



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 641 83 03
www.ckdm.ump.edu.pl
blazejr@ump.edu.pl



Poznań, dn. 24.04.2023

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Marty Dratwy

„Zmienność genetyczna podjednostki katalitycznej telomerazy TERT w kontekście jej ekspresji i długości telomerów w modelu komórkowym *in vitro* oraz u pacjentów z chorobami nowotworowymi”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych.

Recenzję opracowano na podstawie materiałów dostarczonych przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Powierzona mi do recenzji praca była realizowana w laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik a promotorem pomocniczym dr Barbara Wysoczańska. Na dostarczone materiały składa się autoreferat oraz rozprawa doktorska przygotowana na podstawie pięciu prac – w tym czterech oryginalnych i jednej przeglądowej.

1. Znaczenie podjętych badań i realizowany problem naukowy

Tematyka pracy dotyczy badania diagnostycznego potencjału ludzkiej katalitycznej podjednostki telomerazy hTERT i telomerów w komórkach nowotworowych człowieka. Tym samym podjęty problem naukowy jest niezwykle aktualny i ambitny. Zakres ten wpisuje się w ogólnoswiatowe trendy badań naukowych jednej z najczęściej występujących chorób człowieka. Szczególnie wybór telomerazy wydaje się obiecujący. Choć prawdopodobnie należałoby podejść z nieco większym dystansem do nadziei związanych z cząsteczką,

a właściwie kompleksem, który został zidentyfikowany już ponad 30 lat temu. Należy jednak zaznaczyć, że sama podjednostka hTERT, rola mutacji w genie kodującym to białko, regulacja epigenetyczna jego ekspresji i lokalizacji komórkowej białka to wciąż jednak spora zagadka. Szczególnie w kontekście niekanonicznej roli telomerazy lub funkcji poszczególnych podjednostek kompleksu.

Do samego problemu roli podjednostki telomerazy w komórkach nowotworowych doktorantka podeszła w sposób kompleksowy i dobrze zaplanowany. Zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnych wymagało sprawności intelektualnej i manualnej. Zwłaszcza, że metody te tylko w rękach sprawnej osoby dają powtarzalne i wiarygodne wyniki, które przekładają się na spójne wnioski i możliwość opublikowania w renomowanych czasopismach. W swoich badaniach doktorantka posłużyła się m.in. metodami hodowli komórek pierwotnych, analizą PCR w czasie rzeczywistym, badaniami długości telomerów i analizą statystyczną uzyskanych wyników. Materiał badawczy stanowiły zarówno komórki ustalone, dostępne komercyjnie, jak i komórki pierwotne, co zasługuje na szczególne podkreślenie.

Oryginalny dorobek autorki polega na określeniu roli ekspresji i aktywności telomerazy, mutacji w genie kodującym podjednostkę katalityczną oraz długości telomerów jako unikatowych cech komórek nowotworowych i praktycznym wykorzystaniu tej wiedzy.

I tak w pierwszej pracy autorka w badaniach *in vitro* charakteryzuje 27 linii komórek ludzkich o różnej etiologii pod kątem wskazanych wyżej parametrów. Posługuje się przy tym bardzo sprawnie warsztatem metodycznym, zdolnością analitycznego myślenia i ostrożnego ale i kreatywnego wnioskowania. Choć różnorodność linii niesie za sobą ogromną rozbieżność wyników, daje to możliwość doboru stosownych linii, o zdefiniowanej charakterystyce molekularnej, do odpowiednich badań.

W drugiej pracy autorka dokonuje analizy długości telomerów oraz polimorfizmów i mutacji w genach hTERT, FLT3-ITD oraz NPM1 u pacjentów chorujących na ostrą białaczkę szpikową. Wydaje się, że zaobserwowane wyniki i korelacje z parametrami klinicznymi pozwalają na wnioskowanie o pewnej wartości prognostycznej tych parametrów.

Kolejna praca dotyczy analizy pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową pod kątem prognostycznej wartości polimorfizmów genu hTERT i długości telomerów. Wnioski wysunięte w pracy były ostrożne ale sugerowały udział tych parametrów w metabolizmie komórkowym, co może zbliżyć nas do poznania patogenezы choroby nowotworowej i skuteczniejszego jej leczenia.

Praca czwarta to analiza korelacji pomiędzy takimi parametrami jak długość telomerów, wariantów hTERT oraz ekspresji kilku istotnych dla metabolizmu komórek nowotworowych



genów tj. hTERT, TP53, SP1 i MYC u pacjentów z rakiem piersi. Te badania wydają się szczególnie ważne ze względu na istotną rolę tych parametrów jako potencjalnych markerów raka piersi.

I wreszcie ostatnia praca, przeglądowa, w sposób kompleksowy opisuje regulację i rolę hTERT w procesie karcinogenezy. Praca ta w sposób wyczerpujący, zarówno jeśli chodzi o tekst jak i o szatę graficzną, podsumowuje zakres wiedzy o potencjale aplikacyjnym w zakresie roli powiązania badanych parametrów z epigenetyką, stabilnością genomu czy regulacją transkrypcji.

Wnioskując po rozpiętości poruszanych w pracach zagadnień i realizowanych zadań badawczych, autorka zdobyła bardzo szeroką wiedzę i doświadczenie w zakresie biochemii i biologii molekularnej nowotworów. Realizacja założeń badawczych wymagała też zdobycia praktycznych umiejętności w zakresie doświadczeń eksperymentalnych. Szeroki zakres tematyczny i cytowane prace tworzą zwartą całość obejmującą najnowsze osiągnięcia nauki i świadczy o znajomości aktualnych problemów naukowych z obszaru chorób nowotworowych.

2. Ocena pracy

A) Ocena merytoryczna

Zagadnienia związane z nowotworami to zwykle wielowątkowe problemy i tak jest w przypadku przedmiotowej rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością skupienia się na konkretnym wątku dotyczącym telomerazy i telomerów. Wprowadzenie w tematykę zostało oparte o streszczenie. Tu warto byłoby doprecyzować, że telomeraza to nie tylko polimeraza DNA ale polimeraza DNA zależna od RNA, a więc odwrotna transkryptaza. Wydaje się również, że w świetle aktualnego stanu wiedzy to nie telomeraza a hTERT bierze udział w procesach związanych z aktywnością mitochondriów, odpowiedzią na leki czy procesami migracji i adhezji. Autorka twierdzi, że telomeraza uczestniczy w odnowie uszkodzonych tkanek, co kłóci się ze stwierdzeniem w innym miejscu o braku aktywności i ekspresji tego enzymu w komórkach (dokładniej w ich większości) prawidłowych. Co więcej, stwierdzenie dotyczące ekspresji enzymu jest sformułowaniem niefortunnym – należałoby raczej użyć sformułowania opisującego ekspresję poszczególnych podjednostek, które ulegają ekspresji w sposób niezależny. Należałoby również doprecyzować, że podstawowe zadanie telomerazy to raczej odbudowa niż wydłużanie telomerów – nawet jeśli jest to prawda dla pojedynczego cyklu replikacji to w ogólnym rozrachunku jest to przywracanie wyjściowej długości, a nie

wydłużanie telomerów. Może warto zdefiniować podjednostkę katalityczną telomerazy jako hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) a nie TERT.

Cele zostały zdefiniowane jasno aczkolwiek cel nr 2 możliwy byłby do przeprowadzenia jedynie przy pomiarach uwzględniających dynamikę zmian długości telomerów w czasie, a więc pod warunkiem analizy długości telomerów u poszczególnych pacjentów dla co najmniej dwóch punktów czasowych.

Badania przedstawione w jednej z prac odwołują się do organoidów ale trzeba przyznać, że publikacja w najmniejszym stopniu nie odnosi się do organoidów, a zastosowanie tego opisu wydaje się być nadużyciem. Samo pobranie komórek od pacjenta, a później hodowla ale w monowarstwie wydaje się przeczyć podstawowej i powszechnie znanej definicji organoidów, która odnosi się do hodowli w układzie trójwymiarowym, często na rusztowaniach.

Analiza długości telomerów powinna uwzględniać różnice pomiędzy pacjentami, z odniesieniem do momentu diagnozy i momentu pobrania materiału do badań – co uwzględnia dynamikę zmian długości telomerów w trakcie rozwoju choroby nowotworowej. Konkluzja dotycząca różnic w długości telomerów pomiędzy pacjentami AML w różnym wieku wydaje się niewystarczająco skomentowana. Informacja podana w streszczeniu odnośnie identyfikacji mutacji powinna być poparta liczbą przebadanych próbek/pacjentów - choć to tylko streszczenie to jednak jedna z kluczowych informacji.

Rozprawę stanowi 5 prac – w 4 z nich doktorantka jest pierwszą, a w jednej drugą autorką.

Co do uwag dotyczących samych prac:

Praca 1

Nie podano sekwencji starterów pozwalających na amplifikację hTERT. Nie ma uzasadnienia dla wyboru genu GAPDH jako genu referencyjnego. Czy badano jego stabilność?

Praca 2

Jak można wytłumaczyć obserwację dotyczącą krótszych telomerów u chorych niż u kontroli? Czy można zasugerować potencjalny mechanizm? Czy długość telomerów jest przyczyną czy skutkiem/efektem AML?

Praca 3

W tej pracy izolowano DNA z krwi pełnej obwodowej - 5 ml krwi pełnej do izolacji DNA to bardzo, bardzo dużo. Nie ma natomiast informacji jaka objętość krwi była analizowana u kontroli.

Praca 4

W materiałach i metodach jest mowa o organoidach ale wydaje się to być sprzeczne z powszechnie znaną definicją tej formy hodowli komórek.

Praca 5

Czy w świetle dotychczasowych badań na pewno można uznać hTERT jako białko przyczyniające się do rozwoju nowotworu? Czy indukcja hTERT jest raczej konsekwencją (zjawiskiem towarzyszącym) tego procesu?

B) Autoreferat

Autoreferat zawiera informatywne i rzeczowe wprowadzenie, które odpowiednio uzasadnia podjęte działania. Wydaje się jedynie, że określenie „zdrowe tkanki” powinno być zastąpione sformułowaniem „tkanki prawidłowe”. Ta część zawiera bardzo dobre podsumowanie, dobry schemat. W kwestii nomenklatury należy zwrócić uwagę na fakt, że prawidłowe określenie to rak płuca a nie płuc. Epidemiologia schorzenia została opisana rzeczowo i wyczerpująco oraz została poparta bardzo dobrym przeglądem literatury. Wydaje się, że cytowanie pracy na stronie nr 25 jest o tyle niestosowne, że nie jest to praca oryginalna/źródłowa. Bardzo ciekawym zagadnieniem jest korelacja krótszych telomerów z występowaniem agresywnych podtypów molekularnych raka piersi? Czy znany jest mechanizm tej zależności?

Omówienie wyników badań:

Praca 1 – bardzo dobry opis.

Praca 2 – pozostaje pytanie czy zmienność genetyczna hTERT wpływa czy raczej koreluje z przeżyciem i ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej?

Praca 3 – bardzo dobry opis.

Praca 4 – bardzo dobry opis. Podano liczbę pacjentek, której to wartości brakowało w streszczeniu.

Odnosnie podsumowania

Punkt 2 – powstaje pytanie czy mutacja wpływa na długość telomerów?

Punkt 6 – „występowanie zależności pomiędzy analizowanymi genami w organoidach” – należy doprecyzować to sformułowanie – (...) pomiędzy ekspresją analizowanych genów.

C) Strona formalna

Praca napisana bardzo sprawnie, opatrzona istotnie wzbogacającymi treść rycinami. Stosowne oświadczenia – trudno powiedzieć z jakiego powodu są w języku angielskim? Jasno wskazują

jednak na wiodącą rolę w planowaniu i realizacji badań. Bibliografia została przygotowana prawidłowo i obejmuje najnowsze publikacje w temacie.

Należy wspomnieć, że w wykazie zabrakło adnotacji dotyczącej punktacji poszczególnych czasopism.

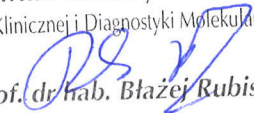
3. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni odpowiada wymogom pracy na stopień doktora określonym w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261).

Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Dratwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Co więcej, w związku z bardzo istotnym wkładem w zakres wiedzy dotyczącej metabolizmu komórek nowotworowych i opublikowaniem wyników pracy w wysoko punktowanych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik Katedry i Zakładu
Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

Prof. dr hab. Błażej Rubiś



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII KLINICZNEJ I DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 641 83 03
www.ckdm.ump.edu.pl
blazejr@ump.edu.pl

Poznań, dn. 25.04.2023

OPINIA

Dotycząca rozprawy doktorskiej mgr Marty Dratwy

„Zmienność genetyczna podjednostki katalitycznej telomerazy TERT w kontekście jej ekspresji i długości telomerów w modelu komórkowym *in vitro* oraz u pacjentów z chorobami nowotworowymi”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych.

Recenzję opracowano na podstawie materiałów dostarczonych przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Powierzona mi do zaopiniowania praca była realizowana w laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik a promotorem pomocniczym dr Barbara Wysoczańska. Na dostarczone materiały składa się autoreferat oraz rozprawa doktorska przygotowana na podstawie pięciu prac – w tym czterech oryginalnych i jednej przeglądowej.

W pracy postawiono jak najbardziej uzasadnioną tezę dotyczącą możliwości wykorzystania telomerazy, ekspresji jej katalitycznej jednostki oraz wariantów genetycznych jako potencjalnych markerów nowotworowych.

Doktorantka zaplanowała i wykonała szereg badań *in vitro* ale i na materiale pochodzącym od pacjentów z chorobami nowotworowymi. Wymagało to szerokiego doświadczenia praktycznego i wiedzy teoretycznej. Oryginalność osiągnięcia polega na pozytywnej korelacji ocenianych parametrów z charakterystyką kliniczną pacjentów. W efekcie uzyskane wyniki mogą

się przyczynić do wytyczenia nowych potencjalnych markerów nowotworowych w raku piersi i białaczkach. Realizacja założeń pracy wymagała od doktorantki integracji wiedzy klinicznej i molekularnej w zakresie najnowszych osiągnięć naukowych w tych dziedzinach.

Podsumowując stwierdzam, że praca stanowi udokumentowanie umiejętności kreatywnego działania doktorantki w zakresie planowania i realizacji zadań badawczych i wyrażam pozytywną opinię o przedstawionej mi do recenzji rozprawie. W związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu opinię niniejszej rozprawy.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik Katedry i Zakładu
Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej


Prof. dr hab. Błażej Rubiś