

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

## **STRESZCZENIE**

Telomeraza to polimeraza DNA zaangażowana w utrzymanie długości telomerów, proliferację komórek macierzystych i nowotworowych, apoptozę czy odnowę uszkodzonych tkanek. Komórki linii płciowej, krypty jelitowe, hepatocyty, komórki macierzyste, aktywowane limfocyty T i B oraz komórki zarodkowe charakteryzują się stałym wysokim poziomem aktywności telomerazy, natomiast nie identyfikuje się ekspresji tego enzymu w komórkach somatycznych. Cechą większości komórek nowotworowych jest aktywacja telomerazy, która umożliwia im osiągnięcie stanu nieograniczonej proliferacji. Telomeraza jest holoenzymem o właściwościach odwrotnej transkryptazy, której integralnym składnikiem jest matryca RNA (ang. *telomerase RNA component*; *TERC*), podjednostka katalityczna telomerazy (ang. *telomerase reverse transcriptase*; *TERT*) oraz kompleks sześciu białek nazywanych szelteryną (ang. *shelterin*). Podstawowym zadaniem telomerazy jest wydłużanie końców 3' chromosomów poprzez dodawanie powtarzającej się sekwencji sześciu nukleotydów (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>, które tworzą odcinki nazywane telomerami. Chromosomy pozbawione telomerów mogą łączyć się ze sobą w nieprawidłowy i niekontrolowany sposób, co w konsekwencji przekłada się na niestabilność genomową i pojawienie się zmian w kariotypie. Enzym ten pełni też szereg funkcji niekanonicznych, wśród których należy wymienić m.in.: kontrolę procesów metabolicznych, epigenetyczną regulację struktury chromatyny, udział w szlakach odpowiedzi na stres i szlakach sygnałowych. Chociaż wydaje się, że wzrost aktywności telomerazy nie jest niezbędny w inicjacji rozwoju nowotworu, pewnym jest jednak, że stymuluje on progresję i ekspansję komórek onkogennych poprzez utrzymanie długości telomerów powyżej krytycznej liczby powtórzeń, zapobiegając w ten sposób inicjacji procesów starzenia się lub śmierci.

Gen *TERT* zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu 5 (5p15.33) i składa się z 15 intronów, 16 eksonów oraz rdzenia promotorowego o długości 260 pz. Do najczęściej występujących zmian genetycznych możemy zaliczyć mutacje somatyczne i zmiany związane z występowaniem polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*; SNPs). Wśród mutacji obszaru promotorowego *TERT* (*TERTp*) wyróżniamy dwie zlokalizowane w odległości -124 pz (*C228T*) i -146 pz (*C250T*) od miejsca startu transkrypcji. Występowanie tych wariantów skutkuje utworzeniem fragmentu nukleotydowego o długości 11 pz, który stanowi nowy motyw wiązania dla czynników transkrypcyjnych z rodziny ETS (ang. *E-twenty-six (ETS) transcription factors*).

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było: 1) oznaczenie i porównanie występowania mutacji somatycznych *TERTp*, aktywności telomerazy, długości telomerów i ekspresji *TERT* w liniach komórkowych reprezentujących nowotwory hematologiczne, guzy lite oraz linie prawidłowe hodowane *in vitro*; 2) określenie zależności pomiędzy wariantami genetycznymi *TERT* a długością telomerów w kontekście parametrów klinicznych u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (ang. *acute myeloid leukaemia*; AML), przewlekłą białaczką limfocytową (ang. *chronic lymphocytic leukemia*; CLL) oraz rakiem gruczołu sutkowego; 3) zbadanie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną *TERT* a ekspresją genów *MYC*, *SPI1*, *TP53* w materiale z krwi kobiet z rakiem gruczołu piersiowego oraz w komórkach wyprowadzonych z tkanki nowotworowej – organoidach; 4) wykazanie roli zmienności genetycznej i ekspresji genu *TERT* oraz długości telomerów jako potencjalnych biomarkerów wybranych nowotworów hematologicznych i guzów litych.

Wyniki badań zostały przedstawione w czterech kolejnych publikacjach naukowych, w których poruszone zostały zagadnienia związane z regulacją poziomu ekspresji genu *TERT*, długości telomerów i aktywności telomerazy w modelu komórkowym *in vitro* i u pacjentów z chorobami hematologicznymi linii mieloidalnej i limfoidalnej, jak również u pacjentek z rakiem piersi oraz komórkach wyizolowanych z guzów raka gruczołu piersiowego - organoidach.

W pierwszej publikacji z wykorzystaniem panelu 27 linii komórkowych hodowanych *in vitro* przeanalizowano występowanie dwóch mutacji *TERTp*: *C228T* i *C250T*. Powyższe mutacje zidentyfikowano w 5 liniach komórkowych nowotworów litych (ang. *solid tumours*): glejaku, raku naskórka, czerniaku, raku pęcherza moczowego i raku gruczołu sutkowego. Linie komórkowe z obecną mutacją *TERTp* cechowały się krótszymi telomerami oraz liniowym wzrostem ekspresji *TERT* skorelowanym ze wzrostem aktywności telomerazy.

Wykazano również, że hematologiczne linie komórkowe, w których nie stwierdzono występowania mutacji, charakteryzowały się najwyższą ekspresją *TERT* w porównaniu do linii guzów litych i linii prawidłowych, oraz występowaniem zależności pomiędzy ekspresją *TERT* a długością telomerów.

U pacjentów z chorobami hematologicznymi, ostrą białaczką szpikową (AML) i przewlekłą białaczką limfocytową (CLL) obserwowano krótsze telomery w porównaniu do grupy osób zdrowych. Chorzy z AML w wieku powyżej 61 lat charakteryzowali się dłuższymi telomerami w porównaniu do młodszych pacjentów.

Analizy całkowitego przeżycia (ang. *overall survival*) wykazały, że pacjenci z genotypem *CC TERT*<sub>p</sub> rs2853669 cechowali się krótszym przeżyciem niż pacjenci z allelem *T*. Chorzy z AML poniżej 61 r.ż., u których stwierdzono występowanie mutacji w genie kinazy tyrozynowej (*FLT3*) wyróżniali się krótszymi telomerami oraz gorszym przeżyciem całkowitym w porównaniu do pacjentów bez tej mutacji. Pacjenci z AML, u których wykazano obecność mutacji w genie kodującym nukleofosminę 1 (*NPM1*) i brak mutacji w *FLT3*-ITD mieli dłuższe telomery niż pacjenci z mutacją w *FLT3* i bez mutacji w *NPM1*.

W grupie pacjentów z CLL z mniej zaawansowanym stadium choroby (0–I wg. kryterium Rai) udokumentowano występowanie dłuższych telomerów niż w grupie chorych z zaawansowaną postacią choroby (II–IV). Ponadto, wśród pacjentów z CLL posiadających allel *C TERT* rs2736100 (intron 2) telomery były dłuższe w mniej zaawansowanym stadium CLL wg. kryterium Binet A oraz wg. Rai 0–I w porównaniu do chorych w stadium, odpowiednio Binet B-C oraz Rai II–IV.

W kolejnej pracy przeprowadzono badania dotyczące zmienności genetycznej *TERT*, długości telomerów i ekspresji panelu genów: *TERT*, *MYC*, *SP1*, *TP53* w grupie kobiet z nowotworem gruczołu piersiowego oraz w organoidach - materiale pochodzącym z hodowli *in vitro* komórek wyizolowanych z fragmentu guza gruczołu piersiowego.

Analiza wykazała występowanie korelacji pomiędzy ekspresją *TERT* i *TP53* oraz *SP1* i *MYC* w organoidach. Badana grupa pacjentek charakteryzowała się zależnością pomiędzy ekspresją genów *TERT* i *MYC* oraz *TP53* i *MYC*. Dalsza część badań dotyczyła zmienności genetycznej *TERT* w kontekście długości telomerów i parametrów klinicznych. Pacjentki z allelem *A TERT* rs10069690 (intron 4) oraz genotypem *GG TERT* rs2736100 miały dłuższe telomery niż kobiety z innymi wariantami genetycznymi. U chorych z allelem *T TERT* rs2736100 i *C TERT*<sub>p</sub> identyfikowano bardziej inwazyjne guzy (ustalone na podstawie badań histopatologicznych)

niż u kobiet z genotypem *GG TERT* rs2736100 i *TT TERTp* rs2735940. Ponadto pacjentki z allelem *A TERT* rs10069690 miały rzadziej amplifikację genu receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu - *HER2* (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*). Analiza polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń tandemowych VNTR-MNS16A (ang. *variable number tandem repeats*) wykazała, że u kobiet z VNTR-234 występowały mniej inwazyjne nowotwory niż u chorych z pozostałymi genotypami MNS16A.

Cykl publikacji zamyka praca poglądowa na temat regulacji oraz roli genu *TERT* w rozwoju nowotworów.

Wyniki badań opisanych w powyższych publikacjach potwierdziły znaczenie zmienności polimorficznej genu *TERT* oraz długości telomerów w patogenezie przewlekłej białaczki limfocytowej, ostrej białaczki szpikowej i raka gruczołu sutkowego. Badania sugerują, że różnice w długości telomerów, obecność określonych mutacji i polimorfizmów w genie *TERT* oraz ekspresja *TERT* mogą być potencjalnymi biomarkerami w nowotworach układu krwiotwórczego i raku gruczołu sutkowego.