

Poznań, 13.11.2020

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN
Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja osiągnięcia naukowego dr Ewy Stępnia-Koniecznej
pt. „Eksperymentalna terapia molekularna dla Dystrofii Miotonicznej typu 1
z wykorzystaniem strategii antysensownych oraz związków niskocząsteczkowych”
oraz pozostałego dorobku naukowego, działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej.

Podstawowe dane o Kandydacie

Pani dr Ewa Stępnia-Konieczna uzyskała dyplom magistra inżyniera biotechnologii w 2002 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskała w roku 2006 na Uniwersytecie Wiedeńskim w Research Institute of Molecular Pathology, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*The role of the AP-1 (Fos/Jun) transcription factor in liver regeneration*”. Promotorem tej wyróżnionej rozprawy doktorskiej był profesor Erwin Wagner.

Dr Ewa Stępnia-Konieczna odbyła dwa zagraniczne staże podoktorskie, w tym dwuletni w Fred Hutchinson Cancer Research Center w Seattle, USA oraz kolejny, również blisko dwuletni na Uniwersytecie Waszyngtona, School of Medicine w Seattle. W latach 2012-2015 pracowała na stanowisku PostDoc w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii, w Zakładzie Ekspresji Genów na wydziale Biologii UAM w Poznaniu.

Zgodnie z informacją załączoną w Autoreferacie Kandydatka jest obecnie zatrudniona w IBMiB UAM w Poznaniu jako kierownik projektu OPUS. Opiekunem naukowym dr Ewy Stępnia-Koniecznej jest profesor dr hab. Krzysztof Sobczak. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Obowiązujące przepisy prawa na dzień wszczęcia ocenianego postępowania habilitacyjnego
Obowiązujące kryteria oceny odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe pt. „*Eksperymentalna terapia molekularna dla Dystrofii Miotonicznej typu 1 z wykorzystaniem strategii antysensownych oraz związków niskocząsteczkowych*” składa się cykl 5 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (obejmujących 4 prace doświadczalne i 1 pracę przeglądową), opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, takich jak *Nucleic Acids Research*, *Nature Communications* oraz *Human Molecular Genetics*. Prace zostały opublikowane w latach 2013-2020. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wg danych zgodnych z latami publikacji jest bardzo wysoki i wynosi 46,188, publikacje posiadają 940 punktów MNiSW. łączna liczba cytowań wg bazy Web of Science wynosi 166, co wskazuje na duże znaczenie opisywanych badań dla środowiska naukowego, zwłaszcza, że jedna z prac ukazała się w 2020 r i nie mogła być cytowana. W dwóch pracach dr Ewa Stępnia-Konieczna jest pierwszą autorką, w dwóch kolejnych drugą i w ostatniej pracy trzecią autorką. Należy podkreślić, że w jednej z prac jest dodatkowo autorem do korespondencji. Oświadczenia Kandydatki oraz współautorów prac, określające ich udział w przygotowaniu publikacji jasno wskazują, że udział Habilitantki był znaczący.

Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest chorobą genetyczną wywoływaną ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CTG w regionie 3'UTR genu *DMPK*. W odróżnieniu od innych chorób genetycznych (np. choroby Huntingtona), wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych w regionach kodujących genu, gdzie głównym czynnikiem patogennym jest białko, DM1 jest typowym przykładem toksyczności RNA. Długie ciągi powtórzeń trójnukleotydowych, osiągające od ok. 50 do nawet kilku tysięcy CUG, tworzą stabilne struktury typu spinki do włosów, mające zdolność sekwestracji białek komórkowych i tworzenia inkluzji jądrowych. Sekwestracji ulegają m.in. białka regulatorowe splicingu, takie jak MBNL1, a ich niedobór prowadzi do deregulacji procesu składania mRNA w komórce.

Głównym celem badań, stanowiących osiągnięcie naukowe Habilitantki było zaprojektowanie terapii molekularnych dla DM1 z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensownych, sztucznych miRNA oraz związków niskocząsteczkowych. Posłużyły one do degradacji toksycznych transkryptów lub zablokowania patogennego oddziaływania białka MBNL ze zmutowanym transkrypcem DM1. Obok celu o charakterze aplikacyjnym, Habilitantka wyznaczyła sobie również cel poznawczy, dotyczący analizy roli białka MBNL w patomechanizmie DM1.

Publikacja przeglądowa nr 1 pt. „*MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation*” podsumowuje stan wiedzy na temat roli białek MBNL w patomechanizmie DM. Obejmuje ona szczegółową charakterystykę białek MBNL, motywów sekwencji oraz struktur docelowych dla tych białek w transkryptach. Opisuje udział białek MBNL w regulacji splicingu oraz zbiera informacje na temat strategii terapeutycznych nakierowanych na patogenne oddziaływanie MBNL z transkryptami w DM. Udział Habilitantki w przygotowaniu tej pracy obejmował głównie napisanie rozdziału dotyczącego terapii, co wiązało się z analizą ok. 30 publikacji naukowych. Publikacja jest wartościowym opracowaniem, które nie tylko porządkuje stan wiedzy na temat białek MBNL ale może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. Została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* i została już doceniona przez środowisko naukowe, osiągając 55 cytowań.

Praca eksperymentalna nr 2 pt. „*Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules*”, w której dr Ewa Stępnia-Konieczna jest jedną z trzech

pierwszych autorów, powstała we współpracy z laboratorium Prof. Disneya z USA. Wykorzystując biblioteki związków niskocząsteczkowych oraz ilościowy test biochemiczny na bazie FRET, autorzy wybrali kilka potencjalnych inhibitorów oddziaływania białka MBNL1 z transkryptem DMPK. Takie patogenne oddziaływanie zaburza lokalizację transkryptu DMPK, zatrzymując go w jądrze komórkowym, gdzie tworzy foci oraz zaburza jego translację. Stosując komórki ze stabilną ekspresją mRNA lucyferazy, zawierającego ciąg 800 (CUG) w 3'UTR wykazano, że dwa związki znacznie poprawiają efektywność translacji mierzoną aktywnością lucyferazy. Co więcej, metodą FISH potwierdzono, że związki te redukują ilość i wielkość foci jądrowych w komórkach HeLa transfekowanych minigenem DM1. Testy powinowactwa i modelowanie strukturalne wykazały, że jeden ze związków oddziałuje z białkiem MBNL1, natomiast drugi z wydłużonym ciągiem CUG w RNA.

Habilitantka badała rolę związku niskocząsteczkowego rozbijającego kompleks RNA-MBNL1 w wyniku oddziaływania z białkiem. Tzw. związek nr 1 wywoływał w zdrowych komórkach fibroblastów zaburzenia alternatywnego splicingu przypominające DM1. W komórkach od pacjentów z DM1 zastosowanie związku nr 1 pogłębiało już istniejące zaburzenia wywołane sekwestracją MBNL1. Co więcej, nie wpływał on na splicing eksonów regulowanych przez inne czynniki. Obniżenie puli MBNL1 przez zastosowanie siRNA jeszcze bardziej pogłębiło zaburzenia splicingu i potwierdziło mechanizm zależny od białka MBNL1. Tak więc wiązanie MBNL1 przez związek nr 1 może być wykorzystane do chemicznej indukcji zaburzeń splicingu obserwowanych w DM1 oraz badania patomechanizmu tej choroby. Jak sugerują autorzy MBNL1 nie jest zatem dobrym celem terapii dla DM1. Dla odróżnienia, drugi z badanych związków, wiążący wydłużone ciągi CUG w mRNA, wywoływał odwrócenie stanu podobnego do DM1. Ponieważ w ramach wcześniejszych badań zidentyfikowano wiele małych cząsteczek zdolnych do wiązania CUG i poprawy splicingu w DM1, najistotniejszym osiągnięciem ww. pracy jest charakterystyka działania związku nr 1. Metody badawcze wykorzystane przez Habilitantkę, takie jak hodowle komórek ludzkich, transfekcja czy RT-PCR są proste lecz właściwie dobrane. Praca została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie Nature Communications w 2013 roku i osiągnęła 54 cytowania.

W kolejnej publikacji eksperymentalnej pt. *"Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy"* autorzy zastosowali podejście terapeutyczne dla DM1 z wykorzystaniem krótkich oligonukleotydów LNA nakierowanych na wydłużone ciągi CUG. Tego typu cząsteczki wiążą się do powtórzeń CUG, zapobiegając tworzeniu się ich kompleksów z białkami MBNL. Wykorzystując metodę EMSA autorzy wykazali, że nawet bardzo krótkie cząsteczki LNA-CAG8 wiązały się stabilnie do sekwencji CUG. Najbardziej efektywna cząsteczka LNA-CAG10 korygowała defekty splicingowe oraz redukowała foci jądrowe w komórkowych modelach DM1 oraz modelu mysim. Co ważne, badane cząsteczki nie degradowały transkryptu, w związku z tym są bezpieczne dla innych komórkowych transkryptów zawierających ciągi CUG (off-target), co potwierdzono eksperymentalnie.

Jednym z największych problemów terapii genowych jest dostarczanie cząsteczek terapeutycznych do tkanek docelowych, w szczególności dotyczy to podawania ogólnoustrojowego. Habilitantka testowała w ramach pracy wpływ modyfikacji tiofosforanowej (PS) na efektywność dostarczania oligonukleotydów LNA w komórkowych modelach DM1. Wg doniesień literaturowych tak zmodyfikowane cząsteczki powinny być efektywnie dostarczane do komórek na drodze gymnozy, bez potrzeby stosowania odczynników transfekcyjnych. Tak zmodyfikowane cząsteczki dostarczane do komórek fibroblastów DM1 indukowały nieznaczną poprawę splicingu oraz zmniejszały liczbę foci

jądrowych, jednak efekt był zależny od stężenia oligonukleotydów i czasu inkubacji. W swoich badaniach Habilitantka wykorzystała metodę RT-PCR, transfekcję oraz analizę foci metodą FISH. Podsumowując, publikacja nr 3 przedstawia bardzo obiecujące wyniki aktywności oligonukleotydów LNA – potencjalnych terapeutów dla DM1. W tej wieloautorskiej pracy opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* w 2015 roku, Habilitantka jest trzecią autorką. Praca była już cytowana 44 razy, co jest bardzo dobrym wynikiem, biorąc pod uwagę charakter aplikacyjny badań.

Problem ogólnoustrojowego dostarczania cząsteczek terapeutycznych był poruszany również w publikacji nr 4 pt. „*Therapeutic impact of systemic AAV-mediated RNA interference in a mouse model of myotonic dystrophy*”. Habilitantka prowadziła te badania w ramach stażu podoktorskiego w University of Washington School of Medicine pod opieką prof. Chamberlain’a. W celu degradacji transkryptów, zawierających wydłużone ciągi CUG autorzy wykorzystali technologię interferencji RNA oraz wektorowe cząsteczki tzw. sztuczne miRNA dostarczane w postaci wektorów wirusowych AAV6. Modelem badawczym DM1 były myszy z ekspresją transgenu ludzkiej alfa aktyny (HSA), zawierającego wydłużone ciągi CTG w regionie 3’UTR genu. Celem dla sztucznych miRNA były sekwencje specyficzne w transgenie HSA. Habilitantka przygotowała kasety ekspresyjne i wektory wirusowe, przeprowadziła iniekcje dożylnie rekombinowanych wektorów AAV6 a następnie na zebranym materiale mięśni szkieletowych przeprowadziła analizy molekularne i histopatologiczne. Wykazała bardzo wydajną transdukcję mięśni, znaczne obniżenie poziomu transkryptu transgenu HSA, poprawę alternatywnego splicingu oraz brak toksyczności rAAV6. Habilitantka brała również udział w eksperymencie elektromiografii igłowej u myszy traktowanych rAAV6 w celu diagnostyki wyładowań miotonicznych. Bardzo ciekawym aspektem badań, dyskutowanym również w publikacji, jest wysoka efektywność sztucznych miRNA w jądrze komórkowym. RNAi jest procesem działającym głównie na terenie cytoplazmy, dlatego głębsza charakterystyka procesów obserwowanych przez autorów (np. udział różnych białek Ago) na ich modelu miałyby istotne znaczenie poznawcze. W pracy tej, opublikowanej w 2015 roku w *Human Molecular Genetics*, dr Ewa Stępiak-Konieczna jest drugą autorką. Publikacja ma charakter aplikacyjny i w sposób kompleksowy charakteryzuje podejście terapeutyczne dla DM1 z wykorzystaniem RNAi i wektorów AAV6. Habilitantka zaprezentowała w niej szeroki warsztat metodyczny, obejmujący klonowanie, składanie wirusów, iniekcje dożylnie, analizy histologiczne, RT-qPCR, czy analizę markerów AST, ALT i CK.

Publikacja eksperymentalna nr 5 pt. “*AON-induced splice-switching and DMPK pre-mRNA degradation as potential therapeutic approaches for Myotonic Dystrophy type 1*” opisuje nowe podejście terapeutyczne dla DM1, wykorzystujące antysensowne oligonukleotydy do indukcji zmian splicingu pre-mRNA DMPK. Zmiany te miały prowadzić do degradacji transkryptu na drodze NMD lub usunięcia z mRNA regionu zawierającego mutację. Modelem badawczym były fibroblasty pochodzące od pacjentów z DM1. Pomimo indukcji zmian splicingowych i wyłączenia docelowych eksonów autorom nie udało się uzyskać efektu degradacji transkryptu, poprawy alternatywnego splicingu czy redukcji foci jądrowych. Ciekawe wyniki uzyskano przy wykorzystaniu systemu reporterowego do badania wpływu ekspansji powtórzeń CUG na transport mRNA i translację. Usunięcie regionu 3’UTR zawierającego fragment DMPK z ekspansją powtórzeń CUG przy pomocy AON zwiększyło translację DMPK. Taki sam efekt wywoływało również usunięcie fragmentu DMPK bez ekspansji CUG, co może świadczyć o wpływie sekwencji oskrzydlających powtórzeń CUG na hamowanie eksportu i translacji – jest to bardzo ciekawa obserwacja warta dalszych badań. Habilitantka wykazała, że modyfikacje chemiczne 2’Ome-PS są toksyczne w fibroblastach, pogłębiają nieprawidłowości splicingu

obserwowane w DM1 i wpływają na nieprawidłową ekspresję i splicing MBNL1 i CELF1. Wykazała również, że gapmery nakierowane na intron transkryptu DMPK mogą być skutecznymi terapeutykami dla DM1. Jest to najważniejsza praca składająca się na osiągnięcie habilitacyjne dr Ewy Stępnia-Koniecznej. Jako pierwsza autorka oraz autor korespondencyjny Habilitantka brała udział we wszystkich etapach przygotowania pracy, od postawienia hipotezy badawczej, poprzez zaprojektowanie eksperymentów, ich wykonanie, analizę wyników i napisanie manuskryptu. Praca została opublikowana w czasopiśmie Nucleic Acids Research w 2020 roku.

Podsumowując stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr Ewy Stępnia-Koniecznej stanowi istotny wkład w rozwój badań aplikacyjnych nad terapią DM1. Publikacje stanowiące podstawę wniosku habilitacyjnego obejmują szeroki zakres stosowanych podejść terapeutycznych, typów cząsteczek, metod dostarczania oraz modeli komórkowych i mysich DM1. Metody badawcze do określania efektywności i bezpieczeństwa stosowanych podejść terapeutycznych zostały właściwie dobrane, przy czym widać stały rozwój Habilitantki i poszerzanie warsztatu badawczego. Ostatnia praca jest doskonałym dowodem na samodzielność i skuteczność w realizacji badań. Rozprawa habilitacyjna pod względem formalnym jak i merytorycznym spełnia wszystkie wymagania stawiane postępowaniom habilitacyjnym. Drobne błędy językowe polegają na stosowaniu wyrazów, które mają swoje polskie odpowiedniki (np. targety, serum, mimikujące, aberracje) i nie wpływają na całkowitą ocenę pracy.

Ocena dorobku naukowego

Całkowity dorobek naukowy dr Ewy Stępnia-Koniecznej obejmuje 16 publikacji, z czego 10 prac po doktoracie. W zasadzie jest ich więcej, bo 4 znakomite prace opublikowane w latach 2007-2010 obejmują okres już po obronie pracy doktorskiej w 2006r. Prawdopodobnie w związku z tym, że są kontynuacją badań realizowanych w trakcie doktoratu Kandydatka ujęła je jako dorobek z okresu doktoratu. Gdyby kierować się datami publikacji 14 z 16 prac jest opublikowanych po doktoracie. Sumaryczny IF prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 132.3, prace cytowane były 925 razy (bez autocytowań) a wskaźnik Hirscha Kandydatki wynosi 11. Są to bardzo dobre wyniki jak na ten etap drogi naukowej. Choć liczba prac nie jest imponująca, na uwagę zasługuje fakt ich bardzo wysokiej jakości, co przejawia się średnim IF/pracę wynoszącym > 8. Wszystkie prace były opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, m.in. Nucleic Acids Research, Nature Communications, Genes and Development oraz Journal of Clinical Investigations. Habilitantka pełniła wiodącą rolę w przygotowaniu 5 publikacji, w tym w jednej z nich była również autorem korespondencyjnym.

Aktywność naukowa, osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne, popularnonaukowe

Habilitantka prezentowała wyniki swoich badań na międzynarodowych konferencjach naukowych w formie 10 posterów oraz 3 prezentacji ustnych. W trakcie realizacji projektu doktorskiego uczestniczyła w organizacji konferencji studenckich i doktoranckich w Wiedniu. Była wykonawcą w 2 projektach naukowych, a obecnie jest kierownikiem projektu Opus (NCN) będącego kontynuacją wcześniejszych badań. Dobrze oceniam tę część aktywności Habilitantki, zwłaszcza fakt kierowania projektem Opus, co świadczy o dojrzałości naukowej. Bardzo dobrze oceniam też aktywność Habilitantki związaną z wyjazdami stażowymi. Po uzyskaniu stopnia doktora na

Uniwersytecie Wiedeńskim w 2006 roku, dr Ewa Stępnia-Konieczna odbyła dwa długoterminowe staże zagraniczne w latach 2007-2011.

Osiągnięcia dydaktyczne Kandydatki oceniam pozytywnie. Obejmują one prowadzenie zajęć ze studentami z przedmiotu „Scientific English” w latach 2012-2013 oraz prowadzenie wykładów z serii „Animal models in human diseases” dla studentów Biotechnologii UAM w latach 2012-2014. Sprawowała opiekę naukową nad 4 studentami, w tym 2 magistrantami, co jest skromną liczbą biorąc pod uwagę pracę w jednostce prowadzącej działalność dydaktyczną. Brak informacji o pełnieniu funkcji promotora lub promotora pomocniczego w przewodach doktorskich. Słabą stroną wniosku jest brak informacji na temat udzielonych patentów międzynarodowych i krajowych, wykonanych ekspertyz lub innych opracowaniach na zamówienie, udziale w zespołach eksperckich i konkursowych, recenzowaniu projektów międzynarodowych i krajowych oraz recenzowaniu publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych.

Wniosek końcowy

Osiągnięcie naukowe dr Ewy Stępnia-Koniecznej, będące cyklem powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Prace te zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych i zostały już docenione przez środowisko naukowe, uzyskując dużą liczbę cytowań. Poza tym, całkowity dorobek naukowy, dydaktyczny i popularyzatorski dr Ewy Stępnia-Koniecznej spełnia wszystkie wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Na tej podstawie stawiam wniosek do rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Z poważaniem,



Marta Olejniczak