównaniu do kontroli. Użycie kombinacji karmustyny i inhibitora P2X7 powodowało, nieistotne statystycznie, obniżenie liczby wybarwionych komórek o 16% w porównaniu do kontroli oraz o 15% w porównaniu do komórek traktowanych samą karmustyną. Traktowanie temozolomidem powodowało obniżenie tej liczby o 7% w porównaniu do kontroli, które nie również nie było istotne statystycznie. Współinkubacja temozolomidu z inhibitorem receptora P2X7, zwiększała efektywność przeciwnowotworową o 13% w porównaniu do kontroli oraz o 6% w porównaniu do komórek traktowanych samym temozolomidem. Traktowanie komórek samym inhibitorem receptora P2X7, obniżało liczbę wybarwionych komórek o 11% w porównaniu do kontroli, jednak otrzymany wynik nie był istotny statystycznie (Rycina 4.13).



Rycina 4.13. Przeżywalność komórek ludzkich glejaków LN-229, U-251 oraz U-138 po 24 godzinach traktowania lekami cytostatycznymi – karmustyną (200 μM), temozolomidem (600 μM) oraz kombinacjami z inhibitorem receptora P2X7 – Kn-62 (2 μM). Wykresy przedstawiają dane skumulowane z sześciu, niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem wszystkich grup obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Duncana. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

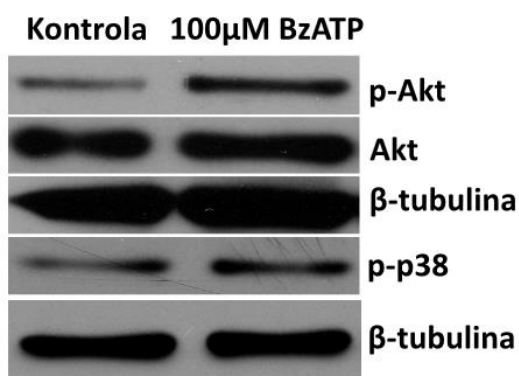
4.12 Wpływ receptora P2X7 na aktywację białek opiekuńczych oraz ścieżek sygnałowych wpływających pozytywnie na proliferację

Po wykazaniu zwiększonej przeżywalności komórek glejaka C6 po traktowaniu lekiem o charakterze cytostatycznym, należało sprawdzić co może powodować zwiększoną przeżywalność. W tym celu w pierwszej kolejności zbadano wpływ aktywacji receptora P2X7 na białka, które chronią komórki nowotworowe przed śmiercią komórkową. Stymulacja komórek szczurzego glejaka C6 agonistą receptora P2X7 przez 24 godziny, powodowała zwiększenie ilości wykrywanych białek opiekuńczych HSPA1 oraz HSPA5. Dodatkowo aktywacją receptora P2X7 wpływała na wykrywanie zwiększonej ilości markera nowotworowych komórek macierzystych – CD133 (Rycina 4.14).



Rycina 4.14. Analiza Western Blot ilości białek szoku cieplnego (HSPA1 i HSPA5) oraz markera nowotworowych komórek macierzystych (CD133) po 24 godzinach stymulacji receptora P2X7. Rycina przedstawia reprezentatywne wyniki z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

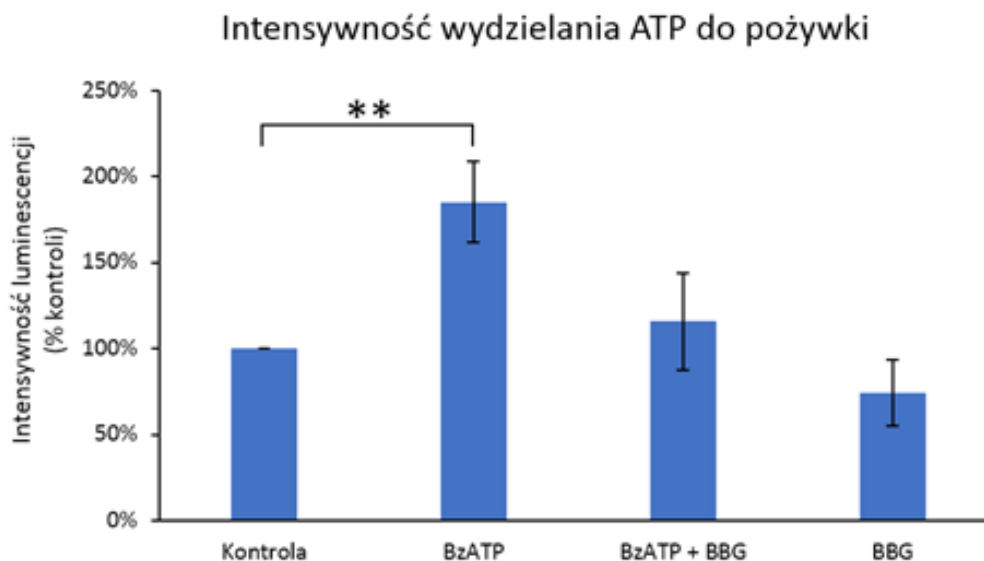
Dodatkowo zbadano wpływ stymulacji receptora P2X7 na fosforylację kinazy AKT oraz p38 MAPK, które mogą w glejaku wielopostaciowym wpływać na częstotliwość podziałów komórkowych oraz modulować odpowiedź na toksyczne leki przeciwnowotworowe. Badania wykazały, że 24 godziny stymulacji komórek glejaka C6 100 μM BzATP powoduje zwiększoną fosforylację białka p38 należącego do kinaz MAPK oraz zwiększoną fosforylację białka kinazy AKT. Aktywacja P2X7 nie miała znaczącego wpływu na ilość całkowitego białka AKT (Rycina 4.15).



Rycina 4.15. Analiza Western Blot fosforylacji kinaz z rodziny AKT i MAPK po 24 godzinach stymulacji receptora P2X7. Rycina przedstawia reprezentatywne wyniki z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.13 Wydzielanie zewnątrzkomórkowego ATP po stymulacji receptora P2X7

W literaturze występują doniesienia o możliwym stymulowaniu uwalniania ATP do środowiska zewnątrzkomórkowego przez aktywowany receptor P2X7. Dlatego tak ważne było zbadanie czy w linii glejaka C6 występuje taki sam mechanizm, mogący powodować aktywację innych receptorów nukleotydowych. W badanej linii C6, 24 godzinna stymulacja receptora powodowała statystycznie istotne zwiększenie stężenia ATP wydzielanego do pożywki o około 85% w porównaniu do grupy kontrolnej. Współinkubacja agonisty z antagonistą znosiła ten efekt do 15% w porównaniu do komórek kontrolnych i znosiła jego istotność statystyczną. Podanie samego antagonisty obniżało stężenie zewnątrzkomórkowego ATP o 26% w porównaniu do komórek kontrolnych. Efekt ten nie był istotny statystycznie (Rycina 4.16).

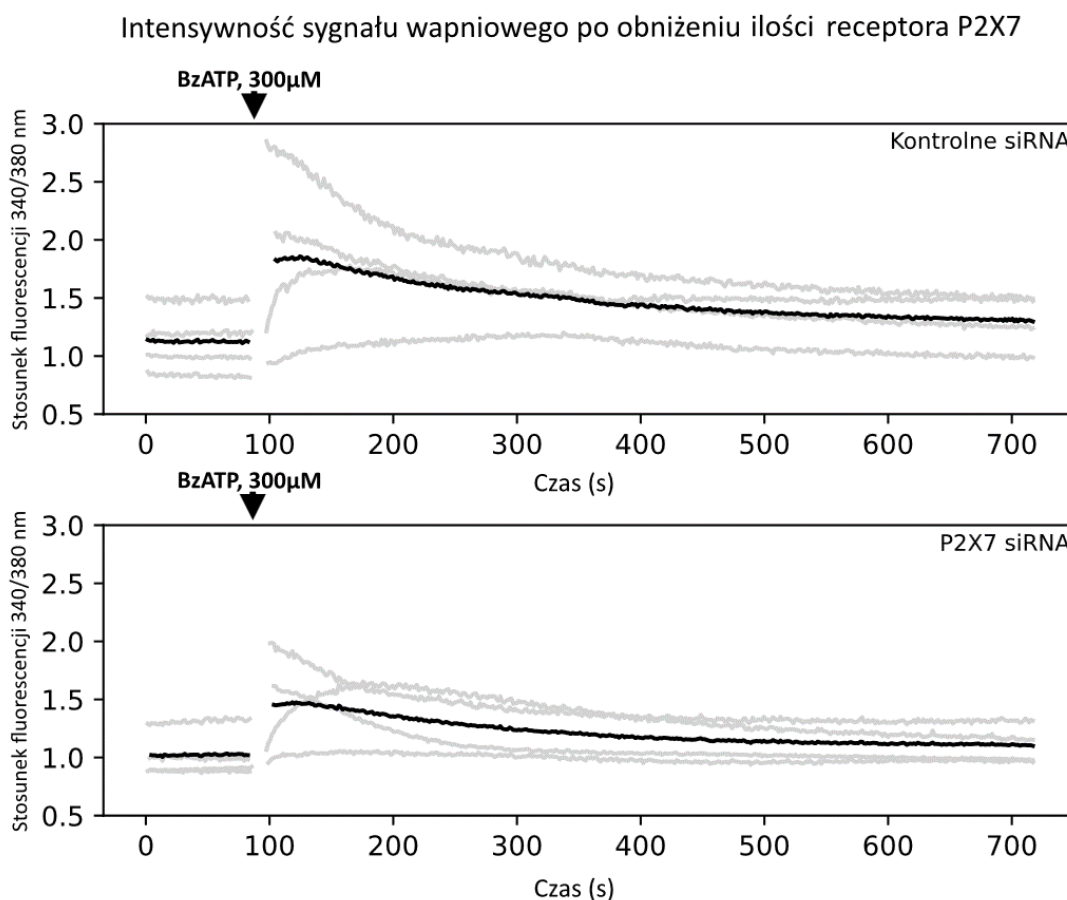


Rycina 4.16. Intensywność wydzielania ATP do pożywki hodowlanej, po modulowaniu aktywności receptora P2X7. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla powtórzonych pomiarów z testem post hoc Bonferroni. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (**); $p < 0,01$ (***) wzg. Kontroli.

4.14 Wpływ obniżenia ilości białka P2X7 na sygnał wapniowy po stymulacji BzATP

Po obniżeniu ilości receptora P2X7 w komórkach glejaka C6 przeprowadzono pomiar sygnału wapniowego, po stymulacji przez BzATP. Z danych literaturowych wiadomo, że BzATP oprócz receptora P2X7 może stymulować P2X5 oraz P2Y2 i P2Y11, dlatego należało zbadać, czy doszło do obniżenia sygnału wapniowego wraz z obniżeniem ilości P2X7. W komórkach z obniżoną ilością P2X7 sygnał wapniowy obserwowany po pobudzeniu przez BzATP, był o około połowę niższy niż w komórkach kontrolnych (Rycina 4.17). Obniżenie intensywności sygnału wapniowego korelowało z obniżoną

ilością białka. Dlatego można wnioskować, że sygnał wapniowy może pochodzić od receptora P2X7, a nie innych receptorów z rodziny P2.

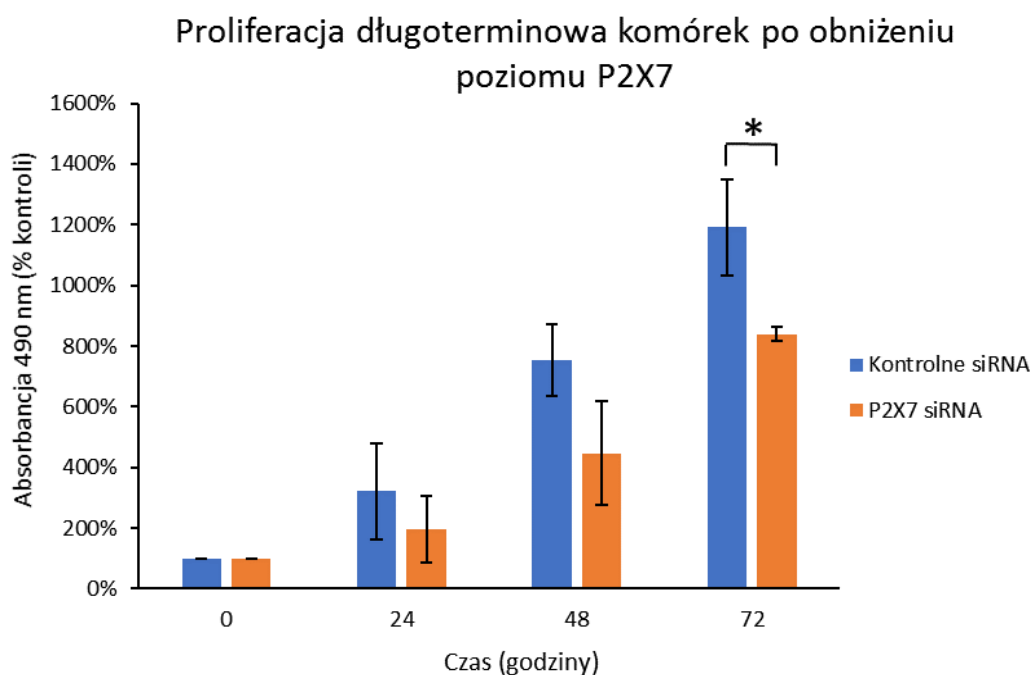


Rycina 4.17. Analiza sygnału wapniowego po obniżeniu ilości receptora P2X7 w komórkach glejaka szczura C6. Czarna strzałka w górnej części wykresu wskazuje na czas podania BzATP. Szare linie przedstawiają pojedyncze powtórzenia biologiczne, czarna linia pokazuje uśredniony poziom sygnału z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.15 Wpływ obniżenia ilości receptora P2X7 na proliferację długoterminową komórek glejaka C6

Wcześniejsze eksperymenty z wykorzystaniem testu metabolicznego MTS oraz fluorescencyjnego barwnika Hoechst 33342 wykazały zwiększony potencjał do podziałów komórek glejaka C6, po stymulacji przez agonistę receptora P2X7 – BzATP. Jednak, aby jednoznacznie potwierdzić czy receptor P2X7 jest zaangażowany w proliferację glejaka C6 należało przeprowadzić test proliferacji długoterminowej. Aby uniknąć korzystania z agonistów i antagonistów, wykorzystano obniżenie ilości receptora P2X7 z wykorzystaniem małego interferującego RNA. Obniżenie wykrywanego białka

receptora P2X7, spowodowało zahamowanie podziałów we wszystkich badanych punktach czasowych. Po 24 godzinach, komórki dzieliły się wolniej o około 50% w porównaniu do kontroli, taki sam poziom obniżenia podziałów komórkowych występował po 48 godzinach. Po 72 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu intensywność proliferacji w komórkach z obniżoną ilością receptora P2X7 był niższy o 33% niż w kontroli i tylko ten punkt czasowy wykazywał istotność statystyczną (Rycina 4.18).

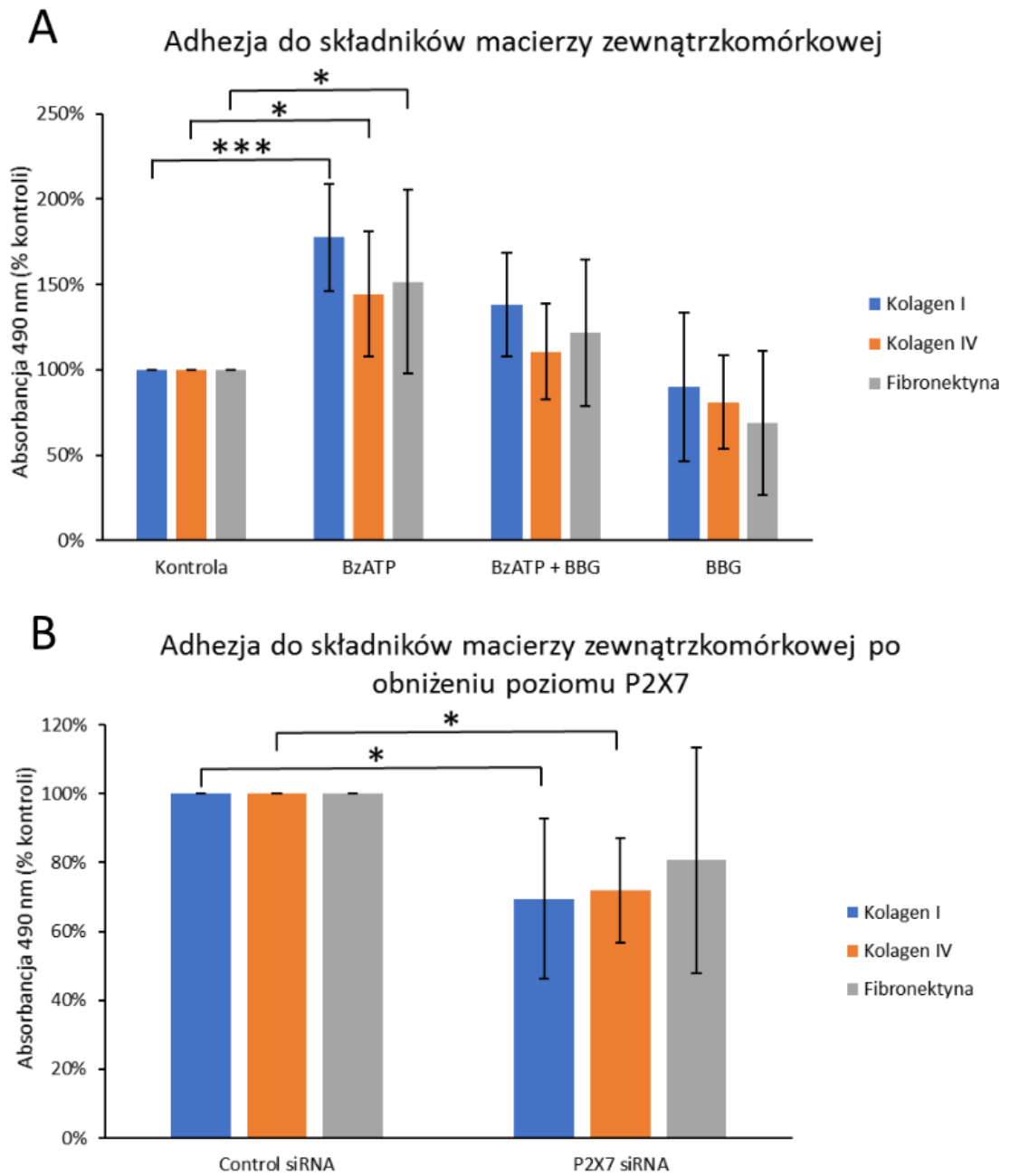


Rycina 4.18. Proliferacja długoterminowa komórek po obniżeniu ekspresji białka P2X7. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek traktowanych kontrolnym siRNA obliczano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (**) wzg. Kontrolne siRNA

4.16 Wpływ receptora P2X7 na adherentność komórek glejaka do wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej

Jako że zwiększona adhezja komórek do składników macierzy zewnątrzkomórkowej, może wpływać pozytywnie na zwiększoną migrację oraz sygnalizację komórkową przez integryny, zbadano wpływ aktywacji receptora P2X7 na przyleganie komórek glejaka C6 do podłoża. Do testu wybrano 3 najczęściej występujące w organizmie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej: kolagen 1, 4 oraz fibronektynę. Stymulacja receptora P2X7 powodowała istotny statystycznie wzrost przylegania komórek glejaka C6 do kolagenu 1 o 80% w porównaniu do komórek kontrolnych. Efekt ten mógł zostać

zmniejszony do około 40% przez podanie inhibitora P2X7 – BBG. Sam BBG obniżał ilość przyklejonych komórek o 20% względem kontroli, jednak ten wynik nie był istotny statystycznie. Stymulacja P2X7 powodowała również statystycznie istotne zwiększenie przylegania komórek do kolagenu IV. Efekt agonisty ten został zredukowany przez współinkubację z inhibitorem receptora P2X7 – BBG. W przypadku przylegania do fibronektyny, stymulacja P2X7 powodowała zwiększone przyleganie do podłoża, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie. Współtraktowanie z inhibitorem obniżało ten wzrost o połowę. Inkubacja z samym inhibitorem obniżała adhezję o 40% względem kontroli, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie (Rycina 4.19a). Zbadano również wpływ obniżenia ilości P2X7 z wykorzystaniem małego interferującego RNA, na przyleganie komórek do składników macierzy (Rycina 4.19b). Obniżenie ilości receptora P2X7 spowodowało obniżenie adhezji komórek glejaka C6 do składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Statystycznie istotne różnice wykazano w adhezji do kolagenu I oraz kolagenu IV. Obniżenie ilości P2X7 niwelowało również adhezję do fibronektyny, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.

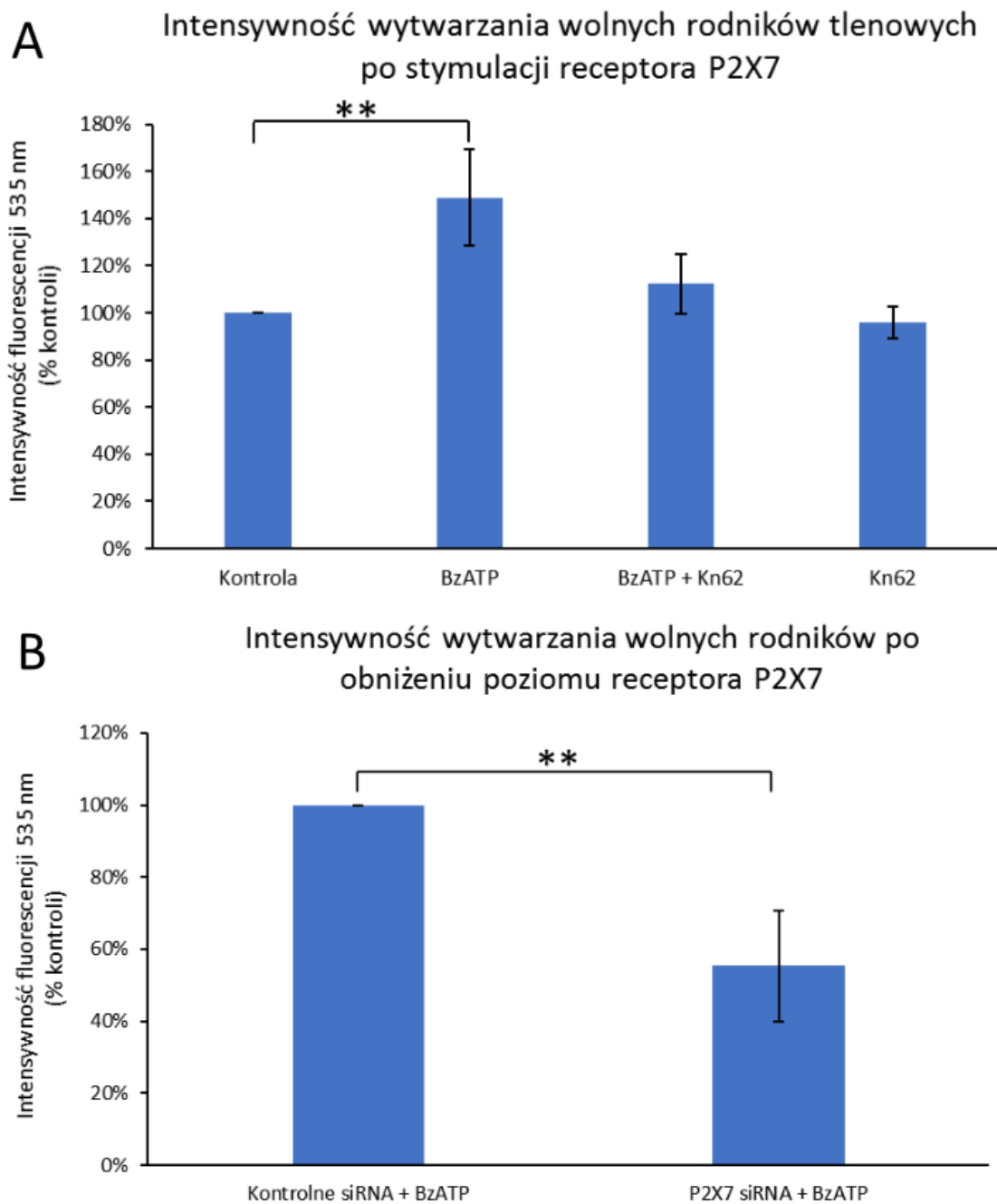


Rycina 4.19. Adhezja komórek glejaka C6 do składników macierzy zewnątrzkomórkowej. A) Wpływ modulowania aktywności receptora P2X7 na adhezję do kolagenu I, kolagenu II i fibronektyny. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla powtórzonych pomiarów z testem post hoc Bonferroni. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) wzg. Kontrola. B) Wpływ obniżenia syntezy receptora P2X7 przez małe interferujące RNA na adhezję do kolagenu I, kolagenu II i fibronektyny. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,05$ (*) wzg. Kontrola.

4.17 Wpływ receptora P2X7 na wytwarzanie wolnych rodników tlenowych

Wnikający do komórek wapń w małym stężeniu może wpływać na metabolizm komórkowy stymulująco. Natomiast masywny napływ jonów wapnia może działać na metabolizm hamująco poprzez depolaryzację błony mitochondrialnej i wprowadzenie komórek na drogę śmierci komórkowej. Jako że we wcześniejszych doświadczeniach udowodniono występowanie sygnału wapniowego po stymulacji receptora P2X7 przeprowadzono pomiar wytwarzania wolnych rodników z wykorzystaniem sondy DCF-DA, która mierzy zdolność utleniającą środowiska. Komórki traktowane przez godzinę 100 μ M BzATP wykazywały o 50% większą intensywność fluorescencji niż komórki kontrolne. Wynik ten był istotny statystycznie. Inkubacja agonisty z antagonistą P2X7 – Kn62 znosiła efekt stymulacji przez BzATP. Traktowanie samym inhibitorem P2X7 – Kn62 obniżało intensywność fluorescencji o 10% (Rycina 4.20a).

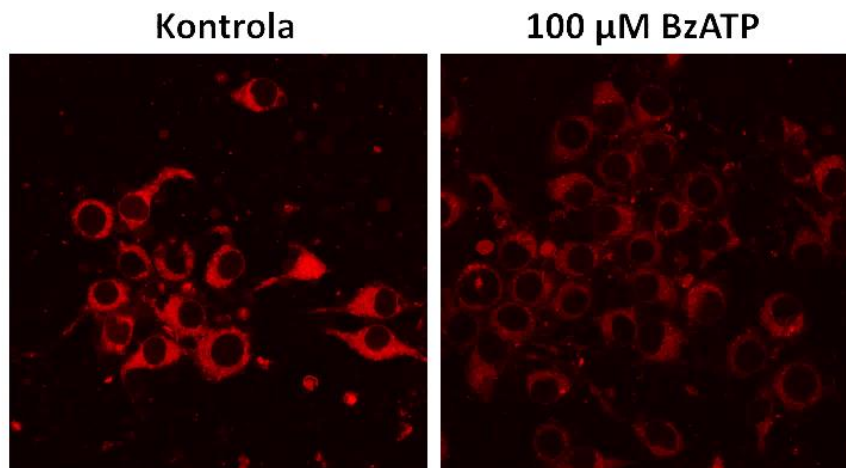
Jako że wcześniejsze badania wskazały na możliwość wydzielina zewnątrzkomórkowego ATP po stymulacji receptora P2X7, które mogłyby aktywować inne receptory z rodziny P2, przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem małego interferującego RNA. Komórki, z obniżoną ilością receptora P2X7, ulegały indukcji o 40% słabszej w porównaniu do komórek kontrolnych, wynik ten był istotny statystycznie (Rycina 4.20b).



Rycina 4.20. Intensywność wytwarzania wolnych rodników tlenowych w komórkach glejaka C6. A) Intensywność wytwarzania wolnych rodników po modulowaniu aktywności receptora P2X7. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla powtórzonych pomiarów z testem post hoc Bonferroni. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,01$ (**) wzg. Kontrola. B) Intensywność wytwarzania rodników po obniżeniu syntezy receptora P2X7 przez małe interferujące RNA. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,01$ (**) wzg. Kontrola.

4.18 Wpływ receptora P2X7 na polaryzację mitochondriów

Jako że wcześniejsze badania wykazały wpływ receptora P2X7 na wytwarzanie wolnych rodników w komórkach glejaka C6, w następnym kroku należało zbadać czy efekt ten jest powiązany ze zmianami w strukturze oraz funkcjonowaniu mitochondrionu. W pierwszej kolejności przy użyciu fluorescencyjnej sondy MitotrackerCMX Ros zbadano strukturę oraz liczbę mitochondriów. Ta sonda fluorescencyjna łączy się tylko z aktywnymi metabolicznie mitochondriami. Przeprowadzona z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej analiza wykazała brak istotnych różnic w ilości oraz strukturze mitochondriów. Jednak mitochondria w komórkach glejaka C6 traktowane BzATP wykazywały obniżoną intensywność fluorescencji co mogło świadczyć o obniżonej polaryzacji błony w obrębie mitochondriów (Rycina 4.21).

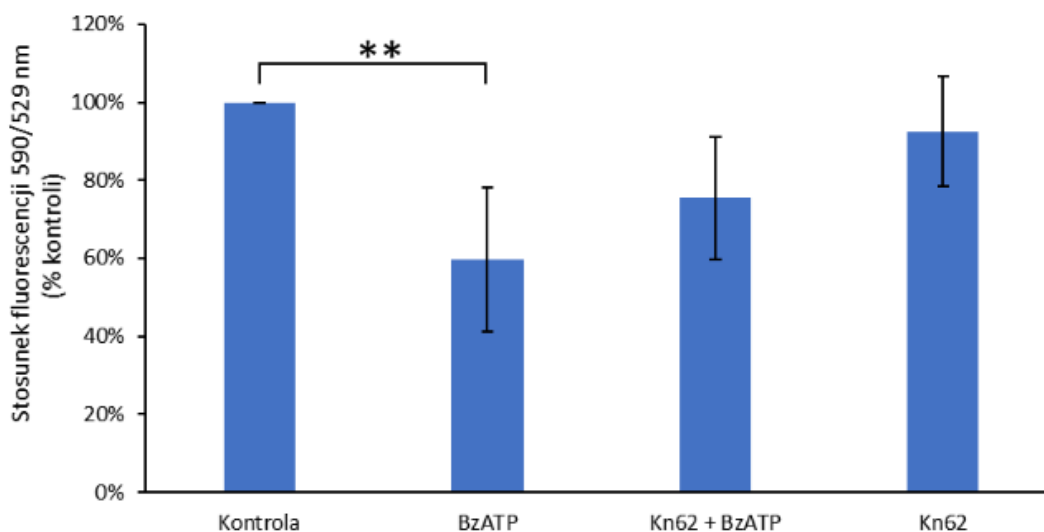


Rycina 4.21. Reprezentatywny obraz mitochondriów glejaka C6 barwionych sondą MitotrackerCMX Ros. Po lewej przedstawiono komórki kontrolne, po prawej komórki stymulowane przez godzinę 100 μ M BzATP.

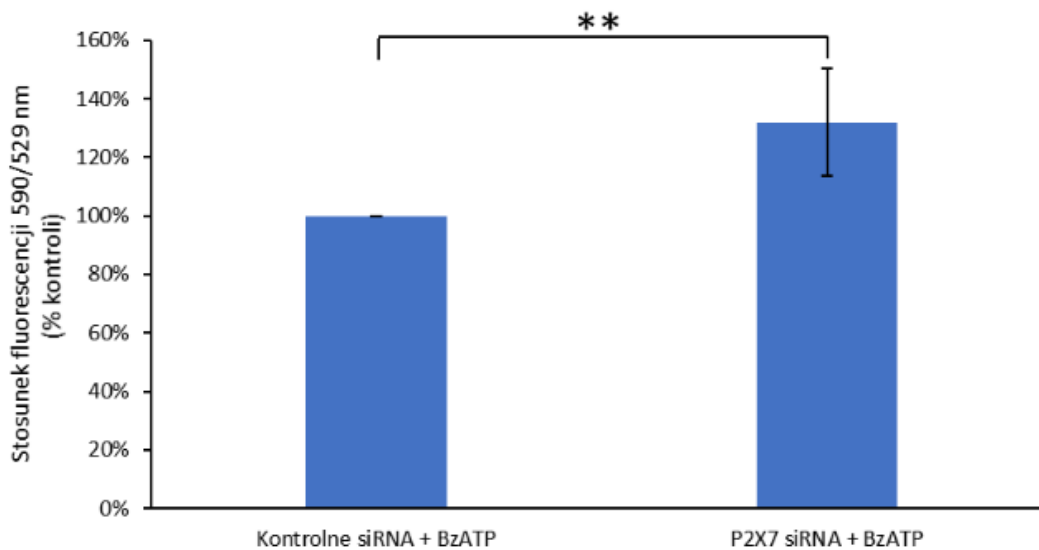
W celu dokładniejszego zbadania polaryzacji mitochondriów wykorzystano dokładniejszą ratiometryczną sondę JC-1 oraz cytometr przepływowy. Sonda ta łączy się do mitochondriów i gdy błona mitochondrialna jest nieuszkodzona barwnik tworzy agregaty wykrywalne w czerwonym kanale, natomiast gdy błona mitochondrialna jest uszkodzona, agregaty barwnika nie tworzą się, a monomery wykrywalne są w zielonym kanale fluorescencji. Stosunek intensywności świecenia na kanale czerwonym do intensywności na kanale zielonym jest proporcjonalny do potencjału błony i nie zależy od stężenia sondy. Stymulacja receptora P2X7 wpływała na obniżenie polaryzacji błony mitochondrialnej w komórkach glejaka C6 o około 60% w porównaniu do komórek kontrolnych. Zmiana ta była istotna statystycznie. Współinkubacja antagonisty wraz z

agonistą receptora P2X7 zmniejszała ten efekt do poziomu 25% i różnica ta nie była istotna statystycznie. Sam inhibitor obniżał polaryzację mitochondriów o 8% w porównaniu do komórek kontrolnych, jednak ten wynik również nie był istotny statystycznie (Rycina 4.22a). Jako że BzATP może pobudzać inne receptory z rodziny P2 należało, sprawdzić czy obserwowany efekt jest związany z pobudzeniem P2X7 czy może z aktywacją innego receptora lub aktywacją parakrynną przez opisany już wyrzut ATP. W tym celu obniżono ilość receptora P2X7 z wykorzystaniem małego interferującego RNA i na tak zmienionych komórkach ponownie zbadano wpływ BzATP na polaryzację mitochondriów. Komórki z obniżoną ilością receptora P2X7 charakteryzowały się mitochondriami o wyższej o 32% polaryzacji, w porównaniu do komórek kontrolnych, co było proporcjonalne do obniżonej przez siRNA ilości receptora. Otrzymany wynik był istotny statystycznie (Rycina 4.22b).

A Potencjał mitochondrialny po stymulacji receptora P2X7



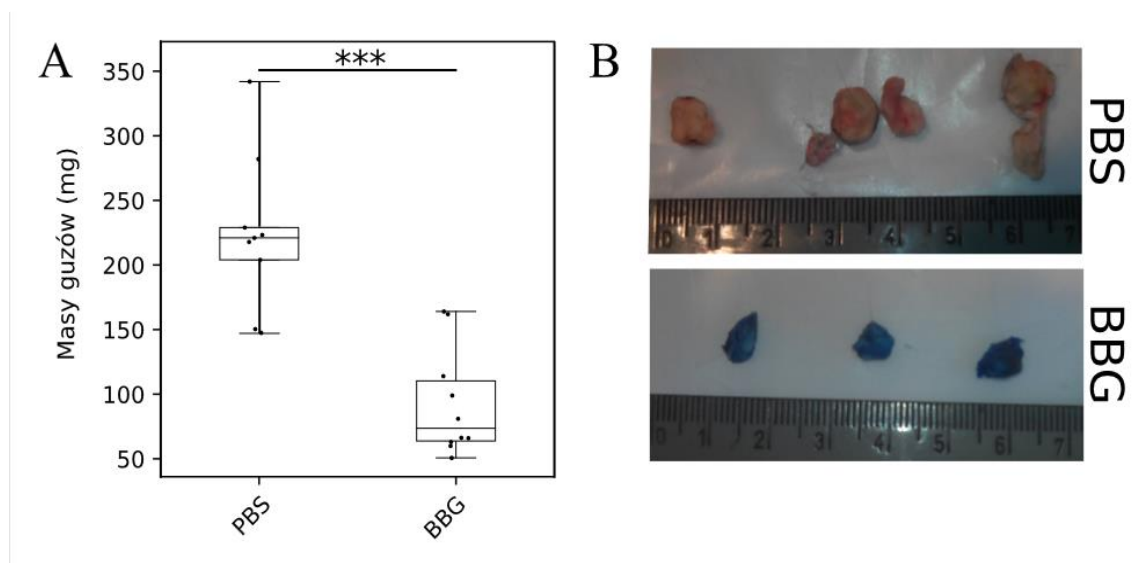
B Potencjał mitochondrialny po obniżeniu poziomu receptora P2X7



Rycina 4.22. Potencjał mitochondrialny w komórkach glejaka C6. A) Polaryzacja mitochondriów po modulowaniu aktywności receptora P2X7. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla powtórzonych pomiarów z testem post hoc Bonferroni. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy; $p < 0,01$ (**). B) Polaryzacja mitochondriów po obniżeniu syntezy receptora P2X7 przez małe interferujące RNA. Istotność statystyczną względem komórek kontrolnych obliczono z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta. Wynik uznawano za statystycznie istotny gdy $p < 0,01$ (**). vs. Kontrola.

4.19 Wpływ receptora P2X7 na rozwój glejaka C6 *in vivo*

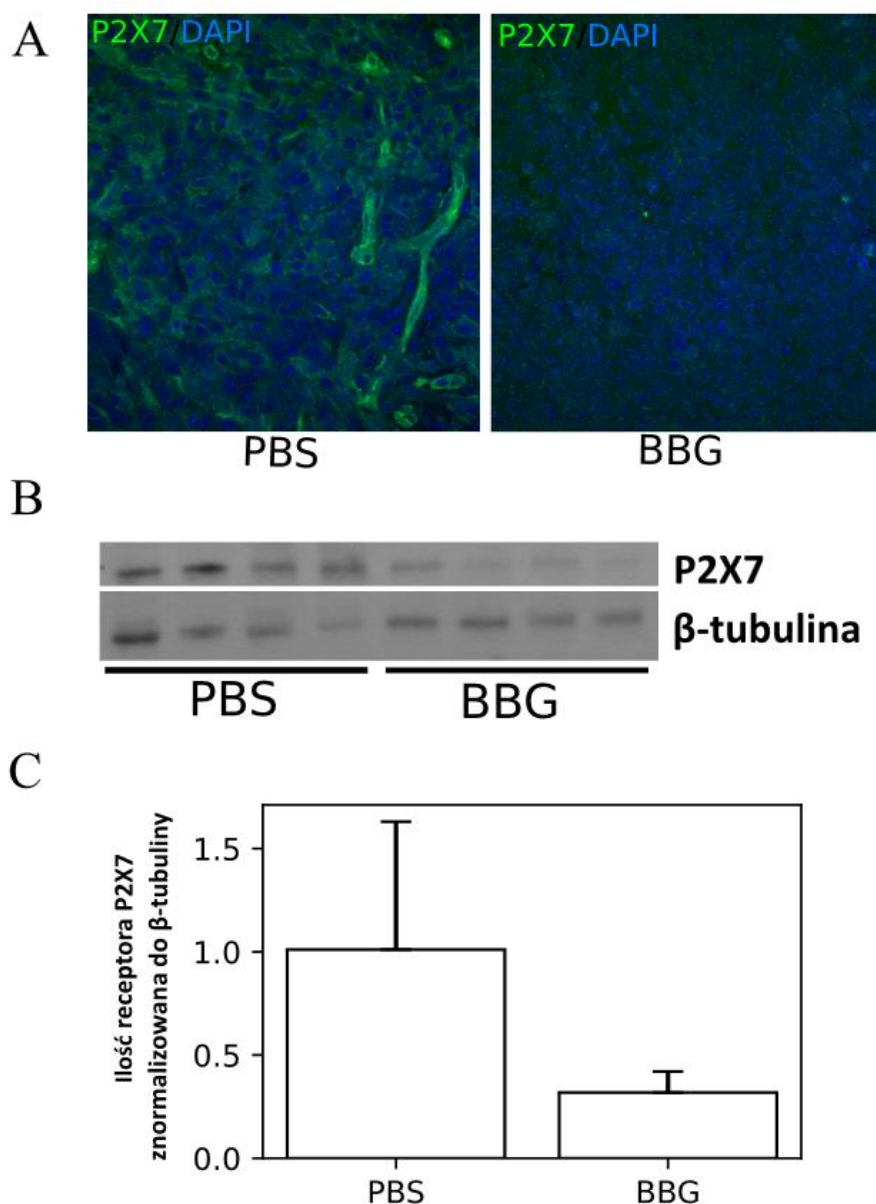
Skumulowana dawka 400 mg BBG na kilogram masy ciała myszy skutecznie obniżała masy guzów glejaka C6. Guzy ze zwierząt traktowanych inhibitorem miały zmniejszoną masę o około 57%, w porównaniu do guzów ze zwierząt traktowanych PBS. Różnica ta była istotna statystycznie. Co więcej u zwierząt, którym podawano inhibitor nie znaleziono przerzutów nowotworowych do innych tkanek, a guzy były zwarte. Zwierzęta kontrolne traktowane PBS miały zwiększoną ilość odległych przerzutów, a guzy były zbudowane z kilku pomniejszych (Rycina 4.23).



Rycina 4.23. Wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7 na rozwój glejaka C6 szczura. A) Masy guzów zwierząt kontrolnych (PBS) oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 (BBG). Punkty na wykresie przedstawiają masy pojedynczych guzów. Na wykresie przedstawiono uśrednioną masę z 10 guzów kontrolnych oraz 10 guzów traktowanych BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Zmianę uznawano za istotną statystycznie gdy $p < 0,001$ (*). B) Reprezentatywny przykład guzów kontrolnych (PBS) oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 (BBG).

4.20 Wpływ BBG na syntezę białka P2X7 w guzach nowotworowych

Po zakończeniu podawania zwierzętom inhibitora P2X7 i izolacji guza, w pierwszej kolejności zbadano wpływ podawanego BBG na ekspresję receptora P2X7. W guzach zwierząt traktowanych BBG zaobserwowano obniżoną immunodetekcję białka P2X7 w skrawkach mrożonych (Rycina 4.24a). Dodatkowo badania z wykorzystaniem hybrydyzacji Western Blot wykazały obniżoną ekspresję receptora P2X7 w guzach zwierząt poddanych działaniu BBG (Rycina 4.24b).



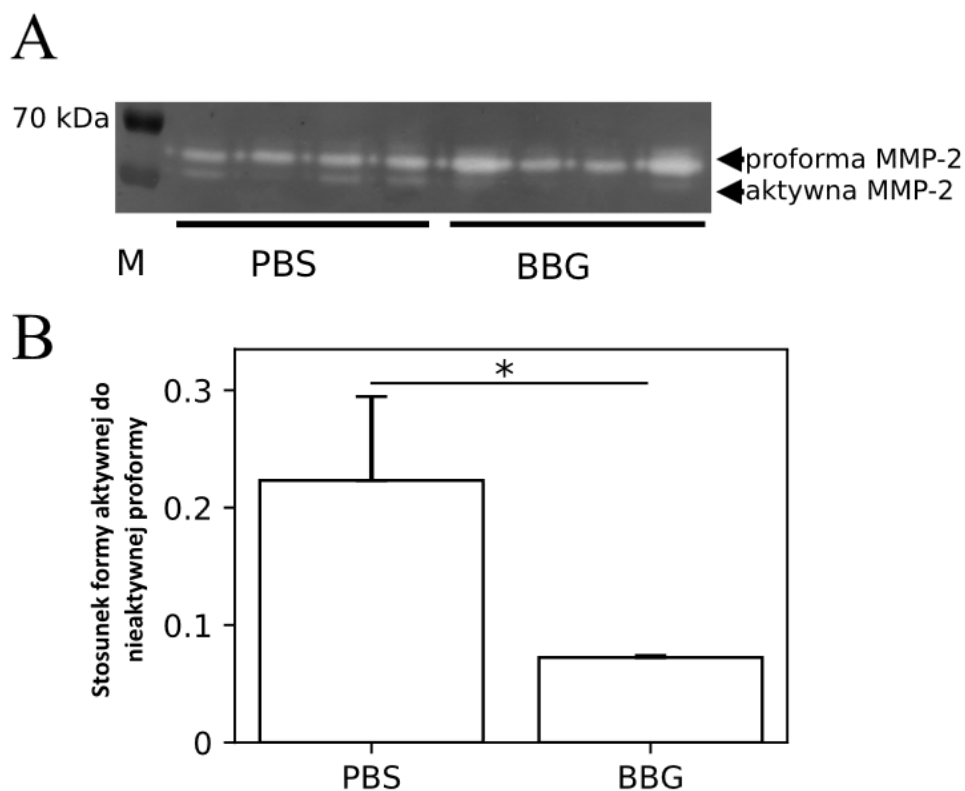
Rycina 4.24. Detekcja receptora P2X7 w guzach kontrolnych oraz traktowanych BBG. A) Immunodetekcja receptora P2X7 w skrawkach mrożonych. Kolor zielony to receptor P2X7, kolorem niebieskim wybarwiono jądra komórkowe z wykorzystaniem barwnika DAPI. B) Analiza Western Blot ilości białka P2X7 w homogenatach z guzów nowotworowych. Na grupę kontrolną (PBS) oraz badaną (BBG) przypadają 4 niezależne powtórzenia biologiczne. C) Analiza densytometryczna ilości białka P2X7 znormalizowanej względem β -tubuliny.

4.21 Analiza aktywności metaloproteiny 2 w guzach nowotworowych

Obniżona ilość przerzutów guzów nowotworowych u zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 sugerowała obniżoną aktywność metaloproteinaz. Enzymy te regulują istotne i pożądane procesy takie jak: neurogeneza, tworzenie się nowych naczyń krwionośnych lub umożliwiają przenikanie makrofagom przez ściany naczyń krwionośnych. Jednak w przypadku nowotworów ich aktywność jest niepożądana,

ponieważ sprzyja w powstawaniu przerzutów komórek nowotworowych. W niniejszych badaniach przeprowadzono oznaczenie aktywności metaloproteinazy 2 (MMP-2) z wykorzystaniem techniki zymografii żelatynowej. Metaloproteinaza ta, charakteryzuje się występowaniem dwóch form: nieaktywnej w warunkach *in vivo* formy pełnej długości oraz skróconej proteolitycznie formy aktywnej, która w organizmie żywym pełni swe funkcje.

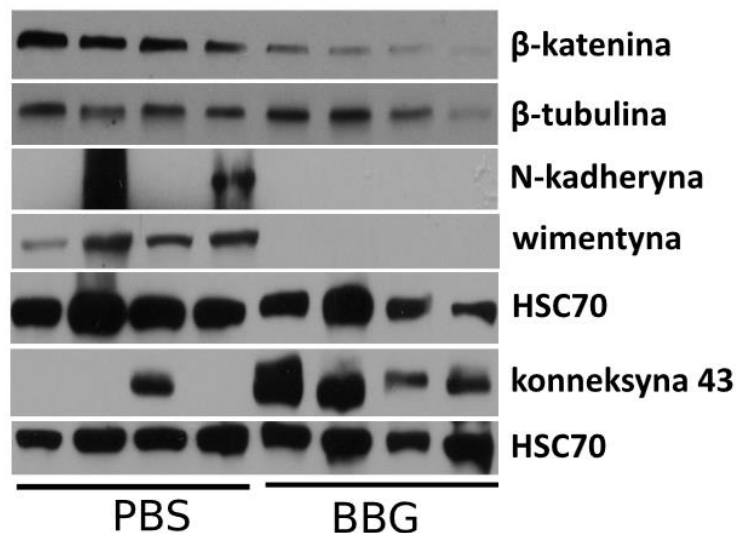
Przeprowadzone badania wykazały obniżoną o około 68% aktywność metaloproteinazy 2 w guzach pochodzących ze zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 w porównaniu do zwierząt traktowanych PBS. Otrzymany wynik był istotny statystycznie (Rycina 4.25).



Rycina 4.25. Aktywność metaloproteinazy 2 w guzach glejaka C6. A) Zymogram przedstawiający aktywność metaloproteinazy 2 w guzach glejaka C6. Górny prążek przedstawia proformę MMP-2, prążek poniżej to cięta forma, aktywna MMP-2. Skrótem M oznaczono molekularny znacznik mas. Na grupę kontrolną (PBS) oraz badaną (BBG) przypadają 4 niezależne powtórzenia biologiczne. B) Wykres przedstawiający uśrednioną wartość stosunku formy aktywnej metaloproteinazy do formy nieaktywnej. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Zmianę uznawano za istotną statystycznie gdy $p < 0,05$ (*).

4.22 Wpływ receptora P2X7 na białka adhezyjne w guzach glejaka C6

Guzy nowotworowe u zwierząt, którym podawano inhibitor, charakteryzowały się zmniejszoną liczbą przerzutów oraz miały bardziej spójną strukturę. Obserwacje te wraz z badaniami *in vitro* wskazują na wpływ receptora P2X7 na adhezję do macierzy zewnątrzkomórkowej. Zbadano również rolę tego receptora w regulowaniu produkcji białek zaangażowanych w adhezję komórka-komórka. W guzach zwierząt, traktowanych BBG, zaobserwowano obniżoną ilość β -kateniny, N-kadheryny oraz wimentyny, znanych markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Jednocześnie zaobserwowano znaczny wzrost koneksyny 43, która jest jednym z białek tworzących połączenia ścisłe (Rycina 4.26).

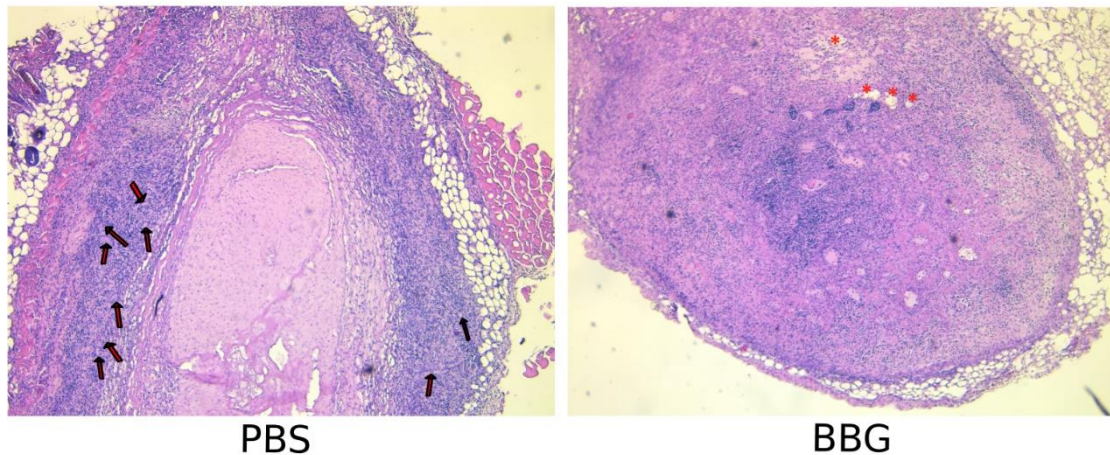


Rycina 4.26. Analiza Western Blot wpływu zahamowania aktywności receptora P2X7 na białka zaangażowane w przejściu epitelialno-mezenchymalnym oraz adhezji komórka - komórka w guzach glejaka C6. Na grupę kontrolną (PBS) oraz badaną (BBG) przypadają 4 niezależne powtórzenia biologiczne.

4.23 Analiza histopatologiczna guzów glejaka C6 implantowanych do myszy

Podczas przeprowadzania analizy histopatologicznej z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną i eozyną wykazano następujące zmiany. Guzy pochodzące ze zwierząt, które były traktowane inhibitorem receptora P2X7 – BBG, wykazywały zmniejszony stopień zmian nekrotycznych w porównaniu do guzów pozyskanych ze zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS. Nekroza w guzach kontrolnych była rozlana, zajmująca duży obszar centrum guza, natomiast w guzach, poddawanych terapii, nekroza

ograniczała się do pojedynczych komórek. Co więcej w guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 nie zaobserwowano pseudopalisad komórkowych. W guzach zwierząt traktowanych BBG zaobserwowano również zwiększoną ilość drożnych naczyń krwionośnych charakteryzujących się dużym światłem (Rycina 4.27).

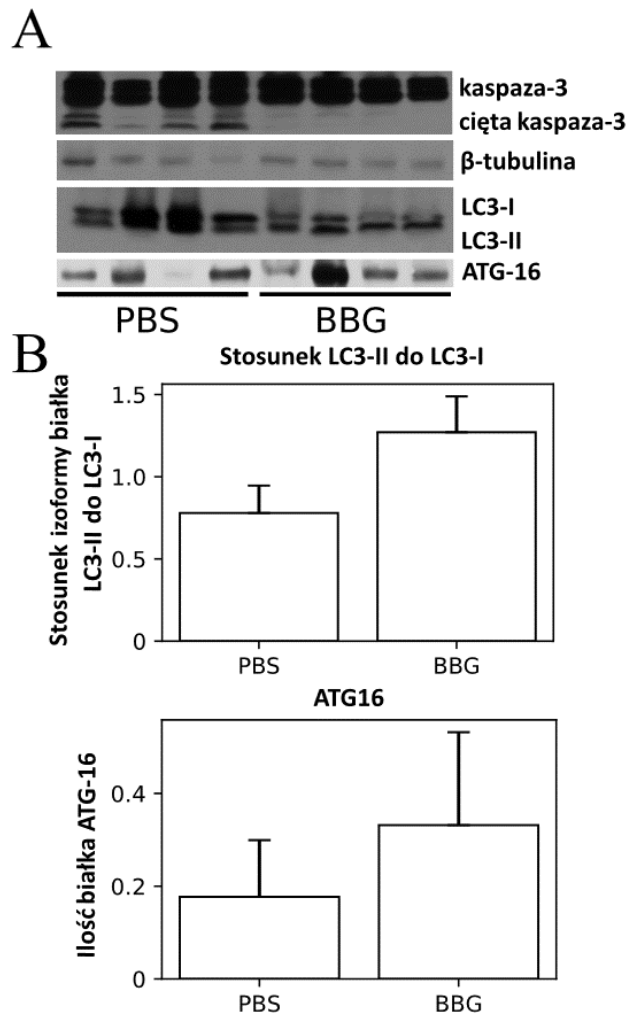


Rycina 4.27. Reprezentatywny obraz guzów po barwieniu histopatologicznym z wykorzystaniem barwienia hematosyliny i eozyna. Guzy kontrolne, traktowane PBS, charakteryzują się rozległą nekrozą w centrum guza oraz dużą ilością pseudopalisad (zaznaczone strzałkami). W guzach, traktowanych inhibitorem P2X7 – BBG, zaobserwano nekrozę pojedynczych komórek oraz brak pseudopalisad komórkowych. Co więcej w guzach traktowanych BBG, można zaobserwować drożne naczynia krwionośne (zaznaczone czerwonymi gwiazdkami).

4.24 Badanie rodzajów śmierci komórkowej w guzach glejaka C6 po inhibicji receptora P2X7

Zmniejszenie masy guzów glejaka C6, traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG, wskazywała na obniżenie tempa podziałów komórkowych wewnątrz guza lub na zwiększoną śmiertelność komórek guza. W celu weryfikacji, czy podanie BBG zwiększa śmiertelność komórek guza zbadano markery apoptotycznej śmierci komórkowej oraz markery śmierci w wyniku procesu autofagii. W celu weryfikacji występowania apoptozy zbadano ilość aktywnej kaspazy 3. W guzach zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS, zaobserwowano wysoką ilość aktywnej kaspazy 3 w porównaniu do guzów zwierząt traktowanych inhibitorem P2X7 – BBG. W guzach tych sygnał pochodzący z aktywnej kaspazy 3 był niewykrywalny. W celu weryfikacji autofagii zbadano dwa markery autofagii LC3-I, LC3-II oraz ATG16. W guzach zwierząt, traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG, zaobserwowano zwiększony stosunek izoformy białka LC3-II do LC3-I, w porównaniu do guzów zwierząt kontrolnych traktowanych PBS. To samo tyczy się drugiego markera autofagii ATG16, w guzach zwierząt traktowanych BBG

zaobserwowano podwyższoną ilość tego białka w porównaniu do guzów traktowanych PBS (Rycina 4.28).

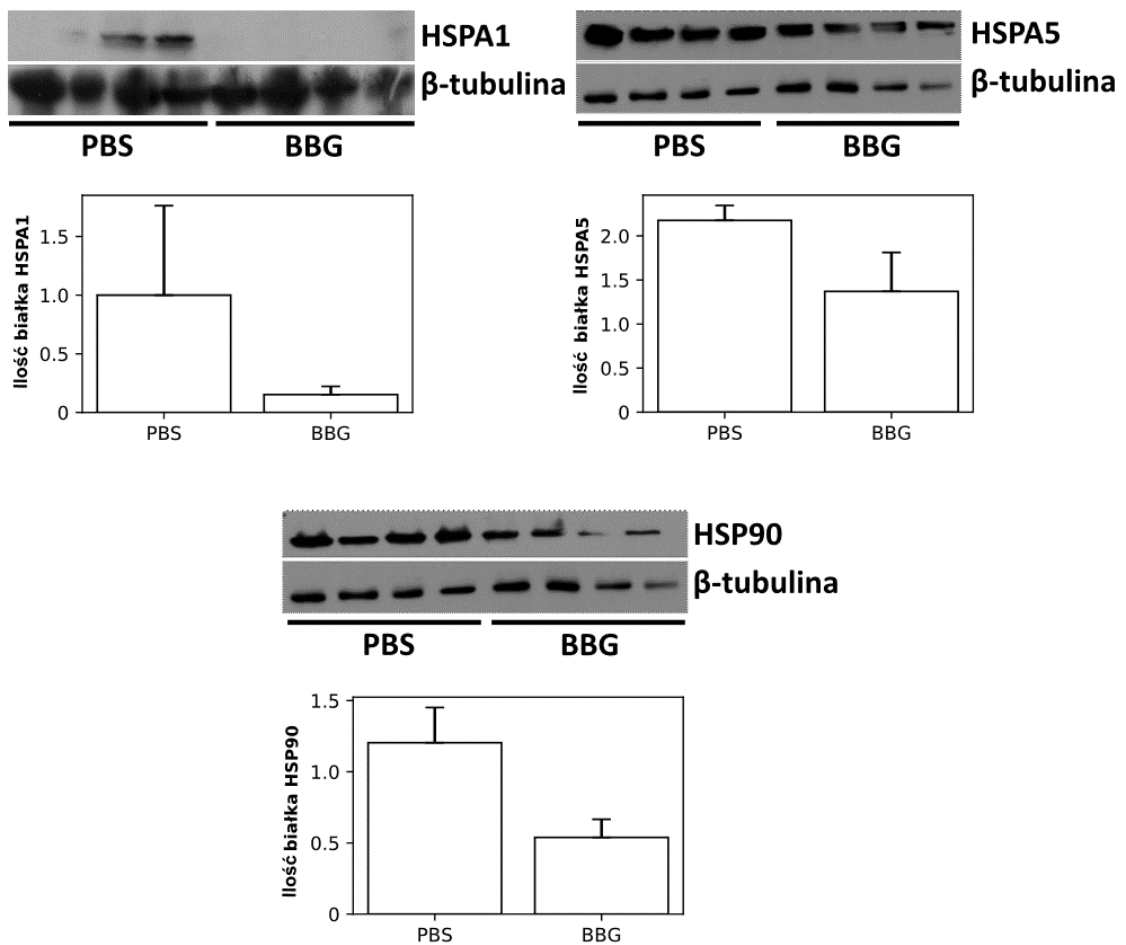


Rycina 4.28. Analiza markerów apoptozy i autofagii metodą Western Blotting. A) Analiza Western Blot markerów apoptozy – ciętej kaspazy 3 oraz autofagii LC3II, LC3I, ATG16. Jako białko referencyjne wykorzystano β -tubulinę. B) Analiza densytograficzna stosunku białka LC3-II do LC3-I oraz białka ATG16, znormalizowanego względem barwienia białek na błonie nitrocelulozowej przez barwnik znakujący białka - ponceau red.

4.25 Analiza ilości białek szoku cieplnego w guzach glejaka C6

W guzach glejaka C6 zbadano, ilość białek szoku cieplnego przy użyciu techniki Western Blotting. Białka szoku cieplnego to jedne z najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie białek występujących w organizmach żywych. Sekwencje aminokwasowe różnią się tylko o kilka procent w porównaniu do białek pochodzących z różnych gatunków. Zadaniem tych białek jest utrzymanie homeostazy i prawidłowe składanie białek uszkodzonych przez czynniki środowiskowe, a w komórkach nowotworowych one wpływać negatywnie na efektywność terapii przeciwnowotworowej. W przedstawionych

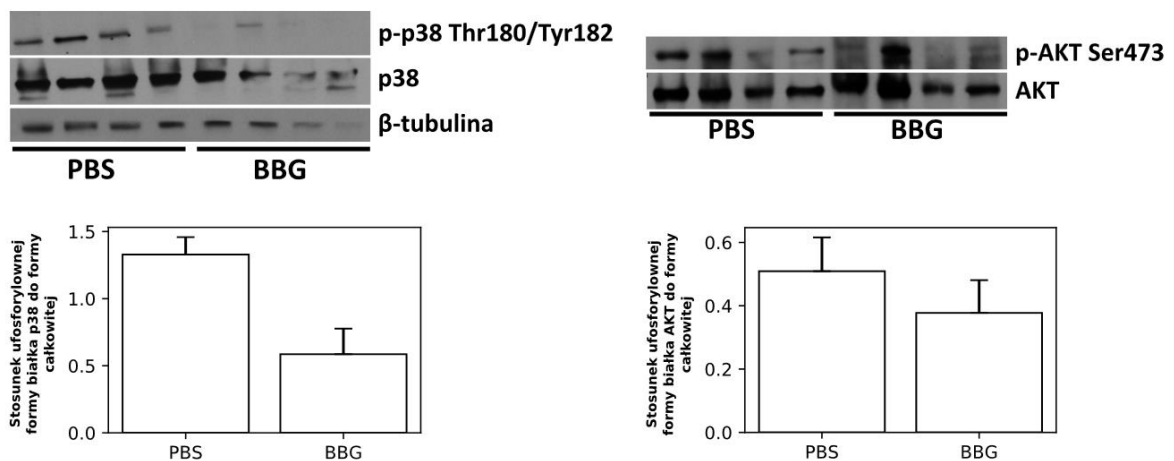
badaniach przeprowadzono detekcję trzech białek szoku cieplnego HSPA1, HSPA5 oraz HSP90. W guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG zaobserwowano obniżenie ilości białka szoku cieplnego HSPA1 w porównaniu do guzów pochodzących ze zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS. Zahamowanie aktywności receptora P2X7 wpływało również na ilość wykrywanego białka HSPA5, BBG obniżał ilość tego białka w porównaniu do guzów kontrolnych. Podobnie z ilością białka HSP90, podawanie zwierzętom inhibitora BBG obniżało ilość tego białka w porównaniu do guzów kontrolnych (Rycina 4.29).



Rycina 4.29. Analiza białek szoku cieplnego w guzach glejaka C6 z wykorzystaniem techniki Western Blott. A) Ilość białka HSPA1 w guzach zwierząt kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Poniżej destylogram przedstawiający ilość białka HSPA1 obliczony względem β -Tubuliny. B) Ilość białka HSPA5 w guzach zwierząt kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 - BBG. Poniżej destylogram przedstawiający ilość białka HSPA5 obliczony względem β -Tubuliny. C) Ilość białka HSP90 w guzach zwierząt kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Poniżej destylogram przedstawiający ilość białka HSP90 obliczony względem β -Tubuliny.

4.26 Wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7 na fosforylację kinaz p38 oraz AKT w guzach glejaka C6

Badania przeprowadzone *in vitro*, z wykorzystaniem linii komórkowych, wykazały, że receptor P2X7 może wpływać na fosforylację, a przez to na aktywność kinaz p-p38 i AKT. Dlatego przeprowadzono analizę Western Blot, aktywności tych kinaz w guzach nowotworowych *in vivo*. W guzach zwierząt traktowanych BBG stosunek ufosforylowanej formy białka p38 do formy całkowitej tego białka był niższy niż w przypadku guzów zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS. W przypadku kinazy AKT, również, zahamowanie aktywności receptora P2X7 obniżało stosunek ufosforylowanego białka AKT w stosunku do formy całkowitej tego białka (Rycina 4.30).

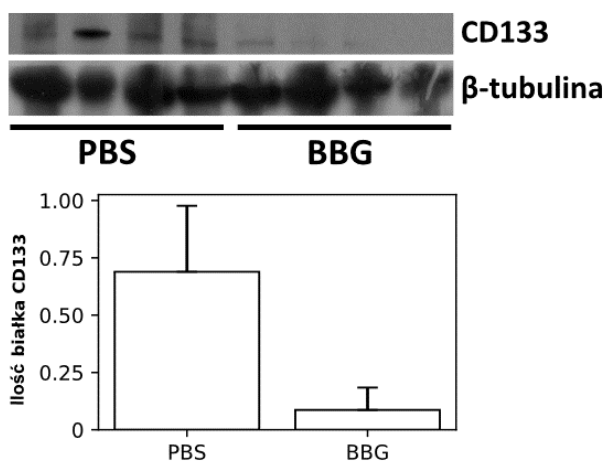


Rycina 4.30. Poziom fosforylacji kinaz p38 i AKT, w guzach kontrolnych traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG z wykorzystaniem techniki Western Blot. A) Ilość całkowitej formy białka p38 oraz ufosforylowanej formy p38 w guzach kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Poniżej destylogram przedstawiający stosunek ufosforylowanej formy p38 do formy całkowitej. B) Ilość całkowitej formy białka AKT oraz ufosforylowanej formy AKT w guzach kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Poniżej destylogram przedstawiający stosunek ufosforylowanej formy AKT do formy całkowitej

4.27 Wpływ receptora P2X7 na ilość wykrywanego markera nowotworowych komórek macierzystych CD133

Białko CD133, zwane inaczej promininą-1, to glikoproteina występująca na powierzchni komórek. Jej funkcja nie jest dokładnie znana, jednak dane w literaturze świadczą o zwiększonej ekspresji tego białka w nowotworowych komórkach macierzystych. Obok nestyny i SOX2 jest jednym z najczęściej wykorzystywanym białkiem do izolacji komórek macierzystych.

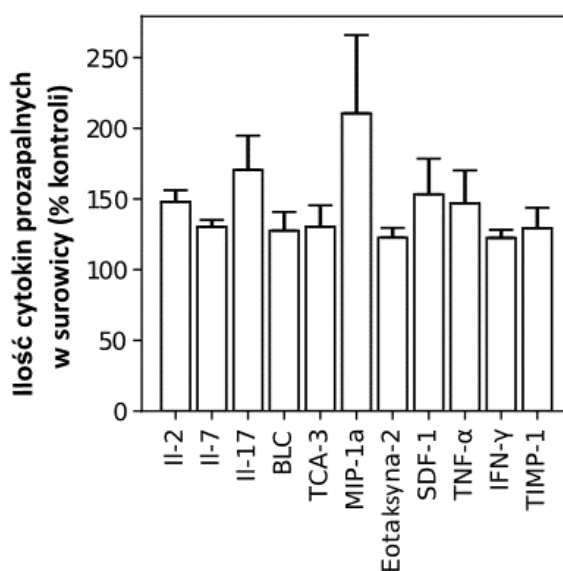
W guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG zaobserwowano obniżenie o 60% ilości białka CD133 w porównaniu do guzów zwierząt kontrolnych traktowanych PBS (Rycina 4.31).



Rycina 4.31. Analiza Western Blot ilości białka CD133 w kontrolnych guzach nowotworowych traktowanych PBS oraz inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Poniżej analiza densytometryczna ilości białka CD133 znormalizowana względem β-tubuliny.

4.28 Wpływ receptora P2X7 na produkcję cytokin prozapalnych w surowicy

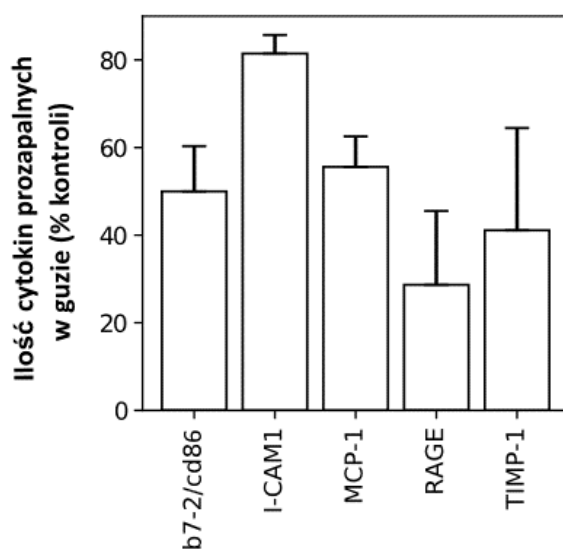
Według niektórych doniesień BBG może wpływać na aktywność stanu zapalnego. Dlatego zbadano ilość cytokin prozapalnych w grupie zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS oraz grupie eksperymentalnej, traktowanej BBG. W surowicy zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG wykryto podwyższoną ilość cytokin prozapalnych. Wykryto zwiększoną produkcję interleukin: Il-2 (o 49%), Il-7 (o 30%) oraz Il-17 (70%) w surowicy zwierząt traktowanych BBG. Zaobserwowano również wzrost ilości białka chemoatrakcji limfocytów B (BLC) o 28% w porównaniu do zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS. Zaobserwowano również wzrost ilości białka TCA-3 (30%) oraz MIP-1 α (110%) w guzach traktowanych BBG. Zahamowanie aktywności receptora P2X7 powodowało również wzrost ilości prozapalnych białek takich jak: Eotaksyny-2 (23%), SDF-1 (53%), TNF- α (47%) oraz IFN- γ (22%). W surowicy zwierząt traktowanych BBG wykryto również podwyższoną ilość inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 o 29% względem zwierząt traktowanych PBS (Rycina 4.32). Wszystkie przedstawione wyniki wykazywały istotność statystyczną.



Rycina 4.32. Analiza ilości cytokin prozapalnych w surowicy zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 - BBG. Na wykresie przedstawiono analizę densytograficzną intensywności sygnału luminescencji badanych białek, znormalizowanych względem zwierząt kontrolnych. Na wykresie przedstawiono tylko istotne statystycznie zmiany poziomu cytokin. Przedstawiony wykres zestawia cztery powtórzenia biologiczne. Na wykresie przedstawiono zmiany, które w teście T-Studenta osiągnęły $p < 0,05$.

4.29 Wpływ receptora P2X7 na produkcję cytokin prozapalnych w guzie nowotworowym

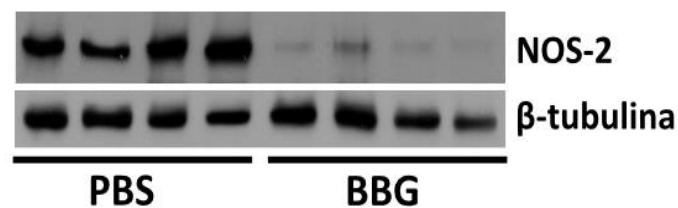
Oprócz surowicy zwierząt traktowanych agonistą receptora P2X7 – BBG zbadano również ilość cytokin prozapalnych w guzach nowotworowych. W guzach z obniżoną aktywnością receptora P2X7 zaobserwowano obniżenie ilości białka b7-2/cd87 o około 51% względem kontroli. Również w guzach traktowanych BBG obserwowano obniżoną ilość I-CAM1 o 19%. Inhibicja aktywności receptora P2X7 również wpływała na ilość cytokin prozapalnych takich jak MCP-1 (obniżenie poziomu o 45%) oraz RAGE (obniżenie o 72%). Wykryto również obniżenie ilość inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 o 59% względem kontroli (Rycina 4.33). Wszystkie przedstawione wyniki wykazywały istotność statystyczną.



Rycina 4.33. Analiza ilości cytokin prozapalnych w guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 - BBG. Na wykresie przedstawiono analizę densytograficzną intensywności sygnału luminescencji badanych białek, znormalizowanych względem zwierząt kontrolnych. Na wykresie przedstawiono tylko istotne statystycznie zmiany ilości cytokin. Przedstawiony wykres zestawia wartości z czterech powtórzeń biologicznych. Na wykresie przedstawiono zmiany, które w teście T-Studenta osiągnęły $p < 0,05$.

4.30 Wpływ P2X7 na ilość indukowalnej syntazy tlenu azotu w guzach nowotworowych

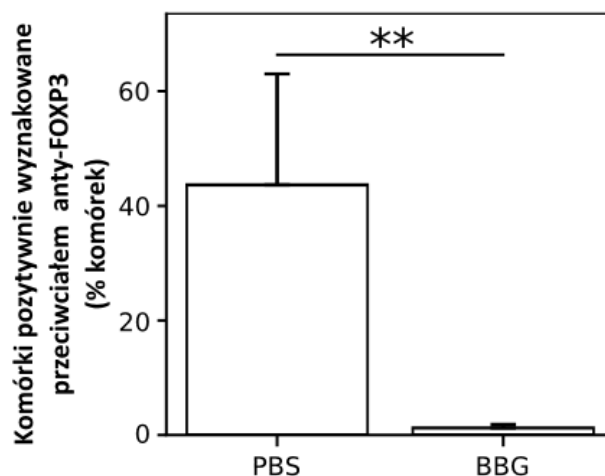
Po otrzymaniu wyników, wskazujących na zaangażowanie receptora P2X7 w regulację odpowiedzi układu immunologicznego w guzach nowotworowych i surowicy, zbadano wpływ tego receptora na ilość indukowalnej syntazy tlenu azotu. Syntaza ta była wykrywalna we wszystkich guzach glejaka C6. Jednak w guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG, ilość tego białka była znacznie obniżona w porównaniu do guzów kontrolnych, traktowanych PBS (Rycina 4.34).



Rycina 4.34 Analiza Western Blot ilości indukowalnej syntazy tlenu azotu w kontrolnych guzach nowotworowych traktowanych PBS oraz traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG.

4.31 Wpływ aktywności receptora P2X7 na frakcję komórek FOXP3 pozytywnych w guzie nowotworowym

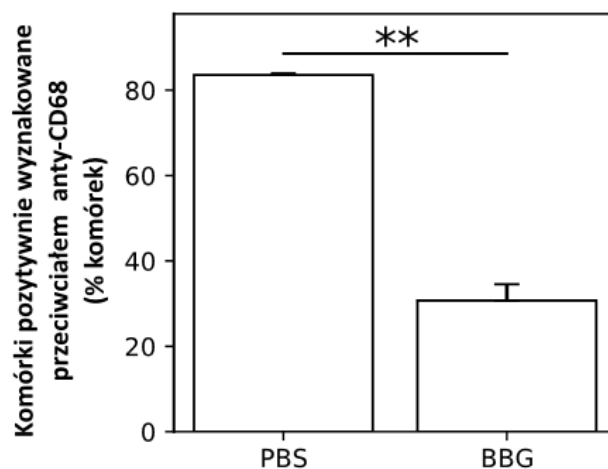
FOXP3 jest czynnikiem transkrypcyjnym występującym w komórkach nowotworowych oraz komórkach układu immunologicznego, którego ekspresja powoduje zahamowanie odpowiedzi układu odpornościowego, poprzez zmniejszenie populacji limfocytów T. Dzieje się tak ponieważ limfocyty T regulatorowe wydzielają cytokiny immunosupresyjne i adenozyne do środowiska zewnątrzkomórkowego oraz posiadają hamujące antygeny powierzchniowe. Jako że guzy glejaka wielopostaciowego charakteryzują się różnego rodzaju defektami odpowiedzi immunologicznej, logicznym wydawało się zbadanie czy aktywność receptora P2X7 może kształtować odpowiedź immunologiczną poprzez zmianę ilości komórek FOXP3 pozytywnych w środowisku guza. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała, że w guzach zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS, odsetek komórek FOXP3 pozytywnych wynosił około 44%. Natomiast w guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG, zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie do 1% komórek FOXP3 pozytywnych (Rycina 4.35).



Rycina 4.35. Wpływ zahamowania receptora aktywności P2X7, na ilość komórek FOXP3 pozytywnych w guzach kontrolnych, traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7 - BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Zmianę uznawano za istotną statystycznie gdy, $p < 0,01$ (**).

4.32 Wpływ inhibicji receptora P2X7 na frakcję komórek CD68 pozytywnych

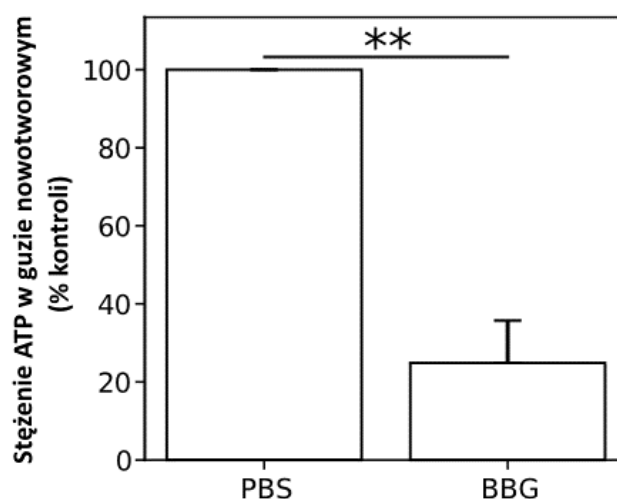
Zbadano również frakcję komórek CD68 pozytywnych w guzach nowotworowych. Marker CD68 lokalizuje się na powierzchni komórek układu odpornościowego – makrofagów przez co po liczbie komórek CD68 pozytywnych możemy określić liczbę makrofagów powiązanych z guzem. We wszystkich guzach wykryto komórki CD68 pozytywnie. W guzach zwierząt kontrolnych traktowanych PBS, wykryto 84% komórek CD68 pozytywnych. W guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG, frakcja wykrytych komórek zmniejszyła się do 31%. Otrzymana różnica, pomiędzy guzami kontrolnymi, a traktowanym BBG była istotna statystycznie na poziomie $p < 0,01$ (Rycina 4.36).



Rycina 4.36. Wpływ zahamowania receptora aktywności receptora P2X7, na frakcję komórek CD68 pozytywnych w guzach kontrolnych, traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7 - BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Zmianę uznawano za istotną statystycznie gdy $p < 0,01$ (**).

4.33 Wpływ obniżenia aktywności receptora P2X7 na zawartość ATP w guzie nowotworowym

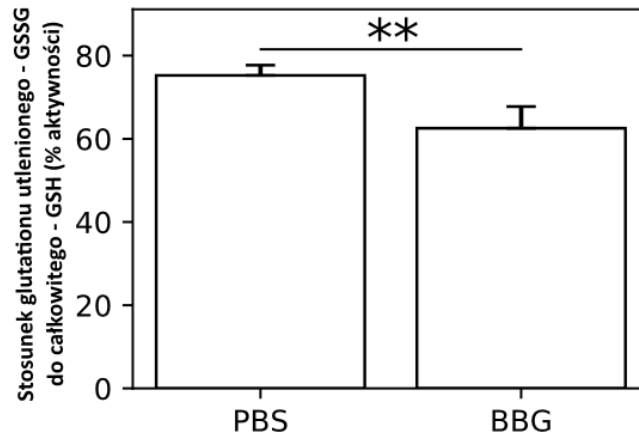
Badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych glejaka C6 wykazały wpływ aktywności receptora P2X7 na ilość ATP, wydzielanego do pożywki hodowlanej. Wynik otrzymany z kultury *in vitro* spowodował chęć sprawdzenia czy receptor P2X7 może stymulować zwiększone wydzielanie ATP w guzie nowotworowym, a przez to pozytywne sprzężenie zwrotne. ATP było wykrywane zarówno w guzach zwierząt kontrolnych traktowanych PBS jak i guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. Jednak stężenie ATP w guzach z zahamowanym receptorem było niższe o 75% w porównaniu do guzów kontrolnych. Otrzymany wynik był istotny statystycznie na poziomie $p < 0,01$ (Rycina 4.37).



Rycina 4.37. Wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7 na stężenie ATP w guzach kontrolnych, traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7 - BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Zmianę uznawano za istotną statystycznie gdy, $p < 0,01$ (**).

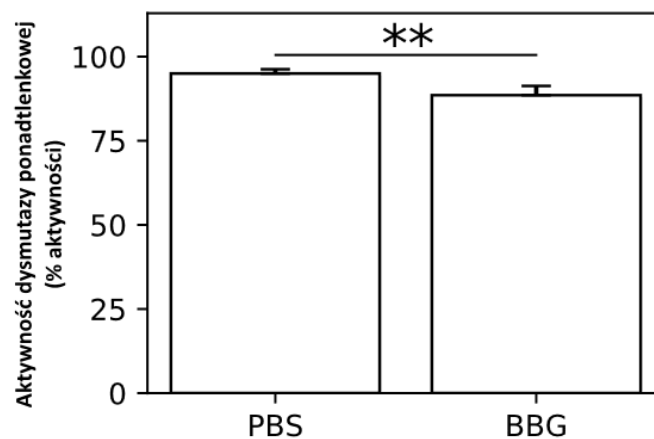
4.34 Wpływ receptora P2X7 na równowagę oksydoredukcyjną w guzie – pomiar utlenionego glutationu oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

W celu zbadania czy receptor P2X7 może wpływać na gospodarkę wolnorodnikową wewnątrz guza przeprowadzono pomiar ilości glutationu całkowitego oraz glutationu utlenionego. Glutation pełni rolę związku redukującego wolne rodniki w komórkach żywych. Przez pomiar stosunku glutationu utlenionego do całkowitego można pośrednio określić intensywność wytwarzania wolnych rodników w tkance. W kontrolnych guzach nowotworowych, zwierząt traktowanych PBS, stosunek glutationu utlenionego do całkowitego wynosił 75%. Guzy zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 wykazywały niższy stosunek glutationów na poziomie 62%. Różnica pomiędzy grupą kontrolną, a traktowaną była istotna statystycznie na poziomie $p < 0,01$ (Rycina 4.38).



Rycina 4.38. Wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7, na stosunek glutationu utlenionego i całkowitego, w guzach kontrolnych, traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7 - BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Za istotną statystycznie zmianę uznawano gdy $p < 0,01$ (**).

Oprócz utleniania glutationu, zbadano również aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w guzach zwierząt kontrolnych oraz traktowanych BBG. Dysmutaza ponadtlenkowa to enzym z grupy oksydoreduktaz, który katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, będącego jednym z ubocznych produktów aktywności mitochondrialnej. W guzach zwierząt kontrolnych aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wynosiła 95% i była wyższa niż w guzach zwierząt traktowanych BBG, w których aktywność wynosiła 88%. Otrzymana, niewielka różnica, była istotna statystycznie na poziomie $p < 0,01$ (Rycina 4.39).



Rycina 4.39. Wpływ zahamowania aktywności receptora P2X7 na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w guzach kontrolnych, traktowanych PBS, oraz guzach traktowanych inhibitorem P2X7 - BBG. Istotność statystyczna została wyliczona z wykorzystaniem testu t-Studenta. Za istotną statystycznie zmianę uznawano gdy $p < 0,01$ (**).

5 DYSKUSJA

Receptor P2X7 jest kationowym kanałem jonowym otwieranym przez zewnątrzkomórkowe ATP. Aktywowany, prowadzi do napływu jonów wapnia do cytoplazmy komórki. Długa stymulacja receptora może prowadzić do otwarcia wielkiego pora w błonie komórkowej i w rezultacie do śmierci komórki. Białko receptora jest rozpowszechnione w wielu typach komórek, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych, jednak jego rola w komórkach zmienionych nowotworowo jest niejednoznaczna. Istnieje szereg doniesień mówiących o pozytywnym wpływie na rozwój nowotworów oraz równie liczne, stawiające tezę przeciwną, o hamowaniu rozwoju nowotworów przez aktywność tego receptora.

5.1 Analiza ekspresji genów kodujących receptory nukleotydowe w komórkach glejaka wielopostaciowego

Ekspresja receptorów nukleotydowych była analizowana przez wielu badaczy w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Jednak najmniej danych o ekspresji receptorów z rodziny P2 pochodziło z komórek glejaka wielopostaciowego. Dlatego w pierwszej kolejności zbadano ekspresję receptorów z rodziny P2X oraz P2Y w ludzkich liniach komórkowych glejaka wielopostaciowego. Przeprowadzone badania wykazały obecność wszystkich transkryptów receptorów z rodziny P2X w ludzkich liniach. Co więcej w badanych liniach zaobserwowano również transkrypty receptorów z rodziny P2Y. Do momentu rozpoczęcia badań, zawartych w tej pracy, informacje na temat ekspresji receptorów nukleotydowych w glejaku wielopostaciowym były fragmentaryczne, zaś w literaturze można było znaleźć głównie informacje o ekspresji tych receptorów w modelach zwierzęcych glejaków (Sabała i wsp., 2001; Krzemiński i wsp., 2007; Wei i wsp., 2008; Tamajusuku i wsp., 2008), a dane z komórek ludzkich ograniczały się tylko do pojedynczych linii takich jak U-251 oraz M059J (Braganhol i wsp., 2015; Gehring i wsp., 2015).

W komórkach ssaków występuje duża liczba receptorów nukleotydowych, odpowiadających na te same ligandy i wywołująca różne odpowiedzi fizjologiczne. Taka sytuacja rodzi problemy w badaniach z wykorzystaniem agonistów i antagonistów. Zewnątrzkomórkowe ATP pobudza wszystkie receptory z rodziny P2X, a bogactwo ektonukleaz na powierzchni błony komórkowej powoduje rozkład tego nukleotydu do ADP i AMP, które mogą pobudzać kolejne receptory. Równie trudne jest wykorzystanie

syntetycznych agonistów i antagonistów receptorów z rodziny P2. Wynika to z niskiej selektywności oraz słabej dostępności handlowej inhibitorów bardziej specyficznych. Do części receptorów z rodziny P2X używano tych samych agonistów w różnych stężeniach (North i Jarvis, 2013). W literaturze możemy również znaleźć doniesienia o interakcjach agonistów receptorów z rodziny P2X, z receptorami z rodziny P2Y (Supłat-Wypych i wsp., 2010).

Podsumowując, ludzkie linie glejaka wielopostaciowego są bogate w receptory z rodziny P2, dlatego planując badania z wykorzystaniem tych linii należy starannie wybierać związki pobudzające i hamujące każdy z badanych receptorów lub przeprowadzić obniżenie ekspresji genu kodującego dany receptor, aby badać efekty pochodzące tylko od tego jednego receptora.

5.2 Ekspresja i funkcjonalność receptora P2X7 w ludzkich liniach glejaka wielopostaciowego

We wszystkich badanych liniach wykryto transkrypty oraz białko receptora P2X7, jednak ich ilość różniła się, w zależności od badanej linii. Najwięcej białka P2X7 wykrywano w komórkach U-87, a najmniej w linii U-251, jednak ilość tego białka była zawsze znacząco niższa niż w modelowej linii glejaka szczura C6. Podobne porównanie poziomu ekspresji można znaleźć w literaturze. Linia mysiego glejaka GL261 charakteryzowała się większą syntezą białka P2X7 niż linia ludzkiego glejaka M059J (Gehring i wsp., 2015). Co więcej analiza danych pochodzących z macierzy, zawarta w pracy Matysiak i wsp., 2021, wykazywała obniżoną ekspresję genów kodujących receptor P2X7 w glejaku IV stopnia, w porównaniu do tkanek normalnych oraz guzów I, II i III stopnia. To znaczące obniżenie ekspresji genu kodującego P2X7, w porównaniu do prawidłowych tkanek lub guzów o niższym stopniu złośliwości można tłumaczyć hipermetylacją genów kodujących receptor P2X7 w ludzkich glejakach IV stopnia (Liu i wsp., 2017). Jediną ludzką linią wyłamującą się z tego schematu jest linia U-87. Jednak badania przeprowadzone przez Allena i jego grupę badawczą, z której pochodzi ta linia, wykazały prawdopodobną pomyłkową, zamianę linii podczas deponowania jej w banku komórkowym. Aby potwierdzić, że w przedstawionych badaniach użyto innej linii komórkowej, przeprowadzono sekwencjonowanie charakterystycznych genów mitochondrialnego DNA według Allen i wsp., 2016 i potwierdzono tę hipotezę. Badania zawarte w pracy Matysiak i wsp., 2020, wykazały, że linia U-87 różni się znacznie od innych linii

glejaków i została wyeliminowana z dalszych badań. To nieznane pochodzenie linii może również tłumaczyć różnicę w ilości wykrywanego białka P2X7, gdyż podwyższona ilość transkryptów receptora P2X7 jest charakterystyczna dla astrocytomy II lub III stopnia na co wskazuje analiza macierzy wykonanej z wykorzystaniem danych od pacjentów (Matyśniak i wsp., 2021).

Po zbadaniu intensywności syntezy receptora P2X7 w wymienionych wyżej liniach glejaka wielopostaciowego przeprowadzono badania mające na celu opisanie funkcjonalność tego receptora. W pierwszej kolejności zbadano wpływ stymulacji syntetycznym agonistą receptora P2X7 – BzATP na pojawienie się sygnału wapniowego w komórkach szczurzego glejaka C6 oraz ludzkich linii U-251 i U-138. Intensywności sygnału wapniowego w badanych liniach były różne, jednak nie można znaleźć systematycznej zależności pomiędzy ilością receptora P2X7, a sygnałem wapniowym wywoływanym przez pobudzenie tego receptora. Najsilniejszą odpowiedź wapniową obserwowano w linii C6, a najsłabszą w linii U-138. Co ciekawe linią o najniższej ilości białka P2X7 była linia U-251, w której obserwowano nierówny sygnał wapniowy. Podobne wyniki uzyskała grupa badawcza Drill'a. W linii U-251 zaobserwowali sygnał wapniowy po stymulacji BzATP. Sygnał ten mógł zostać obniżony przez selektywny inhibitor AZ10606120, co może świadczyć o pochodzeniu tego sygnału ze stymulacji P2X7. Różnice w intensywności sygnału wapniowego, wstępujące pomiędzy liniami U-251 i U-138, mogą świadczyć o wstępowaniu alternatywnych wariantów składania w genach kodujących P2X7. Badania prowadzone równoległe przez inne grupy badawcze, wykazały, że w komórkach linii U-138 występuje tylko jeden wariant składania - P2X7B (Bergamin i wsp., 2019), który może charakteryzować się słabszą aktywnością kanału niż wariant P2X7A. Co więcej w tej samej grupie badawczej przeprowadzono eksperyment polegający na wprowadzeniu do linii U-138 genu kodującego receptor P2X7A co spowodowało przywrócenie sygnału wapniowego w komórkach tej linii. Sygnał wapniowy pojawiający się w linii szczurzego glejaka C6 również był obiektem intensywnej dyskusji pomiędzy grupami badawczymi. Część badaczy postulowała, że sygnał wapniowy po podaniu BzATP pochodzi od receptora P2X7 (Wei i wsp., 2008), natomiast inni postulowali, że obserwowany sygnał pochodzi od stymulacji receptora P2Y2 (Supłat-Wypych i wsp., 2010) lub od innego kanału jonowego nie należącego do rodziny receptorów nukleotydowych (Nörenberg i wsp., 2016). Jednak w żadnej z tych prac nie wykorzystano metod inżynierii genetycznej do obniżenia ilości białka P2X7 i zbadania czy sygnał ten rzeczywiście pochodzi od kanału. Tego typu eksperyment jest

kluczowy w celu określenia funkcjonalności tego receptora i został wykonany podczas tworzenia tej pracy. Dyskusja tych wyników została zawarta w kolejnych rozdziałach. Oprócz aktywności kanałowej w komórkach glejaków, zbadano również tworzenie przez białko receptora P2X7 pora w błonie, umożliwiającego przenikanie dużych cząsteczek barwników, takich jak jodek propidyny. Przeprowadzone badania wykazały zwiększone wnikanie jodku propidyny po stymulacji receptora P2X7 w dwóch liniach komórkowych: glejaku C6 szczura oraz ludzkim glejaku U-251. W linii U-138 nie zaobserwowano żadnej różnicy we wnikaniu barwnika. Zdolność do tworzenia pora w glejaku szczura C6 była ponownie przedmiotem dyskusji pomiędzy grupami badawczymi. Jedna z nich postulowała, że w komórkach glejaka C6 tworzy się por (Wei i wsp., 2008), w drugiej grupie natomiast nie zaobserwowano tworzenia się masywnego pora i zwiększenia ilości przenikania jodku propidyny w tych komórkach (Supłat-Wypych i wsp., 2010). Należy jednak zauważyć, że do weryfikacji wnikania jodku propidyny zastosowano różne metody badawcze. W grupie Wei była to metoda spektrofotometryczna polegająca na liczeniu komórek po stymulacji przez BzATP i pomiarze intensywności fluorescencji uwolnionych barwników, natomiast metoda zastosowana w pracy Supłat-Wypych to zliczanie komórek do których wniknął jodek propidyny. W celu wyeliminowania tych różnic w niniejszej pracy postanowiono przeprowadzić taki sam pomiar wnikania jodku propidyny jak w pracy Wei. Otrzymane wyniki wykazały wnikanie jodku propidyny do komórek glejaka C6, jednak różnice w intensywności fluorescencji były zdecydowanie niższe niż u Wei przy użyciu takich samych stężeń agonista receptora. W pracy Wei wykazano wzrost intensywności fluorescencji o 100% po stymulacji BzATP, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych w niniejszej pracy, gdzie wzrost intensywności fluorescencji wynosił 20%, w porównaniu do kontroli. Otrzymane wyniki wskazują, że bardziej prawdopodobny jest wynik obserwowany w pracy Supłat-Wypych, gdzie pojawienie się komórkowego pora obserwowano tylko w pojedynczych komórkach. Zwiększona intensywność pobierania jodku propidyny została zaobserwowana również w linii U-251. Wynik ten był niższy niż w przydatku komórek szczurzego glejaka C6, lecz wyższy niż w komórkach ludzkiego glejaka U-138. W piśmiennictwie możemy znaleźć informacje o formowaniu pora komórkowego w liniach glejaka U-251 i U-138, jednak zawarte tam wyniki nie umożliwiają porównania pomiędzy tymi liniami (Gehring i wsp., 2012). Zupełny brak pobierania jodku propidyny po stymulacji receptora P2X7 był obserwowany w ludzkiej linii U-138. Wynik ten, tak jak w przypadku sygnału wapniowego, może zostać wyjaśniony wstępowaniem alternatywnych wariantów

składania. W linii U-138, Bergamin, wykryła w tej linii izoformę receptora P2X7B, charakteryzującą się słabszą odpowiedzią wapniową oraz zahamowaniem zdolności do tworzenia pora komórkowego. Wiąże się ona ze skróceniem produkowanego białka o fragment karboksylowy, który w powszechnej opinii odpowiada za tworzenie pora komórkowego (Feng i wsp., 2006; Adinolfi i wsp., 2010). Powoduje to upośledzenie funkcji tworzenia tej struktury (Cheewatrakoolpong i wsp., 2005), co hamuje proapoptotyczny charakter tego receptora. Alternatywny wariant składania P2X7J, który koduje niefunkcjonalny receptor P2X7, może również powodować niewrażliwość komórek na ATP. Co więcej wariant tego receptora może wchodzić w interakcję z innymi wariantami składania receptorów np., P2X7A, powodując powstanie niefunkcjonalnej formy heterooligomeru (Feng i wsp., 2006).

Podsumowując, w dwóch badanych liniach zaobserwowano tworzenie komórkowego pora po stymulacji receptora P2X7, należy jednak zauważyć, że intensywność wnikania jodku propidyny jest znacząco niższa, niż w przypadku innych komórek z aktywnym P2X7 (Suh i wsp., 2001; Supłat-Wypych 2010; Young i wsp., 2012).

5.3 Wpływ aktywacji receptora P2X7 na śmierć komórek glejaków

Po wykryciu zwiększonego pobierania jodku propidyny w komórkach szczurzego glejaka C6 oraz ludzkiego glejaka U-251, przeprowadzono analizę zmian morfologicznych komórek oraz typów występujących śmierci komórkowych. Aktywacja receptora P2X7 nie wpływała na morfologiczne zmiany komórek żadnego z badanych glejaków. Gdyby stymulowane komórki zostały wprowadzone na którąś z dróg śmierci komórkowej powinny pojawić się pęcherzyki świadczące o rozpoczęciu procesu apoptozy (Verhoef i wsp., 2003; Mackenzie i wsp., 2005). Jako że zmiana morfologii nie jest dobrym wyznacznikiem indukcji śmierci komórkowej przeprowadzono dwa kolejne, niezależne testy: wykrywanie dehydrogenazy mleczanowej uwolnionej do pożywki hodowlanej oraz cytometryczny test na apoptozę wykorzystujący przyłączanie znakowanej aneksyny V do komórek apoptotycznych. Przeprowadzone testy nie wykazały żadnych zmian w liczbie żywych komórek. Długotrwała stymulacja receptora P2X7 nie powodowała śmierci komórkowej. W literaturze można znaleźć dane o zwiększonej śmierci komórkowej po stymulacji receptora P2X7 tylko dla mysiej linii glejaka GL261 oraz ludzkiej linii M059J (Tamajusuku i wsp., 2010; Gehring i wsp., 2012). Zdecydowanie większa liczba badań, przeprowadzonych na innych liniach komórkowych nowotworów, wskazuje na brak

występowania śmierci komórkowej po stymulacji receptora P2X7 (Morrone i wsp., 2005; Bergamin i wsp., 2019). Brak objawów śmierci komórkowej po stymulacji receptora P2X7 może być tłumaczony występowaniem alternatywnych wariantów składowania genu kodującego ten receptor co zostało już wspomniane wcześniej, podczas omawiania powstawania pora komórkowego.

5.4 Wpływ aktywacji receptora P2X7 na intensywność podziałów komórek glejaka wielopostaciowego

Jako że w badanych liniach komórkowych nie wykryto żadnego rodzaju śmierci komórkowej, postanowiono zbadać czy aktywacja receptora P2X7 może wpływać na zwiększoną intensywność podziałów w badanych liniach. Istnieje wiele doniesień wskazujących na rolę tego receptora jako czynnika stymulującego podziały komórkowe w niektórych nowotworach (Choi i wsp., 2018; Cicko i wsp., 2019; Park i wsp., 2019). Jednak w komórkach glejaka wielopostaciowego występuje wiele niejasności. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały zwiększoną proliferację tylko w linii szczurzego glejaka C6, natomiast w przypadku ludzkich glejaków, nie zaobserwowano żadnej istotnej statystycznie różnicy w intensywności podziałów po aktywacji receptora P2X7. W ludzkiej linii U-251 zaobserwowano niestatystyczne obniżenie aktywności metabolicznej po podaniu BBG. Podobne wyniki można odnaleźć w dostępnej literaturze. Inhibicja receptora P2X7, powodowała nieistotne statystycznie obniżenie aktywności metabolicznej receptora P2X7, a dopiero zastosowanie inhibitora nowej generacji, AZ10606120, obniżyło intensywność proliferacji komórek w sposób istotny statystycznie (Kan i wsp., 2020). Dane literaturowe wskazują również na podobny schemat odpowiedzi linii U-138: stymulacja nie wpływała na zwiększoną proliferację, jednak podanie inhibitora ludzkiego receptora P2X7 – A740003, obniżało intensywność proliferacji komórek, jednak otrzymany wynik był nieistotny statystycznie. W opozycji do wyników przedstawionych w powyższych źródłach oraz niniejszej pracy, stoją wyniki uzyskane w grupie badawczej Ji. W opublikowanej pracy pokazują znaczący wpływ aktywności receptora P2X7 na proliferację komórek. Co więcej pokazują również, że BBG może skutecznie obniżyć częstotliwość podziałów w linii U-251 (Ji i wsp., 2018). Rozbieżności w przedstawionych wynikach można wytłumaczyć zastosowaniem linii U-251 pochodzącej z innego banku komórkowego.

Zwiększona i istotna statystycznie aktywność metaboliczna w linii szczurzego glejaka C6, spowodowała zwiększone zainteresowanie tym modelem w niniejszej pracy. W pierwszej kolejności potwierdzono zwiększoną intensywność podziałów innym testem niż MTS, który jest testem aktywności metabolicznej i nie zawsze podwyższony sygnał musi oznaczać zwiększoną liczbę komórek (Liu i wsp., 1997). Do potwierdzenia zwiększonej proliferacji wykorzystano barwienie jąder komórkowych sondą Hoechst 33342, a następnie zliczenie intensywności fluorescencji z wykorzystaniem czytnika płytek. Przeprowadzone badanie potwierdziło, że aktywacja receptora P2X7 może powodować intensyfikację podziałów komórkowych. Otrzymane wyniki jasno wskazują, że podanie komórkom glejaka C6 syntetycznego agonisty receptora P2X7 - BzATP, może wpływać na proliferację. Jednakże istnieją doniesienia literaturowe, wskazujące na stymulację innych receptorów przez BzATP, np. P2Y2 (Supłat-Wypych i wsp., 2010). Dlatego aby uzyskać informację czy efekt zintensyfikowania podziałów komórkowych pochodzi od P2X7, przeprowadzono doświadczenia z małym interferującym RNA, skierowanym przeciwko receptorowi P2X7. Obniżenie ilości P2X7 w komórkach glejaka C6 znacząco wpływało na proliferację długoterminową, co sugeruje wpływ receptora P2X7 na intensyfikację podziałów komórkowych. Podsumowując, przedstawione w niniejszej pracy badania oraz dane zawarte w literaturze świadczą o stymulacji proliferacji komórek C6 po aktywacji receptora P2X7.

5.5 Wpływ aktywności receptora P2X7 na przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego po traktowaniu lekami cytostatycznymi

Przeprowadzone badania, które wykazały zwiększoną proliferację komórek glejaka C6, spowodowały zainteresowanie wpływem aktywacji lub zahamowania receptora P2X7 na przeżywalność komórek podczas terapii opartej na lekach cytostatycznych takich jak karmustyna (BCNU) oraz temozolomid, nacelowanymi na intensywnie dzielące się komórki (Friedman i wsp., 2000; Xiao i wsp., 2020). Przeprowadzone badania z wykorzystaniem linii glejaka C6 wykazały stymulujący wpływ BzATP na aktywność metaboliczną komórek po traktowaniu karmustyną. Co więcej zahamowanie receptora P2X7 w komórkach szczurzego glejaka C6, przez inhibitor BBG powodowało obniżoną przeżywalność komórek po traktowaniu przez leki cytostatyczne, takie jak karmustyna oraz temozolomid. Wspólna inkubacja z antagonistą P2X7 oraz cytostatykiem była

efektywniejsza, niż w przypadku zastosowania samego cytostatyku. W literaturze możemy znaleźć dużo doniesień o wyzwaniu do środowiska guza zewnątrzkomórkowego ATP w trakcie terapii przeciwnowotworowej (Martins i wsp., 2009; Kojima i wsp., 2017). Uwolnione do środowiska guza ATP działa jako alarmy, które stymulują aktywność różnych receptorów, w tym receptorów nukleotydowych (Krysko i wsp., 2013). W badaniach z wykorzystaniem linii mysiego glejaka GL261 wykazano pozytywny wpływ aktywności receptora P2X7 na terapię z wykorzystaniem radioterapii. Guzy z obniżoną ilością receptora P2X7 słabiej odpowiadały na radioterapię, natomiast te z normalną ilością tego receptora były leczone w sposób efektywniejszy. Taką samą odpowiedź zaobserwowano w ludzkiej linii glejaka M059J, aktywny receptor P2X7 wpływał na zwiększoną efektywność radioterapii (Gehring i wsp., 2015). Należy jednak zauważyć, że długotrwała stymulacja receptora P2X7 w liniach GL261 oraz M059J, powoduje zwiększoną śmiertelność komórek poprzez otwarcie pora komórkowego. W liniach komórkowych badanych w niniejszej pracy zaobserwowaliśmy tworzenie się pora komórkowego i zwiększony pobór jodku propidyny, jednak nie powodowało to śmierci komórkowej. Dlatego możliwość formowania pora przez receptor P2X7 może być czynnikiem predykcyjnym w odpowiedzi komórek glejaka na radioterapię.

W odniesieniu do wpływu aktywacji receptora P2X7 na skuteczność chemioterapii dane literaturowe są fragmentaryczne, do tej pory porównywano tylko efektywność cytostatyków, takich jak temozolomid i inhibitorów receptora P2X7 (Kan i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przez grupę Kan'a wykazały, że inhibitory receptora P2X7 nowej generacji mogą być skuteczniejsze w hamowaniu podziałów komórek glejaka wielopostaciowego, niż standardowo stosowany w terapii temozolomid. W niniejszej pracy, oprócz badań na linii glejaka szczura C6, przeprowadzono również badania z wykorzystaniem ludzkich linii LN-229, U-251 oraz U-138. Jako inhibitor zastosowano KN-62 o silnym powinowactwie do ludzkiego wariantu P2X7. Przeprowadzone badania wykazały znaczący spadek liczby komórek po traktowaniu kombinacją leku cytostatycznego oraz inhibitora P2X7, w porównaniu do komórek kontrolnych, oraz traktowanych samym cytostatykiem. Co ciekawe linia U-138, która nie uruchamiała sygnału wapniowego po stymulacji receptora P2X7 ani nie wykazywała objawów powstawania pora błonowego, wykazywała tendencję do zwiększania ilości umierających komórek, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie. Może to wskazywać na fakt, że receptor w tych komórkach, jest niefunkcjonalny lub jest go za

mało, aby mieć znaczący wpływ na przeżywalność tych komórek. Jak już wspomniano wcześniej, chemioterapia wpływa na zwiększone wydzielanie ATP do środowiska zewnątrzkomórkowego, co może powodować stymulację receptorów nukleotydowych, w tym receptora P2X7. Co więcej istnieją doniesienia, wskazujące na znaczącą rolę samego receptora P2X7 w wydzielaniu ATP w wyniku jego aktywacji (Suadecani i wsp., 2006; Amoroso i wsp., 2016). Może to powodować powstanie dodatniego sprzężenia zwrotnego, które może aktywować proprzeżyciowe ścieżki sygnałowe w glejakiach, traktowanych cytostatykami. Dlatego zablokowanie receptora P2X7 może korzystnie wpływać na zmniejszoną intensywność podziałów oraz przeżywalność komórek glejaka. W celu weryfikacji tego zagadnienia, zbadano ścieżki sygnałowe, zwiększające przeżywalność komórek glejaka C6. W pierwszej kolejności zbadano ilości białek szoku cieplnego. Stymulacja przez BzATP wywołała znaczący wzrost wykrywanej ilości białka HSPA1 oraz HSPA5. Białka szoku cieplnego to białka opiekuńcze pełniące rolę w zwiększonej przeżywalności komórek w odpowiedzi na stres proteotoksyczny. Doniesienia literaturowe wskazują na znaczącą rolę białek z tej rodziny na zwiększenie złośliwości glejaka wielopostaciowego (Iglesia i wsp., 2019). W komórkach glejaka C6, HSPA1 wpływało na zmniejszenie agregacji białka GAPDH, po stresie oksydacyjnym wywołanym przez chemoterapeutyki (Lazarev i wsp., 2016). Inne badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii szczurzego glejaka wykazały znaczący wpływ białka HSPA1 na oporność tych komórek na działanie doksorubicyny (Lazarev i wsp., 2018). Powyższe dane literaturowe, wskazują, że podwyższenie ilości białka HSPA1 po stymulacji P2X7, może wpływać na efektywność terapii. Również w przypadku białka HSPA5, możemy znaleźć liczne doniesienia o pozytywnej funkcji tego białka w rozwoju nowotworu (Lee i wsp., 2008; Kang i wsp., 2016; Liu i wsp., 2020). Istnieją doniesienia, gdzie wykazana jest korelacja pomiędzy podwyższoną ilością białka HSPA5, a zwiększeniem populacji nowotworowych komórek macierzystych (Peñaranda-Fajardo i wsp., 2019). Co ciekawe po stymulacji receptora P2X7, oprócz podwyższonej ilości wykrywanego białka HSPA5, obserwowano również wzrost poziomu markera nowotworowych komórek macierzystych – CD133. Nowotworowe komórki macierzyste to populacja, komórek nowotworowych charakteryzujących się cechami komórek pluripotencjalnych (Sampetean i wsp., 2013). Istnieje wiele doniesień o korelacji pomiędzy ilością białka CD133, a opornością komórek glejaka na leki cytostatyczne oraz radioterapię (Angelastro i wsp., 2010; Cho i wsp., 2011; Brown i wsp., 2017; Han i wsp., 2017). Może to tłumaczyć obserwowane zwiększenie przeżywalności komórek glejaka

po aktywacji receptora P2X7 oraz analogicznie, obniżenie przeżywalności tych komórek po traktowaniu agonistą receptora P2X7. Oprócz podwyższenia ilości białek opiekuńczych oraz białek związanych z macierzystością komórek, w najbardziej złośliwych formach glejaka wielopostaciowego występuje hiperaktywacja kinaz z rodziny MAPK i AKT. Jedną z intensywniej badanych pod kątem wykorzystania w terapii glejaka wielopostaciowego jest kinaza białkowa B, zwana inaczej kinazą AKT (Mejewska i Szeliga, 2017). Kinaza ta, nadprodukowana w glejaku wielopostaciowym, wpływa na takie parametry komórek jak: podwyższenie liczby podziałów komórkowych, zwiększoną oporność na chemoterapeutyki oraz intensyfikację migracji komórek (Koul i wsp., 2006; Jiang i wsp., 2009; Wei i wsp., 2013). W badanych komórkach szczurzego glejaka C6 stymulacja receptora P2X7 zwiększała poziom fosforylacji kinazy AKT, która jak już wspomniano wcześniej, może być odpowiedzialna za zwiększoną przeżywalność tych komórek po traktowaniu lekami cytostatycznymi. Po stymulacji receptora P2X7, zaobserwowano również zwiększenie fosforylacji kinazy MAPK p38. Białko p38 należy do kinaz MAPK pełniących w komórce rolę sygnalizacyjną. W komórkach prawidłowych fosforylacja tego białka wiąże się z czynnikami stresowymi, takimi jak promieniowanie UV, reaktywne formy tlenu, szok osmotyczny oraz wydzielaniem cytokin prozapalnych. W komórkach prawidłowych aktywacja tej ścieżki sygnałowej powoduje wprowadzenie komórek na drogę apoptozy (Wada i Penninger, 2004). Jednak w komórkach nowotworowych rola tej kinazy zależna jest od pochodzenia linii komórkowej oraz kontekstu molekularnego. W niektórych typach nowotworów hiperaktywacja p38, tak jak w komórkach prawidłowych, prowadzi do apoptozy, jednak w innych komórkach nowotworowych prowadzi do zwiększonej migracji, intensyfikacji podziałów komórkowych oraz pojawienia się oporności na leki cytostatyczne (Koul i wsp., 2013; Martínez-Limón i wsp., 2020). Doniesienia literaturowe wskazują na stymulującą rolę aktywacji białka p38 na przeżywalność i przyrost masy komórkowej glejaka. Obniżenie ilości izoformy gamma tego białka w linii komórkowej ludzkiego glejaka U-251, obniżało częstotliwość podziałów komórkowych oraz zwiększało ilość aktywnej kaspazy 3 i 9. W efekcie czego następowało kierowanie komórki na drogę apoptotycznej śmierci komórkowej (Yang i wsp., 2013).

5.6 Badanie wpływu aktywności receptora P2X7 na przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych w modelu glejaka C6 *in vitro*

Glejak szczura C6 obok linii myszy GL261, jest jedną z najczęściej wykorzystywanych zwierzęcych modeli glejaka wielopostaciowego (Giakoumettis i wsp., 2018).

Wysoka częstotliwość podziałów komórkowych, łatwość tworzenia guzów w modelu zwierzęcym, łatwa hodowla oraz duże podobieństwo do ludzkich linii sprawia że choć wyodrębniono ją już w latach sześćdziesiątych, to wciąż jest atrakcyjnym modelem badawczym glejaka wielopostaciowego (Benda i wsp., 1968).

Nie dziwi więc fakt wykorzystania linii komórkowej glejaka C6 w badaniach nad sygnalizacją purynergiczną. Spowodowane jest to zachodzącą w tej linii ekspresją wielu receptorów nukleotydowych z rodziny P1, P2, jak też ektonukleaz (Jantarantoi i wsp., 2009; Braganhol i wsp., 2009). W wielu pracach wykrywano ekspresję transkryptu oraz białka P2X7, jednak przedmiotem długiej dyskusji była aktywność tego receptora. W celu jej zbadania wykorzystywano różnych agonistów oraz inhibitory tego receptora (Wei i wsp., 2008; Supłat-Wypych i wsp., 2010). Sugerowano, że za sygnał wapniowy obserwowany w badanych komórkach odpowiada inny receptor - P2Y2, który mógłby być pobudzany przez syntetycznego agonistę BzATP (Supłat-Wypych i wsp., 2010), lub wręcz inny kanał błonowy: TRPM7 (Nörenberg i wsp., 2016). Jednak w powyższych pracach, nie stosowano metod inżynierii genetycznej, które w sposób specyficzny obniżają ilość białka P2X7. Wynikało to z niedoskonałości odczynników, które nieefektywnie wprowadzały siRNA lub shRNA do opornych na transfekcję chemiczną komórek linii C6. Dopiero wprowadzenie techniki elektroporacji, pozwoliło na wydajne wprowadzenie konstruktów obniżających ilość receptorów nukleotydowych z rodziny P2Y (Wypych i Pomorski, 2012).

W niniejszej pracy wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw siRNA oraz odczynniki do transfekcji chemicznej nowej generacji, jednak otrzymane wyniki efektywności transfekcji komórek były podobne do wyników uzyskanych w pracy Wypych i Pomorski, 2012. Największy spadek ilości białka receptora P2X7 obserwowano w długim okresie po podaniu mieszaniny transfekcyjnej, po 72 godzinach.

Potwierdziwszy obniżenie ilości receptora P2X7, badano wpływ tego obniżenia na intensywność sygnału wapniowego. Obniżenie intensywności sygnału wapniowego było proporcjonalne do obniżenia ilości receptora P2X7, co sugeruje o zaangażowaniu tego receptora w tworzeniu sygnału wapniowego w komórce, tak jak to postulował Wei.

Dodatkowym wynikiem, który może potwierdzać, że P2X7 w szczurzym glejaku C6 jest zaangażowany w sygnalizację wapniową, jest zwiększone wytwarzanie wolnych rodników tlenowych w komórce. Aktywacja tego receptora przez specyficznego agonistę, powoduje zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, a efekt ten zostaje zmniejszony zarówno poprzez zastosowanie inhibitora jak i obniżenie ilości białka receptora w komórce za pomocą specyficznego siRNA. Jony wapnia napływające wraz z gradientem stężeń do cytoplazmy żywej komórki, stymulują fosforylację oksydacyjną w mitochondriach, a przez to generują zwiększoną produkcję wolnych rodników tlenowych (Duchen, 2000; Glancy i wsp., 2013). Podwyższona produkcja reaktywnych form tlenu może również wpływać na zwiększoną agresywność komórek nowotworowych (Liou i Storz, 2010). Stały stres oksydacyjny nie prowadzi do śmierci komórki nowotworowej, wręcz przeciwnie powoduje aktywację ścieżek sygnałowych, między innymi, kinazy AKT czy p38 (Kennedy i wsp., 2007; Sato i wsp., 2014). Stymulują one podziały komórek, migrację oraz mechanizmy naprawcze białek i DNA, w efekcie czego zmniejszają efektywność leczenia (Ikwegbue i wsp., 2018; Olivier i wsp., 2021). Komórki poddane stałemu endogennemu stresowi oksydacyjnemu charakteryzują się zwiększoną produkcją enzymów i substancji neutralizujących toksyny takich jak glutation oraz peroksydaza glutaminianowa, które w znaczący sposób obniżają efektywność temozolomidu w leczeniu glejaka wielopostaciowego (Polewski i wsp., 2016). Stres oksydacyjny może również wpływać na modulację układu immunologicznego poprzez zwiększone wytwarzanie cytokin (Mittal i wsp., 2014). Oprócz zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych, po stymulacji receptora P2X7 zaobserwowano również depolaryzację błony mitochondrialnej.

Innym, zaobserwowanym skutkiem aktywności receptora P2X7 jest wpływ tego receptora na adhezję komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej. Aktywacja tego receptora przez syntetycznego agonistę – BzATP, wpływała na zwiększoną liczbę komórek, które przyklejały się do podłoża pokrytego kolagenem pierwszym, czwartym oraz fibronektyną. Zahamowanie aktywności tego receptora poprzez zastosowanie siRNA, obniżało adhezję do kolagenu I oraz IV. Kolagen I i IV, oraz fibronektyna są ligandami specyficznych białek powierzchniowych takich jak integryny (Humphries i wsp., 2006; Horton i wsp., 2016). Integryny to białka-receptory, oddziaływujące z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, zapewniające prawidłowy kontakt komórek z podłożem oraz z innymi komórkami. Integryny również są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów i pobudzanie ścieżek sygnałowych wewnątrz komórki.

Aktywowane integryny mogą prowadzić do zwiększonej adhezji komórkowej, przyspieszonej migracji komórkowej oraz zwiększonej proliferacji, czyniąc komórki glejaka bardziej złośliwymi (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2020). W literaturze istnieją doniesienia o interakcji integryn z receptorami nukleotydowymi oraz wpływie tych interakcji na sygnał przekazywany do komórki (Erb i wsp., 2001; Bagchi i wsp., 2005; Tsuda i wsp., 2008), w tym również z receptorem P2X7 (Henríquez i wsp., 2011; Alvarez i wsp., 2016; Brenet i wsp., 2021).

Podsumowując, w modelu komórkowym *in vitro* aktywacja receptora P2X7 wpływa na zwiększoną przeżywalność komórek glejaka C6 oraz glejaków ludzkich U-251 oraz LN-229. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzone na modelowej linii glejaka szczura C6 wykazały, że za zwiększoną złośliwość mogą odpowiadać cytoprotekcyjne ścieżki sygnałowe, aktywowane przez sygnał wapniowy po stymulacji tego receptora.

5.7 Wpływ aktywności receptora P2X7 na rozwój i złośliwość glejaka C6 *in vivo*

W celu zbadania czy receptor P2X7 może mieć wpływ na złośliwość glejaka C6 *in vivo*, zbadano aktywność ścieżek sygnałowych, które wykryto w modelu komórkowym. W literaturze można znaleźć wiele nieścisłości związanych z wpływem aktywności receptora P2X7 na rozwój guza glejaka szczura C6. Istnieją prace, wskazujące na przeciwnowotworowe działanie inhibitorów P2X7 (Wei i wsp., 2008; Fang i wsp., 2011), oraz wręcz przeciwnie, na wspierający rozwój nowotworu wpływ zahamowania receptora P2X7 (Fang i wsp., 2013). Rozbieżność tych prac stawiała pod znakiem zapytania nie tylko sam fakt czy receptor P2X7 w komórkach glejaka C6 jest aktywny, ale również jaka jest rola tego receptora w progresji choroby. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach, podanie zwierzętom BBG w okolicy miejsca wszczepienia komórek glejaka C6 wpływało na znaczące zmniejszenie powstających guzów nowotworowych. Wyniki te stoją w kontrze do pracy Fanga, jednak rozbieżności można wytłumaczyć innym schematem podawania agonisty receptora P2X7. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy, najpierw pozwolono guzowi nowotworowemu wzrosnąć do rozmiarów $\sim 200 \text{ mm}^3$, a dopiero po tym rozpoczęto terapię z zastosowaniem inhibitora. We wszystkich wcześniejszych pracach wykorzystujących linię C6 w badaniach *in vivo* (Wei i wsp., 2008; Fang i wsp., 2011; Fang i wsp., 2013), pierwszą dawkę inhibitora receptora P2X7 podawano wraz ze szczepionymi komórkami nowotworowymi. Podany w ten

sposób inhibitor mógł zaburzyć prawidłowe działanie układu immunologicznego w mikrogleju i spowodować zwiększony wzrost guza nowotworowego. W doświadczeniach, przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy z delecją genu kodującego receptor P2X7, wykazano, że receptor ten wpływa na wielkość zaszczepionych guzów nowotworowych. Guzy, rozwijające się u zwierząt z delecją tego genu, były większe niż u zwierząt typu dzikiego (De Marchi i wsp., 2019). Było to spowodowane upośledzeniem prawidłowego działania układu immunologicznego. Mikrośrodowisko guza bogate było w immunosupresyjne limfocyty T regulatorowe oraz transformujący czynnik wzrostu beta (TGF β). Powodowało to silne zahamowanie działania układu immunologicznego i zwiększony wzrost zaszczepionych guzów nowotworowych.

W otrzymanych guzach nowotworowych zbadano również wpływ inhibicji receptora P2X7 na ilość tego białka oraz jego lokalizację. W guzach traktowanych BBG, ilość wykrywanego białka była niższa niż w przypadku guzów kontrolnych. W literaturze można znaleźć wiele doniesień o wpływie podawania inhibitorów receptora P2X7 na ekspresję samego receptora, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest poznany (Wang i wsp., 2015; Pereira i wsp., 2020).

W celu zbadania wpływu receptora P2X7 na agresywność guzów glejaka C6 zbadano aktywność metaloproteinazy drugiej. Metaloproteinazy to enzymy pełniące ważne role w ontogenezie oraz utrzymaniu homeostazy w organizmie, zwłaszcza w funkcjonowaniu układu odpornościowego (Armstrong i Jude, 2002; Ethell i Ethell, 2007). Oprócz tych ważnych funkcji w komórkach prawidłowych, metaloproteinazy, w tym MMP-2, pełnią rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych, poprzez intensyfikację angiogenezy oraz wspieranie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (Xu i wsp., 2005; Gilles i wsp., 2013; Song i wsp., 2021). W przeprowadzonych badaniach wykazano obniżoną ilość aktywnej formy MMP-2 w guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG. W glejaku wysoka aktywność metaloproteinaz jest proponowana jako jeden z markerów predykcyjnych, wskazujących na bardziej agresywny charakter nowotworu (Roomi i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2019). Dlatego obniżenie aktywności tego enzymu może pozytywnie wpływać na zmniejszenie liczby przerzutów. Oprócz aktywności metaloproteinazy 2 badano również poziom markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Przejście to jest procesem występującym w organizmie podczas rozwoju zarodkowego, gdy powstaje trzeci listek zarodkowy, mezoderma oraz podczas procesów naprawczych w tkankach (Iwadate, 2016). Jednak w przypadku zmian nowotworowych, zwiększona ekspresja markerów przejścia epitelialno-

mezenchymalnego w komórkach guza sprzyja tworzeniu się większej liczby przerzutów oraz bardziej agresywnego fenotypu komórek nowotworowych (Georgakopoulos-Soares i wsp., 2020). W guzach zwierząt traktowanych antagonistą receptora P2X7 zaobserwowano obniżoną ilość wykrywanej wimentyny oraz N-kadheryny. Co więcej po zahamowaniu aktywności receptora P2X7 w guzie, obniżała się również ilość wykrywanej β -kateniny, która jest ważnym składnikiem kompleksu połączenia typu komórka – komórka z E-kadheryną (Tian i wsp., 2011). E-kadheryna w kompleksie z β -kateniną pełni rolę supresora przerzutów nowotworowych oraz inhibitora ścieżki sygnałowej Wnt. Obniżona ilość E-kadheryny wpływa na zwiększenie ilości niezwiązanej β -kateniny w cytoplazmie, a przez to na zwiększoną aktywność ścieżki Wnt, która stymuluje produkcję N-kadheryny oraz uruchamia mechanizmy przeżyciowe dla nowotworu (Loh i wsp., 2019). Aby wyniki, zawarte w niniejszej pracy były pełne, należało zatem zbadać ilość E-kadheryny w guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7, niestety w trakcie prowadzenia badań nie udało się wykryć obecności E-kadheryny żadnym z dostępnych komercyjnie przeciwciał specyficznych dla szczerzego białka. W literaturze można znaleźć doniesienia wskazujące na możliwą rolę receptora P2X7 w regulacji przejścia epitelialno-mezenchymalnego w nowotworowych komórkach macierzystych glejaka (Ziberi i wsp., 2020). Oprócz markerów EMT, zbadano również ilość białka połączeń ścisłych – koneksynę-43, której ilość wzrastała po inhibicji receptora P2X7. Istnieją doniesienia literaturowe o powiązaniu między macierzystym fenotypem komórek nowotworowych, a ekspresją koneksyny-43. W nowotworowych komórkach macierzystych ilość koneksyny-43 jest niższa niż w „zwykłych” komórkach nowotworowych, co więcej, białko to jest zaangażowane w regulację ilości E-kadheryny (Yu i wsp., 2012).

Przeprowadzono również analizę histopatologiczną guzów nowotworowych powstałych z komórek glejaka C6. W guzach zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7 zaobserwowano obniżoną liczbę pól nekrotycznych w porównaniu do guzów pochodzących ze zwierząt traktowanych PBS. Nekroza komórek guza jest charakterystyczna dla wielu typów nowotworowych (Liu i Jiao, 2020), jednak to cechą komórek glejaka wielopostaciowego jest występowanie tzw., pseudopalisad komórkowych otaczających ogniska nekrotyczne guza. Komórki tworzące tą strukturę charakteryzują się intensywną migracją oraz podziałami (Rong i wsp., 2006). Fenotyp tych komórek jest spowodowany silną aktywacją czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją – HIF-1 α oraz nadprodukcją aktywnej formy metaloproteinazy-

2 (Rong i wsp., 2006). W przeciwieństwie do guzów kontrolnych w guzach po podaniu zwierzętom BBG nie zaobserwowano nekrotycznych pól otoczonych pseudopalisadami komórek.

Oprócz oceny histopatologicznej zbadano również mechanizmy śmierci komórkowej w guzach. Przeprowadzono analizę aktywnej kaspazy trzeciej oraz dwóch markerów autofagii LC3 oraz ATG16. W guzach pochodzących ze zwierząt, traktowanych BBG, zaobserwowano obniżony poziom ciętej kaspazy 3 co może świadczyć o obniżonym poziomie apototycznej śmierci komórkowej. W literaturze można znaleźć doniesienia mówiące o populacji komórek ze stale aktywną kaspazą 3 w glejaku wielopostaciowym. Komórki te nie giną na drodze apototycznej śmierci komórkowej (Gdynia i wsp., 2007). Co więcej, populacje tych komórek zlokalizowane były w nekrotycznych rejonach guza co może świadczyć o wzmaganiu nekrozy w guzie glejaka przez komórki z aktywną kaspazą 3. W tej samej pracy, badania z wykorzystaniem linii komórkowych *in vitro*, wykazały obniżoną migrację komórek glejaka wielopostaciowego po obniżeniu endogennej ilości kaspazy 3 (Gdynia i wsp., 2007). Niska efektywność apoptozy w komórkach z aktywną kaspazą 3 może być również powiązana z silnym upośledzeniem ścieżki apototycznej w tych komórkach. Większość glejaków charakteryzuje się zmutowanym genem TP53 oraz nadprodukcją inhibitorów apoptozy takich jak XIAP oraz BCL-2 (Valdés-Rives i wsp., 2017). Z powodu powyższych, niekorzystnych z punktu widzenia terapii zmian w komórkach glejaka, rozważa się wykorzystanie autofagii w terapii tych guzów (Zhuang i wsp., 2009; Zhuang i wsp., 2011; Escamilla-Ramírez i wsp., 2020). Śmierć na skutek rozległej autofagii jest kolejnym rodzajem śmierci komórkowej, występującej w komórkach glejaka wielopostaciowego po nekrozie i apoptozie. Tak jak w przypadku pozostałych rodzajów śmierci komórkowej, może ona hamować lub wspierać rozwój nowotworu w zależności od kontekstu komórkowego. W trakcie terapii z zastosowaniem temozolomidu, obserwowano korzystną odpowiedź terapeutyczną dla inhibitorów autofagii oraz dla związków indukujących autofagię (Yan i wsp., 2016). W guzach glejaka C6 traktowanych inhibitorem receptora P2X7 wykryto zwiększony poziom markerów autofagii ATG16 oraz LC-3II co może świadczyć o zwiększonej intensywności procesu autofagii nad innymi procesami śmierci komórkowej. W literaturze znajdują się doniesienia wskazujące na rolę receptora P2X7 w regulacji procesu autofagii. Długotrwała stymulacja receptora P2X7 w mikrogleju myszy SOD1-G93A obniżała intensywność procesu autofagii w tych komórkach (Fabbrizio i wsp., 2017). Podobne wyniki uzyskano z wykorzystaniem mysich astrocytów. Zahamowanie

aktywności receptora P2X7 sprzyjało aktywacji białka szoku cieplnego HSPB1, które podwyższało intensywność procesu autofagii w tych komórkach (Kim i wsp., 2018). Mechanizm zahamowania autofagii przez nadmierną aktywację P2X7 mógł występować w badanych guzach glejaka C6. W guzach cechujących się intensywną nekrozą, takich jak np. glejak wielopostaciowy, stężenie zewnątrzkomórkowego ATP jest wysokie, co może powodować silną aktywację receptorów nukleotydowych, w tym receptora P2X7 (Iyer i wsp., 2009; Martins i wsp., 2009). Co więcej pomiar całkowitego stężenia ATP w guzach wydaje się potwierdzać tę teorię. W guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG stężenie ATP było niższe niż w przypadku guzów kontrolnych, traktowanych PBS.

5.8 Wpływ receptora P2X7 na ścieżki sygnałowe zwiększające przeżywalność komórek w guzach glejaka C6

Po zbadaniu ścieżek sygnałowych wpływających na przeżywalność *in vitro* komórek glejaka C6, przeprowadzono analizę tych samych białek w warunkach *in vivo*. W pierwszej kolejności zbadano ilości białek szoku cieplnego HSPA1, HSPA5 oraz HSP90. W przypadku wszystkich badanych białek, zahamowanie aktywności receptora P2X7 przez BBG, powodowało obniżenie wykrywanej ilości tych białek. W literaturze istnieją doniesienia o białku HSPA1, wchodzącym w kompleks z receptorem P2X7 i pośredniczącym w transdukcji sygnału (Kim i wsp., 2001). Te same doniesienia wskazują również na białko HSP90 jako partnera molekularnego białka P2X7 (Kim i wsp., 2001). Białko HSP90 jest również przedstawiane jako negatywny marker prognostyczny odpowiedzi komórek glejaka na radioterapię (Orth i wsp., 2021). Zastosowanie inhibitorów HSP90 spowalniało wzrost guzów glejaka *in vivo* (Sauvageot i wsp., 2009; Chen i wsp., 2020). Co więcej dane literaturowe pokazują, że zastosowanie inhibitorów HSP90 obniżało ruchliwość komórek ludzkich linii glejaków DK-MG oraz SNB19 (Mommel i wsp., 2017). Białko HSP90 może również wpływać pozytywnie na nadprodukcję innych białek cytoprotekcyjnych i antyapoptotycznych takich jak EGFR oraz kinaz AKT i ERK (van Ommeren i wsp., 2016; Orth i wsp., 2021). Tak jak wspomiano we wcześniejszych rozdziałach, białka HSPA1 oraz HSPA5 pełnią rolę ważną rolę w odpowiedzi na stres komórkowy. Badania ilości białka HSPA1 w sferoidach pochodzących z radioopornych linii glejaka wielopostaciowego wykazały zwiększoną produkcję tego białka zaraz po napromienieniu (Fredrigo i wsp., 2011). W

przypadku białka HSPA5, zahamowanie aktywności tego białka za pomocą specyficznych przeciwciał, zwiększało efektywność radioterapii. Guzy zwierząt traktowanych przeciwciałami i radioterapią były mniejsze, oraz charakteryzowały się zmniejszoną fosforylacją cytoprotekcyjnej kinazy AKT (Dadey i wsp., 2017).

Tak jak w przypadku badań *in vitro*, w guzach glejaka C6, zaobserwowano obniżenie poziomu ufosforylowanej kinazy AKT oraz p38. Jak wspomniano we wcześniejszych rozdziałach nadmierna aktywność kinazy AKT jest charakterystyczna dla komórek glejaka wielopostaciowego (McDowell i wsp., 2011; Majewska i Szeliga, 2017). Badania *in vivo* z wykorzystaniem indukowanych mysich guzów glejaka wykazały zwiększoną fosforylację AKT we wszystkich stadiach rozwoju guza. Co więcej, inhibicja tej kinazy hamowała rozwój guza nowotworowego (Robinson i wsp., 2011). Inne doniesienia wskazują na powiązanie pomiędzy aktywnością kinazy AKT, a populacją komórek macierzystych w guzie. Zastosowanie inhibitorów AKT obniżało ekspresję markerów nowotworowych komórek macierzystych oraz hamowało tempo podziałów tych komórek (Gallia i wsp., 2009). W literaturze możemy znaleźć doniesienia o regulacji aktywności kinazy AKT przez receptor P2X7 w astrocytach szczura. Stymulacja receptora P2X7, przez BzATP lub ATP w tych komórkach, zwiększała fosforylację kinazy AKT (Jacques-Silva i wsp., 2004). Podobny mechanizm obserwowano w komórkach neuroblastomy. Aktywacja P2X7 stymulowała kinazę AKT, zwiększając przeżywalność tego nowotworu (Gómez-Villafuertes i wsp., 2015). Oprócz kinazy AKT, zbadano poziom fosforylacji kinazy p38 w guzach nowotworowych. Badania przedstawione w niniejszej pracy, wykazały, że podanie inhibitora receptora P2X7 obniżało poziom ufosforylowanego p38 w guzach. W literaturze możemy znaleźć informacje o wpływie tej kinazy na rozwój glejaka wielopostaciowego *in vivo*. Zahamowanie aktywności kinazy p38, przez specyficzny inhibitor SB203580, zmniejszało objętość guza oraz zasięg nacieków nowotworowych w mózgu myszy. Co więcej, inhibicja p38 obniżała frakcję macierzystych komórek nowotworowych występujących w guzie mózgu (Soeda i wsp., 2017). Należy zauważyć, że badania przeprowadzone w niniejszej pracy, również wykazują obniżenie markera nowotworowych komórek macierzystych – CD133 wraz z obniżeniem aktywności kinaz AKT oraz p38, spowodowanym hamowaniem receptora P2X7.

5.9 Wpływ aktywności receptora P2X7 na mikrośrodowisko guza

Na podstawie doniesień o immunosupresyjnym wpływie zahamowania aktywności receptora P2X7 w tkankach prawidłowych (Geraghty i wsp., 2017; Geraghty i wsp., 2019), postanowiono zbadać czy kilkukrotne podanie inhibitora P2X7 nie obniży ilości cytokin w mysiej surowicy. U myszy, którym podawano BBG, nie zaobserwowano żadnego znaczącego spadku ilości cytokin w surowicy w porównania do myszy kontrolnych, którym podawano PBS. Co więcej, zaobserwowano wzrost ilości cytokin prozapalnych, świadczących o mobilizacji układu immunologicznego. Interleukina druga i siódma pełni rolę przeciwnowotworową, poprzez stymulację limfocytów T cytotoksycznych (Liao i wsp., 2011; Lin i wsp., 2017). W surowicy myszy, traktowanych inhibitorem receptora P2X7, zaobserwowano również wzrost ilości interferonu gamma, czynnika martwicy nowotworów oraz interleukiny 17. W literaturze można znaleźć informację o prognostycznym charakterze tych trzech cytokin występujących w surowicy pacjentów chorujących na glejaka wielopostaciowego. Wpływają one na wydłużenie czasu życia i zwolnioną progresję choroby (Zhenjiang i wsp., 2018). Wpływ na zwiększoną przeżywalność pacjentów miał również poziom inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 w surowicy. Pacjenci, u których po operacji usunięcia guza glejaka wielopostaciowego wykrywano wysoki poziom tego białka, przeżywali dłużej (Yi i wsp., 2013). W surowicy zwierząt traktowanych inhibitorem receptora P2X7, zaobserwowano podwyższoną ilość tego białka w porównaniu do zwierząt kontrolnych, traktowanych PBS. W surowicy zwierząt traktowanych BBG zaobserwowano również wzrost stężenia chemokiny - chemoatraktanta limfocytów B (BLC), która może pełnić zarówno rolę stymulatora jak i inhibitora rozwoju nowotworów. Inhibicja rozwoju guzów nowotworowych przez tą chemokinę jest związana z pobudzeniem limfocytów B i zwiększoną infiltracją guza przez te komórki (Rubio i wsp., 2020). Zbadano również profil chemokin i cytokin w guzach nowotworowych. W przeciwieństwie do ilości cytokin w surowicy, w guzach traktowanych BBG zaobserwowano obniżenie ilości CD86, I-CAM1, MCP-1, RAGE oraz TIMP-1. CD86, inaczej zwane B7-2, pełni rolę czynnika aktywującego limfocyty T poprzez współaktywację z MHC klasy II (Subauste i wsp., 1998). Jednak białko CD86 może również wchodzić w kompleks z białkiem CTLA-4, które powoduje zahamowanie aktywacji limfocytów T i wygaszenie działania układu immunologicznego. Co ciekawe CTLA-4 jest silnie nadprodukowane w komórkach glejaka i ilość tego białka wpływa negatywnie na przeżywalność pacjentów (Liu i wsp.,

2020). Doniesienia literaturowe wskazują również na I-CAM1, jako czynnik prognostyczny osłabiający efektywność terapii z wykorzystaniem bevacizumabu w modelu glejaka myszy (Piao i wsp., 2017). Wpływ na ilość tworzenia nowych naczyń w guzie ma również białko RAGE. W modelu glejaka myszy GL261 wysoka ilość tego białka w mikrogleju wpływała na zwiększoną waskularyzację guzów (Chen i wsp., 2014). Jako czynnik zwiększający agresywność glejaka, poprzez zwiększenie infiltracji przez mikroglej, przedstawiane jest również białko MCP-1 (Platten i wsp., 2003; Jung i wsp., 2018). Istnieje doniesienie, które wskazuje na rolę receptora P2X7 w regulacji wydzielania tego białka (Fang i wsp., 2011). Ciekawa jest rola inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 w glejaku. Pomimo, że TIMP-1 hamuje aktywność metaloproteinaz, to wysoki poziom tego białka koreluje ze zmniejszoną przeżywalnością u pacjentów chorych na glejaka (Aaberg-Jessen i wsp., 2009), jednak dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany.

W ramach badań ścieżek sygnałowych, których aktywność jest związana z przeżywalnością komórek, przeprowadzono również badanie ilości indukowalnej syntazy tlenu azotu NOS-2. Białko to poprzez wydzielanie reaktywnych form azotu może stymulować wiele ścieżek sprzyjających przetrwaniu komórek glejaka wielopostaciowym oraz stymulować onkogenezę (Jahani-Asl i wsp., 2013). Obniżenie ilości NOS-2 w komórkach glejaka zmniejszało agresywność guza oraz częstotliwość podziałów jego komórek (Kostourou i wsp., 2011). W niniejszej pracy pokazano, że zahamowanie aktywności receptora P2X7 w guzach glejaka C6 obniżało ilość białka NOS-2. W literaturze można znaleźć informacje o podwyższonej ilości tego białka w guzach o dużym stopniu hipoksji. Co ciekawe, autorzy pokazali, że wraz z NOS-2, wrosła ilość receptora P2X7 (Tafani i wsp., 2011).

W celu zbadania wpływu aktywności receptora P2X7 na mikrośrodowisko guza przeprowadzono cytometryczną analizę markera CD68, który jest charakterystyczny dla komórek mononuklearnych krwi w tym makrofagów oraz mikrogleju (Barros i wsp., 2013), a także czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (Martin i wsp., 2010), który jest charakterystyczny dla limfocytów T regulatorowych, odpowiedzialnych za hamowanie aktywności układu immunologicznego. CD68 oraz Foxp3 są przedstawiane w literaturze jako negatywne czynniki predycyjne przebiegu choroby nowotworowej (Reardon i wsp., 2017; Wang i wsp., 2018; Guo i wsp., 2021). W guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7 – BBG zaobserwowano obniżenie liczby komórek CD68 oraz Foxp3 pozytywnych. W literaturze możemy znaleźć wiele doniesień wskazujących na

zaangażowanie komórek immunologicznych w środowisku guza. Wiadomo, że podanie myszom limfocytów T z delecją genu kodującego P2X7, znacząco redukowało wielkość guzów nowotworowych czerniaka B16 (Romagnani i wsp., 2020). W makrofagach, infiltrujących guzy glejaka wielopostaciowego, zaobserwowano podwyższoną ilość receptora P2X7, co więcej, BBG, podawany do hodowli mikrogleju *in vitro* wpływał hamująco na częstotliwość podziału tych komórek (Monif i wsp., 2014). Badania z zastosowaniem innego inhibitora receptora P2X7 – A740003, wykazały obniżenie liczby limfocytów T regulatorowych w mikrośrodowisku guza czerniaka B16 oraz obniżenie stężenia zewnątrzkomórkowego ATP (De Marchi i wsp., 2019). W niniejszej pracy również zaobserwowano obniżenie stężenia ATP w guzach traktowanych antagonistą receptora P2X7. Zewnątrzkomórkowe ATP wydzielane do mikrośrodowiska guza na skutek śmierci komórkowej po terapii przeciwnowotworowej (Martins i wsp., 2009; Gilber i wsp., 2019), powoduje stymulację receptorów nukleotydocowych oraz tworzy gradienty dla makrofagów lub innych komórek układu immunologicznego, które następnie mogą wspierać rozwój nowotworu (Desai i wsp., 2014). Co więcej, doświadczenia z wykorzystaniem apyrazy, enzymu rozkładającego ATP, wstrzykiwanej do guza glejaka C6 wykazały znaczące zmniejszenie objętości guzów oraz liczby naczyń krwionośnych (Morrone i wsp., 2006). W literaturze możemy również znaleźć doniesienia o regulacji wydzielania zewnątrzkomórkowego ATP przez kanał panneksyn-1 regulowaną przez pobudzony receptor P2X7, w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych (Adinolfi i wsp., 2005; Brandao-Burch i wsp., 2012; Amoroso i wsp., 2016; Wilkaniec i wsp., 2017). Może to powodować powstanie dodatniego sprzężenia zwrotnego, gdzie stymulowany P2X7 będzie stymulował wyrzut ATP, a przez to stymulację samego siebie oraz innych receptorów nukleotydocowych.

5.10 Wpływ aktywności receptora P2X7 na wytwarzanie wolnych rodników tlenowych w guzach glejaka C6

W poprzednich rozdziałach pracy pokazano udział receptora P2X7 w regulacji wytwarzania wolnych rodników tlenowych w komórkach glejaka C6 *in vitro*. W związku z tym zbadano status redox *in vivo*, by potwierdzić wyniki uzyskane na linii komórkowej. Bezpośrednie badanie wolnych rodników w tkance jest trudne. Wynika to z ogromnej reaktywności tych rodników i co za tym idzie, krótkiego czasu ich życia. Dlatego zdecydowano się na pośredni pomiar gospodarki rodnikowej, pomiar aktywności

dysmutazy ponadtlenkowej oraz ilość utlenionego glutationu. W guzach traktowanych antagonistą receptora P2X7 zaobserwowano obniżoną ilość utlenionego glutationu, w porównaniu do guzów kontrolnych. Glutation jest podstawową składową systemu detoksyfikującego w komórce żywej. Pełni on rolę redukującą wolne rodniki oraz substancji detoksyfikującej ksenobiotyki takie jak np. paracetamol (Bansal i Simon, 2018). Podwyższona ilość utlenionego glutationu w guzach kontrolnych może świadczyć o zwiększonej produkcji wolnych rodników, które z kolei mogą aktywować ścieżki sygnałowe, powodujące zwiększoną progresję nowotworu oraz oporność na terapie (Liou i Storz, 2010). Podwyższone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, wpływa również na zwiększenie ruchliwości komórek (Wu i wsp., 2006) oraz angiogenezę (Xia i wsp., 2007). Jako że na zmiany ilości utlenionego glutationu może wpływać więcej czynników, nie tylko intensywny stres oksydacyjny, w celu dodatkowego potwierdzenia przeprowadzono pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. W guzach traktowanych inhibitorem receptora P2X7 zaobserwowano obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej co może świadczyć o obniżeniu produkcji wolnych rodników w guzie, a przez to zahamowanie wielu ścieżek sygnałowych aktywowanych przez wolne rodniki, takie jak kinaza AKT, p38 oraz cytoprotekcyjnych białek szoku cieplnego (Benhar i wsp., 2002; Ikwegbue i wsp., 2018).

Wyniki otrzymane podczas doświadczeń na guzach nowotworowych *in vivo* są spójne z wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem kultury komórek C6 *in vitro* i wskazują na zaangażowanie receptora P2X7 w transdukcji sygnału z udziałem wolnych rodników.

6 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, wskazują na regulację rozwoju glejaka wielopostaciowego przez receptor nukleotydowy P2X7 w szczurzych i ludzkich modelach komórkowych.

Wyniki uzyskane z doświadczeń na komórkach glejaków wykazały:

1. Ekspresję na poziomie mRNA wszystkich receptorów z rodziny P2 w liniach komórkowych glejaków ludzi
2. Obecność białka receptora P2X7 we wszystkich badanych liniach komórkowych glejaków
3. Aktywność wapniową receptora P2X7 w liniach glejaka C6 oraz U-251
4. Brak aktywności proapoptotycznej receptora P2X7 w komórkach badanych glejaków
5. Wpływ aktywacji/zahamowania receptora P2X7 na przeżywalność komórek glejaków C6, LN-229 oraz U-251
6. Wpływ receptora P2X7 na aktywność metaboliczną glejaka C6 oraz na produkcję wolnych rodników i stan mitochondriów
7. Wpływ receptora P2X7 na aktywację ścieżek sygnałowych AKT i p38, wzrost ilości białek szoku cieplnego oraz markerów nowotworowych komórek macierzystych
8. Wpływ receptora P2X7 na adhezję komórek glejaka C6 do macierzy zewnątrzkomórkowej
9. Wpływ receptora P2X7 na wydzielanie ATP do pożywki hodowlanej

Wyniki uzyskane z doświadczeń na guzach glejaka C6 szczura wykazały:

1. Wpływ receptora P2X7 na wzrost i przerzuty guzów nowotworowych
2. Możliwość regulacji ścieżek sygnałowych AKT, p38, białek szoku cieplnego oraz markerów nowotworowych komórek macierzystych *in vivo* przez receptor P2X7
3. Wpływ aktywacji receptora P2X7 na markery przejścia epitelialno-mezenchymalnego
4. Wpływ receptora P2X7 na mikrośrodowisko guza *in vivo*
5. Wpływ receptora P2X7 na potencjał redox *in vivo*

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 proliferację 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 glejaka.

7 LITERATURA

- A. McDowell, K., J. Riggins, G., & L. Gallia, G. (2011). Targeting the AKT Pathway in Glioblastoma. *Current Pharmaceutical Design*, 17(23).
<https://doi.org/10.2174/138161211797249224>
- Aaberg-Jessen, C., Christensen, K., Offenberg, H., Bartels, A., Dreehsen, T., Hansen, S., Schröder, H. D., Brüner, N., & Kristensen, B. W. (2009). Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *Journal of Neuro-Oncology*, 95(1). <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9910-8>
- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A., & Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y 14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(2), 52–55. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00038-X)
- Adinolfi, E., Callegari, M. G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M. R., Pinton, P., Rizzuto, R., & Di Virgilio, F. (2005). Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular Biology of the Cell*, 16(7), 3260–3272.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-1025>
- Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M. G., Sandonà, D., Markwardt, F., Schmalzing, G., & Di Virgilio, F. (2010). Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *The FASEB Journal*, 24(9), 3393–3404. <https://doi.org/10.1096/fj.09-153601>
- Adinolfi, E., Kim, M., Young, M. T., Di Virgilio, F., & Surprenant, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37344–37351.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301508200>
- Adinolfi, E., Melchiorri, L., Falzoni, S., Chiozzi, P., Morelli, A., Tieghi, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Di Virgilio, F., & Baricordi, O. R. (2002). P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*, 99(2), 706–708.
<https://doi.org/10.1182/blood.V99.2.706>
- Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A. L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., & Di Virgilio, F. (2012). Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Research*, 72(12), 2957–2969.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1947>
- Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F., & Koch-Noke, F. (2008). ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *The FASEB Journal*, 22(3), 861–869.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-9294com>
- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., & Seman, M. (2001). Rapid Induction of Naive T Cell Apoptosis by Ecto-Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a Downstream Effector. *The Journal of Immunology*, 167(1), 196–203. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.196>
- Aittaleb, M., Boguth, C. A., & Tesmer, J. J. G. (2010). Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Molecular Pharmacology*, 77(2), 111–125. <https://doi.org/10.1124/mol.109.061234>
- Alfadda, A. A., & Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
- Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., & Westermark, B. (2016). Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, 8(354). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6853>
- Alqallaf, S. M., Evans, B. A. J., & Kidd, E. J. (2009). Atypical P2X 7 receptor pharmacology in two human osteoblast-like cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 156(7), 1124–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00119.x>

- Alvarez, A., Lagos-Cabré, R., Kong, M., Cárdenas, A., Burgos-Bravo, F., Schneider, P., Quest, A. F. G., & Leyton, L. (2016). Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.018>
- Amberger-Murphy, V. (2009). Hypoxia Helps Glioma to Fight Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 9(3), 381–390. <https://doi.org/10.2174/156800909788166637>
- Amoroso, F., Capece, M., Rotondo, A., Cangelosi, D., Ferracin, M., Franceschini, A., Raf-faghello, L., Pistoia, V., Varesio, L., & Adinolfi, E. (2015). The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3 β /VEGF signaling network: Evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene*, 34(41), 5240–5251. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.444>
- Amoroso, F., Falzoni, S., Adinolfi, E., Ferrari, D., & Di Virgilio, F. (2012). The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death and Disease*, 3(8). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.105>
- Amoroso, F., Salaro, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Giuliani, A. L., Cavallesco, G., Maniscalco, P., Puozzo, A., Bononi, I., Martini, F., Tognon, M., & Di Virgilio, F. (2016). P2X7 targeting inhibits growth of human mesothelioma. *Oncotarget*, 7(31). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10430>
- Amstrup, J., & Novak, I. (2003). P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochemical Journal*, 374(1), 51–61. <https://doi.org/10.1042/BJ20030585>
- Andrejew, R., Oliveira-Giacomelli, Á., Ribeiro, D. E., Glaser, T., Arnaud-Sampaio, V. F., Lameu, C., & Ulrich, H. (2020). The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00124>
- Angelastro, J. M., & Lamé, M. W. (2010). Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Molecular Cancer Research*, 8(8). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0383>
- Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S. D., Kessar, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M. A., Monyer, H., & Mammano, F. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18770–18775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800793105>
- Armstrong, D. G., & Jude, E. B. (2002). The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 92(1). <https://doi.org/10.7547/87507315-92-1-12>
- Bada, J. L. (2004). How life began on Earth: A status report. *Earth and Planetary Science Letters*, 226(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2004.07.036>
- Bader, A., Bintig, W., Begandt, D., Klett, A., Siller, I. G., Gregor, C., Schaarschmidt, F., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P. O., Hell, S. W., & Ngezahayo, A. (2017). Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca²⁺ influx through cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Physiology*, 595(8), 2497–2517. <https://doi.org/10.1113/JP273150>
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. Do. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells*, 32(6), 491–509. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0276-3>
- Bagchi, S., Liao, Z., Gonzalez, F. A., Chorna, N. E., Seye, C. I., Weisman, G. A., & Erb, L. (2005). The P2Y2 nucleotide receptor interacts with α integrins to activate Go and induce cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47). <https://doi.org/10.1074/jbc.M504819200>
- Bansal, A., & Celeste Simon, M. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, 217(7). <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Gessi, S., & Borea, P. A. (2008). Adenosine receptor antagonists: Translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chemical Reviews*, 108(1), 238–263. <https://doi.org/10.1021/cr0682195>

- Barberà-Cremades, M., Baroja-Mazo, A., Gomez, A. I., Machado, F., Di Virgilio, F., & Pelegrín, P. (2012). P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *The FASEB Journal*, 26(7), 2951–2962. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205765>
- Barden, J. A., Sluyter, R., Gu, B. J., & Wiley, J. S. (2003). Specific detection of non-functional human P2X7 receptors in HEK293 cells and B-lymphocytes. *FEBS Letters*, 538(1–3), 159–162. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00172-8)
- Barden, J. A. (2014). Non-Functional P2X7: A Novel and Ubiquitous Target in Human Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 05(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000237>
- Baricordi, O. R., Melchiorri, L., Adinolfi, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Buell, G., & Di Virgilio, F. (1999). Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X7 ATP receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33206–33208. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33206>
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080908>
- Bartlett, R., Stokes, L., & Sluyter, R. (2014). The p2x7 receptor channel: Recent developments and the use of p2x7 antagonists in models of disease. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 638–675. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>
- Bazil, J. N., Buzzard, G. T., & Rundell, A. E. (2010). Modeling mitochondrial bioenergetics with integrated volume dynamics. *PLoS Computational Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000632>
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839). <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>
- Bergamin, L. S., Capece, M., Salaro, E., Sarti, A. C., Falzoni, S., Pereira, M. S. L., De Bastiani, M. A. nio, Scholl, J. N., Battastini, A. M. O., & Di Virgilio, F. (2019). Role of the P2X7 receptor in in vitro and in vivo glioma tumor growth. *Oncotarget*, 10(47), 4840–4856. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27106>
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315–325. <https://doi.org/10.1038/361315a0>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bian, S., Sun, X., Bai, A., Zhang, C., Li, L., Enjyoji, K., Junger, W. G., Robson, S. C., & Wu, Y. (2013). P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060184>
- Bianco, F., Ceruti, S., Colombo, A., Fumagalli, M., Ferrari, D., Pizzirani, C., Matteoli, M., Di Virgilio, F., Abbracchio, M. P., & Verderio, C. (2006). A role for P2X 7 in microglial proliferation. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 745–758. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04101.x>
- Boldrini, L., Giordano, M., Ali, G., Melfi, F., Romano, G., Lucchi, M., & Fontanini, G. (2015). P2x7 mrna expression in non-small cell lung cancer: MicroRNA regulation and prognostic value. *Oncology Letters*, 9(1), 449–453. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2620>
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiological Reviews*, 98(3), 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>
- Borea, P. A., Varani, K., Vincenzi, F., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Merighi, S., & Gessi, S. (2015). The a3 adenosine receptor: History and perspectives. *Pharmacological Reviews*, 67(1), 74–102. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008540>
- Bradley, H. J., Browne, L. E., Yang, W., & Jiang, L. H. (2011). Pharmacological properties of the rhesus macaque monkey P2X7 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 164(2 B), 743–754. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01399.x>
- Braganhol, E., Huppés, D., Bernardi, A., Wink, M. R., Lenz, G., & Battastini, A. M. O. (2009). A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line

- cultures and C6 ex vivo glioma model. *Cell and Tissue Research*, 335(2), 331–340. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0723-4>
- Brandao-Burch, A., Key, M. L., Patel, J. J., Arnett, T. R., & Orriss, I. R. (2012). The P2X7 receptor is an important regulator of extracellular ATP levels. *Frontiers in Endocrinology*, 3(MAR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00041>
- Brenet, M., Martínez, S., Pérez-Nuñez, R., Pérez, L. A., Contreras, P., Díaz, J., Avalos, A. M., Schneider, P., Quest, A. F. G., & Leyton, L. (2021). Thy-1 (CD90)-Induced Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion Are β 3 Integrin-Dependent and Involve a Ca^{2+} /P2X7 Receptor Signaling Axis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.592442>
- Broom, D. C., Matson, D. J., Bradshaw, E., Buck, M. E., Meade, R., Coombs, S., Matchett, M., Ford, K. K., Yu, W., Yuan, J., Sun, S. H., Ochoa, R., Krause, J. E., Wustrow, D. J., & Cortright, D. N. (2008). Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl) methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3), 620–633. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.141853>
- Brown, D. V., Filiz, G., Daniel, P. M., Hollande, F., Dworkin, S., Amiridis, S., Kountouri, N., Ng, W., Morokoff, A. P., & Mantamadiotis, T. (2017). Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intratumor heterogeneity. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172791>
- Bryant, D. E., Greenfield, D., Walshaw, R. D., Johnson, B. R. G., Herschy, B., Smith, C., Pasek, M. A., Telford, R., Scowen, I., Munshi, T., Edwards, H. G. M., Cousins, C. R., Crawford, I. A., & Kee, T. P. (2013). Hydrothermal modification of the Sikhote-Alin iron meteorite under low pH geothermal environments. A plausibly prebiotic route to activated phosphorus on the early Earth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 109, 90–112. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.12.043>
- Buell, G. N., Talabot, F., Gos, A., Lorenz, J., Lai, E., Morris, M. A., & Antonarakis, S. E. (1998). Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors and Channels*, 5(6), 347–354. <https://europepmc.org/article/med/9826911>
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), 509–581. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4404211/>
- Burnstock, G., & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology*, 16(5), 433–440. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1)
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, 87(2), 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
- Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*, 240(SPEC.ISS.), 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
- Burnstock, G., & Verkhratsky, A. (2012). Purinergic signalling and the nervous system. *Purinergic Signalling and the Nervous System*, 9783642288, 1–715. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0>
- Bush, N. A. O., Chang, S. M., & Berger, M. S. (2017). Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical Review*, 40(1). <https://doi.org/10.1007/s10143-016-0709-8>
- Calik, I., Calik, M., Turken, G., & Ozercan, I. H. (2020). A promising independent prognostic biomarker in colorectal cancer: P2X7 receptor. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(2).
- Cankurtaran-Sayar, S., Sayar, K., & Ugur, M. (2009). P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Molecular Pharmacology*, 76(6), 1323–1332. <https://doi.org/10.1124/mol.109.059923>
- Chaudry, I. H. (1982). Does ATP cross the cell plasma membrane. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 55(1), 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7051582>

- Cheewatrakoolpong, B., Gilchrest, H., Anthes, J. C., & Greenfeder, S. (2005). Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.087>
- Chen, H., Gong, Y., Ma, Y., Thompson, R. C., Wang, J., Cheng, Z., & Xue, L. (2020). A Brain-Penetrating Hsp90 Inhibitor NXD30001 Inhibits Glioblastoma as a Monotherapy or in Combination With Radiation. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00974>
- Chen, J. F., Eltzschig, H. K., & Fredholm, B. B. (2013). Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(4), 265–286. <https://doi.org/10.1038/nrd3955>
- Chen, X., Zhang, L., Zhang, I. Y., Liang, J., Wang, H., Ouyang, M., Wu, S., Da Fonseca, A. C. C., Weng, L., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Natarajan, R., & Badie, B. (2014). RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma. *Cancer Research*, 74(24). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1240>
- Chessell, I. P., Simon, J., Hibell, A. D., Michel, A. D., Barnard, E. A., & Humphrey, P. P. A. (1998). Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Letters*, 439(1–2), 26–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01332-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01332-5)
- Cho, D. Y., Lin, S. Z., Yang, W. K., Hsu, D. M., Lin, H. L., Lee, H. C., Lee, W. Y., & Chiu, S. C. (2011). The role of cancer stem cells (CD133+) in malignant gliomas. *Cell Transplantation*, 20(1). <https://doi.org/10.3727/096368910X532774>
- Choi, J. H., Ji, Y. G., Ko, J. J., Cho, H. J., & Lee, D. H. (2018). Activating P2X7 Receptors Increases Proliferation of Human Pancreatic Cancer Cells via ERK1/2 and JNK. *Pancreas*, 47(5). <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001055>
- Chong, J. H., Zheng, G. G., Zhu, X. F., Guo, Y., Wang, L., Ma, C. H., Liu, S. Y., Xu, L. L., Lin, Y. M., & Wu, K. F. (2010). Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.087>
- Chow, S. C., Kass, G. E. N., & Orrenius, S. (1997). Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology*, 36(9), 1149–1156. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00123-8)
- Cicko, S., Zech, A., Hossfeld, M., Schneider, S., Bals, R., & Idzko, M. (2019). P2X7 receptor regulates cell survival, inflammation processes and proliferation of lung carcinoma cells. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.pa4075>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clarke, C. E., Benham, C. D., Bridges, A., George, A. R., & Meadows, H. J. (2000). Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *Journal of Physiology*, 523(3), 697–703. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00697.x>
- Cockcroft, S., & Gomperts, B. D. (1980). The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochemical Journal*, 188(3), 789–798. <https://doi.org/10.1042/bj1880789>
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A., & Buell, G. (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1277–1283. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00140-8)
- Constantinescu, P., Wang, B., Kovacevic, K., Jalilian, I., Bosman, G. J. C. G. M., Wiley, J. S., & Sluyter, R. (2010). P2X7 receptor activation induces cell death and microparticle release in murine erythroleukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(9), 1797–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.002>
- Costa-Junior, H. M., Vieira, F. S., & Coutinho-Silva, R. (2011). C terminus of the P2X7 receptor: Treasure hunting. *Purinergic Signalling*, 7(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9215-1>
- Coutinho-Silva, R., Alves, L. A., De Carvalho, A. C. C., Savino, W., & Persechini, P. M. (1996). Characterization of P2Z purinergic receptors on phagocytic cells of the thymic reticulum in culture. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1280(2), 217–222. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00293-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00293-6)

- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Cheung, K. K., De Campos, N. E., De Oliveira Souza, C., Ojeius, D. M., & Burnstock, G. (2005). P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: Effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5 51-5). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00211.2004>
- Dadey, D. Y. A., Kapoor, V., Hoye, K., Khudanyan, A., Collins, A., Thotala, D., & Hallahan, D. E. (2017). Antibody targeting GRP78 enhances the efficacy of radiation therapy in human glioblastoma and non-small cell lung cancer cell lines and tumor models. *Clinical Cancer Research*, 23(10). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1935>
- Dahl, G., Qiu, F., & Wang, J. (2013). The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1. *Neuropharmacology*, 75, 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.019>
- Danquah, W., Catherine, M. S., Rissiek, B., Pinto, C., Arnau, S. P., Amadi, M., Iacenda, D., Knop, J. H., Hammel, A., Bergmann, P., Schwarz, N., Assunção, J., Rotthier, W., Haag, F., Tolosa, E., Bannas, P., Eric, B. G., Magnus, T., Laeremans, T., ... Friedrich, K. N. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Science Translational Medicine*, 8(366). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>
- De Marchi, E., Orioli, E., Pegoraro, A., Sangaletti, S., Portararo, P., Curti, A., Colombo, M. P., Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2019). The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. *Oncogene*, 38(19). <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0684-y>
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A., & Bertics, P. J. (2001). Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X 7 Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1871–1876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1871>
- Denton, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(11), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
- Desai, B. N., & Leitinger, N. (2014). Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00580>
- Di Virgilio, F., Bronte, V., Collavo, D., & Zanovello, P. (1989). Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(6), 1955–1960. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2789252>
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- Di Virgilio, F., Schmalzing, G., & Markwardt, F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Trends in Cell Biology*, 28(5), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>
- Dinarello, C. A. (1994). The biological properties of interleukin-1. *European Cytokine Network*, 5(6), 517–531. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7727685/>
- Dinarello, C. A. (2018). Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: Drivers of innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 5–7. <https://doi.org/10.1111/imr.12624>
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Han, P., & Jarvis, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: Comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x>
- Dos Santos-Rodrigues, A., Grañé-Boladeras, N., Bicket, A., & Coe, I. R. (2014). Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochemistry International*, 73(1), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.014>

- Drill, M., Powell, K. L., Kan, L. K., Jones, N. C., O'Brien, T. J., Hamilton, J. A., & Monif, M. (2020). Inhibition of purinergic P2X receptor 7 (P2X7R) decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) expression in U251 glioblastoma cells. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71887-x>
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, *68*(3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>
- Duan, S., & Neary, J. T. (2006). P2X7 receptors: Properties and relevance to CNS function. *GLIA*, *54*(7), 738–746. <https://doi.org/10.1002/glia.20397>
- Dubyak, G. R. (2012). P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cellular Microbiology*, *14*(11), 1697–1706. <https://doi.org/10.1111/cmi.12001>
- Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death. *Journal of Physiology*, *529*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x>
- El Ouaaliti, M., Seil, M., & Dehaye, J. P. (2012). Activation of calcium-insensitive phospholipase A2 (iPLA 2) by P2X7 receptors in murine peritoneal macrophages. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *99*(3–4), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.09.005>
- Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K., Pasierbinska, M., & Kaminska, B. (2020). Integrin signaling in glioma pathogenesis: From biology to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21030888>
- Elssner, A., Duncan, M., Gavrilin, M., & Wewers, M. D. (2004). A Novel P2X 7 Receptor Activator, the Human Cathelicidin-Derived Peptide LL37, Induces IL-1 β Processing and Release. *The Journal of Immunology*, *172*(8), 4987–4994. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4987>
- Ennion, Hagan, & Evans. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(45), 35656. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063753>
- Erb, L., Liu, J., Ockerhausen, J., Kong, Q., Garrad, R. C., Griffin, K., Neal, C., Krugh, B., Santiago-Pérez, L. I., González, F. A., Gresham, H. D., Turner, J. T., & Weisman, G. A. (2001). An RGD sequence in the P2Y2 receptor interacts with $\alpha\beta 3$ integrins and is required for Go-mediated signal transduction. *Journal of Cell Biology*, *152*(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.491>
- Escamilla-Ramírez, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Zavala-Vega, S., Jimenez-Farfan, D., Anaya-Rubio, I., Briseño, E., Palencia, G., Guevara, P., Cruz-Salgado, A., Sotelo, J., & Trejo-Solís, C. (2020). Autophagy as a potential therapy for malignant glioma. *Pharmaceuticals*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/ph13070156>
- Ethell, I. M., & Ethell, D. W. (2007). Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: Synaptic functions and targets. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(13). <https://doi.org/10.1002/jnr.21273>
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A., & Surprenant, A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x) purinoceptors). *Molecular Pharmacology*, *48*(2), 178–183. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7544432/>
- Fabbrizio, P., Amadio, S., Apolloni, S., & Volonté, C. (2017). P2X7 receptor activation modulates autophagy in SOD1-g93a mouse microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00249>
- Fang, J., Chen, X., Zhang, L., Chen, J., Liang, Y., Li, X., Xiang, J., Wang, L., Guo, G., Zhang, B., & Zhang, W. (2013). P2X7R suppression promotes glioma growth through epidermal growth factor receptor signal pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *45*(6), 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.005>
- Fang, K. M., Wang, Y. L., Huang, M. C., Sun, S. H., Cheng, H., & Tzeng, S. F. (2011). Expression of macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant protein-1 in glioma-infiltrating microglia: Involvement of ATP and P2X7 receptor. *Journal of Neuroscience Research*, *89*(2), 199–211. <https://doi.org/10.1002/jnr.22538>

- Fedrigo, C. A., Grivicich, I., Schunemann, D. P., Chemale, I. M., Santos, D. D., Jacovas, T., Boschetti, P. S., Jotz, G. P., Filho, A. B., & da Rocha, A. B. (2011). Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. *Radiation Oncology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-156>
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology*, *1180*, 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- Feng, Y. H., Li, X., Zeng, R., & Gorodeski, G. I. (2006). Endogenously expressed truncated P2X7 receptor lacking the C-terminus is preferentially upregulated in epithelial cancer cells and fails to mediate ligand-induced pore formation and apoptosis. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, *25*(9–11). <https://doi.org/10.1080/15257770600890921>
- Feng, Y. H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., & Gorodeski, G. I. (2006). A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(25), 17228–17237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602999200>
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P., & Di Virgilio, F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *156*(4), 1531–1539. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8568257>
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Forchap, S., Sitta, B., Turchet, L., Falzoni, S., Minelli, M., Baricordi, R., & Di Virgilio, F. (2004). The Antibiotic Polymyxin B Modulates P2X 7 Receptor Function. *The Journal of Immunology*, *173*(7), 4652–4660. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4652>
- Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Madi, L., & Cohn, I. (2002). A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, *13*(5), 437–443. <https://doi.org/10.1097/00001813-200206000-00001>
- Fonfria, E., Clay, W. C., Levy, D. S., Goodwin, J. A., Roman, S., Smith, G. D., Condreay, J. P., & Michel, A. D. (2008). Cloning and pharmacological characterization of the guinea pig P2X 7 receptor orthologue. *British Journal of Pharmacology*, *153*(3), 544–556. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707596>
- Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., & Wasserman, W. (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *362*(4–5), 364–374. <https://doi.org/10.1007/s002100000313>
- Friedman, H. S., Kerby, T., & Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*, *6*(7).
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, *104*, 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>
- Gallia, G. L., Tyler, B. M., Hann, C. L., Siu, I. M., Giranda, V. L., Vescovi, A. L., Brem, H., & Riggins, G. J. (2009). Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, *8*(2). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0680>
- Garcia-Guzman, M., Stühmer, W., & Soto, F. (1997). Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Molecular Brain Research*, *47*(1–2), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00036-3)
- García-Huerta, P., Díaz-Hernandez, M., Delicado, E. G., Pimentel-Santillana, M., Miras-Portugals, M. T., & Gómez-Villafuertes, R. (2012). The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(53), 44628–44644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390971>
- Gartland, A., Hipskind, R. A., Gallagher, J. A., & Bowler, W. B. (2001). Expression of a P2X7 receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(5), 846–856. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.5.846>

- Gdynia, G., Grund, K., Eckert, A., Böck, B. C., Funke, B., Macher-Goeppinger, S., Sieber, S., Herold-Mende, C., Wiestler, B., Wiestler, O. D., & Roth, W. (2007). Basal caspase activity promotes migration and invasiveness in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0343>
- Gebhart, G. F., & Schmidt, R. F. (Eds.). (2013). *Encyclopedia of Pain*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28753-4>
- Gehring, M. P., Kipper, F., Nicoletti, N. F., Sperotto, N. D., Zanin, R., Tamajusuku, A. S. K., Flores, D. G., Meurer, L., Roesler, R., Filho, A. B., Lenz, G., Campos, M. M., & Morrone, F. B. (2015). P2X7 receptor as predictor gene for glioma radiosensitivity and median survival. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *68*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.09.001>
- Gehring, M. P., Pereira, T. C. B., Zanin, R. F., Borges, M. C., Filho, A. B., Battastini, A. M. O., Bogo, M. R., Lenz, G., Campos, M. M., & Morrone, F. B. (2012). P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signalling*, *8*(4), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9319-2>
- Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpakis, D. V., Kyriazopoulou, V., & Zaravinos, A. (2020). EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>
- Geraghty, N. J., Belfiore, L., Ly, D., Adhikary, S. R., Fuller, S. J., Varikatt, W., Sanderson-Smith, M. L., Sluyter, V., Alexander, S. I., Sluyter, R., & Watson, D. (2017). The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G reduces serum human interferon- γ in a humanized mouse model of graft-versus-host disease. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1111/cei.13005>
- Geraghty, N. J., Watson, D., & Sluyter, R. (2019). Long-term treatment with the P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G reduces liver inflammation in a humanized mouse model of graft-versus-host disease. *Cellular Immunology*, *336*. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.12.001>
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G., & Ford, A. P. D. W. (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *452*(5), 513–537. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0070-9>
- Ghalali, A., Wiklund, F., Zheng, H., Stenius, U., & Högberg, J. (2014). Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, *35*(7), 1547–1555. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu019>
- Giakoumettis, D., Kritis, A., & Foroglou, N. (2018). C6 cell line: The gold standard in glioma research. *Hippokratia*, *22*(3).
- Giannuzzo, A., Pedersen, S. F., & Novak, I. (2015). The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0472-4>
- Giannuzzo, A., Saccomano, M., Napp, J., Ellegaard, M., Alves, F., & Novak, I. (2016). Targeting of the P2X7 receptor in pancreatic cancer and stellate cells. *International Journal of Cancer*, *139*(11), 2540–2552. <https://doi.org/10.1002/ijc.30380>
- Gilbert, S. M., Gidley Baird, A., Glazer, S., Barden, J. A., Glazer, A., Teh, L. C., & King, J. (2017). A phase I clinical trial demonstrates that nfP2X7-targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, *177*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1111/bjd.15364>
- Gilbert, S., Oliphant, C., Hassan, S., Peille, A., Bronsert, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., McNulty, S., & Lara, R. (2019). ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfP2X7, a key mediator of cancer cell survival. *Oncogene*, *38*(2), 194–208. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0426-6>
- Gilles, C., Newgreen, D. F., Sato, H., & Thompson, E. W. (2004). Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis. *Madame Curie Bioscience Database*.
- Gillespie, J. H. (1934). The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *The Journal of Physiology*, *80*(4), 345–359. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1934.sp003095>

- Giuliani, A. L., Colognesi, D., Ricco, T., Roncato, C., Capece, M., Amoroso, F., Wang, Q. G., De Marchi, E., Gartland, A., Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2014). Trophic activity of human P2X7 receptor isoforms A and B in osteosarcoma. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107224>
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2019). Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology Letters*, 205, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006>
- Glancy, B., Willis, W. T., Chess, D. J., & Balaban, R. S. (2013). Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*, 52(16). <https://doi.org/10.1021/bi3015983>
- Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M. H., Lamaze, C., & Kanellopoulos, J. M. (2009). Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *The FASEB Journal*, 23(3), 795–805. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114637>
- Gordon, J. L. (1986). Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochemical Journal*, 233(2), 309–319. <https://doi.org/10.1042/bj2330309>
- Gorman, M. W., Feigl, E. O., & Buffington, C. W. (2007). Human plasma ATP concentration. *Clinical Chemistry*, 53(2), 318–325. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.076364>
- Gómez-Villafuertes, R., García-Huerta, P., Díaz-Hernández, J. I., & Miras-Portugal, M. T. (2015). PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18417>
- Gray, J. H., Owen, R. P., & Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 728–734. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y>
- Gross, O., Thomas, C. J., Guarda, G., & Tschopp, J. (2011). The inflammasome: An integrated view. *Immunological Reviews*, 243(1), 136–151. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x>
- Gu, B. J., Zhang, W. Y., Bendall, L. J., Chessell, I. P., Buell, G. N., & Wiley, J. S. (2000). Expression of P2X7 purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: Evidence for non-functional P2X7 receptors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(4 48-4). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.c1189>
- Gudipaty, L., Munetz, J., Verhoef, P. A., & Dubyak, G. R. (2003). Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1 β secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 285(2 54-2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2003>
- Guerra, A. N., Gavala, M. L., Chung, H. S., & Bertics, P. J. (2007). Nucleotide receptor signaling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signalling*, 3(1–2), 39–51. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9035-x>
- Guo, X. Y., Zhang, G. H., Wang, Z. N., Duan, H., Xie, T., Liang, L., Cui, R., Hu, H. R., Wu, Y., Dong, J. jun, He, Z. Q., & Mou, Y. G. (2021). A novel foxp3-related immune prognostic signature for glioblastoma multiforme based on immunogenomic profiling. *Aging*, 13(3). <https://doi.org/10.18632/aging.202282>
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Köhl, M., Lorenzen, S., & Thiele, H. G. (1994). Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *Journal of Molecular Biology*, 243(3), 537–546. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1680>
- Han, X., Xue, X., Zhou, H., & Zhang, G. (2017). A molecular view of the radioresistance of gliomas. *Oncotarget*, 8(59). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21753>
- Hashimoto-Hill, S., Friesen, L., Kim, M., & Kim, C. H. (2017). Contraction of intestinal effector T cells by retinoic acid-induced purinergic receptor P2X7. *Mucosal Immunology*, 10(4), 912–923. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.109>
- He, Y., Franchi, L., & Núñez, G. (2013). TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 190(1), 334–339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202737>

- Heiss, K., Jänner, N., Mähneß, B., Schumacher, V., Koch-Nolte, F., Haag, F., & Mittrücker, H.-W. (2008). High Sensitivity of Intestinal CD8+ T Cells to Nucleotides Indicates P2X7 as a Regulator for Intestinal T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, *181*(6), 3861–3869. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3861>
- Helliwell, R. M., Shioukhuey, C. O., Dhuna, K., Molero, J. C., Ye, J. M., Xue, C. C., & Stokes, L. (2015). Selected ginsenosides of the protopanaxdiol series are novel positive allosteric modulators of P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology*, *172*(13), 3326–3340. <https://doi.org/10.1111/bph.13123>
- Henríquez, M., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Alvarez, A., Kong, M., Muñoz, N., Eisner, V., Jaimovich, E., Schneider, P., Quest, A. F. G., & Leyton, L. (2011). ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *Journal of Cell Science*, *124*(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.073171>
- Hoffman, D. L., & Brookes, P. S. (2009). Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(24), 16236–16245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809512200>
- Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *460*(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.110>
- Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M., Zhong, C., Wade, C., Chandran, P., Zhu, C., Carroll, W., Perez-Medrano, A., Iwakura, Y., & Jarvis, M. F. (2009). The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1 α knockout mice. *Behavioural Brain Research*, *204*(1), 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.018>
- Horton, E. R., Humphries, J. D., James, J., Jones, M. C., Askari, J. A., & Humphries, M. J. (2016). The integrin adhesome network at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(22). <https://doi.org/10.1242/jcs.192054>
- Huang, S., Chen, Y., Wu, W., Ouyang, N., Chen, J., Li, H., Liu, X., Su, F., Lin, L., & Yao, Y. (2013). MiR-150 promotes human breast cancer growth and malignant behavior by targeting the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080707>
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, *119*(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>
- Iglesia, R. P., Fernandes, C. F. de L., Coelho, B. P., Prado, M. B., Escobar, M. I. M., Almeida, G. H. D. R., & Lopes, M. H. (2019). Heat shock proteins in glioblastoma biology: Where do we stand? *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225794>
- Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A. P., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2008). P2X7 receptor-Pannexin1 complex: Pharmacology and signaling. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *295*(3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2008>
- Ikwegbue, P. C., Masamba, P., Oyinloye, B. E., & Kappo, A. P. (2018). Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. *Pharmaceuticals*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/ph11010002>
- Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology Letters*, *11*(3). <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>
- Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., Leemans, J. C., & Sutterwala, F. S. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.0908698106>
- Jackson, M. F. (2015). Interdependence of ATP signalling and pannexin channels; The servant was really the master all along? *Biochemical Journal*, *472*(3), e27–e30. <https://doi.org/10.1042/BJ20151016>
- Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong O, Tran M, Kang Y, Gonzales FA, Weisman GA, & Neary JT. (2004). P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol*, *141*(7), 1106–1117.

- Jahani-Asl, A., & Bonni, A. (2013). iNOS: A Potential Therapeutic Target for Malignant Glioma. *Current Molecular Medicine*, 13(8). <https://doi.org/10.2174/1566524011313080002>
- Jantaratnotai, N., Choi, H. B., & McLarnon, J. G. (2009). ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-442>
- Ji, Z., Xie, Y., Guan, Y., Zhang, Y., Cho, K. S., Ji, M., & You, Y. (2018). Involvement of P2X7 Receptor in Proliferation and Migration of Human Glioma Cells. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8591397>
- Jiang, H., Shang, X., Wu, H., Gautam, S. C., Al-Holou, S., Li, C., Kuo, J., Zhang, L., & Chopp, M. (2009). Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 8(1).
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A., & Surprenant, A. (2000). Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Molecular Pharmacology*, 58(1), 82–88. <https://doi.org/10.1124/mol.58.1.82>
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Mackenzie, A., Zhang, Y. H., Surprenant, A., & North, R. A. (2005). N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X7 receptors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289(5 58-5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00253.2005>
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A., & North, R. A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34190–34196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005481200>
- Jimenez-Mateos, E. M., Smith, J., Nicke, A., & Engel, T. (2019). Regulation of P2X7 receptor expression and function in the brain. *Brain Research Bulletin*, 151, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.008>
- Jones, D. P. (1986). Intracellular diffusion gradients of O₂ and ATP. *The American Journal of Physiology*, 250(5 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1986.250.5.c663>
- Jung, Y., Ahn, S. H., Park, H., Park, S. H., Choi, K., Choi, C., Kang, J. L., & Choi, Y. H. (2018). MCP-1 and MIP-3 α Secreted from Necrotic Cell-Treated Glioblastoma Cells Promote Migration/Infiltration of Microglia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(3). <https://doi.org/10.1159/000492092>
- Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 286(5 55-5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00494.2003>
- Kan, L. K., Seneviratne, S., Drummond, K. J., Williams, D. A., O'Brien, T. J., & Monif, M. (2020). P2X7 receptor antagonism inhibits tumour growth in human high-grade gliomas. *Purinergic Signalling*, 16(3), 327–336. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09705-2>
- Kang, B. R., Yang, S. H., Chung, B. R., Kim, W., & Kim, Y. S. (2016). Cell surface GRP78 as a biomarker and target for suppressing glioma cells. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep34922>
- Kazmierczak, J., Kempe, S., & Kremer, B. (2013). Calcium in the Early Evolution of Living Systems: A Biohistorical Approach. *Current Organic Chemistry*, 17(16), 1738–1750. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990081>
- Kennedy, C. (2017). P2Y11 receptors: Properties, distribution and functions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1051, 107–122. https://doi.org/10.1007/5584_2017_89
- Kennedy, N. J., Cellurale, C., & Davis, R. J. (2007). A Radical Role for p38 MAPK in Tumor Initiation. *Cancer Cell*, 11(2). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.009>
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Séguéla, P., Voigt, M., & Humphrey, P. P. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 107–118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171941>
- Kim, J. E., Ko, A. R., Hyun, H. W., Min, S. J., & Kang, T. C. (2018). P2RX7-MAPK1/2-SP1 axis inhibits MTOR independent HSPB1-mediated astroglial autophagy article. *Cell Death and Disease*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0586-x>

- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO Journal*, *20*(22). <https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6347>
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *61*(3), 215–225. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.3.215>
- Kłopocka, W., Korczyński, J., & Pomorski, P. (2020). Cytoskeleton and Nucleotide Signaling in Glioma C6 Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1202*, 109–128. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_6
- Kojima, S., Ohshima, Y., Nakatsukasa, H., & Tsukimoto, M. (2017). Role of ATP as a key signaling molecule mediating radiation-induced biological effects. *Dose-Response*, *15*(1). <https://doi.org/10.1177/1559325817690638>
- Kostourou, V., Cartwright, J. E., Johnstone, A. P., Boulton, J. K. R., Cullis, E. R., Whitley, G., & Robinson, S. P. (2011). The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *British Journal of Cancer*, *104*(1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606034>
- Koul, D., Shen, R., Bergh, S., Sheng, X., Shishodia, S., Lafortune, T. A., Lu, Y., de Groot, J. F., Mills, G. B., & Yung, W. K. A. (2006). Inhibition of Akt survival pathway by a small-molecule inhibitor in human glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *5*(3). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0453>
- Koul, H. K., Pal, M., & Koul, S. (2013). Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes and Cancer*, *4*(9–10). <https://doi.org/10.1177/1947601913507951>
- Krysko, O., Aaes, T. L., Bachert, C., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death and Disease*, *4*(5). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.156>
- Krzemiński, P., Supłat, D., Czajkowski, R., Pomorski, P., & Barańska, J. (2007). Expression and functional characterization of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors in long-term serum-deprived glioma C6 cells. *FEBS Journal*, *274*(8). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05741.x>
- Künzli, B. M., Berberat, P. O., Giese, T., Csizmadia, E., Kaczmarek, E., Baker, C., Halaceli, I., Büchler, M. W., Friess, H., & Robson, S. C. (2007). Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*(1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00259.2006>
- Künzli, B. M., Bernlochner, M. I., Rath, S., Käser, S., Csizmadia, E., Enjyoji, K., Cowan, P., D'Apice, A., Dwyer, K., Rosenberg, R., Perren, A., Friess, H., Maurer, C. A., & Robson, S. C. (2011). Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signalling*, *7*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9228-9>
- Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kubo, M., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2012). Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature Communications*, *3*. <https://doi.org/10.1038/ncomms2023>
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G., & Mutschler, E. (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *European Journal of Pharmacology*, *217*(2–3), 217–219. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90877-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90877-7)
- Lazarev, V. F., Nikotina, A. D., Mikhaylova, E. R., Nudler, E., Polonik, S. G., Guzhova, I. V., & Margulis, B. A. (2016). Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *470*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.076>
- Lazarev, V. F., Sverchinsky, D. V., Mikhaylova, E. R., Semenyuk, P. I., Komarova, E. Y., Niskanen, S. A., Nikotina, A. D., Burakov, A. V., Kartsev, V. G., Guzhova, I. V., & Margulis, B. A. (2018). Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell Death and Disease*, *9*(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0160-y>

- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., & Harden, T. K. (2000). Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31061–31068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003255200>
- Lecciso, M., Ocadlikova, D., Sangaletti, S., TrabANELLI, S., De Marchi, E., Orioli, E., Pegoraro, A., Portararo, P., Jandus, C., Bontadini, A., Redavid, A., Salvestrini, V., Romero, P., Colombo, M. P., Di Virgilio, F., Cavo, M., Adinolfi, E., & Curti, A. (2017). ATP release from chemotherapy-treated dying leukemia cells Elicits an immune suppressive effect by increasing regulatory T cells and Tolerogenic dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01918>
- Leduc-Pessah, H., Weilinger, N. L., Fan, C. Y., Burma, N. E., Thompson, R. J., & Trang, T. (2017). Site-specific regulation of P2X7 receptor function in microglia gates morphine analgesic tolerance. *Journal of Neuroscience*, 37(42), 10154–10172. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0852-17.2017>
- Ledur, P. F., Villodre, E. S., Paulus, R., Cruz, L. A., Flores, D. G., & Lenz, G. (2012). Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signalling*, 8(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9252-9>
- Lee, H. K., Xiang, C., Cazacu, S., Finnis, S., Kazimirsky, G., Lemke, N., Lehman, N. L., Rempel, S. A., Mikkelsen, T., & Brodie, C. (2008). GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro-Oncology*, 10(3). <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-006>
- Leiva-Salcedo, E., Coddou, C., Rodríguez, F. E., Penna, A., Lopez, X., Neira, T., Fernández, R., Imarai, M., Rios, M., Escobar, J., Montoya, M., Huidobro-Toro, J. P., Escobar, A., & Acuña-Castillo, C. (2011). Lipopolysaccharide inhibits the channel activity of the P2X7 receptor. *Mediators of Inflammation*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/152625>
- Lemaire, I., Falzoni, S., Zhang, B., Pellegatti, P., & Di Virgilio, F. (2011). The P2X 7 Receptor and Pannexin-1 Are Both Required for the Promotion of Multinucleated Macrophages by the Inflammatory Cytokine GM-CSF. *The Journal of Immunology*, 187(7), 3878–3887. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002780>
- Lenertz, L. Y., Wang, Z., Guadarrama, A., Hill, L. M., Gavala, M. L., & Bertics, P. J. (2010). Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry*, 49(22), 4611–4619. <https://doi.org/10.1021/bi902083n>
- Letavic, M. A., Lord, B., Bischoff, F., Hawryluk, N. A., Pieters, S., Rech, J. C., Sales, Z., Velter, A. I., Ao, H., Bonaventure, P., Contreras, V., Jiang, X., Morton, K. L., Scott, B., Wang, Q., Wickenden, A. D., Carruthers, N. I., & Bhattacharya, A. (2013). Synthesis and pharmacological characterization of two novel, brain penetrating P2X7 antagonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(4), 419–422. <https://doi.org/10.1021/ml400040v>
- Li, G., Zou, L., Xie, W., Wen, S., Xie, Q., Gao, Y., Xu, C., Xu, H., Liu, S., Wang, S., Xue, Y., Wu, B., Lv, Q., Ying, M., Zhang, X., & Liang, S. (2016). The effects of NON-RATT021972 lncRNA siRNA on PC12 neuronal injury mediated by P2X7 receptor after exposure to oxygen-glucose deprivation. *Purinergic Signalling*, 12(3), 479–487. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9513-8>
- Li, S., Tomić, M., & Stojilkovic, S. S. (2011). Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels. *General and Comparative Endocrinology*, 174(2), 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.019>
- Li, X., Qi, X., Zhou, L., CATERA, D., Rote, N. S., Potashkin, J., Abdul-Karim, F. W., & Gorodeski, G. I. (2007). Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 106(1), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.03.032>
- Li, X., Qi, X., Zhou, L., Fu, W., Abdul-Karim, F. W., MacLennan, G., & Gorodeski, G. I. (2009). P2X7 receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signalling*, 5(3), 351–368. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9161-3>

- Liang, X., Samways, D. S. K., Wolf, K., Bowles, E. A., Richards, J. P., Bruno, J., Dutertre, S., DiPaolo, R. J., & Egan, T. M. (2015). Quantifying Ca²⁺ current and permeability in ATP-gated P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7930–7942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627810>
- Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2011). IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 23(5). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.003>
- Lin, J., Zhu, Z., Xiao, H., Wakefield, M. R., Ding, V. A., Bai, Q., & Fang, Y. (2017). The role of il-7 in immunity and cancer. *Anticancer Research*, 37(3). <https://doi.org/10.21873/anticancer.11405>
- Lin, Y., Wang, J. F., Gao, G. Z., Zhang, G. Z., Wang, F. L., & Wang, Y. J. (2013). Plasma levels of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 correlate with diagnosis and prognosis of glioma patients. *Chinese Medical Journal*, 126(22). <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131765>
- Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Lipmann, F. (1941). *Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy*. 99–162. <https://doi.org/10.1002/9780470122464.ch4>
- Liu, F., Huang, J., Liu, X., Cheng, Q., Luo, C., & Liu, Z. (2020). CTLA-4 correlates with immune and clinical characteristics of glioma. *Cancer Cell International*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1085-6>
- Liu, J., Li, N., Sheng, R., Wang, R., Xu, Z., Mao, Y., Wang, Y., & Liu, Y. (2017). Hypermethylation downregulates P2X7 receptor expression in astrocytoma. *Oncology Letters*, 14(6), 7699–7704. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7241>
- Liu, K., Tsung, K., & Attenello, F. J. (2020). Characterizing Cell Stress and GRP78 in Glioma to Enhance Tumor Treatment. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.608911>
- Liu, L., Zou, J., Liu, X., Jiang, L. H., & Li, J. (2010). Inhibition of ATP-induced macrophage death by emodin via antagonizing P2X7 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 640(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.036>
- Liu, S., Zou, L., Xie, J., Xie, W., Wen, S., Xie, Q., Gao, Y., Li, G., Zhang, C., Xu, C., Xu, H., Wu, B., Lv, Q., Zhang, X., Wang, S., Xue, Y., & Liang, S. (2016). LncRNA NON-RATT021972 siRNA regulates neuropathic pain behaviors in type 2 diabetic rats through the P2X7 receptor in dorsal root ganglia. *Molecular Brain*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0226-2>
- Liu, Y., & Peterson, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of ...*, 69(2).
- Liu, Z. G., & Jiao, D. (2020). Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell Stress*, 4(1). <https://doi.org/10.15698/cst2020.01.208>
- Lo, C., Cristofalo, V. J., Morris, H. P., & Weinhouse, S. (1968). Studies on respiration and glycolysis in transplanted hepatic tumors of the rat. *Cancer Research*, 28(1), 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4294911>
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C., & Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. *FEBS Letters*, 581(3), 483–488. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.056>
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
- Macarthur, M., Hold, G. L., & El-Omar, E. M. (2004). Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(4 49-4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00475.2003>

- Mackenzie, A. B., Young, M. T., Adinolfi, E., & Surprenant, A. (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.M502705200>
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 15(5), 825–835. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1)
- Majewska, E., & Szeliga, M. (2017). AKT/GSK3 β Signaling in Glioblastoma. *Neurochemical Research*, 42(3). <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2044-4>
- Martel-Gallegos, G., Casas-Pruneda, G., Ortega-Ortega, F., Sánchez-Armass, S., Olivares-Reyes, J. A., Diebold, B., Pérez-Cornejo, P., & Arreola, J. (2013). Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(10), 4650–4659. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.023>
- Martin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Apetoh, L., & Ghiringhelli, F. (2010). Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*, 29(29). <https://doi.org/10.1038/onc.2010.174>
- Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
- Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Sèror, C., Métiévier, D., Perfettini, J. L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle*, 8(22), 3723–3728. <https://doi.org/10.4161/cc.8.22.10026>
- Matyśniak, D., Nowak, N., Chumak, V., & Pomorski, P. (2020). P2X7 receptor activity landscape in rat and human glioma cell lines. *Acta Biochimica Polonica*, 67(1), 7–14. https://doi.org/10.18388/ABP.2020_2848
- Memmel, S., Sisario, D., Zöller, C., Fiedler, V., Katzer, A., Heiden, R., Becker, N., Eing, L., Ferreira, F. L. R., Zimmermann, H., Sauer, M., Flentje, M., Sukhorukov, V. L., & Djuzenova, C. S. (2017). Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. *Oncotarget*, 8(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16847>
- Meyerhof, O. (1951). Mechanisms of glycolysis and fermentation. *Canadian Journal of Medical Sciences*, 29(2), 63–77. <https://doi.org/10.1139/cjms51-008>
- Michel, A. D., Chambers, L. J., Clay, W. C., Condreay, J. P., Walter, D. S., & Chessell, I. P. (2007). Direct labelling of the human P2X 7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *British Journal of Pharmacology*, 151(1), 84–95. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707196>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Monif, M., Burnstock, G., & Williams, D. A. (2010). Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(11), 1753–1756. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.021>
- Monif, M., O'Brien, T. J., Drummond, K. J., Reid, C. A., Liubinas, S. V., & Williams, D. A. (2014). P2X7 receptors are a potential novel target for anti-glioma therapies. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12950-014-0025-4>
- Monif, M., Reid, C. A., Powell, K. L., Smart, M. L., & Williams, D. A. (2009). The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: A trophic role for P2X7R pore. *Journal of Neuroscience*, 29(12), 3781–3791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009>
- Morelli, A., Chiozzi, P., Chiesa, A., Ferrari, D., Sanz, J. M., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., Olson, M. F., & Di Virgilio, F. (2003). Extracellular ATP causes ROCK I-dependent Bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(7), 2655–2664. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-04-0061>
- Morrone, F. B., Horn, A. P., Stella, J., Spiller, F., Sarkis, J. J. F., Salbego, C. G., Lenz, G., & Battastini, A. M. O. (2005). Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP

- cytotoxicity. *Journal of Neuro-Oncology*, 71(2). <https://doi.org/10.1007/s11060-004-1383-1>
- Morrone, F. B., Oliveira, D. L., Gamermann, P., Stella, J., Wofchuk, S., Wink, M. R., Meurer, L., Edelweiss, M. I. A., Lenz, G., & Battastini, A. M. O. (2006). In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-226>
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*, 38(6), 1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
- Murakami, M., Shiraishi, A., Tabata, K., & Fujita, N. (2008). Identification of the orphan GPCR, P2Y₁₀ receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.145>
- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M., & Di Virgilio, F. (1993). Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P(2Z) receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8199–8203. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53082-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53082-9)
- Nelson, D. W., Gregg, R. J., Kort, M. E., Perez-Medrano, A., Voight, E. A., Wang, Y., Grayson, G., Namovic, M. T., Donnelly-Roberts, D. L., Niforatos, W., Honore, P., Jarvis, M. F., Faltynek, C. R., & Carroll, W. A. (2006). Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X₇ antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(12), 3659–3666. <https://doi.org/10.1021/jm051202e>
- Nörenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plötz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., & Schaefer, M. (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X₇ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 167(1), 48–66. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x>
- Nörenberg, W., Hempel, C., Urban, N., Sobottka, H., Illes, P., & Schaefer, M. (2011). Clemastine potentiates the human P2X₇ receptor by sensitizing it to lower ATP concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11067–11081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198879>
- Nörenberg, W., Plötz, T., Sobottka, H., Chubanov, V., Mittermeier, L., Kalwa, H., Aigner, A., & Schaefer, M. (2016). TRPM7 is a molecular substrate of ATP-evoked P2X₇-like currents in tumor cells. *Journal of General Physiology*, 147(6), 467–483. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611595>
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- North, R. A. (2016). P2X receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1700). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0427>
- North, R. A., & Jarvis, M. F. (2013). P2X receptors as drug targets. *Molecular Pharmacology*, 83(4). <https://doi.org/10.1124/mol.112.083758>
- North, R. A., & Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40, 563–580. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563>
- Olivier, C., Oliver, L., Lalier, L., & Vallette, F. M. (2021). Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677>
- Orellano, E. A., Rivera, O. J., Chevres, M., Chorna, N. E., & González, F. A. (2010). Inhibition of neuronal cell death after retinoic acid-induced down-regulation of P2X₇ nucleotide receptor expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 337(1–2), 83–99. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0288-x>
- Orth, M., Albrecht, V., Seidl, K., Kinzel, L., Unger, K., Hess, J., Kreutzer, L., Sun, N., Stegen, B., Nieto, A., Maas, J., Winssinger, N., Friedl, A. A., Walch, A. K., Belka, C., Zitzelsberger, H., Niyazi, M., & Lauber, K. (2021). Inhibition of HSP90 as a Strategy to Radiosensitize Glioblastoma: Targeting the DNA Damage Response and Beyond. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.612354>

- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *452*(5), 589–597. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0061-x>
- Park, M., Kim, J., Phuong, N. T. T., Park, J. G., Park, J. H., Kim, Y. C., Baek, M. C., Lim, S. C., & Kang, K. W. (2019). Involvement of the P2X7 receptor in the migration and metastasis of tamoxifen-resistant breast cancer: effects on small extracellular vesicles production. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47734-z>
- Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO Journal*, *25*(21), 5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
- Peñaranda-Fajardo, N. M., Meijer, C., Liang, Y., Dijkstra, B. M., Aguirre-Gamboa, R., den Dunnen, W. F. A., & Kruyt, F. A. E. (2019). ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death and Disease*, *10*(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1934-1>
- Pereira, J. M. S., Barreira, A. L., Gomes, C. R., Ornellas, F. M., Ornellas, D. S., Miranda, L. C., Cardoso, L. R., Coutinho-Silva, R., Schanaider, A., Morales, M. M., Leite, M., & Takiya, C. M. (2020). Brilliant blue G, a P2X7 receptor antagonist, attenuates early phase of renal inflammation, interstitial fibrosis and is associated with renal cell proliferation in ureteral obstruction in rats. *BMC Nephrology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01861-2>
- Perregaux, D., & Gabel, C. A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(21), 15195–15203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8195155>
- Piao, Y., Henry, V., Tiao, N., Park, S. Y., Martinez-Ledesma, J., Dong, J. W., Balasubramanian, V., & de Groot, J. F. (2017). Targeting intercellular adhesion molecule-1 prolongs survival in mice bearing bevacizumab-resistant glioblastoma. *Oncotarget*, *8*(57). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18859>
- Platten, M., Kretz, A., Naumann, U., Aulwurm, S., Egashira, K., Isenmann, S., & Weller, M. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Annals of Neurology*, *54*(3). <https://doi.org/10.1002/ana.10679>
- Plattner, H., & Verkhatsky, A. (2016). Inseparable tandem: Evolution chooses atp and ca²⁺ to control life, death and cellular signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1700). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0419>
- Pochet, S., Tandel, S., Quérière, S., Tre-Hardy, M., Garcia-Marcos, M., De Lorenzi, M., Vandendriessche, M., Marino, A., Devleeschouwer, M., & Dehaye, J. P. (2006). Modulation by LL-37 of the responses of salivary glands to purinergic agonists. *Molecular Pharmacology*, *69*(6), 2037–2046. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021444>
- Polewski, M. D., Reveron-Thornton, R. F., Cherryholmes, G. A., Marinov, G. K., Cassady, K., & Aboody, K. S. (2016). Increased expression of system xc⁻ in glioblastoma confers an altered metabolic state and temozolomide resistance. *Molecular Cancer Research*, *14*(12). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0028>
- Poornima, V., Madhupriya, M., Kootar, S., Sujatha, G., Kumar, A., & Bera, A. K. (2012). P2X7 receptor-pannexin 1 hemichannel association: Effect of extracellular calcium on membrane permeabilization. *Journal of Molecular Neuroscience*, *46*(3), 585–594. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9646-8>
- Pupovac, A., Stokes, L., & Sluyter, R. (2013). CAY10593 inhibits the human P2X7 receptor independently of phospholipase D1 stimulation. *Purinergic Signalling*, *9*(4), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9371-6>
- Qiu, F., & Dahl, G. (2009). A permeant regulating its permeation pore: Inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *296*(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00433.2008>
- Qiu, Y., Li, W. H., Zhang, H. Q., Liu, Y., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2014). P2X7 mediates ATP-driven invasiveness in prostate cancer cells. *PLoS ONE*, *9*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114371>

- Qu, Y., & Dubyak, G. R. (2009). P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signalling*, 5(2), 163–173. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9132-8>
- Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., Dubyak, G. R., Hackos, D., & Dixit, V. M. (2011). Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6553–6561. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100478>
- Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., & Pistoia, V. (2006). The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Research*, 66(2), 907–914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3185>
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>
- Rassendren, F., Buell, G. N., Virginio, C., Collo, G., North, R. A., & Surprenant, A. (1997). The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5482–5486. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5482>
- Ravenna, L., Sale, P., Di Vito, M., Russo, A., Salvatori, L., Tafani, M., Mari, E., Sentinelli, S., Petrangeli, E., Gallucci, M., Di Silverio, F., & Russo, M. A. (2009). Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. *Prostate*, 69(11), 1245–1255. <https://doi.org/10.1002/pros.20966>
- Reardon, D. A., & Antonio Chiocca, E. (2017). Immunotherapy for glioblastoma: On the sidelines or in the game? *Discovery Medicine*, 24(133).
- Reinhold, W. C., Sunshine, M., Liu, H., Varma, S., Kohn, K. W., Morris, J., Doroshow, J., & Pommier, Y. (2012). CellMiner: A web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set. *Cancer Research*, 72(14), 3499–3511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1370>
- Robinson, J. P., Vanbrocklin, M. W., McKinney, A. J., Gach, H. M., & Holmen, S. L. (2011). Akt signaling is required for glioblastoma maintenance in vivo. *American Journal of Cancer Research*, 1(2).
- Romagnani, A., Rottoli, E., Mazza, E. M. C., Rezzonico-Jost, T., de Ponte Conti, B., Proietti, M., Perotti, M., Civanelli, E., Perruzza, L., Catapano, A. L., Baragetti, A., Tenedini, E., Tagliafico, E., Falzoni, S., Di Virgilio, F., Norata, G. D., Biciato, S., & Grassi, F. (2020). P2X7 receptor activity limits accumulation of T cells within tumors. *Cancer Research*, 80(18). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3807>
- Roman, S., Cusdin, F. S., Fonfria, E., Goodwin, J. A., Reeves, J., Lappin, S. C., Chambers, L., Walter, D. S., Clay, W. C., & Michel, A. D. (2009). Cloning and pharmacological characterization of the dog P2X7 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1513–1526. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00425.x>
- Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G., & Brat, D. J. (2006). “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: A familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00001>
- Roomi, M. W., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2017). Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5391>
- Rubio, A. J., Porter, T., & Zhong, X. (2020). Duality of B Cell-CXCL13 Axis in Tumor Immunology. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.521110>
- Ryu, J. K., Jantarantotai, N., Serrano-Perez, M. C., McGeer, P. L., & McLarnon, J. G. (2011). Block of purinergic P2X7R inhibits tumor growth in a c6 glioma brain tumor animal model. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(1), 13–22. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318201d4d4>
- Sabala, P., Czajkowski, R., Przybyłek, K., Kalita, K., Kaczmarek, L., & Barańska, J. (2001). Two subtypes of G protein-coupled nucleotide receptors, P2Y1 and P2Y2 are involved in calcium signalling in glioma C6 cells. *British Journal of Pharmacology*, 132(2). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703843>

- Sampetean, O., & Saya, H. (2013). Characteristics of glioma stem cells. *Brain Tumor Pathology*, 30(4). <https://doi.org/10.1007/s10014-013-0141-5>
- Sanz, J. M., Chiozzi, P., & Di Virgilio, F. (1998). Tenidap enhances P2Z/P2X7 receptor signaling in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 355(2–3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00482-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00482-8)
- Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., & Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.012>
- Sauvageot CM, Weatherbee JL, Kesari S, Winters SE, Barnes J, Dellagatta J, & Wen P. Y. C. (2009). Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro-Oncology*, 11, 109–121.
- Schachter, J., Motta, A. P., Zamorano, A. de S., da Silva-Souza, H. A., Guimarães, M. Z. P., & Persechini, P. M. (2008). ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *Journal of Cell Science*, 121(19), 3261–3270. <https://doi.org/10.1242/jcs.029991>
- Schmid, S., Kübler, M., Korcan Ayata, C., Lazar, Z., Haager, B., Hofffeld, M., Meyer, A., Cicko, S., Elze, M., Wiesemann, S., Zissel, G., Passlick, B., & Idzko, M. (2015). Altered purinergic signaling in the tumor associated immunologic microenvironment in metastasized non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 90(3), 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.10.005>
- Schöneberg, T., Hermsdorf, T., Engemaier, E., Engel, K., Liebscher, I., Thor, D., Zierau, K., Römpler, H., & Schulz, A. (2007). Structural and functional evolution of the P2Y12-like receptor group. *Purinergic Signalling*, 3(4), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9064-0>
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2000). Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Molecular Pharmacology*, 58(3), 477–482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953039>
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*, 15(9), 813–827. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00058-5)
- Schwarz, N., Drouot, L., Nicke, A., Fliegert, R., Boyer, O., Guse, A. H., Haag, F., Adriouch, S., & Koch-Nolte, F. (2012). Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041269>
- Sha, W. gang, Shen, L., Zhou, L., Xu, D. yu, & Lu, G. yuan. (2015). Down-regulation of miR-186 contributes to podocytes apoptosis in membranous nephropathy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 75, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.021>
- Shankavaram, U. T., Varma, S., Kane, D., Sunshine, M., Chary, K. K., Reinhold, W. C., Pommer, Y., & Weinstein, J. N. (2009). CellMiner: A relational database and query tool for the NCI-60 cancer cell lines. *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-277>
- Slater, M., Danieleto, S., Gidley-Baird, A., Teh, L. C., & Barden, J. A. (2004). Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolitic P2X7 receptors. *Histopathology*, 44(3), 206–215. <https://doi.org/10.1111/j.0309-0167.2004.01798.x>
- Slater, M., Danieleto, S., & Barden, J. A. (2005). Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium is a marker for early prostate cancer and correlates with increasing PSA levels. *Journal of Molecular Histology*, 36(3), 159–165. <https://doi.org/10.1007/s10735-004-6166-7>
- Slater, M., Danieleto, S., Pooley, M., Teh, L. C., Gidley-Baird, A., & Barden, J. A. (2004). Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(1), 1–10. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000010670.85915.0f>

- Slater, M., Scolyer, R. A., Gidley-Baird, A., Thompson, J. F., & Barden, J. A. (2003). Increased expression of apoptotic markers in melanoma. *Melanoma Research*, *13*(2), 137–145. <https://doi.org/10.1097/00008390-200304000-00005>
- Smart, M. L., Gu, B., Panchal, R. G., Wiley, J., Cromer, B., Williams, D. A., & Petrou, S. (2003). P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8853–8860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211094200>
- Soeda, A., Lathia, J., Williams, B. J., Wu, Q., Gallagher, J., Androutsellis-Theotokis, A., Giles, A. J., Yang, C., Zhuang, Z., Gilbert, M. R., Rich, J. N., & Park, D. M. (2017). The p38 signaling pathway mediates quiescence of glioma stem cells by regulating epidermal growth factor receptor trafficking. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16741>
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., & Gabel, C. A. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 125–132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>
- Soltoff, S. P., McMillian, M. K., & Talamo, B. R. (1989). Coomassie Brilliant Blue G is a more potent antagonist of P2 purinergic responses than Reactive Blue 2 (Cibacron Blue 3GA) in rat parotid acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *165*(3), 1279–1285. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92741-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92741-1)
- Song, Z., Wang, J., Su, Q., Luan, M., Chen, X., & Xu, X. (2021). The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, *87*(5). <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.10.009>
- Spildrejorde, M., Bartlett, R., Stokes, L., Jalilian, I., Peranec, M., Sluyter, V., Curtis, B. L., Skarratt, K. K., Skora, A., Bakhsh, T., Seavers, A., McArthur, J. D., Downton, M., & Sluyter, R. (2014). R270C polymorphism leads to loss of function of the canine P2X7 receptor. *Physiological Genomics*, *46*(14), 512–522. <https://doi.org/10.1152/physiol-genomics.00195.2013>
- Strong, A. D., Indart, M. C., Hill, N. R., & Daniels, R. L. (2018). GL261 glioma tumor cells respond to ATP with an intracellular calcium rise and glutamate release. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *446*(1–2), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3272-5>
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F., & Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *Journal of Neuroscience*, *26*(5). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006>
- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *GLIA*, *60*(7), 1106–1116. <https://doi.org/10.1002/glia.22338>
- Subauste, C. S., de Waal Malefyt, R., & Fuh, F. (1998). Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(4).
- Suh, B.-C., Kim, J.-S., Namgung, U., Ha, H., & Kim, K.-T. (2001). P2X 7 Nucleotide Receptor Mediation of Membrane Pore Formation and Superoxide Generation in Human Promyelocytes and Neutrophils . *The Journal of Immunology*, *166*(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6754>
- Sun, Y., & Huang, P. (2016). Adenosine A2B receptor: From cell biology to human diseases. *Frontiers in Chemistry*, *4*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00037>
- Suplat-Wypych, D., Dygas, A., & Barańska, J. (2010). 2', 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP-mediated calcium signaling in rat glioma C6 cells: Role of the P2Y2 nucleotide receptor. *Purinergic Signalling*, *6*(3), 317–325. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9194-7>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, *272*(5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Tafani, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., Raco, A., Salvati, M., De Maria, R., & Russo, M. A. (2011). Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *Journal of Neuroinflammation*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-32>

- Tafani, M., Russo, A., Di Vito, M., Sale, P., Pellegrini, L., Schito, L., Gentileschi, S., Bracaglia, R., Marandino, F., Garaci, E., & Russo, M. A. (2010). Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. *Cancer Science*, *101*(4), 1014–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01493.x>
- Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., & Kojima, S. (2014). Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. *Purinergic Signalling*, *10*(3), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9411-x>
- Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., & Kojima, S. (2012). Autocrine regulation of TGF- β 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, *125*(21), 5051–5060. <https://doi.org/10.1242/jcs.104976>
- Tamajusuku, A. S. K., Villodre, E. S., Paulus, R., Coutinho-Silva, R., Battasstini, A. M. O., Wink, M. R., & Lenz, G. (2010). Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.22478>
- Tan, C., Han, L., Zou, L., Luo, C., Liu, A., Sheng, X., & Xi, D. (2015). Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *10*(4), 1472–1478. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2705>
- Tanamachi, K., Nishino, K., Mori, N., Suzuki, T., Tanuma, S. I., Abe, R., & Tsukimoto, M. (2017). Radiosensitizing effect of P2X7 receptor antagonist on melanoma in vitro and in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *40*(6), 878–887. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00083>
- Tang, Y., Wang, Y., Park, K. M., Hu, Q., Teoh, J. P., Broskova, Z., Ranganathan, P., Jayakumar, C., Li, J., Su, H., Tang, Y., Ramesh, G., & Kim, I. M. (2015). MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovascular Research*, *106*(3), 387–397. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv121>
- Taylor, C. W., & Thorn, P. (2001). Calcium signalling: IP3 rises again... and again. *Current Biology*, *11*(9). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00192-0)
- Taylor, S. R. J., Gonzalez-Begne, M., Dewhurst, S., Chimini, G., Higgins, C. F., Melvin, J. E., & Elliott, J. I. (2008). Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death. *The Journal of Immunology*, *180*(1), 300–308. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.300>
- Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C. H., & Zheng, G. (2011). E-Cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/567305>
- Toki, Y., Takenouchi, T., Harada, H., Tanuma, S. I., Kitani, H., Kojima, S., & Tsukimoto, M. (2015). Extracellular ATP induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1 β , HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *458*(4), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.011>
- Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., Di Virgilio, F., & Zanetti, M. (2008). The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(45), 30471–30481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802185200>
- Tsuda, M., Toyomitsu, E., Komatsu, T., Masuda, T., Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Yamamoto, K., Ando, J., & Inoue, K. (2008). Fibronectin/integrin system is involved in P2X4 receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. *GLIA*, *56*(5). <https://doi.org/10.1002/glia.20641>
- Tu, G., Zou, L., Liu, S., Wu, B., Lv, Q., Wang, S., Xue, Y., Zhang, C., Yi, Z., Zhang, X., Li, G., & Liang, S. (2016). Long noncoding NONRATT021972 siRNA normalized abnormal sympathetic activity mediated by the upregulation of P2X7 receptor in superior cervical ganglia after myocardial ischemia. *Purinergic Signalling*, *12*(3), 521–535. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9518-3>

- Urbanek, E., Nickel, P., & Schlicker, E. (1990). Antagonistic properties of four suramin-related compounds at vascular purine P2X receptors in the pithed rat. *European Journal of Pharmacology*, 175(2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90232-U](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90232-U)
- Valdés-Rives, S. A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M. A., & González-Arenas, A. (2017). Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7403747>
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371(6497), 516–519. <https://doi.org/10.1038/371516a0>
- van Ommeren, R., Staudt, M. D., Xu, H., & Hebb, M. O. (2016). Advances in HSP27 and HSP90-targeting strategies for glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 127(2). <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2070-8>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Martínez-Ramírez, A. S., Robles-Martínez, L., Garay, E., García-Carranca, A., Pérez-Montiel, D., Castañeda-García, C., & Arellano, R. O. (2014). Paracrine Stimulation of P2X7 Receptor by ATP Activates a Proliferative Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(11), 1955–1966. <https://doi.org/10.1002/jcb.24867>
- Verhoef, P. A., Estacion, M., Schilling, W., & Dubyak, G. R. (2003). P2X7 Receptor-Dependent Blebbing and the Activation of Rho-Effector Kinases, Caspases, and IL-1 β Release. *The Journal of Immunology*, 170(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5728>
- Virginio, C., Church, D., North, R. A., & Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1285–1294. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00141-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00141-X)
- Von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Wada, T., & Penninger, J. M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23(16 REV. ISS. 2). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207556>
- Wang, L., Zhang, C., Zhang, Z., Han, B., Shen, Z., Li, L., Liu, S., Zhao, X., Ye, F., & Zhang, Y. (2018). Specific clinical and immune features of CD68 in glioma via 1,024 samples. *Cancer Management and Research*. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S183293>
- Wang, Y. C., Cui, Y., Cui, J. Z., Sun, L. Q., Cui, C. M., Zhang, H. A., Zhu, H. X., Li, R., Tian, Y. X., & Gao, J. L. (2015). Neuroprotective effects of brilliant blue G on the brain following traumatic brain injury in rats. *Molecular Medicine Reports*, 12(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3607>
- Wei, L., Caseley, E., Li, D., & Jiang, L. H. (2016). ATP-induced P2X receptor-dependent large pore formation: How much do we know? *Frontiers in Pharmacology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00005>
- Wei, W., Ryu, J. K., Choi, H. B., & McLarnon, J. G. (2008). Expression and function of the P2X7 receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Letters*, 260(1–2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.10.025>
- Wei, Y., Jiang, Y., Liu, Y., Zou, F., Liu, Y. C., Wang, S., Xu, N., Xu, W., Cui, C., Xing, Y., Cao, B., Liu, C., Wu, G., Ao, H., Zhang, X., & Jiang, J. (2013). Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.1217002110>
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, 359(5), 492–507. <https://doi.org/10.1056/nejmra0708126>
- Weng, T., Mishra, A., Guo, Y., Wang, Y., Su, L., Huang, C., Zhao, C., Xiao, X., & Liu, L. (2012). Regulation of lung surfactant secretion by microRNA-150. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 586–589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.030>
- White, N., Butler, P. E. M., & Burnstock, G. (2005). Human melanomas express functional P2X7 receptors. *Cell and Tissue Research*, 321(3), 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1149-x>

- Wilkaniac, A., Gąssowska, M., Czapski, G. A., Cieślak, M., Sulkowski, G., & Adamczyk, A. (2017). P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Purinergic Signalling*, *13*(3). <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9567-2>
- Wilson, H. L., Wilson, S. A., Surprenant, A., & Alan North, R. (2002). Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(37), 34017–34023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205120200>
- Wu, B., Zhang, C., Zou, L., Ma, Y., Huang, K., Lv, Q., Zhang, X., Wang, S., Xue, Y., Yi, Z., Jia, T., Zhao, S., Liu, S., Xu, H., Li, G., & Liang, S. (2016). LncRNA uc.48+ siRNA improved diabetic sympathetic neuropathy in type 2 diabetic rats mediated by P2X7 receptor in SCG. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *197*, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.04.001>
- Wu, P. Y., Lin, Y. C., Chang, C. L., Lu, H. T., Chin, C. H., Hsu, T. T., Chu, D., & Sun, S. H. (2009). Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cellular Signalling*, *21*(6), 881–891. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.036>
- Wu, W. S. (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, *25*(4). <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9037-8>
- Wypych, D., & Barańska, J. (2020). Cross-Talk in Nucleotide Signaling in Glioma C6 Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1202*, 35–65. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_3
- Wypych, D., & Pomorski, P. (2012). P2Y1 nucleotide receptor silencing and its effect on glioma C6 calcium signaling. *Acta Biochimica Polonica*, *59*(4). https://doi.org/10.18388/abp.2012_2115
- Xiao, Z. Z., Wang, Z. F., Lan, T., Huang, W. H., Zhao, Y. H., Ma, C., & Li, Z. Q. (2020). Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.01036>
- Xu, H., He, L., Liu, C., Tang, L., Xu, Y., Xiong, M., Yang, M., Fan, Y., Hu, F., Liu, X., Ding, L., Gao, Y., Xu, C., Li, G., Liu, S., Wu, B., Zou, L., & Liang, S. (2016). LncRNA NON-RATT021972 siRNA attenuates P2X7 receptor expression and inflammatory cytokine production induced by combined high glucose and free fatty acids in PC12 cells. *Purinergic Signalling*, *12*(2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9500-0>
- Xu, X., Wang, Y., Chen, Z., Sternlicht, M. D., Hidalgo, M., & Steffensen, B. (2005). Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Research*, *65*(1). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4313>
- Yan, Y., Xu, Z., Dai, S., Qian, L., Sun, L., & Gong, Z. (2016). Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *35*(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0303-5>
- Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q., & Núñez, G. (2015). Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*, *43*(5), 923–932. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.009>
- Yang, K., Liu, Y., Liu, Z., Liu, J., Liu, X., Chen, X., Li, C., & Zeng, Y. (2013). P38 γ overexpression in gliomas and its role in proliferation and apoptosis. *Scientific Reports*, *3*. <https://doi.org/10.1038/srep02089>
- Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P. A., & Junger, W. G. (2009). Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *The FASEB Journal*, *23*(6), 1685–1693. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126458>
- Young, C. N. J., Brutkowski, W., Lien, C. F., Arkle, S., Lochmüller, H., Zabłocki, K., & Górecki, D. C. (2012). P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: Relationship to pathology and potential target for treatment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01397.x>
- Young, C. N. J., Sinadinos, A., Lefebvre, A., Chan, P., Arkle, S., Vaudry, D., & Górecki, D. C. (2015). A novel mechanism of autophagic cell death in dystrophic muscle regulated by

- P2RX7 receptor large-pore formation and HSP90. *Autophagy*, *11*(1), 113–130. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.994402>
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 529–547. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>
- Yu, S. C., Xiao, H. L., Jiang, X. F., Wang, Q. L., Li, Y., Yang, X. J., Ping, Y. F., Duan, J. J., Jiang, J. Y., Ye, X. Z., Xu, S. L., Xin, Y. H., Yao, X. H., Chen, J. H., Chu, W. H., Sun, W., Wang, B., Wang, J. M., Zhang, X., & Bian, X. W. (2012). Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells*, *30*(2). <https://doi.org/10.1002/stem.1685>
- Yu, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Inoue, K., Kyaw Nyunt, A., Umemura, A., Mase, M., Yamada, K., & Shimada, S. (2008). Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Research*, *1194*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.064>
- Zanovello, P., Bronte, V., Rosato, A., Pizzo, P., & Di Virgilio, F. (1990). Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *The Journal of Immunology (1950)*, *145*(5), 1545–1550.
- Zhang, H. U. I., Ma, Y., Wang, H., Xu, L., & Yu, Y. (2019). MMP-2 expression and correlation with pathology and MRI of glioma. *Oncology Letters*, *17*(2). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9806>
- Zhang, W. jun, Zhu, Z. ming, & Liu, Z. xu. (2020). The role and pharmacological properties of the P2X7 receptor in neuropathic pain. *Brain Research Bulletin*, *155*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.11.006>
- Zhang, X. J., Zheng, G. G., Ma, X. T., Yang, Y. H., Li, G., Rao, Q., Nie, K., & Wu, K. F. (2004). Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leukemia Research*, *28*(12), 1313–1322. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.04.001>
- Zhang, Y., Ding, J., & Wang, L. (2019). The role of P2X7 receptor in prognosis and metastasis of colorectal cancer. *Advances in Medical Sciences*, *64*(2), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.05.002>
- Zhenjiang, L., Rao, M., Luo, X., Valentini, D., von Landenberg, A., Meng, Q., Sinclair, G., Hoffmann, N., Karbach, J., Altmannsberger, H. M., Jäger, E., Peredo, I. H., Dodoo, E., & Maeurer, M. (2018). Cytokine Networks and Survivin Peptide-Specific Cellular Immune Responses Predict Improved Survival in Patients With Glioblastoma Multiforme. *EBio-Medicine*, *33*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.014>
- Zhou, L., Luo, L., Qi, X., Li, X., & Gorodeski, G. I. (2009). Regulation of P2X7 gene transcription. *Purinergic Signalling*, *5*(3), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9167-x>
- Zhou, L., Qi, X., Potashkin, J. A., Abdul-Karim, F. W., & Gorodeski, G. I. (2008). MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(42), 28274–28286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802663200>
- Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q., & Liang, Z. (2011). Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *International Journal of Cancer*, *129*(11). <https://doi.org/10.1002/ijc.25975>
- Zhuang, W., Qin, Z., & Liang, Z. (2009). The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *41*(5). <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp028>
- Ziberi, S., Zuccarini, M., Carluccio, M., Giuliani, P., Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Caciagli, F., Di Iorio, P., & Ciccarelli, R. (2019). Upregulation of Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and P2X7 Receptors Is Associated to Increased Invasiveness Caused by P2X7 Receptor Stimulation in Human Glioblastoma Stem Cells. *Cells*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010085>
- Ziganshin, A. U., Hoyle, C. H. V., & Burnstock, G. (1994). Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Development Research*, *32*(3), 134–146. <https://doi.org/10.1002/ddr.430320303>

Zou, L., Tu, G., Xie, W., Wen, S., Xie, Q., Liu, S., Li, G., Gao, Y., Xu, H., Wang, S., Xue, Y., Wu, B., Lv, Q., Ying, M., Zhang, X., & Liang, S. (2016). LncRNA NONRATT021972 involved the pathophysiologic processes mediated by P2X7 receptors in stellate ganglia after myocardial ischemic injury. *Purinergic Signalling*, *12*(1), 127–137.
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9486-z>

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w pracach:

Matyśniak D., Chumak V., Nowak N., Kukla A., Lehka L., Oślisłok M., Pomorski P. (2021) P2X7 receptor: the regulator of glioma tumor development and survival. *Purinergic Signalling*

Matyśniak D., Nowak N., Chumak V., Pomorski P. (2020) P2X7 receptor activity landscape in rat and human glioma cell lines. *Acta Biochimica Polonica*

Doniesienia konferencyjne:

Lehka L., **Matyśniak D.**, Rędownicz M. J. Involvement of myosin VI in inflammatory process in skeletal muscles and myogenic cells. Virtual European Muscle Conference, 20-22.09.2021, Spotkanie wirtualne

Matyśniak D., Chumak V., Nowak N., Kukla A., Lehka L., Pomorski P. Involvement of P2X7 receptor in glioma cell growth and spreading. FEBS Young Scientists Forum, 15-18.06.2021, Spotkanie wirtualne

Pomorski P., Nowak N., **Matyśniak D.**, P2X7 receptor role in biology of rat and human glioma cell lines. The FEBS Congress 2019, 6-11.07.2019, Kraków, Polska

Matyśniak D., Chumak V., Nowak N., Lehka L., Pomorski P., P2X7 receptor may regulate glioma C6 tumor aggressiveness. ASCB/EMBO Meeting, 8-12.12.2018, San Diego, USA

Matyśniak D., Chumak V., Nowak N., Lehka L., Pomorski P., P2X7 receptor as tumor microenvironment regulator. XXIIst Gliwice Scientific Meetings, 16-17.11.2018, Gliwice, Polska

Topolewska M., **Matyśniak D.**, Chumak V., Rędownicz M. J. Myosin VI – a molecular motor protein engaged in myoblasts differentiation and function. 3rd PhD Conference of the Nencki Institute of Experimental Biology, 11-12.10.2018

Topolewska M., **Matyśniak D.**, Chumak V., Rędownicz M. J. Role of myosin VI in myoblast function and differentiation into myotubes. 47th European Muscle Conference, 30-03.09.2018, Budapeszt, Węgry

Matyśniak D., Chumak V., Nowak N., Lehka L., Pomorski P., P2X7 receptor as regulator of glioma C6 tumor aggressiveness. Brain Tumors Meeting 2018 - From Biology to Therapy, 21-23.06.2018, Warszawa, Polska

Matyśniak D., Nowak N., Pomorski P., P2X7 activation - death or rebirth of glioma C6 cells? 42nd FEBS Congress from Molecules to Cell and Back, 10-14.09.2017, Jerozolima, Izrael

Matyśniak D., Nowak N., Pomorski P., Hidden role of P2X₇ receptor in glioma C6 cells. Biomolecules and Nanostructures 6, 10-14.05.2017, Podlesice, Polska

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy doktorskiej zostały wykonane w ramach funduszy pochodzących z projektu badawczego pt. „Pozakomórkowe gradienty nukleotydów jako regulator ruchliwości glejaków”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki grant nr: 2015/17/B/NZ3/03771 oraz środków statutowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN.

Podziękowania

W szczególny sposób chciałbym podziękować promotorowi pracy, Panu dr hab. Pawłowi Pomorskiemu oraz promotorowi pomocniczemu Pani dr Virze Chumak za opiekę merytoryczną i praktyczną nad projektem, inspirujące dyskusje naukowe, bezcenne wsparcie podczas redagowania tekstu rozprawy oraz wszelką udzieloną pomoc.

Pragnę również serdecznie podziękować Pani Profesor Marii Jolancie Rędownicz za pomoc merytoryczną, nieocenione wsparcie mentalne oraz czuwanie nad sprawami formalnymi związanymi z niniejszą pracą.

Serdecznie dziękuję pracownikom Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN za fachową pomoc, życzliwość oraz pełną sympatii atmosferę, w której dane mi było prowadzić badania. Szczególne podziękowania kieruję do mgr Natalii Nowak.

Pragnę również podziękować Panu Profesorowi Rostyslavowi Stoice oraz Panu dr Rostyslavowi Panchukowi za umożliwienie wykonania doświadczeń na zwierzętach w Instytucie Biologii Komórki Ukrainskiej Akademii Nauk we Lwowie.