

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Deręgowskiej
pt.: „Ocena kompleksu telomerowego jako potencjalnego czynnika prognostycznego i/lub
predykcyjnego w przewlekłej białaczce szpikowej”,
w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Nauk
Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Praca doktorska została przygotowana w Instytucie Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz Zakładzie Immunologii i Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. prof. UR Macieja Wnuka, przy współdziałaniu jako promotora pomocniczego prof. dr n. med. Tomasza Stokłosa. Praca została przygotowana w formie manuskryptu zalecanego dla prac promocyjnych. Recenzent uznaje niniejszą rozprawę jako bardzo dobrą, co wynika z problematyki realizowanej przez Autorkę.

Rozprawę rozpoczyna **Spis treści** liczący pięć stron. Następnie zamieszczono **Wykaz skrótów** obejmujący również pięć stron, jest to ważna część rozprawy, ponieważ wprowadzone skróty ułatwiają czytanie. Kolejne rozdziały to **Streszczenie** w języku polskim i angielskim.

Rozdział **Wstęp** liczy 25 stron, zawiera cenne informacje dotyczące przewlekłej białaczki szpikowej i jej podłoża molekularnego. Już rycina pierwsza dotycząca chromosomu Filadelfia przywołuje mi wspomnienie o stażu naukowym w Chicago, podczas którego poznałem panią Janet D. Rowley, której mężem był mój ówczesny szef Donald Rowley. Należy jednak zaznaczyć, że mechanizm molekularny powstawania translokacji wzajemnej *de novo* wciąż nie jest w pełni poznany. We Wstępie Doktorantka porusza także kliniczne cechy przewlekłej białaczki szpikowej oraz rolę kinazy BCR/ABL1 w procesach komórkowych. Informacje zawarte we Wstępie wspierane są interesującymi rycinami. Doktorantka wskazuje na możliwości leczenia przewlekłej białaczki szpikowej, które są bardzo ograniczone i mogą prowadzić do ciężkich powikłań. Odpowiedź na leczenie określa się na trzech poziomach: hematologicznym, cytogenetycznym i molekularnym. Końcowa część Wstępu dotyczy telomerów i podsumowuje w tabeli informacje dotyczące białek towarzyszących komponentom kompleksu telomerowego wraz z ich funkcją. Jak można było przewidzieć, Wstęp kończy się informacjami na temat struktury i funkcji telomerazy, jak również mechanizmami wydłużania telomerów. Rozdział Wstęp uznaję za dobrze napisany, wnoszący do rozprawy cały szereg kluczowych informacji, bardzo przydatny w czytaniu rozprawy.

Rozdział **Założenia i cel pracy** przedstawiony jest na dwóch stronach. Doktorantka uzasadnia dlaczego postanowiła realizować właśnie taki cel badań i wymienia pięć głównych hipotez badawczych. Dzięki temu możliwe było wskazanie, że celem ogólnym rozprawy było określenie zaangażowania poszczególnych białek kompleksu telomerowego w dynamikę długości telomerów, w przewlekłej białaczce szpikowej. Autorka zdecydowała się podzielić cele szczegółowe na trzy etapy, z których każdy obejmuje część poznawczą, przetworzenie uzyskanych informacji i wskazanie potencjalnych markerów. Cele uważam za ambitne, trudne do realizacji ze względu na olbrzymi zakres podjętych prac.

Rozdział **Materiały** został przedstawiony na siedmiu stronach. Autorka charakteryzuje odczynniki chemiczne, odczynniki do hodowli komórkowych, zestawy komercyjne, przeciwciała, pozostałe odczynniki a także materiały jednorazowe i aparaturę. Materiał kliniczny został zgromadzony przez zespół prof. Tomasza Stokłosa z Zakładu Immunologii i Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zgodę na prowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz Komisja Bioetyczna przy Instytucie Hematologii i Transfuzjologii. Korzystano zarówno z materiału pochodzącego od chorych jak i linii komórkowych.

Rozdział **Metody** jest rozdziałem rozległym i liczy 28 stron. Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje stosowane metody począwszy od hodowli komórek CD34+, poprzez hodowle linii komórkowych, hodowle komórek z inhibitorem kinazy tyrozynowej (IKT), aż do oceny liczby i żywotności komórek oraz czystości hodowli. Kolejne opisy dotyczą izolacji genomowego DNA z krwi i z linii komórkowych, a także pozyskiwania RNA. Po pozyskaniu RNA została przeprowadzona reakcja odwrotnej transkrypcji. Kolejnym etapem opisanym przez Doktorantkę jest diagnostyka przewlekłej białaczki szpikowej i oznaczenie długości telomerów. Do analizy długości telomerów w komórkach CD34+ wykorzystano zestaw Telomere PNA FISH Kit. Aktywność telomerazy została oceniona metodą ELISA-PCR. Jak można było oczekiwać, Doktorantka przedstawiła fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* jako metodę wykrywania zmian chromosomowych, a rozdział Metody zamyka część proteomiczna prowadzonych badań. Wykonano analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR, analizę ekspresji białka metodą Western blot i immunofluorescencyjną detekcję białek. W ten sposób Autorka poinformowała o zastosowaniu szerokiego wachlarza badań molekularnych, obejmującego przegląd dostępnych współcześnie metod badawczych. Ponadto znalazła jeszcze miejsce na analizę uszkodzeń DNA metodą kometową, testem mikrojądrowym, określenie poziomu reaktywnych form tlenu i wykrywanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Po włączeniu analizy fenotypu metabolicznego komórek wspomniała, że Doktorantka dołożyła wszystkich

starań, aby spełnić założone cele przyczyniając się do oceny podłoża molekularnego przewlekłej białaczki szpikowej.

Rozdział **Wyniki** liczy 48 stron i został podzielony na trzy bloki obejmujące: 1) Ocenę zmian długości telomerów, ekspresji białek kompleksu telomerowego oraz aktywności telomerazy w odniesieniu do poziomu ekspresji *BCR/ABL1* w komórkach CD34+ izolowanych od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową; 2) Charakterystykę mechanizmów wpływających na długość telomerów w komórkowym modelu kryzy blastycznej oraz 3) Ocenę działania inhibitora kinazy tyrozynowej na zmiany w obszarach telomerowych w oparciu o model komórkowy przewlekłej białaczki szpikowej. Zagadnienia te ściśle odpowiadają założonym celom.

W badaniach Doktorantka wykorzystała 78 próbek pochodzących od chorych ze zdiagnozowaną przewlekłą białaczką szpikową w różnych stadiach choroby. We wszystkich próbkach wykazała obecność genu fuzyjnego *BCR/ABL1* metodą RT-PCR oraz FISH, a komórki chorych w fazie kryzy blastycznej wykazały istotne statystycznie zwiększenie ekspresji transkryptu *BCR/ABL1* w porównaniu z fazą przewlekłą. Zmiany nie były obserwowane na poziomie aktywności białka fuzyjnego BCR/ABL1. Autorka wykazała istotne statystycznie skracanie telomerów w komórkach chorych z przewlekłą białaczką szpikową wraz z ekspresją *BCR/ABL1*, szczególnie w fazie kryzy blastycznej. Nie wykazano natomiast korelacji długości telomerów z ekspresją i aktywnością telomerazy. Z kolei zaobserwowano silną dodatnią korelację między ekspresją *BCR/ABL1* a ekspresją kilku genów kompleksu telomerowego (*RAP1*, *TNKS1*, *TRF2*, *TNKS2*) u chorych. Ciekawą obserwację stanowi wskazanie wydłużania telomerów w komórkach CD34+ pacjentów w momencie wykrycia oporności na leczenie inhibitorami kinazy tyrozyny w porównaniu z fazą przewlekłą.

Druga część wyników odnosi się do komórkowego modelu kryzy blastycznej, w którym wykorzystano linie komórkowe z aktywną kinazą BCR/ABL1: MEG-A2, MOLM-1, LAMA-84, K562, KU-812 oraz jako kontrolę linię ostrej białaczki promielocytarnej HL-60. Za wyjątkiem komórek kontrolnych potwierdziła występowanie zrównoważonej translokacji t(9;22) (q34;q11), a liczba fuzji *BCR/ABL1* wykazywała dużą zmienność. Zaobserwowała dużą zmienność liczby kopii genu *JAK2*, między liniami oraz dużą heterogenność wewnątrz linii. Najwyższa aktywność kinazy BCR/ABL1 została zaobserwowana dla linii K-562, a najniższa dla linii KU-812. Wykazano silną dodatnią korelację między poziomem ekspresji genu *BCR/ABL1* a długością telomerów ($r=0,8$) oraz aktywnością kinazy BCR/ABL1 a długością telomerów ($r=0,81$). Również potwierdzono, że

ekspresja i aktywność telomerazy nie wpływają na utrzymanie długości telomerów w komórkowym modelu kryzy blastycznej. Natomiast poziom białek kompleksu telomerowego wpływa na długość telomerów i jest częściowo zależny od aktywności kinazy BCR/ABL1. Alternatywny mechanizm wydłużania telomerów związany z lokalizacją jądrowych ciałek białaczki promielocytarnej (PML) w okolicach struktur telomerowych zaobserwowano wyłącznie w linii K-562. W związku z silnym zapotrzebowaniem komórek nowotworowych na energię i glukozę, Doktorantka wykazała podwyższony poziom białka GLUT1 odpowiedzialnego za transport glukozy do komórki, istotnie statystycznie wyższy poziom ufosforylowania kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) oraz wyższy poziom produkcji ATP w stosunku do linii HL-60, za wyjątkiem linii KU-812. Zaobserwowano istotne statystycznie korelacje ekspresji białka GLUT1 i długości telomerów oraz ufosforylowanej formy AMPK i długości telomerów. Doktorantka wykazała istotnie statystycznie wzrost reaktywnych form tlenu monitorowanych sondą MitoSOX dla mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego w porównaniu z linią kontrolną HL-60. Zaobserwowała jednocześnie wysoki poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej 1 SOD1 w stosunku do kontroli, co umożliwia ograniczenie wzrostu reaktywnych form tlenu podczas stresu egzogenego. Wskazała wzrost poziomu karbonylacji białek oraz agregatów białkowych związanych z nieenzymatycznymi potranslacyjnymi modyfikacjami białek, szczególnie dla linii MOLM-1. Poziom końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE) korelował ze skracaniem telomerów. Doktorantka nie zaobserwowała podwyższonego poziomu uszkodzeń DNA w komórkach BCR/ABL1 pozytywnych względem kontroli HL-60, przy czym poziom uszkodzeń był zróżnicowany w analizowanych liniach.

Trzecia część wyników została poświęcona wpływowi imatynibu jako inhibitora kinazy tyrozynowej na sekwencje telomerowe w komórkowym modelu przewlekłej białaczki szpikowej. Badania przeprowadzono na dwóch liniach modelowych kryzy blastycznej K-562 oraz MEG-A2 w odniesieniu do kontrolnej linii HL-60. Doktorantka wyselekcjonowała linie odporne na imatynib. W liniach wrażliwych imatynib obniżał poziom ekspresji *BCR/ABL1*. Zaobserwowała zmiany potencjału proliferacyjnego komórek BCR/ABL1 pozytywnych monitorowanych na poziomie komórkowym, a także markerów Ki67 i białka p21. Na długość telomerów w komórkach opornych na imatynib nie wpływają białka telomerazowe. Z kolei poziom ekspresji białek kompleksu telomerowego w komórkach opornych na działanie imatynibu zmienia się w zależności od długości hodowli z imatynibem. Podobnie mechanizm alternatywnego wydłużania telomerów ALT oraz telomerowe powtórzenia RNA *TERRA* są związane z utrzymaniem długości telomerów w komórkach opornych na imatynib.

Niezależnie od obecności imatynibu w liniach *BCR/ABL1* pozytywnych wraz z czasem hodowli, zaobserwowano nagromadzenie uszkodzeń genomu. Dochodzi również do zmiany metabolizmu w obecności imatynibu. Doktorantka wykazała obniżenie poziomu *RAP1* w komórkach opornych na imatynib oraz zróżnicowanie poziomu potranslacyjnych nieenzymatycznych modyfikacji białka *RAP1* w komórkach *BCR/ABL1*-pozytywnych.

Rozdział **Dyskusja** liczy 18 stron i został przygotowany zgodnie z założeniem, aby wszystkie poruszane kwestie znalazły swoje odniesienie w dyskusji. Jest to zgodne z większością rozpraw doktorskich, jednakże w przypadku niniejszej rozprawy, rozdział ten został przygotowany bardzo starannie. Logicznie odnosi się do wyników badań. Wskazuje, że badania rozpoczęto od charakterystyki profilu ekspresji *BCR/ABL1* w komórkach CD34+, u wszystkich badanych chorych onkogen *BCR/ABL1* wykazywał aktywność transkrypcyjną, zwiększającą się wraz z progresją choroby. Komórki przewlekłej białaczki szpikowej wykazują podwyższoną niestabilność genetyczną, prowadząc do aberracji chromosomowych. Ponadto, obserwuje się krótsze długości telomerów. Autorka uważa, że bardzo przydatną metodą w realizacji rozprawy okazała się technika Southern blot oraz połączenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z cytometrią przepływową. Ciekawa obserwacja związana była ze zwiększeniem długości telomerów u chorych z opornością na inhibitor kinazy tyrozynowej. Autorka nie zaobserwowała zmian ekspresji telomerazy na poziomie ekspresji i liczby kopii genu *TERT*, natomiast zależności wystąpiły w przypadku wybranych białek kompleksu telomerowego. Ważną część dyskusji stanowi ocena poziomu reaktywnych form tlenu oraz poziomu karbonylacji białek wraz z ich mechanizmami. Doktorantka odnosi się również do markerów niestabilności genetycznej, terapii imatynibem czy zwiększonej ekspresji składników kompleksu telomerowego korelującej z ekspresją *BCR/ABL1*. Część dyskusji poświęcona została znaczeniu procesu glikacji oraz stresu metabolicznego. Dyskusję uważam za bardzo dobrze opracowaną.

Rozdział **Podsumowanie i wnioski** obejmuje dwie strony. Doktorantka uważa, że zmiany w kompleksie telomerowym mają kluczowe znaczenie dla dynamiki zmian długości telomerów w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej. Skracaniu telomerów towarzyszy wzrost ekspresji *RAP1* oraz wzrost produktów glikacji białek. W dość nietypowy sposób Autorka przedstawia w podsumowaniu i wnioskach rycinę. Oczywiście nie wpływa to ogólny kształt wniosków, których w sumie zamieszcza siedem. Autorka dobrze podzieliła wnioski, które odzwierciedlają główne odkrycia. Dotyczą one monitorowania, molekularnej patogenezы, zastosowania imatynibu w leczeniu, wskazania kluczowej roli białek kompleksu telomerowego w utrzymaniu stabilności i długości telomerów oraz nabywaniu oporności na

IKT. Kolejne wnioski dotyczą zależności długości telomerów od aktywności kinazy tyrozynowej BCR/ABL1. Piąty wniosek dotyczy obniżenia poziomu ekspresji TRF2-RAP1, a szósty akumulacji zaawansowanych produktów glikacji białek. Substancje wpływające na metabolizm komórkowy mogą być w przyszłości rozpatrywane jako leczenie wspomagające. Wnioski są przedstawione bardzo zwięźle i nie mam do nich zastrzeżeń, jednakże Doktorantka nie uwzględniła w nich wyników badań, które prezentuje na końcu rozdziałów Metody i Wyniki.

Bibliografia przedstawiona jest na 13 stronach obejmuje 277 pozycji. Jeśli Autorka wszystkie z nich przeczytała, to należą się Jej gratulacje. Niemniej, stanowią one bardzo ciekawy zbiór dla badaczy i personelu medycznego, zajmującego się badaniami o podobnej tematyce.

Wniosek końcowy. Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne magister Annie Deręgowskiej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz 1669 z późn. zm.).

Ze względu na opracowanie bardzo szerokiej problematyki związanej z diagnostyką i poszukiwaniem markerów przewlekłej białaczki szpikowej zgłaszam **wniosek o wyróżnienie rozprawy**. Wyróżnienie uzasadniam uzyskaniem bardzo wartościowych wyników przy zastosowaniu nowoczesnej metodyki. W toku realizacji Autorka przygotowała lub uczestniczyła w przygotowaniu 18 publikacji, których łączny *impact factor* przekracza 70 a liczba punktów ministerialnych wynosi 875. Stawia to Jej parametry bibliometryczne bardzo wysoko i nieczęsto spotykane. Właściwie dane bibliometryczne są na poziomie postępowań habilitacyjnych, o czym mogę poświadczyć pełniąc funkcję członka CK przez osiem lat. Praca jest bardzo ładnie przygotowana, z odpowiednio opracowanymi rycinami co podkreśla walory rozprawy.

Z-ca DYREKTORA
Instytutu Genetyki Człowieka PAN

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Słomski

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Słomski