



RECENZJA

osiągnięcia naukowego pt.: „Eksperymentalna terapia molekularna dla Dystrofii Miotonicznej typu 1 z wykorzystaniem strategii antysensownych oraz związków niskocząsteczkowych” stanowiącego podstawę wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz istotnej aktywnością naukową realizowanej w więcej niż jednej uczelni (instytucji naukowej) i dorobku naukowo-badawczego, organizacyjnego i dydaktycznego

Doświadczenie naukowe oraz przebieg pracy zawodowej

Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna w 2002 roku ukończyła studia na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, broniąc pracę magisterską, pt.: *„Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis in evolution studies of four species belonging to the family Canidae”*, promotorem pracy był Prof. dr hab. Marek Światoński z Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu. Po ukończeniu studiów magisterskich, Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna podjęła studia doktoranckie w ramach Międzynarodowego Programu Studiów Doktoranckich w Vienna BioCenter oraz Uniwersytetu Wiedeńskiego w laboratorium Prof. Dr Erwina Wagnera. W 2006 roku Habilitantka obroniła pracę doktorską pt.: *„The role of the AP-1 (Fos/Jun) transcription factor in liver regeneration”*, pod kierownictwem Prof. Dr Erwin Wagner. Na uwagę zasługuje bardzo aktywna postawa Habilitantki w zakresie zdobywania doświadczenia naukowego; początkowo w ramach studiów na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, Pani dr Ewa Stępnia-Konieczna odbyła staż w Scottish Agricultural College (SAC), Edynburg, Szkocja jako stypendystka programu Socrates-Erasmus; następnie, po ukończeniu studiów doktoranckich w Austrii, Habilitantka odbyła staż podoktorski w Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC), Seattle, WA, USA a następnie swoje doświadczenie zawodowe rozwijała w University of Washington, School of Medicine, Division of Medical Genetics Seattle, WA, USA. W 2012 roku została zatrudniona jako ‘postdoc’ w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w programie FNP-TEAM, kierowanym przez Prof. Krzysztofa Sobczaka; od 2015 roku Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna jest zatrudniona w w/w Instytucie, jako kierownik projektu naukowego NCN Opus, pt.: *“The use of chemically modified antisense oligonucleotides in the experimental therapy against Myotonic Dystrophy (DM)”*.

Podsumowując, Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna to osobą z bardzo bogatym doświadczeniem naukowym; realizacja studiów doktoranckich w renomowanym centrum naukowym w Austrii oraz odbyte staże podoktorskie w USA oraz na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, to doświadczenie naukowe, które znacząco rozszerzyło horyzonty poznawcze Habilitantki, czego wyrazem jest doskonale opanowany warsztat naukowy w zakresie szeroko pojętej biologii komórki, biologii molekularnej i biochemii, a widocznym rezultatem są liczne publikacje, które ukazały się w najbardziej prestiżowych czasopismach naukowych.



Ogólna ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej to 16 opracowań naukowych, w tym 15 to publikacje, które ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych będących na liście *Journal Citation Reports* (JRC) oraz jedno opracowanie to rozdział w monografii, która została wydana przez uznane wydawnictwo naukowe *Springer*. Sumaryczny 'Impact Factor - IF' zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 132,3; indeks h=11, całkowita liczba cytowań wynosi 925, z wykluczeniem autocytowań. Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 2630. W ocenie parametrycznej, dorobek naukowy Habilitantki jest doskonały, nie tylko biorąc pod uwagę same wskaźniki bibliometryczne, ale przede wszystkim wartość prac naukowych, które ukazały się bardzo prestiżowych czasopismach oraz ich jakość została uznana przez środowisko naukowe w formie licznych cytacji.

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiące monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Eksperymentalna terapia molekularna dla Dystrofii Miotonicznej typu 1 z wykorzystaniem strategii antysensownych oraz związków niskocząsteczkowych”

Zestaw prac stanowiący monotematyczny cykl publikacji to pięć publikacji naukowych, które ukazały się w bardzo prestiżowych czasopismach naukowych uwzględnionych w basie JCR. Cztery prace, to opracowania o charakterze doświadczalnym oraz jedna to praca przeglądowa.

Zestawie prac:

- <i>Nucleic Acids Research</i> (2014 rok)	- IF - 9.112,	MNiSW - 200 pkt, cytowanie = 55;
- <i>Nature Communications</i> (2013 rok)	- IF - 10.742	MNiSW - 200 pkt, cytowanie = 54;
- <i>Nucleic Acids Research</i> (2015 rok)	- IF - 9.202	MNiSW - 200 pkt, cytowanie = 44;
- <i>Human Molecular Genetics</i> (2015)	- IF - 5.985	MNiSW - 140 pkt, cytowanie = 13;
- <i>Nucleic Acids Research</i> (2020)	- IF - 11.147	MNiSW - 200 pkt, cytowanie = 0;

Podsumowanie: sumaryczny IF - 46,188, w tym uwzględniając rok publikacji; ilość punktów MNiSW - 940; łączna ilość cytowań - 166, co stawia bardzo dobry dorobek pod względem wskaźników bibliometrycznych. Przedłożone do oceny publikacje naukowe to opracowania wieloautorskie, w których Habilitantka posiada znaczący udział a realizacji zadań badawczych, i tak: w przeglądowej publikacji opublikowanej w *Nucleic Acids Research* (2014 rok) jest Ona na drugim autorem; w pracy opublikowanej w nad wyraz prestiżowym czasopiśmie naukowych, tj. *Nature Communications* (2013 rok), Habilitantka jest na prawach pierwszego autora, co jest niebagatelnym osiągnięciem; w pracy w *Nucleic Acids Research* (2015 rok) Habilitantka jest trzecim autorem wśród ośmiu innych autorów; w publikacji, która ukazała się na łamach czasopisma *Human Molecular Genetics* (2015) jest drugim autorem; a w ostatniej zaprezentowanej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, Habilitanta występuje w podwójnej roli, tj. jest Ona pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Na bazie załączonych oświadczeń współautorów oraz zamieszczonych deklaracji Habilitantki stwierdzam, iż udział Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej w realizacji prac naukowych, które zostały



opublikowane jako pięć publikacji stanowiących monotematyczny cykl prac stanowiących przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe, jest znaczący i wniosła Ona istotny wkład w realizację wszystkich projektów badawczych. Habilitantka posiada doskonałe doświadczenie w realizacji prac badawczych, włączając wszystkie etapy w realizacji zadań naukowych, począwszy od opracowania koncepcji i planowania analiz eksperymentalnych, poprzez bezpośrednią realizację konkretnych eksperymentów, opracowanie danych eksperymentalnych, a skończywszy na edycji i przygotowaniu manuskryptów. Zatem, Habilitantki wykazuje się wysokim zaangażowaniem na wszystkich etapach realizacji poszczególnych zadań badawczych.

Przedłożone do oceny pięć publikacji, to opracowania tworzące spójne pod względem tematycznym osiągnięcie naukowe. Tematyka prac skupia się na dystrofii miotonicznej typu 1, schorzeniu o podłożu genetycznym, charakteryzującej się zanikiem mięśni szkieletowych oraz charakterystyczną miotonią tj. zaburzeniami w pracy mięśni; Habilitantka skupiła swoją uwagę przede wszystkim na aspektach molekularnych leżących u podstaw tego schorzenia, tj. zasadniczym obiektem badawczym jest kompleks złożony z białka MBNL oraz RNA tzw. „toksycznego RNA”, który w rejonie 3' UTR dla mRNA kodującego białko DMPK, posiada unikalny wielokrotnie powtórzony triplet CUG, który formuje stabilną strukturę pętli, która jest zasadniczym elementem dokującym białko MBNL. W konsekwencji, utworzenie kompleksu prowadzi do sekwestracji białka MBNL z nukleoplazmy, czego konsekwencją są zaburzenia w procesie dojrzewania mRNA – '*spliceopatia*'. W działaniach Habilitantki można dostrzec dwa równorzędne nurty badawcze: pierwszy to opracowanie innowacyjnej terapii skierowanej na dystrofię miotoniczną, zaś drugi równie ważny, to opisanie mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem białka MBNL w kontekście dystrofii miotonicznej. Działania Habilitantki to doskonały przykład mariażu badań podstawowych z badaniami aplikacyjnymi wykorzystując zaawansowane techniki biologii molekularnej w połączeniu z biologią komórki na poziomie *in vitro* jak i *in vivo*; takie właśnie działania leżą u podstaw opracowania innowacyjnych bio-produktów w zakresie biotechnologii medycznej, a Pani Dr Ewa Stępiak-Konieczna należy do awangardy młodego pokolenia polskich naukowców działających w kierunku opracowywania innowacyjnych 'nano-bio-materiałów'.

Pierwsza praca to opracowanie przeglądowe, zatytułowane: '*MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation*' opublikowane na łamach prestiżowego czasopisma naukowego *Nucleic Acids Research*, autorstwa: Patryk Konieczny, Ewa Stępiak-Konieczna i Krzysztof Sobczak. Opracowanie skupia się na białku MBNL w kontekście jego roli w dystrofii miotonicznej, a przede wszystkim Autorzy skupili się na opisanu roli tego białka w procesie dojrzewania pre-mRNA, zwracając szczególną uwagę na jego partnerów metabolicznych oraz rolę kompleksu MBNL/RNA w regulacji procesów związanych z alternatywnym dojrzewaniem pre-mRNA; jednym z istotnych elementów opracowania jest aspekt dystrofii miotonicznej, w którym interakcja białka MBNL z powtórzeniami CUG leży u podstaw zaburzeń metabolicznych prowadzących do tego schorzenia. I tak, Autorzy w sposób bardzo wyczerpujący przedstawili szereg aspektów biologicznych związanych z białkiem MBNL,



tj. charakterystyka samego białka pod względem jego organizacji strukturalnej w kontekście regulacji dojrzewania pre-mRNA, przedstawili model strukturalny oddziaływań RNA-MBNL zwracając uwagę na regulację alternatywnego dojrzewania mRNA, nakreślając obraz funkcjonowania MBNL w szerokim kontekście metabolizmu RNA. W zakresie zamieszczonej publikacji Habilitantka opracowała dział dotyczący molekularnych terapii ukierunkowanych na dystrofię miotoniczną - „*Therapeutic strategies targeting pathogenic MBNL/RNA interaction*”. Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna skupiła swoją uwagę na strategiach terapeutycznych dotyczących ‘toksycznego’ kompleksu MBNL/RNA_{CUG}^{exp}. W szczególności Habilitantka scharakteryzowała nisko-cząsteczkowe związki, które interferują z kompleksem MBNL/RNA_{CUG}^{exp} prowadząc do jego rozpadu; przedstawiła Ona informację na temat szeregu grup związków, które mogą działać na zasadzie kompetycji z MBNL hamując jego oddziaływanie z RNA_{CUG}^{exp} lub mogą prowadzić do jego uwolnienia z kompleksu, jak na przykład ‘*D-amino acid hexapeptide*’. Habilitantka także zwróciła uwagę na alternatywne podejście do poszukiwania nowych związków ukierunkowanych na interferencję z kompleksem MBNL/RNA_{CUG}^{exp}, mianowicie analizy *in silico*, które otwierają nowe możliwości opracowywania związków o wysokiej specyfice działania, tzw. ‘*less off-target effects*’. W dalszej części opracowania zwróciła uwagę na nowe podejście na bazie oligomerów antysensownych, które mogą prowadzić do degradacji transkryptów zawierających sekwencje CUG, w szczególności zwróciła uwagę na 25-mer CAG₂₅, który wiążąc się do powtórzeń CUG i może hamować sekwestrację białek MBNL, jednocześnie nie prowadząc degradacji docelowego mRNA. Podsumowując, przygotowany przez Habilitantkę rozdział stanowi doskonałą kompilację informacji jednocześnie uzupełniając opracowanie o aspekt aplikacyjny. Należy podkreślić, iż praca znalazła wysokie uznanie w środowisku naukowym uzyskując 55 cytacji na przestrzeni sześciu lat.

Druga praca, która została włączona w monotematyczny cykl prac, to publikacja zatytułowana: ‘*Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules*’, autorstwa Jessica L. Childs-Disney, Ewa Stepniak-Konieczna, Tuan Tran, Ilyas Yildirim⁴, Hajeung Park, Catherine Z. Chen, Jason Hoskins, Noel Southall, Juan J. Marugan, Samarjit Patnaik, Wei Zheng, Chris P. Austin, George C. Schatz, Krzysztof Sobczak, Charles A. Thornton & Matthew D. Disney, którą opublikowano w bardzo prestiżowym czasopiśmie *Nature Communications*. Praca posiada dwa zasadnicze nurty badawcze, pierwszy to poszukiwanie nowych niskocząsteczkowych związków, które mogą negatywnie wpływać na formowanie się kompleksu MBNL/RNA_{CUG}^{exp}, a tym samym mogą być wykorzystane jako tzw. ‘*lead compounds*’ do opracowania w przyszłości terapeutyków do leczenia dystrofii miotonicznej, oraz jako narzędzia do badania alternatywnego dojrzewania pre-mRNA; drugi nurt to charakterystyka zidentyfikowanych związków chemicznych pod względem ich aktywności w kierunku kompleksu MBNL/RNA_{CUG}^{exp} (w którym to Habilitantka posiada znaczący udział). W konsekwencji, analizy przesiewowe biblioteki niskocząsteczkowych związków z wykorzystaniem opracowanej wcześniej metody na bazie kompleksu MBNL1/krótkim oligomer (CUG)₁₂ (MBNL1-CUG₁₂) i techniki analitycznej TR-FRET, zidentyfikowano dwa związki - #1 na bazie kwasu karboksylowego zawierającego tiofen, oraz #2 na bazie naftyrydino-karbonitrylu. Oba związki okazały się bardzo



aktywne w stosunku do kompleksu MBNL1-CUG₁₂, w tym #1 wykazywał potencjał do dysocjacji kompleksu poprzez specyficzne oddziaływanie z MBNL1, zaś #2 wykazywał powinowactwo do sekwencji CUG₁₂ a tym samym posiadał właściwości w kierunku dysocjacji kompleksu. Całość prac była realizowana w dużym interdyscyplinarnym zespole badawczym, a Habilitantce przypadło zadanie charakterystyki związku #1, który wiąże białko MBNL1 pod względem aktywności biologicznej w modelowych liniach komórkowych dla dystrofii miotonicznej typu 1. Ponieważ, tzw. sekwestracja białka MBNL, czyli zmniejszenie jego dostępności w formie kompleksu MBNL/RNA_{CUG}^{exp} jest główną przyczyną zaburzeń w dojrzewaniu wielu transkryptów, Autorka założyła że związek #1, mając powinowactwo do MBNL1 może blokować działanie białka, a tym samym zaburzać dojrzewanie pre-mRNA zależnych od MBNL1. Wykorzystując technikę RT-PCR wykazała, że faktycznie związek #1 obniża alternatywny 'splicing' szeregu transkryptów zależnych od MBNL1, ale zwiększa aberrację w dojrzewaniu pre-mRNA w liniach komórkowych pozyskanych od pacjentów z dystrofią miotoniczną. W kolejnym kroku, Autorka zaplanowała i wykonała kluczową analizę, tj. 'wyciszenie' genu dla białka MBNL1 wykorzystując technikę siRNA i w połączeniu ze związkiem #1, wskazała na synergistyczny efekt działania związku #1 z obniżoną ilością MBNL1 - analizując efektywności dojrzewania wybranych genów markerowych wykorzystując RT-PCR. Wykonane przez Habilitantkę, analizy wskazały, że związek #1, w przeciwieństwie związku #2 który został scharakteryzowany przez członków zespołu badawcze, wykazuje negatywne działanie, zaburzając proces dojrzewania transkryptów MBNL1 zależnych, a tym samym jego działanie może wywoływać efekt podobny do dystrofii miotonicznej. Podsumowując, Pani Dr Ewa Stępiak-Konieczna działając w interdyscyplinarnym zespole badawczym opisała, zidentyfikowany metodami wysokoprzepustowymi, związek #1 pod względem jego aktywności biologicznej, wskazując że może on być traktowany jako specyficzny inhibitor dla białka MBNL1; działania Habilitantki wraz z całym zespołem stanowią istotny wkład poznawczy, ponieważ rozszerzają repertuar inhibitorów białek MBNL, a tym samym dostarczają nowych narzędzi badawczych do poznania podstaw molekularnych dystrofii miotonicznej. Należy podkreślić duży wkład Habilitantki w badania zaprezentowane w w/w publikacji; z jednej strony wyrazem tego jest Jej uznanie jako Autorki 'na prawach pierwszego autora', a co więcej z przedstawionych informacji wyłania się obraz Habilitantki charakteryzującej się kreatywnym podejściem do zadań badawczych oraz osoby, która doskonale opanowała warsztat badawczy w zakresie biologii komórki i biologii molekularnej.

Kolejny projekt badawczy, w którym Habilitantka brała udział to prace badawcze ukierunkowane na opracowanie innowacyjnej strategii terapeutycznej dla dystrofii miotonicznej z wykorzystaniem syntetycznych oligomerów. Projekt został zrealizowany w grupie badawczej pod kierownictwem prof. dr hab. Krzysztofa Sobczaka, a efektem pracy jest publikacja pt.: '*Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy*' autorstwa Agnieszka Wojtkowiak-Szlachcic, Katarzyna Taylor, Ewa Stępiak-Konieczna, Lukasz J. Sznajder, Agnieszka Mykowska, Joanna Sroka, Charles A. Thornton i Krzysztof Sobczak, opublikowana w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Projekt skupia się przede wszystkim na wykorzystywaniu antysensownych syntetycznych oligo-nukleotydów, zawierające zmodyfikowane grupy cukrowe rybozy tzw. '*locked nucleic acid - LNA*'



ukierunkowanych na specyficzną interakcję z powtórzeniami CUG zlokalizowanymi na tzw. toksycznych mRNA. W ramach prac zespół badawczy wykazał, że w warunkach *in vitro* LNA efektywnie wiązały się do fragmentów RNA zawierających sekwencję CUG i blokowały formowanie się kompleksu MBNL/RNA_{CUG}^{exp}. Co ważne, wykorzystując modelowe linie komórkowe dla dystrofii miotonicznej typu 1 oraz model myszy wykazano, że LNA znacząco obniżały formowanie się kompleksów MBNL/RNA_{CUG}^{exp} *in vivo*, oraz pozytywnie wpływały na dojrzewanie transkryptów MBNL zależnych, wykazując widoczny efekt 'terapeutyczny' w systemie modelowym. Jednakże, pomimo tak obiecujących wyników, kliniczne zastosowanie LNA jest utrudnione z racji na fakt niskiej efektywności biodystrybucji LNA do tkanek docelowych po dostarczeniu ogólnoustrojowym. Rola Habilitantki w tym projekcie to właśnie rozszerzenie tego podejścia i poszukiwanie rozwiązań polepszających farmakokinetykę LNB. I tak, Habilitantka scharakteryzowała efektywność bio-dystrybucji LNB z modyfikacją chemiczną w formie tiofosforanu – PS-LNB, który znacząco polepsza parametry biofizyczne oligonukleotydów. Autorka zastosowała metodę gymnozy w celu dostarczenia PS-LNB do fibroblastów DM1, wskazując, że podejście to jest skuteczne, jednakże analiza RT-PCR dojrzewania markerowych transkryptów czy analiza FISH formowania kompleksów MBNL/RNA_{CUG}^{exp} wskazały na niską efektywność dystrybucji PS-LNB na drodze gymnozy w porównaniu z klasycznym podejściem opartym na transfekcji komórek. Prace Habilitantki to ważny element komplementujący badania ukierunkowane na opracowania skutecznej terapii w leczeniu dystrofii miotonicznej w oparciu o krótkie oligonukleotydy LNB; Autorka wskazuje na szereg ograniczeń w zakresie bio-dystrybucji LNB, a tym samym wspomaga drogę poznawczą, którą należy podążać w celu uzyskania efektywnej terapii.

Czwarta praca, w zakresie prezentowanego osiągnięcia, to opracowanie będące bezpośrednią kontynuacją prac badawczych realizowanych przez Panią Dr Ewę Stępniać-Konieczną w tematyce dystrofii miotonicznej, ukierunkowane na opracowanie technologii umożliwiającej efektywną terapię tego genetycznego schorzenia. Habilitantka, pracując w grupie badawczej pod kierownictwem Prof. Joel Chamberlain (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA) uczestniczyła w projekcie badawczym, w którym wykorzystując konstrukty genetyczne na bazie rekombinowanych wektorów adenowirusowych testowano metodę innowacyjnej terapii dystrofii miotonicznej, stosując ogólnoustrojowe dostarczenie terapeutów, wykorzystując myszy model eksperymentalny; w poprzednich projektach Habilitantka przede wszystkim wykorzystywała modelowe linie komórkowe, co z reguły stanowi pierwszy etap w charakterystyce procesów biologicznych na modelu ssaczym w odniesieniu, np. do opracowania nowych terapeutów; obecny projekt to przeniesienie badań na myszy model dystrofii miotonicznej typu 1 - HSA^{LR}. W zakres tego projektu wchodziło ogólnoustrojowe podanie terapeutu wykorzystując zjawisko RNAi i wyciszenie genów zawierających powtórzenia CUG. Habilitantka, przygotowała wektory na bazie adenowirusów rAAV, które zawierały kasetę ekspresyjną prowadzącą ekspresję miRNA ukierunkowaną na obniżenie poziomu transkryptów niosących sekwencję CUG w mysim modelu HSA^{LR} wraz genem reporterowym dla ludzkiej fosfatazy alkalicznej; tak przygotowane układy genetyczne (rAAV6-HSA4 oraz rAAV6-HSA10) Autorka podała dożylnie myszom, a następnie po 12 tygodniach od



podania przeprowadziła szeroko zakrojone analizy tkanki mięśniowej oraz morfologię krwi, która wskazał na brak widocznego wpływu toksycznego na organizm myszy; przeprowadzone analizy histologiczne a przede wszystkim analiza RT-PCR pokazała redukcję transkryptu HSA niosącego sekwencje CUG; co istotne analiza dojrzewania wybranych markerowych pre-mRNA wskazała na znaczącą redukcję zaburzeń w alternatywnym 'splicingu' oraz wykonana elektromiografia we współpracy z neurologami pokazała zmniejszenie wyładowań miotonicznych, które stanowią typowy objaw fenotypowy dla dystrofii miotonicznej. Podsumowując, zaprezentowane wyniki, wskazały jednoznacznie, że przyjęte założenie wykorzystania adenowirusów rAAV oraz zjawiska RNAi jako układu terapeutycznego okazało się bardzo trafne i dożylna pojedyncza aplikacja rekombinowanych wektorów adenowirusowych jest efektywna w zakresie zniwelowania molekularnych jak i fenotypowych efektów towarzyszących dystrofii miotonicznej; należy podkreślić, iż analizy wykonane przez Habilitantkę stanowią zasadniczy trzon projektu, dlatego też Jej udział w realizacji projektu oceniam na bardzo wysoki. Należy pokreślić, że znaczenie projektu jest ogromne, ponieważ informacje zgromadzone na bazie wykonanych analiz dają realne podstawy do opracowania terapii niwelującej objawy choroby, a co równie ważne wektory rAAV zostały zatwierdzone jako komercyjny nośnik genetyczny. Projekt ten znalazł swoje zakończenie w formie publikacji, pt.: *'Therapeutic impact of systemic AAV-mediated RNA interference in a mouse model of myotonic dystrophy'* autorstwa Darren R. Bisset, Ewa A. Stepniak-Konieczna, Maja Zavaljevski, JessicaWei, Gregory T. Carter, Michael D. Weiss and Joel R. Chamberlain, która ukazała się w d czasopiśmie *Human Molecular Genetics*.

Ostatnia publikacja w cyklu, to opracowanie mające już znacznie inny wymiar pod względem organizacji pracy Habilitantki; jest to autorskie podejście Habilitantki do problemu, czego wyrazem jest pozycja Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej, nie tylko jako pierwszy autor, a co istotne jako autor korespondencyjny. Projekt ten został zrealizowany w ramach grantu OPUS, w którym Habilitantka jest kierownikiem projektu; informacje te wskazują, że Autorka jest nie tylko eksperymentatorem posiadającym doskonale opanowany warsztat badawczy, ale także aktywnie pozyskuje środki finansowe na realizację własnych koncepcji naukowych, co stawia Ją jako osobę samodzielnie działającą na polu naukowy - jak że ważna cecha dla osób ubiegających się o stopień doktora habilitowanego. Równie ważny aspektem, który dotyczy realizowanego projektu, to fakt, iż Habilitantka konsekwentnie realizuje i rozwija tematykę dotyczącą molekularnych aspektów dystrofii miotonicznej, a w szczególności Jej zainteresowania skupione są na opracowaniu terapii dla tego schorzenia, wskazując na Jej determinację naukową i konsekwentne zmierzanie do celu. Celem projektu był 'toksyczny' transkrypt niosący informację dla białka DMPK, a przede wszystkim w projekcie zaplanowano unikalne podejście eksperymentalne w kierunku modyfikacji dojrzewania 'toksycznego' pre-mRNA, tak aby zainicjować degradację transkryptu na drodze komórkowych mechanizmy kontroli jakości RNA, a w konsekwencji usunąć z komórki tzw. 'toksyczny RNA' – opisane przez Habilitantkę jako -- strategia #1; drugie, alternatywne podejście, to usunięcie z transkryptu DMPK regionu zawierający powtórzenia CUG -- strategia #2. Obie koncepcje były ukierunkowane na obniżenie poziomu 'toksycznego RNA', a tym samym uwolnienia białka MBNL i zmniejszenie aberracji dojrzewania pre-mRNA zależnego od tego białka. W celu osiągnięcia zamierzonych celów jako



narzędzie wykorzystano chemicznie modyfikowane oligonukleotydy antysensownych - AON jak na przykład 2'-Ome-PS, wykorzystując modelowe linie komórkowe - GM07492 i GM04033/GM03989. Jak już wspomniałem na wstępie, projekt ten to autorskie podejście Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej, w którym zaplanowała pełne podejście eksperymentalne, oraz co równie ważne w pracy naukowej, posiadając doskonale opanowany warsztat badawczy, zrealizowała nad wyraz bogaty zestaw eksperymentów, co czyni ją nie tylko wiodącym Autorem pod względem koncepcyjnym, ale także głównym wykonawcą projektu. Prace badawcze wskazały, że pomimo bardzo ciekawej hipotezy badawczej, obie strategie nie przyniosły spodziewanych efektów końcowych w stosunku do zniwelowania molekularnych aspektów dystrofii miotonicznej, a co więcej zastosowanie 2'-Ome-PS oligonukleotydów wywołuje efekt toksyczny. Ale, badania te wskazały, że użyte AON'y działają efektywnie w kierunku dojrzewania 'toksycznego RNA', wskazując na rolę nieopisanych dotychczas sekwencji nukleotydowych w rejonie 3'UTR odgrywających istotną rolę w transporcie mRNA dla białka MNBL z jądra do cytoplazmy. Podsumowując, zrealizowany projekt badawczy wnosi istotny wkład poznawczy w zakresie opracowania innowacyjnych technologii terapeutycznych rozszerzając wiedzę na temat zastosowania oraz ograniczeń w stosowaniu chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów antysensownych; ponadto, projekt przyniósł dodatkową wartość dodaną w formie informacji na temat roli sekwencji 3'UTR w biologii mRNA dla białka MBNL. Informacje zostały upowszechnione w formie publikacji na łamach czasopisma *Nucleic Acids Research*, pt. 'AON-induced splice-switching and DMPK pre-mRNA degradation as potential therapeutic approaches for Myotonic Dystrophy type 1', autorstwa Ewa Stępnia-Konieczna, Patryk Konieczny, Piotr Cywoniuk, Julia Dłuzewska, Krzysztof Sobczak.

Podsumowując, przedłożone do oceny osiągnięcia naukowego to zestaw pięciu spójnych pod względem tematycznym opracowań naukowych dotyczących dystrofii miotonicznej typu 1. Cztery prace posiadają charakter prac eksperymentalnych ukierunkowanych na opracowanie terapii tego genetycznego schorzenia, wykorzystując najnowsze technologie w zakresie szeroko pojętej biologii molekularnej na modelowych liniach komórkowych czy także z użyciem modelowych zwierząt jak myszy; piąta praca to opracowanie przeglądowe stanowiące kompendium wiedzy na temat molekularnych aspektów leżących u podstaw dystrofii miotonicznej wraz z wyczerpującym przeglądem informacji na temat potencjalnych metod terapeutycznych. Prace te stanowią przykład powiązania zdobytej wiedzy w zakresie nauk podstawowych z działaniami aplikacyjnymi na polu biotechnologii medycznej, wnoszą ogromny bagaż poznawczy do opracowania innowacyjnych terapii i stanowią istotny wkład w rozwój nauk biologicznych; działania Habilitantki wpisują się w oczekiwania społeczeństwa, którego funkcjonowanie oparte jest na zaawansowanej wiedzy w dziedzinie nano-technologii, czego dobitnym przykładem jest obecnie pandemia wywołana wirusem SARS-CoV2, a wprowadzenie szczepionki (będącej osiągnięciem w biotechnologii medycznej - nano-technologii) to jedyna droga opanowania obecnej sytuacji epidemicznej. Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna jawi się jako osoba o bardzo wysokich kompetencjach naukowych z doskonale opanowanym warsztatem badawczym oraz posiada jasno sprecyzowane zainteresowania naukowe konsekwentnie realizując szereg spójnych tematycznie projektów badawczych.



Ocena istotnej aktywności naukową realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna już od początku swojej kariery naukowej wykazywała bardzo wysoką aktywność w formie realizacji projektów naukowych w międzynarodowych grupach badawczych. Już jako studentka studiów magisterskich, odbyła staż w *Scottish Agricultural College, Edynburg*, Szkocja jako stypendystka programu *Socrates-Erasmus*; w kolejnych lat, po ukończeniu studiów na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, w latach 2003-2007 odbyła studia doktoranckie w *Research Institute of Molecular Pathology, Vienna BioCenter*, Wiedeń, pod opieką Prof. Dr. Erwina Wagnera, a Jej aktywności przełożyła się na szereg publikacji naukowych realizowanych w interdyscyplinarnych zespołach badawczych. Swoją pasję naukową rozwijała dalej i w latach 2007-2009 pracowała w zespole badawczym pod kierownictwem Dr. Valeri Vasioukhin'a w *Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC), Seattle, USA*; zaś w latach 2010-2011 odbyła kolejny staż podoktorski w laboratorium kierowanym przez Prof. Joel Chamberlain's z *University of Washington, School of Medicine, Division of Medical Genetics, Seattle, USA*. Kolejny staż podoktorski odbyła w latach 2012-2015 w laboratorium kierowanym przez prof. Krzysztofa Sobczaka w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Ponadto, Habilitantka uczestniczyła w wielu konferencjach naukowych, prezentując postery oraz wygłaszając prezentacje naukowe. Wszystkie staże naukowe zaowocowały licznymi publikacjami w uznanych czasopismach, z których część wchodzi bezpośrednio do osiągnięcia naukowego lub można zaliczyć do dodatkowej aktywności naukowej. Stwierdzam, że Habilitantka wykazała się bardzo szeroką aktywnością naukową w zakresie realizacji wielu projektów badawczych w interdyscyplinarnych i międzynarodowych grupach badawczych poza macierzystym ośrodkiem badawczym – stwierdzam, że istotna aktywności naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej – nie budzi zastrzeżeń.

Ocena dodatkowej aktywności naukowej, działalności organizacyjnej i dydaktycznej

Dodatkowa aktywność naukowa. Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna posiada znaczący dorobek naukowy, który nie został włączona bezpośrednio w zakres osiągnięcia naukowego; i tak, jest to 10 opracowań naukowych, które ujęte są w bazie danych JCR raz jedno opracowanie mające charakter rozdziału w monografii - w sumie 11 prac naukowych. Już na wstępie należy podkreślić, że znaczna część prac ukazała się w bardzo prestiżowych czasopismach naukowych, jak: *Nucleic Acids Research, RNA Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, PNAS-USA, Genes & Development, Journal of Clinical Investigations, Cell Death & Differentiation, Cell Cycle, Hepatology, Journal of Applied Genetics*. Początkowo, Habilitantka realizowała swoje zainteresowania naukowe w formie studiów doktoranckich, w tematyce dotyczącej roli czynników transkrypcyjnych w proliferacji komórek wątroby uwzględniając ścieżki sygnałowe zależne od takich białek jak p53/p21 czy MAP kinaza p38. W tym czasie Pani Dr Ewa Stępnia-



Konieczna opanowała jak i doskonaliła warsztat naukowy w zakresie biologii komórki, histologii, technik immunologicznych oraz biologii molekularnej; prace te przyniosły istotny wkład w zrozumienie mechanizmów regulujących cykl komórkowy hepatocytów, czy to w kontekście regeneracji wątroby jak i w procesach nowotworzenia, wskazując na kluczową rolę kinazy p38 czy białka p21 w regulacji zachowania się hepatocytów w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. Jej udział w realizacji wielu projektów, w tym okresie, jest znaczący uwzględniając choćby publikację w czasopiśmie *Genes & Development*, w której to jest jednym z wiodących autorów. Habilitantka także skierowała swoją uwagę na tematykę związaną biologią białek Kadheryn i Katenin w ramach stażu podoktorskiego w laboratorium Dr Valeri Vasioukhin'a, gdzie uczestniczyła w przygotowaniu opracowania przeglądowego na temat udziału tych białek w regulacji szlaków przesyłania sygnału w takich procesach jak podział komórek, migracja, różnicowanie, apoptoza czy embriogeneza (publikacja w *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*); także należy zanotować Jej udział w publikacji będącej komentarzem naukowym do opracowań eksperymentalnych, które ukazały się w prestiżowym czasopiśmie *PNAS-USA*. Jednakże, kluczowa tematyka, dotyczy dystrofii miotonicznej, ze szczególnym uwzględnieniem opracowania terapii celowanej w kierunku 'toksycznego kompleksu RNA/MBNL'. Aktywność Habilitantki oscyluje w obrębie generowania/kompilacji/zestawienia w wielu danych, czy to na drodze prac eksperymentalnych czy opracowań przeglądowych i budowaniu obrazu dotyczącego roli białka MBNL w rozwoju dystrofii miotonicznej typu 1; przede wszystkim, dominują Jej zainteresowania w zakresie projektowania i testowania nowatorskich strategii terapeutycznych, czego wymiernym rezultatem są publikacje o charakterze przeglądowym, zapewne inspirujące dla Autorki jak i dla czytelników, oraz jedna praca eksperymentalna będąca wyrazem Jej dobrze opanowanego warsztatu laboratoryjnego. Stwierdzam, że Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna to osoba wykazująca się istotną aktywnością naukową, którą można postrzegać jako kompetentnego partnera naukowego aktywnie współdziałającego w zespole badawczym.

Działalność organizacyjna i dydaktyczna. Pani Dr Ewa Stępnia-Konieczna uczestniczyła aktywnie w realizacji dwóch projektów naukowych jako wykonawca oraz jest obecnie kierownikiem grantu Opus przyznanego przez NCN, co jednoznacznie wskazuje na Jej aktywną postawę w zakresie organizacji i realizacji własnych projektów badawczych - dorobek dobry nie budzący zastrzeżeń. W zakresie aktywności dydaktycznej Habilitantka we wczesnym okresie kariery naukowej jedynie realizowała epizodyczne zadania dydaktyczne dotyczące opieki naukowej nad studentami, jednakże niskie zaangażowanie dydaktyczne w tym okresie jest w pełni zrozumiałe, ponieważ Habilitantka odbyła studia doktoranckie oraz staże podoktorskie na pozycji naukowej, co nie obligowało Ją do rozbudowanej aktywności dydaktycznej. Pracując już na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu to czas w którym Jej aktywność dydaktyczna znacznie wzrosła; opracowała wykłady w języku angielskim dla studentów Biotechnologii na temat „*Animal models in human diseases*”, zorganizowała, prowadziła oraz koordynowała zajęcia w języku angielskim z przedmiotu „*Scientific English*” w ramach programu „*Studia na Biotechnologii i Ochronie Środowiska UAM drogą do sukcesu zawodowego*”. Opiekowała się także studentami realizującym pracę licencjacką jak i magisterską, co wskazuje że czynnie uczestniczy w procesie dydaktycznym na macierzystej uczelni; drobny niedosyt może



budzić brak udziału w kształceniu doktorantów, na przykład jako promotor pomocniczy. W ramach popularyzacji nauki Habilitantka aktywnie uczestniczyła w licznych konferencjach naukowych prezentując postery oraz wygłosiła krótkie prezentacje ustne, a ponadto, będąc na studiach doktoranckich uczestniczyła jako organizator konferencji naukowej 'Vienna BioCenter PhD Programme Symposium' co można uznać za dobre doświadczenie.

Wniosek końcowy

Oceniając osiągnięcie naukowe stanowiące monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „*Eksperymentalna terapia molekularna dla Dystrofii Miotonicznej typu 1 z wykorzystaniem strategii antysensownych oraz związków niskocząsteczkowych*” oraz odnosząc się do oceny istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej, wraz z opinią na temat dodatkowej aktywności naukowej, organizacyjnej i dydaktycznej Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej, stwierdzam że Habilitantka wykazała się istotną aktywnością we wszystkich ocenianych aspektach, a zrealizowane prace badawcze mające swoje odzwierciedlenie w licznych publikacjach naukowych wnoszą znaczący wkład poznawczy w dyscyplinie nauk biologicznych. W związku z powyższym stwierdzam, że zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2020 roku (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, osiągnięcie Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej odpowiada wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 1, 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2020 roku (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.). Popieram wniosek Pani Dr Ewy Stępnia-Koniecznej z dnia 20 marca 2020 roku, o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Lublin 2020-12-01

Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

