



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

### Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Majewskiej  
pt.: "Regulacja ekspresji genu związanego z biosyntezą prekursora tanszidonów  
u Szałwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*)"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w **Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego** w Łodzi pod kierunkiem naukowym Pana dr hab. n. farm. Łukasza Kuźmy, prof. UM. Promotorem pomocniczym rozprawy był Pan dr n. biol. Piotr Szymczyk.

Obiektem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest *Salvia miltiorrhiza* Bunge – szalwia czerwonokorzeniowa z rodziny Lamiaceae (jasnotowate). Jest to gatunek pochodzący z Azji, którego korzenie od ponad 1000 lat znajdują zastosowanie w leczeniu m.in. chorób układu krążenia, chorób immunologicznych, zapalenia wątroby, bezsenności.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Majewskiej stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów opublikowanych w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach naukowych i opatrzone: wstępem, celem pracy, opisem materiałów i metod stosowanych w realizacji założeń pracy doktorskiej, prezentacją kluczowych wyników, ich dyskusją oraz wnioskami, piśmiennictwem oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Ponadto, podsumowując swoje osiągnięcia, Autorka wskazała kierunek dalszych badań nad rolą czynników transkrypcyjnych w biosyntezie tanszidonów. Praca zawiera również oświadczenia współautorów publikacji, łącznie z którymi liczy 128 stron.

Publikacje wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej ukazały się w przedziale lat 2018 -2022, w takich czasopismach jak: *Molecules*, *Plants* oraz *Gene*. We wszystkich

publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Całkowity współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wynosi **12,223**, a liczba punktów **MNiSW – 230**.

Wśród publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej znajduje się jedna praca przeglądowa: Majewska M., Wysokińska H., Kuźma Ł., Szymczyk P. „Eukaryotic and prokaryotic promoter databases as valuable tools in exploring the regulation of gene transcription: a comprehensive overview”, *Gene*, 2018, 644, 38–48, doi: 10.1016/j.gene.2017.10.079; IF = 2,638 (wg Journal Citation Reports 2018), pkt. MEiN = 20,

oraz dwie publikacje oryginalne doświadczalne:

- 1) Majewska M., Kuźma Ł., Szymczyk P. „Isolation and comprehensive *in silico* characterisation of a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 4 (*HMGR4*) gene promoter from *Salvia miltiorrhiza*: comparative analyses of plant HMGR promoters”, *Plants*, 2022, 11, 1861, doi: 10.3390/plants11141861; IF = 4,658; pkt. MEiN = 70;
- 2) Majewska M., Szymczyk P., Gomulski J., Jeleń A., Grąbkowska R., Balcerczak E., Kuźma Ł. „The expression profiles of the *Salvia miltiorrhiza* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 4 gene and its influence on the biosynthesis of tanshinones” *Molecules*, 2022, 27, 4354, doi: 10.3390/molecules27144354; IF = 4,927), pkt. MEiN = 140.

Wyniki pracy doktorskiej prezentowane były także na konferencji naukowej w formie plakatu.

Dorobek naukowy Doktorantki stanowi również pięć współautorskich publikacji spoza zakresu pracy doktorskiej, siedem komunikatów zjazdowych. Mgr Małgozrata Majewska jest również współtwórczynią patentowanego wynalazku pt.: Strapagiel D., Majewska M., Słomka M., Janik K., Sobalska M., Bartosz G. „Sposób ustalania płci” Biuletyn Urzędu Patentowego RP, 2015, 13, 1082, 406569. Ponadto praca, w której mgr Małgozrata Majewska była współautorką, uzyskała wyróżnienie w konkursie „InnoTechAkademia II BioTechScience – droga do własnych marzeń.

W przygotowaniu pracy przeglądowej udział Doktorantki był znaczący i obejmował opracowanie koncepcji pracy, zebranie i analizę piśmiennictwa oraz napisanie manuskryptu. Praca ta została opublikowana w czasopiśmie *Gene*. Stanowi ona opis wykorzystania 40 baz danych do poszukiwania informacji na temat regulacji ekspresji genów na poziomie ich transkrypcji, zarówno u gatunków eukariotycznych, jak i prokariotycznych.

W przygotowaniu publikacji eksperymentalnych udział mgr Małgorzaty Majewskiej był również znaczący i polegał na: opracowywaniu koncepcji badań i ich realizacji, analizie wyników oraz przygotowywaniu manuskryptów. Prace te prezentują spójną tematykę badawczą, której celem było zbadanie mechanizmów regulacji genu kodującego reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A 4 (*HMGR4*) w gatunku *S. miltiorrhiza*, genu którego poziom ekspresji jest jednym z czynników wpływających ograniczająco na wysokość biosyntezy tanszidonów. Tanszidony, abietanowe norditerpenowe chinony, należą do głównych metabolitów wtórnych *S. miltiorrhiza*, które biosyntetyzowane i gromadzone są w perydermie jej korzeni. Związki te odpowiadają za aktywność przeciwzapalną, antyoksydacyjną, regulującą metabolizm, fitoestrogenną oraz przeciwdrobnoustrojową tego surowca. Ponadto wykazują one działanie ochronne w chorobach układu krążenia, zapobiegają chorobom układu nerwowego, osteoporozie oraz chorobom nowotworowym. Tak szeroki zakres aktywności biologicznej i wynikających z niej zastosowań tanszidonów obecnych w korzeniach *S. miltiorrhiza* skutkuje stałym wzrostem zapotrzebowania na ten surowiec. Z uwagi na fakt, iż zawartość tanszidonów jest w korzeniach bardzo niska, wysoce zasadnym jest opracowanie metod pozwalających na zwiększenie ich biosyntezy. Metody biotechnologiczne pozwalają, w sposób nie ograniczony w czasie oraz w warunkach podlegających pełnej kontroli eksperymentatora, na prowadzenie bioprocessów w organach bezpośrednio zaangażowanych w biosyntezę określonych metabolitów wtórnych, związków o często skomplikowanej strukturze chemicznej, których synteza chemiczna jest w wielu przypadkach niezwykle trudna i kosztowna, a w ostatecznym rozrachunku nieopłacalna. Jedną z głównych przyczyn limitujących produkcję metabolitów wtórnych na skalę przemysłową w roślinnych kulturach *in vitro*, jest

niewystarczająca wiedza na temat mechanizmów leżących u podstaw regulacji ich biosyntezy w komórkach roślinnych.

Uważam, że podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy jest aktualna i nowoczesna, postawione cele badawcze i przeprowadzone badania są uzasadnione i niezmiernie ważne. Zrealizowane badania wpisują się w zakres działań mających na celu optymalizację bioprocessów zachodzących w roślinnych kulturach *in vitro*, prowadzącą do intensyfikacji produkcji metabolitów wtórnych. Główny cel pracy Doktorantka realizowała w trzech uzupełniających się obszarach badawczych: biologii molekularnej, biotechnologii roślin oraz fitochemii.

Do izolacji niepoznanego dotychczas promotora genu *HMGR4*, analizy jego sekwencji *in silico*, badań porównawczych jego sekwencji, oceny konserwatywności oraz wytypowania potencjalnych regulatorów ekspresji genu *HMGR4*, Doktorantka zastosowała szereg narzędzi bioinformatycznych, które pozwoliły na: ustalenie położenia: promotora, kasety TATA, miejsca startu transkrypcji (TSS) oraz regionu 5'UTR. Umożliwiły również identyfikację i wskazanie miejsc występowania powtórzeń tandemowych wysp CpG, miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne oraz na identyfikację czynników transkrypcyjnych oraz ich wzajemnych oddziaływań w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Ponadto możliwe było wykonanie analiz wskazujących na obecność miRNA oraz pozwalających na lokalizację ich miejsc wiązania do sekwencji promotora i 5'UTR.

Doktorantka, metodą qRT-PCR, przeprowadziła również ocenę wpływu trzech wybranych regulatorów wzrostu tj. kwasu giberelinowego GA<sub>3</sub>, kwasu inolilo-3-octowego lub kwasu salicylowego, na poziom ekspresji genu *HMGR4*. Metodą tą wykonała również analizę porównawczą wpływu transformacji konstruktem zawierającym sekwencję kodującą genu *HMGR4* lub wektorem bez tego konstrukt, na poziom jego ekspresji w transformowanych liściach, łodygach i korzeniach *S. miltiorrhiza* hodowanych *in vitro*. Doktorantka zbadała także korelację pomiędzy poziomem ekspresji genu *HMGR4* a wysokością biosyntezy tanszidonów w liściach, pędach oraz korzeniach roślin hodowanych *in vitro* i traktowanych kwasem giberelinowym GA<sub>3</sub> lub kwasem inolilo-3-octowym. Uzyskane wyniki zostały opracowane statystycznie.

Przeprowadzone przez mgr Małgorzatę Majewską, w toku realizacji założeń pracy doktorskiej, badania są bardzo pracochłonne i czasochłonne. Doktorantka podołała temu wyzwaniu, a wszystkie uzyskane przez Nią wyniki przedstawione w publikacjach są innowacyjne.

Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki w sposób istotny poszerzyły aktualny stan wiedzy na temat:

- 1) sekwencji regionu promotora genu *HMGR4*, która została zdeponowana w GenBanku pod numerem KT921337.1;
- 2) roli poszczególnych sekwencji promotora genu *HMGR4* w regulacji biosyntezy tanszinonów, w tym roli potencjalnych czynników transkrypcyjnych oraz miRNA regulujących aktywność tego promotora;
- 3) różnic w poziomie ekspresji genu *HMGR4* w poszczególnych organach *S. miltiorrhiza*;
- 4) korelacji między poziomem ekspresji genu *HMGR4* a wydajnością biosyntezy tanszinonów w różnych organach rośliny w różnych wariantach hodowlanych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje poznanie i zdeponowanie w GenBanku sekwencji promotora genu *HMGR4* oraz identyfikacja potencjalnych czynników transkrypcyjnych oraz miRNA, wpływających na aktywność regulacyjną tego promotora, co ma bezpośredni wpływ na wydajność biosyntezy badanych tanszinonów.

Nie mam pytań do Doktorantki dotyczących tematyki badawczej rozprawy ponieważ jest ona tak dobrze przedstawiona pod względem merytorycznym, że w trakcie czytania rozprawy znajdowałam w niej odpowiedzi na wszystkie nurtujące mnie pytania.

Podczas obrony chciałabym poprosić Panią mgr Małgorzatę Majewską o przedyskutowanie następującego zagadnienia: przeprowadzone przez Panią badania wskazują na istotny wpływ poziomu ekspresji genu *HMGR4* na możliwość pozyskania surowca roślinnego o wysokiej zawartości tanszinonów, czy w związku z tym widzi Pani możliwość opracowania metody biotechnologicznej pozwalającej na wytwarzanie na skalę przemysłową tych związków diterpenowych o znaczeniu terapeutycznym?

Podsumowując, uważam, że tematyka pracy jest aktualna i niezwykle istotna w obszarze badań biotechnologicznych nad biosyntezą związków naturalnych

o potencjale terapeutycznym w materiale roślinnym. Zakres wykonanych prac wskazuje na wszechstronną wiedzę teoretyczną Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, umiejętność prowadzenia prac eksperymentalnych oraz ich właściwą interpretację.

Zważywszy na powyższe uważam, że udział Pani mgr Małgorzaty Majewskiej w przygotowanie trzech publikacji naukowych, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, upoważnia mnie do stwierdzenia, że **rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Majewskiej pt.: "Regulacja ekspresji genu związanego z biosyntezą prekursora tanszynonów u Szałwii 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.)

**Przedstawiam zatem Radzie Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

*Katarzyna Sykińska-Borewicz*

Warszawa, 12 lipca 2023 r.