

dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG  
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
Uniwersytet Gdański,  
Tel.: +48 58 523 6305  
Fax: +48 58 523 6426  
E-mail: [aleksandra.krolicka@ug.edu.pl](mailto:aleksandra.krolicka@ug.edu.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Majewskiej zatytułowanej  
„Regulacja ekspresji genu związanego z biosyntezą prekursora tanszinoń  
u Szałwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*)”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi pod kierunkiem promotora Pana dr. hab. n. farm. Łukasza Kuźmy, prof. UM oraz promotora pomocniczego Pana dr. n. biol. Piotra Szymczyka.

Rozprawa doktorska opiera się na trzech oryginalnych publikacjach naukowych (jednej pracy przeglądowej i 2 pracach eksperymentalnych), które ukazały się drukiem w latach 2018 – 2022. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera wprowadzenie dotyczące *Salvia miltiorrhiza* Bunge (właściwości biologicznie czynne ekstraktów pozyskiwanych z tej rośliny, metabolitów wtórnych w niej zawartych ze szczególnym uwzględnieniem abietanowych nor-diterpenowych chinonów – tanszinoń, które akumulowane są w roślinach w perydermie korzeni w niewielkich ilościach oraz ich szlaków metabolicznych). Doktorantka wprowadziła czytelnika w skomplikowany temat dotyczący powstawania tanszinoń w roślinie z uwzględnieniem wysokoprzepustowych badań omocnym (genom, transkryptom, proteom i metabolom). W pracy doktorskiej znaleźć można również streszczenie w języku polskim i angielskim, rozdział dotyczący materiałów i metod wykorzystywanych w pracy, omówieniu najważniejszych wyników oraz ich dyskusja, wniosków końcowych oraz koncepcję dalszych

badania związanych z regulacją genu reduktazy 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMGR4) *S. miltiorrhiza* oraz bardzo licznej literatury, która zawiera 148 pozycji anglojęzycznych. Na końcu rozprawy Doktorantka zaprezentowała swoje pozostałe osiągnięcia w postaci innych publikacji, patentu, doniesień konferencyjnych oraz nagród i wyróżnień. Łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor, IF*) przedstawionych w pracy doktorskiej publikacji wynosi 12,223, co przekłada się na 230 punktów ministerialnych.

Wybór publikacji przedstawionych w pracy doktorskiej jest zasadny i doskonale pokazuje ciąg przyczynowo-skutkowy dotyczący regulacji ekspresji genu związanego z biosyntezą prekursora tanszironów u Szałwii czerwonokorzeniowej. Ze względu na fakt, że prace stanowiące rozprawę doktorską przed opublikowaniem były wnikliwie poddane procesowi recenzji (*peer-review*) oraz edycji, nie będę ich szczegółowo omawiać.

Metabolity wtórne wytwarzane przez tkanki roślinne stanowią nieocenione źródło związków biologicznie czynnych wykorzystywanych z powodzeniem w przemyśle farmaceutycznym. Doskonałym przykładem jest *S. miltiorrhiza* Bunge, która była wykorzystywana przez tysiąclecia przez ludzi. Stosowana jest w chińskiej medycynie w leczeniu między innymi schorzeń wieńcowych i hematologicznych, co jest ściśle związane z obecnością w jej tkankach pigmentów diterpenowych – tanszironów, które były głównym tematem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Ze względu na fakt że te cenne metabolity wórne roślina gromadzi w perydermie korzenia w bardzo małych ilościach, a zapotrzebowanie na surowiec roślinny jest ogromny, próba zwiększenia wydajności biosyntezy tanszironów w kulturach *in vitro* Szałwii czerwonokorzeniowej jest wysoce wskazana. Z tego też względu podjęcie przez Doktorantkę badań nad reduktazą 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMGR), od której w dużej mierze zależy tempo biosyntezy tanszironów uważam za w pełni uzasadnione. Temat podjęty przez Panią mgr Małgorzatę Majewską wydaje się niezmiernie istotny nie tylko z punktu widzenia poznawczego, lecz również praktycznego, bo uzyskanie roślin bogatszych w cenne biologicznie czynne metabolity wtórne może pozwolić na pozyskiwanie tanszironów na skalę przemysłową. Dzięki zastosowaniu przez

Doktorantkę na początku swoich badań analizy *in silico* pozwoliło w znacznym stopniu skrócić czas badań, obniżyć ich koszty i ukierunkować badania na właściwe tory. Pani mgr Małgorzata Majewska doskonale orientuje się w badaniach *in silico*, co pokazała w pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Gene* w 2018 roku. Opisanie przez Doktorantkę 40 wybranych internetowych baz dostarczających eksperymentalnej i teoretycznej wiedzy na temat promotorów jako regulatorów transkrypcji genów u eukariontów i prokariotów oraz dane opisujące organizację promotorów i ich interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi (TF) i miRNA uważam za bardzo ważne i świadczące o doskonałej znajomości tematu. Doktorantka skorzystała z cennego narzędzia wykorzystywanego w badaniach regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji. Doktorantka wykorzystując technikę *genome walking* wyizolowała niepoznany dotąd region promotora *HMGR4 S. miltiorrhiza*. Wykonała również analizę *in silico* sekwencji promotora *HMGR4 S. miltiorrhiza* korzystając z programu TSSP (Softberry Inc.), PlantPan 2.0, Tandem repeats Finder, aplikacje CpGProD, Match oraz PWMs z baz PLACE, AGRIS i JASPAR. Zweryfikowała obecność miRNA i miejsc ich wiązania do sekwencji promotora i 5'UTR za pomocą miRBase. Uzyskana przez Doktorantkę sekwencja promotora *HMGR4 S. miltiorrhiza* o długości 1646 pz została poddana analizom strukturalnym. Dzięki uzyskanym wynikom zlokalizowano TATA box, powtórzenia tandemowe, sekwencję bogatą w pirymidyny w regionie 5' niepodlegającym translacji (5'UTR), 5369 potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych (TFBS), 365 oddziałujących z mini czynników transkrypcyjnych znalezionych wcześniej w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* oraz 12 miejsc wiązania dla dojrzałych miRNA. Bardzo istotną informacją jest to, że Doktorantka wykazała że wiele miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych znalezionych w sekwencji promotora *HMGR4 S. miltiorrhiza* oddziałuje z czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez światło, kwas salicylowy, infekcje bakteryjne i fitohormony (auksyny, gibereliny, kwas abscysynowy, kwas salicylowy, kwas jasmonowy). Kompleksowa analiza *in silico*, która wykonała Doktorantka przedstawia cenne nowe informacje na temat regulacji funkcji promotorów HMGR, a to może być w przyszłości wykorzystane do tworzenia zmodyfikowanych/syntetycznych

promotorów, które mogą być aktywne w kontrolowanych warunkach, a w konsekwencji może się to przełożyć na pozyskiwanie cennych metabolitów wtórnych z tkanek roślinnych w znacznych ilościach.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka wykorzystwała wyniki swoich analiz *in silico* na modelu roślinnym. Uważam, że wyniki przedstawione w publikacji *Molecules* w 2022 roku są zwieńczeniem jest kilkuletniej pracy. Dzięki uzyskaniu transformantów *S. miltiorrhiza* zawierających konstrukt nadekspresyjny pRI201-AN-HMGR4 przy wykorzystaniu *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*), Doktorantka mogła stwierdzić, że najwyższa ekspresja genu *HMGR4* obserwowana była w liściach i łodygach, a w korzeniach poziom transkrypty był niższy. Ponadto wcześniejsze analizy *in silico* wykonane przez Panią mgr Małgorzatę Majewską wskazywały na wpływ giberelin, auksyn i kwasu salicylowego na poziom ekspresji genu *HMGR4* *S. miltiorrhiza*, co zostało również potwierdzone doświadczalnie i opisane w publikacji *Molecules*. Badania pokazały, że dzięki nadekspresji *HMGR4* znacząco zwiększyła się akumulacja dihydrotanszinonu I (DHTI), kryptotanszinonu (CT), tanszinonu I (TI) i tanszinonu IIA (TIIA) w korzeniach, a także tanszinonu IIA w łodygach i liściach. Korzenie *S. miltiorrhiza* uzyskane z hodowli w glebie wykazywały wyższe stężenia badanych metabolitów niż hodowane w kulturach *in vitro*. Ponadto Doktorantka wykazała, że dodatek kwasu giberelinowego na korzenie *in vitro* *S. miltiorrhiza* z nadekspresją *HMGR4* wpływa korzystnie na podwyższenie poziomu syntezy kryptotanszinonu o 794,2 µg/g s.m. i tanszinonu IIA o 88,1 µg/g s.m. Z kolei inny hormon – IAA istotnie hamował biosyntezę badanych tanszinonów w korzeniach.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Panią mgr Małgorzatę Majewską o przedyskutowanie kilku zagadnień i rozwianiu kilku moich wątpliwości, które pojawiły się podczas analizy jej dysertacji:

1. Dlaczego części nadziemne Szatwii czerwonokorzeniowej hodowano na pożywce Murashige i Skoog, a korzenie w podłożu B% typu Gamborg?

2. Na jakiej podstawie wytypowano określone stężenia kwasu giberelinowego (1 mg/L), kwasu indolilo-3-octowego (0,5 mg/L) i kwasu salicylowego (20 mg/L), które zostały użyte do ekspresji genu HMGR4 *S. miltiorrhiza*? Czy badano inne stężenia regulatorów wzrostu? Dlaczego do analizy materiału genetycznego metodą RT-qPCR ze starterami specyficznymi dla genów HMGR4 i ACT7 wybrano tylko liście?

3. Czy zdaniem Doktorantki indukcja morfogenezy *S. miltiorrhiza* z udziałem fazy kalusa po transformacji mogło mieć wpływ na poziom tanszynonów w uzyskanych transformowanych pędach, skoro do indukcji kalusa stosowano między innymi auksynę?

4. Skoro Doktorantka hodowała rośliny szatwii w sterylnej glebie wolnej od bakterii to jak można wytłumaczyć wyższy poziom tanszynonów w korzeniach właśnie z takiej hodowli? Czy korzenie hodowane w glebie różniły się morfologicznie od korzeni hodowanych w kulturach *in vitro*?

5. Jaki elicytor biotyczny byłby potencjalnie dobrym kandydatem do podwyższenia poziomu tanszynonów w transformowanej Szatwii czerwonokorzeniowej z nadekspresją genu HMGR4?

6. Moje ostatnie pytanie do Pani Małgorzaty Majewskiej związane jest z produktywnością tanszynonów w transformowanych roślinach *S. miltiorrhiza*. Często się bowiem zdarza, że nadekspresja genu wiąże się ze wzrostem poziomu metabolitu wtórnego, ale wpływa niekorzystnie na wzrost roślin, a tym samym produktywność. Czy zauważyła Pani takie niekorzystne zjawisko w przypadku nadekspresji genu HMGR4?

W podsumowaniu stwierdzam, że prezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki i ich interpretacja są wystarczającym materiałem dla uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Oświadczenia współautorów publikacji wskazują jednoznacznie, że wkład Pani mgr Małgorzaty Majewskiej w powstanie 3 prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej jest wiodący i znaczący (we wszystkich jest ona pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym). Tylko w jednej pracy w czasopiśmie *Molecules* drugim autorem korespondencyjnym jest promotor dr hab. Łukasz Kuźma, prof. UM. W mojej opinii Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki wnoszące wartość naukową w dziedzinie szeroko pojętej biotechnologii roślin. Wykorzystując zaawansowane badania bioinformatyczne regionu promotora genu HMGR4 *S. miltiorrhiza* wniosła nowe i cenne informacje dotyczące jego budowy oraz potencjalnych czynników transkrypcyjnych i miRNA regulujących aktywność kontrolowanego przez niego genu. Wskazała że nadekspresja sekwencji kodującej gen HMGR4 *S. miltiorrhiza* przekłada się na podwyższenie poziomu biosyntezy

tanszynonów w korzeniach hodowanych w glebie oraz w kulturach *in vitro*. Poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów regulacji ekspresji genów *HMGR4 S. miltiorrhiza* pozwoli na wykorzystanie tego zjawiska do pozyskiwania znacznych ilości cennych biologicznie czynnych tanszynonów, które z powodzeniem znajdą zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

Na uwagę zasługuje również fakt, że Pani mgr Małgorzata Majewska jest również współautorem pięciu innych prac, które ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w latach 2014 - 2023 oraz patentu przyznanego w 2015 roku. Świadczy to o szerokich zainteresowaniach badawczych Doktorantki.

Uważam, że udział Pani mgr Małgorzaty Majewskiej w powstanie trzech prac naukowych o zasięgu międzynarodowym włączonych do rozprawy doktorskiej upoważnia mnie do stwierdzenia, że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Majewskiej pt. „Regulacja ekspresji genu związanego z biosyntezą prekursora tanszynonów u Szalwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*)” spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie naukowej. Na uwagę zasługuje również fakt, że Pani mgr Małgorzata Majewska połączyła w swojej pracy wiele technik - od hodowli roślin w kulturach *in vitro*, analizy *in silico* sekwencji promotora *HMGR4 S. miltiorrhiza*, oznaczenia ekspresji genu *HMGR4* przed i po elicytacji, po oznaczenie poziomu tanszynonów w transformantach *S. miltiorrhiza* za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na względzie wartość poznawczą zaprezentowanych przez nią badań oraz opublikowanie ich w czasopismach o zasięgu międzynarodowym wnoszę ponadto o **wyróżnienie pracy doktorskiej** stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,  
Kierownik  
Zakład Badania Związków Biologicznie  
Czynnych  
  
dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG