



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biofizyki i Biologii Nowotworów

Kraków, 5.12.2024

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pana mgr Bartosza Szymczaka
z tytułu
“Sygnalizacja purynergiczna w komórkach glejaka - badania *in vitro*
nad mechanizmami patologicznymi i możliwościami terapeutycznymi“
wykonanej pod kierunkiem
Pani dr hab. Katarzyny Roszek, prof. UMK
oraz promotora pomocniczego Pani dr Joanny Czarneckiej

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Dr hab. Agnieszka
Wolnicka-Głubisz, prof. UJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza Szymczaka jest zbiorem tematycznie spójnych trzech artykułów: dwóch opublikowanych w latach 2023-2024 w *International Journal of Molecular Sciences*, i *Cellular Signaling* oraz jednego przyjętego do publikacji w *BBA-Molecular Basis of Disease*, co wypełnia art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U. z 2021 r. poz. 478.

Rozprawa przygotowana w języku polskim składa się z dziesięciu rozdziałów obejmujących: Wykaz skrótów (2 strony), Streszczenie w języku polskim (2 strony), Streszczenie w języku angielskim (2 strony), Wstęp (7 stron), Cel badań (2 strony), Materiały i metody (6 stron), Omówienie wyników (5 stron), Podsumowanie i wnioski (1 strona), Literatura (69 pozycje), Oświadczenia o współautorstwie (1 strona).

We wstępie Autor krótko i zwięźle przedstawia stan wiedzy na temat glejaka wielopostaciowego oraz istniejących i alternatywnych metod terapii glejaka, w tym różnicowania komórek za pomocą kwasu retinowego oraz sygnalizacji purynergicznych z uwzględnieniem receptora P2X7 jako nowego celu terapeutycznego.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6526
fax +48(12) 664 69 02
email: a.wolnicka-
glubisz@uj.edu.pl

GBM jest najczęstszym pierwotnym nowotworem złośliwym mózgu, który zwykle kończy się śmiercią wkrótce po rozpoznaniu ze względu na szybki wzrost i agresywny charakter, dlatego praca doktorska pana mgr Szymczaka jest niezwykle aktualna i ważna. **Stan wiedzy w zakresie sygnalizacji w komórkach nowotworowych pozostaje nadal niepełny, stąd też wyniki badań uzyskane przez pana mgr Bartosza Szymczaka uważam za cenne, poszerzające aktualną wiedzę z zakresu biologii nowotworów.**

Badania te wpisują się też ściśle w aktualne kierunki badawcze, o czym świadczy m.in. finansowanie uzyskane z Narodowego Centrum Nauki w konkursie MINIATURA 3 na realizację projektu, którego kierownikiem była Pani dr Joanna Czarnecka oraz z UMK w Toruniu w ramach projektu „Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza”, w którym Doktorant pełnił rolę kierownika.

Autor formuje cztery cele:

1. Scharakteryzowanie zmian fizjologii komórek glejaka poddanych różnicowaniu, ze szczególnym uwzględnieniem zmian potencjału proliferacyjnego i migracyjnego;
2. Określenie różnic w funkcjonowaniu elementów sygnalizacji purynergicznej, w tym aktywności katalitycznej zewnątrzkomórkowych enzymów metabolizujących nukleotydy, poziomie ekspresji receptorów purynergicznych, a w szczególności izoform receptora P2X7 w komórkach glejaka poddanych procesowi różnicowania;
3. Zbadanie zmian w odpowiedzi fizjologicznej różnicowanych komórek na traktowanie ligandami receptora P2X7, w tym określenie efektu cytotoksycznego, zmian potencjału migracyjnego, a także aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych;
4. Porównanie i wyjaśnienie mechanizmu zmian efektu cytotoksycznego wywołanego przez chemoterapeutyki oraz przez chemoterapeutyki podawane wraz z ligandami receptora P2X7, w niezróżnicowanych i zróżnicowanych komórkach glejaka

Warto podkreślić, że wszystkie wymienione cele zostały realizowane.

Doktorant jako model badawczy wybrał trzy linie komórkowe glejaka: M059J i M059K pochodzące od tego samego pacjenta, ale, co

ważne, różniące się wrażliwością na cytostatyki i promieniowanie jonizujące, oraz A172, która podobnie jak T98G czy U87 należy do bardzo często wykorzystywanych linii komórkowych w badaniach tego nowotworu.

Część badań Doktorant zrealizował w Università degli Studi di Ferrara podczas dwóch krótkoterminowych staży, na które otrzymał dofinansowanie z UMK w Toruniu i programu Short-term Scientific Mission (PRESTO). **Należy zauważyć, że współpraca z innymi zespołami stanowi istotny element pracy badawczej Pana Szymczaka.**

Wyniki przedstawione w formie opisowej opierają się o dwie prace eksperymentalne, których Doktorant jest pierwszym autorem. Należy jednak zaznaczyć, że nie są to jedyne prace Doktoranta, który wg załączonego CV ma na swoim koncie jeszcze dwie inne prace doświadczalne.

Biorąc pod uwagę fakt, że stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej prace przeszły przez krytyczny systemem oceny *peer-review* podczas publikacji w recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, można być pewnym, że opublikowane badania są oryginalne, mają wpływ na rozwój dyscypliny naukowej i są zgodne z najlepszymi praktykami w danej dziedzinie.

W pracy przeglądowej z roku 2023 pt. *„The P2X7 Receptor in Oncogenesis and Metastatic Dissemination: New Insights on Vesicular Release and Adenosinergic Crosstalk.”* Autor opisuje aktualny stan wiedzy na temat roli receptora purynergicznego P2X7 w mikrośrodowisku guza, mechanizmy aktywowane przez P2X7 sprzyjające rozprzestrzenianiu się nowotworu, jak i zależne od P2X7 uwalnianie mikropęcherzyków i egzosomów, ich zawartości, w tym ATP i miRNA, oraz wpływ P2X7 na oś adenyloergiczną, tworzoną przez ektonukleotyduzy CD39 i CD73 oraz receptor adenylozyny A2A w raku.

W pracy badawczej z roku 2023 pt. *„Purinergic approach to effective glioma treatment with temozolomide reveals enhanced anti-cancer effects mediated by P2X7 receptor”* Autor wykazał, że proces różnicowania z wykorzystaniem kwasu retinowego jak i indukowane zmiany w systemie sygnalizacji purynergiczej zwiększają wrażliwość

komórek glejaka A172 na działanie chemoterapeutyku - temozolomidu, a efekt ten jest modulowany przez receptor P2X7. Co więcej, Autor poszerzył swoje badania o analizy *in silico*: uzyskał wysokiej jakości strukturę homologicznego receptora P2X7 o odwzorowanej kieszeni wiążącej ligand. Wykorzystując metody symulacji dokowania molekularnego Mgr Szymczak wykazał, że temozomolid wykazuje powinowactwo do kieszeni wiążącej ligand, i w stężeniu przewyższającym stężenie eATP, naturalnego liganda, może dojść do jego związania, co udowodnił także doświadczalnie w warunkach *in vitro*.

W pracy badawczej przyjętej do publikacji zatytułowanej „*Retinoic acid-induced alterations enhance eATP-mediated anti-cancer effects in glioma cells: Implications for P2X7 receptor variants as key players*” Autor obserwował, że różnicowanie indukowane kwasem retinowym zmniejsza potencjał proliferacyjny komórek glejaka (M059K i M059J) i zwiększa ich wrażliwość na cytotoksyczny wpływ eATP, a zmiany te są wspierane przez spadek aktywności ekto-nukleotydz i wzrost ekspresji P2X7R z wariantem splicingowym P2X7A jako dominującym, ale zależnym również od obecności wariantu P2X7B wspomagającego otwieranie porów. Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie aktywności pAKT, co może ograniczać zależną od pAKT sygnalizację proliferacyjną.

Do najważniejszych i jednocześnie bardzo ciekawych wyników pracy doktorskiej Pana mgr. Szymczaka zaliczyć należy:

- Wykazanie, że proces indukowanego różnicowania obniża potencjał proliferacyjny i migracyjny komórek glejaka oraz obniża aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów metabolizujących zewnątrzkomórkowe nukleotydy i podnosi ekspresję receptora P2X7;
- Wykazanie, że w efekcie różnicowania dochodzi do modulowanego przez P2X7 zwiększenia cytotoksycznego działania zewnątrzkomórkowego ATP, aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków PI3K/AKT indukowanej przewagą ilościową izoformy P2X7A nad P2X7B;

- Pokazanie, że różnicowanie zwiększa dostępność i działanie temozolomidu, co jest dodatkowo wzmacniane przez obecność ligandów receptorów purynergistycznych;
- Wykazanie, że strukturalne podobieństwo temozolomidu do naturalnych antagonistów receptora P2X7 umożliwia interakcję TMZ z kieszenią wiążącą ligand receptora i działanie TMZ jako antagonisty receptora

Wnioski i perspektywy są dobrym podsumowaniem pracy, choć szkoda, że Autor nie pokusił się o napisanie planu dalszych badań z wykorzystaniem przedstawionego w pracy modelu. Wydaje się, że możliwość wpływania na poziom ekspresji izoform receptora P2X7 i jego warunkowa oraz miejscowo specyficzna aktywacja może stanowić obiecujący cel terapeutyczny warty dalszych badań również na modelach przedklinicznych.

Uwagi

Opis metod powinien być taki, jak w publikacjach, czyli pełny.

W opisie metody Western blot brakuje opisu izolacji i pomiaru stężenia białka. Nie wiadomo, ile białka rozdzielano podczas analizy Western blot. Brakuje kontroli ładowania. Poza tym, Western blot jest metodą, a nie reakcją (str.23).

Jednym z testów wykorzystanych do oceny funkcjonalności receptora P2X7 jest test z wychwytem bromku etydyny. Brakuje informacji na jakiej zasadzie działa ten test. Jak przygotowano komórki do tego testu? Bromek etydyny wnika do komórek martwych o uszkodzonej błonie i interkaluje do DNA, co powoduje nawet 20-krotny wzrost intensywności jego fluorescencji.

Potencjał proliferacyjny oceniany jest przez liczenie komórek i analizę faz cyklu komórkowego. Czy niskie odchylenie standardowe wynika z powtórzeń technicznych? Szkoda, że nie wykonano testu z ki67 lub BrdU powszechnie stosowanych do oceny proliferacji komórek.

Potencjał migracyjny oceniony jest testem rysy, na który może wpływać też proliferacja komórek. Szkoda, że nie wykonano testu z użyciem transwell. Można by wtedy określić potencjał migracyjny i inwazyjny komórek.

Niewątpliwie słabą stroną tej części rozprawy doktorskiej jest brak wspólnej dyskusji wszystkich uzyskanych wyników. W opinii recenzenta jest to bardzo ważny rozdział, pomimo, że każda z publikacji posiada odrębną dyskusję. Dyskusja powinna zwierać koncepcje pracy naukowej i stanowić logiczne ich następstwo, dlatego też wskazuje czy Autor dysertacji potrafi w sposób spójny przedstawić wspólną analizę wszystkich uzyskanych wyników badań. Podjęcie próby przedyskutowania wszystkich zebranych wyników potwierdziłoby dojrzałość naukową Doktoranta.

Należy zaznaczyć, że przedstawione powyżej uwagi dotyczą w większości formy i sposobu opisu uzyskanych wyników, a nie aspektu merytorycznego omawianej pracy.

Uważam, że praca doktorska Pana mgr. Bartosza Szymczaka przedstawia oryginalne wyniki badań o dużym znaczeniu i jakości, wnosi istotne informacje na temat sygnalizacji nukleotydowej w terapii glejaka.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U.z 2021 r. poz. 478 i przedkładaam Wysokiej Radzie Naukowej w Dyscyplinie Nauk Biologicznych UMK w Toruniu wniosek o dopuszczenie Pana mgr Bartosza Szymczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ