



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. data: 10-05-2023
L.dz. 125

Katedra i Zakład Genetyki

prof. dr hab. Maria M. Sasiadek

Wrocław, 05. 05. 2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister

Marty Joanny Dratwy pt. „Zmienność genetyczna podjednostki katalitycznej telomerazy *TERT* w kontekście jej ekspresji i długości telomerów w modelu komórkowym *in vitro* oraz u pacjentów z chorobami nowotworowymi” przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu.

Rozprawa doktorska pani mgr Marty Joanny Dratwy jest wynikiem Jej badań nad znaczeniem klinicznym zmienności ekspresji genu *TERT* (powiązanej z występowaniem jego wariantów), długości telomerów i aktywności telomerazy u pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego (przewlekłą białaczką limfocytową i ostrą białaczką szpikową) oraz u pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego.

Autorka podjęła się badań nad tym problemem, gdyż mimo zidentyfikowanych licznych biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, wciąż nie są poznane w pełni mechanizmy molekularne, modulujące indywidualny przebieg choroby nowotworowej, a tym samym wciąż poszukiwane są kolejne markery dla lepszego przewidywania zarówno odpowiedzi na leczenie, jaki prognozowania przebiegu choroby.

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe zatytułowane „Zmienność genetyczna podjednostki katalitycznej telomerazy *TERT* w kontekście jej ekspresji i długości telomerów w modelu komórkowym *in vitro* oraz u pacjentów z chorobami nowotworowymi” stanowi cykl 5 publikacji (4 oryginalne i jedna przeglądowa) poświęconych temu zagadnieniu, opublikowanych w latach 2019 – 2022 w czasopismach o szerokim, międzynarodowym zasięgu (sumaryczny IF 22.108). W czterech spośród tych publikacji Doktorantka jest pierwszą, a w jednej drugą autorką.

W skład cyklu weszły następujące publikacje:

1. **Dratwa M**, Wysoczanska B, Tutlej E, Anisiewicz A, Maciejewska M, Wietrzyk J, Bogunia-Kubik K. Heterogeneity of telomerase reverse transcriptase mutation and expression, telomerase activity and telomere length across human cancer cell lines cultured *in vitro*. *Exp Cell Res*. 2020 Nov 1;396(1):112298. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112298. Epub 2020 Sep 21. PMID: 3297111

2. **Dratwa M**, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol.* 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. PMID: 33329574; PMCID: PMC7717964.
3. Wysoczańska B, **Dratwa M**, Gebura K, Mizgala J, Mazur G, Wrobel T, Bogunia-Kubik K. Variability within the human TERT gene, telomere length and predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Onco Targets Ther.* 2019 May 31;12:4309-4320. doi: 10.2147/OTT.S198313. PMID: 31239704; PMCID: PMC6551596.
4. **Dratwa M**, Wysoczańska B, Brankiewicz W, Stachowicz-Suhs M, Wietrzyk J, Matkowski R, Ekiert M, Szlachowska J, Maciejczyk A, Szajewski M, Baginski M, Bogunia-Kubik K. Relationship between Telomere Length, TERT Genetic Variability and TERT, TP53, SP1, MYC Gene Co-Expression in the Clinicopathological Profile of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 May 5;23(9):5164. doi: 10.3390/ijms23095164. PMID: 35563554; PMCID: PMC9102200.
5. **Dratwa M**, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol.* 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. PMID: 33329574; PMCID: PMC7717964.

Współautorzy artykułów złożyli oświadczenia, w których potwierdzili istotny wkład pani mgr Marty J. Dratwy w opracowanie koncepcji, realizację badań oraz przygotowanie manuskryptów (powyżej 40%).

Ocena rozprawy doktorskiej:

W obszernym wprowadzeniu zamieszczonym w Autoreferacie pani Dratwa szczegółowo omówiła teoretyczne podstawy oraz istniejący stan wiedzy w zakresie zagadnień, którymi zajęła się w swojej pracy badawczej.

Wprowadzenie rozpoczęła od omówienia znaczenia biologicznego telomerazy oraz jej kanonicznych i niekanonicznych funkcji. Nacisk położyła na omówienie znaczenia telomerów w utrzymaniu stabilności chromosomów i ich kluczowej roli w procesie replikacyjnego starzenia się komórek, a tym samym w regulacji przejścia komórek w apoptozę. Przedstawiła konsekwencje nieprawidłowo wznowionej ekspresji telomerazy i tym samym uzyskanie przez komórkę nieśmiertelność replikacyjnej, a także zwróciła uwagę, że w niektórych nowotworach utrzymanie długości telomerów przebiega z uruchomieniem alternatywnych mechanizmów utrzymania długości telomerów (telomere maintenance mechanisms, TMMs) lub za pomocą aktywacji obu mechanizmów jednocześnie. Ponadto omówiła krótko inne funkcje telomerazy w komórkach, jak np. regulacja procesów energetycznych w mitochondriach, szlaków przekazywania sygnałów i odpowiedzi na stres.

Kolejno, Doktorantka skupiła się na omówieniu genu *TERT*, jego struktury i mechanizmów działania. Podkreśliła, że obecnie uważa się, że czynnikiem regulującym aktywność telomerazy jest podjednostka katalityczna *TERT* oraz przedstawiła mechanizmy genetyczne i epigenetyczne regulacji aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych, skupiając się na szczegółowym przedstawieniu najczęstszych somatycznych mutacji *TERT* i mechanizmów epigenetycznej regulacji ekspresji genów, a w szczególności zjawiska hipermetylacji. Autorka podkreśliła, że mutacje genu *TERT* były rzadko identyfikowane w komórkach raka gruczołu piersiowego, jąder, jelit i ostrej białaczce szpikowej. Podczas omawiania epigenetycznego mechanizmu regulacji ekspresji genu *TERT* Doktorantka zwróciła uwagę na fakt, że w złośliwych guzach mózgu u dzieci, rdzeniakach i oponiakach hipermetylacja prowadzi do wzrostu ekspresji genu *TERT* (co stoi w sprzeczności z powszechnie znanym mechanizmem regulacji ekspresji genów poprzez hipermetylację promotorów). Zjawisko to zostało wyjaśnione, dzięki zidentyfikowaniu w 2017r przez Neri i wsp. regionu genu *TERT* (określonego jako „hipermetylowany obszar onkologiczny *TERT* - hypermethylated Oncological Region, THOR), którego hipermetylacja prowadzi do aktywacji te-

lomerazy. Pani Dratwa obszerny fragment wprowadzenia poświęciła szczegółowemu omówieniu szlaków sygnałowych o kluczowym znaczeniu w regulacji podstawowych funkcji życiowych komórek, jak proliferacja, migracja i różnicowanie komórek, w których zaangażowany jest gen *TERT*. Omówiła liczne geny biorące udział w regulacji (pozytywnej i negatywnej) genu *TERT* oraz liczne geny, regulowane przez ten gen. Kolejno, Autorka skupiła się na omówieniu zaburzeń ekspresji *TERT* w różnych postaciach białaczek. Jak przedstawiła, u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową pomiar długości telomerów może stanowić wczesny marker prognostyczny progresji choroby. Omawiając ostrą białaczkę mieloidalną (AML) zwróciła uwagę, że do klonalnej proliferacji i akumulacji niedojrzałych blastów prowadzą liczne i heterogenne zmiany molekularne w komórkach nowotworowych. Liczne spośród nich są wykorzystywane jako markery predykcyjne i prognostyczne. Nadekspresja genu *TERT*, obserwowana w komórkach AML koreluje z występowaniem nawrotów, gorszą odpowiedzią na leczenie, a tym samym gorszym rokowaniem. Jak wynika z badań różnych autorów, różne mogą być podstawy molekularne tych zjawisk. Kolejno, Autorka omówiła zaburzenia ekspresji telomerazy, opisywane w komórkach raka gruczołu piersiowego. Rak piersi jest jednym z najbardziej heterogennych genetycznie nowotworów i może występować jako zmiana sporadyczna lub na podłożu dziedzicznej predyspozycji. Autorka powołała się na najnowsze badania (Judasz, 2022), w których wykazano, że w prawidłowych komórkach gruczołu piersiowego nie występuje aktywność telomerazy, podczas gdy w komórkach nowotworów piersi aktywność telomerazy występowała, w zależności od histopatologicznego podtypu u 77-85% badanych. Ponadto, Doktorantka zwróciła uwagę, że liczni autorzy wskazują na korelacje pomiędzy długością telomerów a wielkością guza, przerzutami do węzłów chłonnych, stopniem złośliwości, a także że krótsze telomery występowały w komórkach guzów o wysokiej agresywności (potrójnie ujemnych i luminary B).

Podsumowując wprowadzenie, Autorka stwierdziła, że telomeraza, ze względu na zmienność jej aktywności, a także gen *TERT*, ze względu na jego zmienność molekularną mogą stanowić potencjalnie dobry cel terapeutyczny. Już obecnie są prowadzone badania nad takimi terapiami, oparte na kilku mechanizmach: hamowania telomerazy, wyciszania promotorów *TERT* lub *TERC*, choć jak dotychczas z umiarkowanie dobrym efektem.

Wprowadzenie stanowi zwięzłe, ale dokładne omówienie poruszanych w dysertacji zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorantka skupia się w swojej pracy badawczej. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres problemów, omówionych przez Autorkę, wskazujący że jest Ona bez wątpienia wysokiej klasy ekspertką w zakresie molekularnych podstaw transformacji nowotworowej, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych z utrzymanie stabilności telomerów i znaczeniu tej zmienności w procesie nowotworzenia, a także możliwościami klinicznego wykorzystania przedstawionej wiedzy.

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Dratwy był ocena znaczenia klinicznego zmienności molekularnej genu *TERT*, długości telomerów i aktywności telomerazy na podstawie badania pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, ostrą białaczką szpikową i pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego oraz w modelu *in vitro*.

W pierwszym etapie pracy badawczej pani mgr Dratwa przeprowadziła analizę korelacji pomiędzy występowaniem dwóch somatycznych mutacji genu *TERT*, ekspresją *TERT*, aktywnością telomerazy oraz długością telomerów. Badania zostały przeprowadzone na 27 ludzkich liniach komórkowych wśród których 11 pochodziło z komórek guzów litych, 13 z komórek nowotworów hematologicznych i 3 z komórek prawidłowych. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły Autorce i wsp. na stwierdzenie różnic pomiędzy liniami pochodzącymi z komórek nowotworów

hematologicznych i guzów litych – w 5 liniach pochodzących z komórek guzów litych stwierdzono mutacje somatyczne *TERT*. Wariantów tych nie stwierdzono w komórkach nowotworów hematologicznych. Komórki z mutacjami *TERT* charakteryzowały się krótszymi telomerami, niż komórki bez tych wariantów. Wykazano również zależność między ekspresją *TERT* a aktywnością telomerazy we wszystkich liniach komórek nowotworowych, ale korelacja między długością telomerów a ekspresją *TERT* obserwowana była jedynie w liniach nowotworów hematologicznych (Dratwa M, Wysoczańska B, Turlej E, Anisiewicz A, Maciejewska M, Wietrzyk J, Bogunia-Kubik K. *Heterogeneity of telomerase reverse transcriptase mutation and expression, telomerase activity and telomere length across human cancer cell lines cultured in vitro. Exp Cell Res. 2020 Nov 1;396(1):112298. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112298. Epub 2020 Sep 21. PMID: 3297111*).

Kolejno, Autorka i współpracownicy przeprowadzili badania nad zależnością pomiędzy długością telomerów i zmiennością *TERT* a ryzykiem zachorowania i przebiegiem klinicznym ostrej białaczki szpikowej (AML) w odniesieniu do znanych markerów prognostycznych takich, jak status mutacyjny *FLT3-ITD* i *NPM1*. Wykazali, że długość telomerów i polimorfizmy *TERT* korelują z ryzykiem choroby oraz jej przebiegiem. W oparciu o otrzymane wyniki, postawili tezę, że podczas ustalania prognozy przebiegu choroby, obok znanych czynników prognostycznych jak wiek pacjenta, liczba czerwonych krwinek i status mutacyjny *FLT3-ITD* i *NPM1* powinna być wzięta pod uwagę zmienność mutacyjna *TERT* oraz długość telomerów (Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. *TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. Front Immunol. 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. PMID: 33329574; PMCID: PMC7717964*).

W następnym etapie Doktorantka i wsp. przeprowadzili badania mające na celu wyjaśnienie, czy warianty genu *TERT* są powiązane z długością telomerów oraz przebiegiem choroby u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (CLL). Badania przeprowadzono w grupie 67 osób z rozpoznaną CLL przed rozpoczęciem leczenia. Kontrolę stanowiła grupa 238 zdrowych osób. Badano obecność 4 SNPs (polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, single nucleotide polymorphisms) w genie *TERT* oraz przeprowadzono analizę zmiennej liczby powtórzeń tandemowych (VNTR-MNS16A) i ocenę długości telomerów. Stwierdzono, że obecność wariantów w genie *TERT* jest powiązana zarówno z długością telomerów, jak i ryzykiem zachorowania na CLL (Wysoczańska B, Dratwa M, Gebura K, Miżgala J, Mazur G, Wróbel T, Bogunia-Kubik K. *Variability within the human TERT gene, telomere length and predisposition to chronic lymphocytic leukemia. Onco Targets Ther. 2019 May 31;12:4309-4320. doi: 10.2147/OTT.S198313. PMID: 31239704; PMCID: PMC6551596*).

W ostatnim oryginalnym artykule z cyklu pani mgr Dratwa i wsp. przedstawili wyniki badań nad zależnością pomiędzy długością telomerów, zmiennością genu *TERT*, co-ekspresją *TERT*, *TP53*, *SD1* i *MYC* oraz przebiegiem choroby u pacjentów z rakiem piersi. Autorzy wykazali, że niektóre spośród badanych wariantów genu *TERT* mają wpływ na długość telomerów, a ponadto mogą stanowić marker prognostyczny, związany ze stopniem inwazyjności guza (Dratwa M, Wysoczańska B, Brankiewicz W, Stachowicz-Subs M, Wietrzyk J, Matkowski R, Ekiert M, Szlachowska J, Maciejczyk A, Szajewski M, Baginski M, Bogunia-Kubik K. *Relationship between Telomere Length, TERT Genetic Variability and TERT, TP53, SP1, MYC Gene Co-Expression in the Clinicopathological Profile of Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2022 May 5;23(9):5164. doi: 10.3390/ijms23095164. PMID: 35563554; PMCID: PMC9102200*).

Ostatni artykuł z cyklu jest artykułem przeglądowym, w którym Autorki przedstawiły szczegółowo aktualną wiedzę dotyczącą genu *TERT*, mechanizmów jego zmienności (aberracje chromosomowe, mutacje regionu promotorowego oraz zmiany epigenetyczne jak zaburzenia wzoru metylacji oraz micro-RNA). Kolejno, Autorki omówiły funkcje genu *TERTp*, jako aktywatora transkrypcji. Podkreśliły, że *TERTp* zawiera liczne miejsca wiążące aktywatory i represory transkrypcji, które bezpośrednio lub pośrednio regulują ten proces. Zwróciły uwagę na fakt, że liczne ścieżki o kluczowym znaczeniu w procesie karcinogenezy regulują zarówno aktywność *TERT*, jak i długość telomerów. Omawiając szczegółowo zmienność genu *TERT* Autorki zwróciły uwagę na polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz polimorfizm liczby powtórzeń tandemowo-

wych i zaburzenia wynikające z alternatywnego splicingu (Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. *TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. Front Immunol. 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. PMID: 33329574; PMCID: PMC7717964*).

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka postawiła szereg istotnych wniosków, które stanowią nie tylko odpowiedź na zagadnienia, które postawiła sobie jako problemy do wyjaśnienia w trakcie pracy badawczej, ale też istotny wkład do rozwoju wiedzy w omawianym przedmiocie.

Do najważniejszych osiągnięć badawczych Doktorantki należy zaliczyć stwierdzenie, że linie komórek nowotworowych układu krwiotwórczego charakteryzują się wyższą ekspresją *TERT* i brakiem mutacji *TERTp* w porównaniu do linii komórkowych guzów litych oraz, że występują istotne korelacje pomiędzy ekspresją *TERT* a aktywnością telomerazy i długością telomerów, a zmienność *TERT* jest powiązana z przebiegiem choroby i całkowitym przeżyciem pacjentów z nowotworami hematologicznymi. Istotne jest również stwierdzenie przez Doktorantkę, że długość telomerów w liniach komórkowych guzów litych jest powiązana z obecnością wariantów somatycznych C228T i C250T genu *TERTp*, a także, że istnieją istotne zależności pomiędzy wybranymi SNP genu *TERT* i zmienną liczbą powtórzeń tandemowych VNTR-NMS16A a długością telomerów i amplifikacją *HER2* u kobiet z rakiem piersi. Należy podkreślić, że całościowe wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę i wsp. sugerują jednoznacznie, że zmienność genetyczna i ekspresja *TERT* a także długość telomerów stanowią potencjalne markery rokownicze dla pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego i guzami litymi.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka przeprowadziła badania dotyczące istotnych i aktualnych zagadnień i zastosowała nowoczesne metody badań molekularnych, dobrane właściwie dla realizacji celów badawczych. Uzyskała wyniki o istotnym znaczeniu badawczym i klinicznym.

Na podstawie analizy jej publikacji, przedstawionych do oceny, jako rozprawa doktorska należy jednoznacznie stwierdzić, że pani Dratwa wykazuje się ogromną wiedzą i umiejętnością analizy danych literaturowych oraz umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników.

Należy również podkreślić (mimo że zgodnie z obowiązującą Ustawą omówione poniżej osiągnięcia nie są poddawane ocenie podczas recenzowania rozprawy doktorskiej), pani mgr. M. J. Dratwa posiada istotny dorobek naukowy, poza przedstawionym do oceny cyklem, brała udział w realizacji projektów badawczych finansowanych przez NCN, jest współautorką licznych doniesień zjazdowych i była wyróżniona 4-krotnie za dorobek badawczy, stypendiami naukowymi w placówkach zagranicznych.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Marty Joanny Dratwy spełnia wymogi, stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie pani magister MJ Dratwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jej pracy nagrodą.

Chciałabym, w uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie dysertacji, podkreślić, że zarówno cel pracy Doktorantki, zakres i sposób przeprowadzonych badań, waga uzyskanych wyników oraz znaczenie opublikowanych artykułów znacznie przewyższają wymogi, jakie są stawiane rozprawom doktorskim.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA ZAKŁAD GENETYKI
kierownik
prof. dr hab. Maria M. Sasiadek