



Katarzyna Sykłowska-Baranek

AUTOREFERAT

Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2014

Katarzyna Sykłowska-Baranek

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- a) **2002.07.12** - studia podyplomowe w Szkole Głównej Handlowej w Warszawie, Kolegium Zarządzania i Finansów, Rachunkowość i Finanse Przedsiębiorstwa, praca dyplomowa pt.: „Wybrane aspekty wyceny i ewidencji wartości niematerialnych i prawnych”. Promotor: dr Irena Kondratowicz.
- b) **2001.06.20** - doktor nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), praca doktorska pt.: „Wytwarzanie paklitakselu oraz 10-deacetylobakkatyny III w korzeniach transformowanych i niezmienionych genetycznie organach i tkankach dwóch odmian cisa *Taxus x media* Rehd.”. Promotor: prof. dr hab. Mirosława Furmanowa.
- c) **1993.06.21** - magister inżynier, SGGW, Wydział Rolniczy, praca magisterska pt.: „Introdukcja wybranych gatunków z rodziny *Amarantaceae*, rodzaju *Amaranthus* do warunków kultur *in vitro*”. Praca wykonana w Pracowni Biotechnologii Roślin Ogrodu Botanicznego - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Powsinie. Promotor: prof. dr hab. J.J. Rybczyński.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- | | |
|--------------------------------|--|
| 01.10.2001 – obecnie | adiunkt, Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych (dawniej: Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej), Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny. |
| 16.11.1993 – 30.09.2001 | asystent, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny AM w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny, WUM). |

4. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wykorzystanie potencjału produkcyjnego organów i komórek wybranych gatunków roślin z kultur *in vitro* do pozyskiwania związków o właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwdrobnoustrojowych”

Zgłoszona do postępowania habilitacyjnego tematyka obejmuje cykl siedmiu publikacji. Ponadto wyniki prowadzonych badań nad zastosowaniem ciekłego perfluorozwiązku do ekstrakcji *in situ* metabolitów wtórnych, zostały objęte zgłoszeniem patentowym.

b) wykaz publikacji:

Lp.	Publikacja	Punktacja	
		IF	KBN/MNiSW
1.	Syklowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A., Furmanowa M. (2009). Enhancement of taxane production in hairy root culture of <i>Taxus x media</i> var. <i>Hicksii</i> . Journal of Plant Physiology 166, 1950 – 1954. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonaniu większości hodowli korzeni i analiz HPLC, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 78%.</i>	2,500	32
2.	Exposito O., Syklowska-Baranek K., Moyano E., Onrubia M., Bonfill M., Palazon J., Cusido R. M. (2010). Metabolic responses of <i>Taxus media</i> transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. Biotechnology Progress, 26 (4): 1145 – 1153. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na otrzymaniu komórek z wbudowanym genem syntazy taksadienowej oraz na współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 15%.</i>	2,178	32
3.	Graikou K., S. Baranek K., Pietrosiuk A., Damianakos H., Jeziorek M., Chinou I. (2011). Chemical analysis of <i>Lithospermum canescens</i> (Michx.) Lehm. hairy roots through TLC, CC, GC-MS, ESI-MS and NMR methods. Acta Chromatographica, 23 (2): 353 – 363. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na prowadzeniu hodowli korzeni transformowanych oraz na przygotowaniu ekstraktów z uzyskanego materiału roślinnego. Ponadto brałam udział w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 17%.</i>	0,760	20

4.	Syklowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Gawron A., Kawiak A., Łojkowska E., Jeziorek M., Chinou I. (2012). Enhanced production of antitumour naphthoquinones in transgenic hairy root lines of <i>Lithospermum canescens</i>. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures, 108: 213 – 219. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonaniu większości hodowli korzeni i analiz HPLC, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 69%.</i>	3,633	25
5.	Syklowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Naliwajski M.R., Kawiak A., Jeziorek M., Wyderska S., Łojkowska E., Chinou I. (2012). Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of <i>Arnebia euchroma</i> (Royle) Johnston. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 48: 555 – 564. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonaniu większości hodowli zawiesinowych i analiz HPLC, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 59%.</i>	1,139	20
6.	Damianakos H., Kretschmer N., Syklowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Bauer R., Chinou I. (2012). Antimicrobial and cytotoxic isohexenylnaphthazarins from <i>Arnebia euchroma</i> (Royle) Johnston. (Boraginaceae) callus and cell suspension culture. Molecules, 17: 14310 – 14322. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na prowadzeniu hodowli zawiesinowych, przygotowaniu ekstraktów roślinnych oraz na współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 17%.</i>	2,428	25
7.	Syklowska-Baranek K., Pilarek M., Cichosz M., Pietrosiuk A. Liquid perfluorodecalin application for <i>in situ</i> extraction and enhanced naphthoquinones production in <i>Arnebia euchroma</i> cell suspension cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology, DOI 10.1007/s12010-013-0701-5. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu koncepcji badań, wykonaniu badań chromatograficznych techniką HPLC, w tym analizy chiralnej, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu i korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 40%.</i>	1,893	25
8.	Syklowska-Baranek K., Pilarek M., Pietrosiuk A. Zgłoszenie patentowe P.404726 z dnia 16.07.2013 pt.: „Zastosowanie perfluorow związków do ekstrakcji metabolitów roślinnych”. <i>Mój wkład w przygotowanie zgłoszenia patentowego wyniósł 30% i dotyczył współudziału w opracowaniu koncepcji wynalazku, wykonaniu badań chromatograficznych i hodowli in vitro oraz w przygotowaniu opisu wynalazku.</i>	-	-
Łącznie:		14,531	179

Wyniki badań opublikowane w wymienionych pracach uzyskałam przy finansowym wsparciu z grantów KBN 3499/B/P01/2007/3:3, MNiSW N N405 362537 oraz prac statutowych WUM.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Celem podjętych przeze mnie badań, opisanych w pracach zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym, było zwiększenie metodami biotechnologicznymi wytwarzania taksanów, a wśród nich paklitakselu – związku o ugruntowanej pozycji w leczeniu wielu nowotworów, oraz barwnych pochodnych alkaniny/szikoniny, związków wykazujących wielokierunkową aktywność biologiczną m.in. przeciwzapalną, przyspieszającą gojenie ran oraz przeciwdrobnoustrojową.

Materiał do badań stanowiły korzenie transformowane *Taxus x media* var. *Hicksii* (Taxaceae), komórki w hodowli zawiesinowej z wprowadzonym dodatkowym genem syntazy taksadienowej (genem *txs*) *Taxus x media*, korzenie transformowane *Lithospermum canescens* (Boraginaceae), tkanka kalusowa i komórki w hodowli zawiesinowej *Arnebia euchroma* (Boraginaceae).

Ponadto celem mojej pracy było określenie profilu chemicznego korzeni transformowanych *Lithospermum canescens*, tkanki kalusowej i komórek z hodowli zawiesinowej *Arnebia euchroma* oraz zbadanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej otrzymanych z nich ekstraktów i wyizolowanych związków.

Wybrane do badań biotechnologicznych rośliny należą do gatunków chronionych (cisy) lub też zagrożonych wyginięciem na skutek nadmiernej eksploatacji ich stanowisk naturalnych (*Arnebia euchroma*, *Lithospermum canescens*).

Korzenie transformowane *T. x media* var. *Hicksii*, otrzymałam w czasie wykonywania pracy doktorskiej, w wyniku transformacji przeprowadzonej z wykorzystaniem szczepu LBA 9402 *Agrobacterium rhizogenes* (Furmanowa et Sykłowska-Baranek, 2000).

Badania nad wytwarzaniem taksanów w hodowli zawiesinowej komórek z wprowadzonym dodatkowym genem *txs* zostały zapoczątkowane i wykonane we współpracy z prof. Mercedes Bonfill z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Barcelonie.

Korzenie i tkanki cisów zmienione genetycznie stanowią unikatowy materiał roślinny ze względu na niską podatność roślin nagozalążkowych na transformację genetyczną.

Natomiast korzenie transformowane *L. canescens* otrzymałam po transformacji szczepem *A. rhizogenes* ATCC 15834, a badania nad ośmioma liniami tych korzeni stanowiły część pracy habilitacyjnej dr hab. n. farm. Agnieszki Pietrosiuk (Pietrosiuk et al., 2006). Kultury korzeni

transformowanych tego gatunku są alternatywnym źródłem barwnych związków naftochinonowych, w stosunku do szeroko opisywanego w piśmiennictwie *L. erythrorhizon*.

Tkankę kalusową *A. euchroma*, wykorzystaną w moich badaniach otrzymano dzięki uprzejmości dr Urmantsevej z Rosyjskiej Akademii Nauk (Pietrosiuk et al., 1999).

Wprowadzenie w tematykę badawczą publikacji zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym

Rośliny stanowią bardzo liczną grupę organizmów, do tej pory opisano ponad 250 tys. gatunków, a ocenia się, że istnieje ich przynajmniej 500 tys. Wśród tej grupy wyizolowano i zidentyfikowano ponad 100 tys. metabolitów wtórnych, a szacuje się, że co roku identyfikowanych jest ok. 4 tys. nowych związków (Oksman-Caldentey et Inzé, 2004).

Związki te są produktami wyspecjalizowanej przemiany materii roślin o bardzo różnorodnym charakterze chemicznym i najczęściej stanowią końcowe produkty procesów biosyntezy.

Nie przypisuje się im podstawowej funkcji w życiu rośliny, mogą natomiast pełnić specyficzną rolę w jej fizjologii, np. są: hormonami roślinnymi – regulują procesy wzrostu i różnicowania; fitoaleksynami – związkami o właściwościach obronnych i antybiotycznych (ogrywają istotną rolę w odporności czynnej roślin); fitoncydami lub mogą pełnić funkcję ekologiczną (na drodze allelopatii). Związki te mogą gromadzić się w całej roślinie lub tylko w określonych jej częściach.

Zainteresowanie metabolitami wtórnymi znacznie wzrosło, głównie z uwagi na ich właściwości biologiczne i farmakologiczne. W większości są one substancjami o bardzo złożonej budowie, ich synteza chemiczna jest niezwykle trudna i kosztowna, co w ostatecznym rozrachunku czyni ją nieopłacalną. W warunkach naturalnych biosynteza przebiega powoli i na ogół z bardzo małą wydajnością. Również dostępność materiału roślinnego może być ograniczona, co może wynikać ze specyficznych wymagań klimatycznych (np. *Arnebia euchroma* występuje w Himalajach na wysokości 3700-4200 m n.p.m.). ścisłej ochrony niektórych gatunków (np. cisy w Polsce), bardzo powolnego wzrostu roślin (np. *Cinchona* sp. – chinowiec – korę można pozyskiwać dopiero z 10-letnich drzew), uwarunkowań politycznych (np. rząd Chin blokował dostęp do roślin *Artemisia annua* i związków z nich izolowanych do wczesnych lat osiemdziesiątych XX wieku) oraz z trudności izolacji związków z materiału roślinnego.

Dlatego też produkcja metabolitów wtórnych na dużą skalę z użyciem kultur komórkowych, tkankowych lub organów roślinnych wydaje się być uzasadnionym i atrakcyjnym rozwiązaniem. Tym bardziej, że roślinne kultury *in vitro* wykorzystywane są jako systemy do poznawania metabolicznych szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych. Znajomość tych szlaków pozwala na zastosowanie metod inżynierii metabolicznej w celu ich modyfikacji i uzyskania syntezy

pożądanych związków. Do zalet metody roślinnych kultur tkankowych zaliczyć można ścisłą kontrolę i optymalizację procesów biosyntezy, która przyspiesza i zwiększa produkcję metabolitów oraz ułatwia ich izolację i uniezależnia od wymagań klimatycznych. Ponadto, nie obowiązują w tym przypadku ograniczenia wynikające z ochrony roślin oraz możliwy jest wybór organów lub tkanek bezpośrednio związanych z biosyntezą metabolitów (Kolewe et al., 2008; Shilpa et al., 2010; Vijaya Sree et al., 2010).

Pierwszym metabolitem wtórnym, wdrożonym w 1983 r. do produkcji metodami biotechnologicznymi, była szikonina (ok. 4500 USD/kg) produkowana w kulturze zawieszinowej *Lithospermum erythrorhizon* (Mitsui Petrochemical, Japonia) (Papageorgiou et al. 1999).

Do tej pory, poza szikoniną, na skalę przemysłową metodami biotechnologicznymi wytwarza się kilka metabolitów wtórnych, np.: berberynę (*Coptis japonica*), polisacharydy (*Echinacea purpurea*), winkaminę (*Vinca minor*), saponiny i biomasę żeń-szenia (*Panax ginseng*), kwas rozmarynowy (*Coleus blumei*), geraniol (*Geranium sp.*), purpurynę (*Rubia sp.*), skopolaminę (*Duboisia spp.*) (Grajek, 2001; Kolewe et al., 2008) oraz paklitaksel (*Taxus sp.*) (Frense, 2007).

Wymienione metabolity produkowane są w hodowlach zawieszinowych z zastosowaniem bioreaktorów. Istotnym problemem, z którego wynika ograniczona liczba związków pozyskiwanych do celów leczniczych metodami biotechnologicznymi, jest niska wydajność roślinnych kultur *in vitro*. Wynika ona, m. in. z faktu, że metabolity wtórne nie są wytwarzane lub wytwarzane w bardzo niewielkim stopniu przez niezróżnicowane tkanki, tj. kalus i hodowle zawieszinowe. Ponadto, wiele z tych związków akumulowanych jest w określonych organach, a ich biosynteza zachodzi w niektórych organelach komórkowych, np. plastydach i może być ściśle związana z ontogenezą rośliny. Jednakże hodowle roślin lub ich organów wymagają zastosowania innego rodzaju bioreaktorów niż hodowle zawieszinowe co ogranicza ich zastosowanie na skalę przemysłową.

Zwiększenie wydajności metabolitów wtórnych w hodowlach komórek, tkanek i organów roślinnych *in vitro* można uzyskać przez stosowanie hodowli dwuetapowych, selekcję wysokowydajnych linii komórkowych, elicytację, suplementację prekursorami, immobilizację, ekstrakcję *in situ* czy też transformację genetyczną (Kolewe et al., 2008; Shilpa et al., 2010; Vijaya Sree et al., 2010; Wilson et Roberts, 2012).

Badania opublikowane w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego obejmowały trzy obszary tematyczne:

- 1) zastosowanie metod biotechnologicznych do intensyfikacji wytwarzania taksanów oraz pochodnych szikoniny w kulturach korzeni transformowanych *Taxus x media* i *Lithospermum canescens* oraz hodowlach zawieszinowych *Taxus x media* i *Arnebia euchroma*;
- 2) analizę fitochemiczną materiału roślinnego gatunków *L. canescens* i *A. euchroma* otrzymanego *in vitro*;
- 3) badania biologiczne ekstraktów przygotowanych z komórek i tkanek roślinnych *L. canescens* i *A. euchroma* uzyskanych metodami biotechnologicznymi, oraz pochodnych alkaniny i szikoniny wyizolowanych z rosnących w zawieszinie komórek *A. euchroma*.

Badania biotechnologiczne

Taksany

Pierwszą grupą związków pochodzenia roślinnego, której zwiększenie wytwarzania było przedmiotem moich badań przedstawionych w postępowaniu habilitacyjnym, a stanowiących kontynuację mojej pracy doktorskiej, były taksany.

Taksany to związki obecne w różnych tkankach i organach gatunków z rodzaju *Taxus*. Spośród ponad 350 wyizolowanych taksanów (Baloglu et Kingston, 1999; Parmar et al., 1999), paklitaksel (zwany pierwotnie taksolem) posiada ugruntowaną pozycję w leczeniu wielu nowotworów. Paklitaksel i jego półsyntetyczny analog – docetaksel stosowane są w leczeniu raka piersi i jajników, niedrobnokomórkowego raka płuc, mięsaka Kapoisego, nowotworów głowy i szyi, raka żołądka (FDA, EMA, 2010), a także w terapii skojarzonej z innymi cytostatykami np. doksyubicyną, cyklofosfamidem, karboplatiną (Yared et Tkaczuk, 2012; Czernek et al., 2009; Szydłowska-Pazera et al., 2004). Ponadto znalazły zastosowanie w terapii neoadiuwantowej i adiuwantowej (Tabaczar et al., 2010). Paklitaksel wykazuje również skuteczność w leczeniu: wielotorbielowatości nerek (PKD), stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS, RA), w chorobie Alzheimera, w łuszczycy (Standridge, 2006; Kurose et al., 2001; Ehrlich et al., 2004; Zhang et al., 2005). Stosowany jest także w kardiologii interwencyjnej, w zapobieganiu restenozie (Park et al. 2003; Kręcki et al., 2009; Woźakowska-Kapłon et al., 2009).

Rosnące zapotrzebowanie na paklitaksel i inne taksany, wykorzystywane m. in. do poszukiwania jego analogów o większej skuteczności i przyswajalności, uzasadnia kontynuowanie prac nad zwiększeniem jego wytwarzania w kulturach tkankowych cisów.

Jedną ze strategii zwiększenia wytwarzania metabolitów wtórnych w kulturach roślinnych jest stosowanie podłoży uzupełnianych elicytorami, związkami stymulującymi odpowiedź obronną roślin na czynnik stresowy ponieważ produkcja metabolitów wtórnych jest w wielu przypadkach związana z reakcją roślin na czynniki stresowe (Szpitter et Królicka, 2010; Shilpa et al., 2010). Korzystny wpływ na produkcję metabolitów wtórnych ma również dodatek do kultur prekursorów danego związku w szlaku biosyntezy.

Kolejnym sposobem intensyfikacji biosyntezy związków w materiale roślinnym jest włączanie do genomu komórki roślinnej fragmentu obcego DNA.

Aby uzyskać stabilną ekspresję wprowadzonego genu stosuje się najczęściej techniki wektorowe, oparte o zjawisko naturalnej zdolności przenoszenia DNA do komórek roślinnych przez bakterie glebowe z rodzaju *Agrobacterium*. Zdolność do transformacji komórek przez *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* związana jest z przeniesieniem fragmentu bakteryjnego T-DNA, odpowiednio z plazmidów Ti lub Ri. Istotną cechą T-DNA bakteryjnego jest to, że żaden ze znajdujących się w jego obrębie genów nie jest niezbędny do jego przenoszenia. Dla procesu przenoszenia niezbędne są 25 nukleotydowe sekwencje graniczne znajdujące się z obu stron T-DNA. W związku z tym, możliwe jest zastąpienie całego fragmentu zawartego między sekwencjami granicznymi dowolnym odcinkiem DNA i przeniesienie go do komórki roślinnej. W ten sposób można do komórki wprowadzić jeden lub więcej genów funkcjonujących w szlakach metabolizmu wtórnego. Geny te mogą pochodzić z różnych, nieraz odległych taksonomicznie organizmów, zarówno roślin, jak i drobnoustrojów, a nawet zwierząt. W efekcie można uzyskać wyższą biosyntezę dotychczasowych produktów, np. w wyniku zwiększonej dostępności prekursorów, jak również biosyntezę nowych związków (Wasilewska et Królicka, 2005; Guillon et al., 2006a; Guillon et al., 2006b; Wilson et Roberts, 2012; Georgiev et al., 2012).

Korzenie transformowane, otrzymywane w wyniku transformacji *A. rhizogenes*, charakteryzują się znacznym potencjałem syntetycznym, większą stabilnością genetyczną oraz zdolnością do sekrecji produktów, mogą stanowić wartościowe źródło związków roślinnych (Wysokińska et Chmiel, 2006; Zhou et al., 2011; Chandra et Chandra, 2011; Georgiev et al., 2012).

W czasie badań oceniałam wpływ dwóch prekursorów: L-feniloalaniny (FEN) oraz kwasu p-aminobenzoesowego (PAB), stosowanych osobno lub w połączeniu z elicytorem – jasmonianem metylu (JM), na wytwarzanie bakkatyny III, 10-deacetylobakkatyny III (10-DAB III) i paklitakselu w kulturze korzeni transformowanych *T. x media* var. *Hicksii* (**Publikacja 1**). FEN w dawce 1 μ M zwiększała ponad 8-krotnie akumulację paklitakselu po 4 tygodniach kultury (z 40,3 μ g/l do 335,6 μ g/l). Równocześnie korzenie zaczęły wytwarzać 10-DAB III,

której nie wykryto w hodowli kontrolnej, a jej najwyższą zawartość (422,7 µg/l) zanotowano po 4 tygodniach hodowli. Łączne zastosowanie 100 µM FEN i 100 µM JM spowodowało najwyższą wydajność paklitakselu (568,2 µg/l), spośród wszystkich badanych modyfikacji pożywek.

W przeciwieństwie do hodowli uzupełnionych FEN, paklitaksel i 10-DAB III wytwarzane były w korzeniach rosnących we wszystkich modyfikacjach podłoży zawierających PAB. Wyjątek stanowiła pożywka zawierająca 1 µM PAB i 100 µM MJ, w której nie zanotowano obecności żadnego z badanych taksanów.

Najwyższą akumulację paklitakselu (221,8 µg/l) zaobserwowano pod wpływem jednoczesnego użycia 100 µM PAB i 100 µM MJ. 10-DAB III w największej ilości (411,3 µg/l) wytwarzana była pod wpływem 100 µM PAB po 4 tygodniach hodowli.

W korzeniach rosnących w badanych modyfikacjach pożywek nie występowała bakkatyna III.

Zaprezentowane wyniki wskazują na skuteczność zastosowanej strategii suplementacji podłoży prekursorami i elicytorem w celu zwiększenia wytwarzania wybranych taksanów w kulturze korzeni transformowanych *T. x media* var. *Hicksii*.

W dalszym etapie pracy porównywałam wytwarzanie taksanów w hodowlach zawiesinowych dwóch linii komórek, założonych z tkanki kalusowej odróżnicowanej z korzeni transformowanych oraz w hodowli zawiesinowej złożonej z komórek nietransformowanych (kontrola) (**Publikacja 2**).

Porównywane były dwa rodzaje hodowli zawiesinowych komórek transformowanych. Pierwsza została założona z kalusa powstałego z korzeni transformowanych uzyskanych po transformacji roślin *Taxus x media* szczepem LBA9402 *Agrobacterium rhizogenes*. Tę linię komórek oznaczono jako RolC. Drugą linię komórek założono z kalusa powstałego z korzeni transformowanych, do których wprowadzono dodatkowy gen syntazy taksadienowej (*txs*). Tę hodowlę oznaczono jako TXS. Wprowadzenia genu *txs* dokonano z zastosowaniem szczepu *A. tumefaciens* C58C1 zawierającego plazmid RiA4 z *A. rhizogenes* oraz binarny plazmid pCA-TXS-His z sekwencją genu *txs*. Gen *txs* pochodził z *T. baccata*. Plazmid zawierał promotor wirusa mozaiki kalafiora 35S CaMV i gen fosfotransferazy hygromycyny (*hptII*) jako marker oporności.

Gen *txs* koduje enzym – syntazę taksadienową, która katalizuje cyklizację difosforanu geranylogeranylu (GGPP) z wytworzeniem taksa-(4,5),(11,12)-dienu (powstającym w 94%). Produktem ubocznym jest taksa-(4,20),(11,12)-dien stanowiący 6% wszystkich produktów (Williams et al., 2000).

Stosowano hodowlę dwuetapową. W pierwszym etapie hodowle zawiesinowe prowadzono w pożywce stymulującej przyrosty biomasy komórek. Etap ten trwał 12 dni, w czasie których hodowle osiągały fazę stacjonarną wzrostu. W 12 dniu, zmieniano pożywkę z promującej przyrosty biomasy, na stymulującą produkcję taksanów. Hodowla w podłożu produkcyjnym trwała 28 dni. Badano także wpływ elicytora – jasmonianu metylu (JM, 100 μ M), dodawanego do pożywki produkcyjnej, na wysokość akumulacji taksanów w analizowanych hodowlach zawiesinowych.

Obecność genów *rol*, *ags*, *aux* i *mas* pochodzących z *A. rhizogenes*, w obu typach hodowanych komórek transformowanych, potwierdzono techniką PCR. Ponadto w komórkach linii TXS, stwierdzono wbudowanie do genomu komórek genu *txs* pochodzącego z *T. baccata*. W obydwu liniach komórek transformowanych obecny był także endogenny gen *txs*.

W hodowlach komórek nietransformowanych i transformowanych rosnących w pożywce wzrostowej, zawartość taksanów była niska i wynosiła od 0,5 do 0,6 mg/l.

Po przeniesieniu do pożywki produkcyjnej obserwowano znaczące zwiększenie akumulacji badanych taksanów, z najwyższą ich ilością (2,2 mg/l) oznaczoną w kontroli w dniu 28. Największy wpływ na wydajność badanych hodowli zawiesinowych miał JM dodany do podłoża produkcyjnego. Pod jego wpływem zawartość taksanów wyniosła, w 28 dniu hodowli, 8,8 mg/l, 15,0 mg/l i 23,3 mg/l odpowiednio w kontroli i hodowlach komórek RolC oraz TXS.

Wydzielanie taksanów do podłoża hodowlanego, w pierwszym etapie hodowli (pożywka promująca wzrost), było na poziomie poniżej 30% w hodowlach wszystkich analizowanych linii komórkowych. Zmiana pożywki na produkcyjną, w hodowli linii RolC, spowodowała wzrost akumulacji tych związków w podłożu o 57%. Zależności takiej nie obserwowano w hodowli komórek linii TXS, w której wydzielanie taksanów było i pozostało na poziomie 15%. Odwrotny efekt wywarł JM, pod wpływem którego wydzielanie taksanów w hodowli linii TXS wzrosło o 54%, a w hodowli RolC nie zmieniło się.

W podłożu produkcyjnym, spośród pięciu poszukiwanych taksanów: 10-deacaetylobakkatyny III (10-DAB III), bakkatyny III, 10-deacetylotaksolu, paklitakselu i cefalomanniny, w wszystkich badanych liniach komórek najwięcej było cefalomanniny. Stanowiła ona 40%, 37% i 66% sumy wszystkich taksanów, odpowiednio w kontroli oraz liniach komórek RolC i TXS. W kontroli paklitaksel stanowił jedynie 5% łącznej zawartości ww. taksanów, a drugim co do ilości związkiem była bakkatyna III – 24%. W komórkach linii RolC udział paklitakselu w całkowitej zawartości oznaczanych taksanów wyniósł 42%, a bakkatyny III jedynie 6%. W komórkach linii TXS paklitaksel stanowił 5% całkowitej zawartości taksanów, a bakkatyna III - 13%.

Dodanie elicytora spowodowało wzrost udziału cefalomanniny w całkowitej zawartości taksanów do 70%, 79% i 95%, odpowiednio w kontroli, komórkach linii RolC i TXS. W tej modyfikacji pożywki najwięcej paklitakselu, 20% całkowitej zawartości taksanów, akumulowały komórki linii RolC.

Jasmonian metylu znacząco zwiększał ekspresję genu *txs*. W takich warunkach hodowli najwyższy, i jednocześnie dwukrotnie wyższy niż w komórkach linii TXS, poziom ekspresji genu *txs* zanotowano w komórkach linii RolC. Był on również ponad 54-krotnie wyższy w komórkach linii RolC niż w kontroli. Natomiast w komórkach linii TXS wzrost poziomu transkrypcji genu *txs* był jedynie 12-krotnie wyższy w stosunku do kontroli.

Badano również aktywność enzymu – syntazy taksadienowej, która w komórkach wszystkich trzech linii hodowanych w pożywkach stymulujących wzrost i wytwarzanie taksanów ale nieelicytowanych, była bardzo niska. Korelowało to z niską akumulacją taksanów w tych hodowlach. Elicytor (jasmonian metylu) znacząco zwiększał aktywność syntazy taksadienowej, która była, odpowiednio w kontroli oraz w komórkach linii RolC i TXS, 23-, 17- i 46-krotnie wyższa niż w pożywkach bez dodatku elicytora. Porównując aktywność tego enzymu w komórkach linii transformowanych stwierdzono, że była ona o 37% wyższa w komórkach linii RolC w stosunku do komórek linii TXS, co odpowiada podobnie wyższej ekspresji genu *txs* w tych komórkach.

Zaprezentowane wyżej wyniki wskazują na korzystny wpływ jednoczesnego wprowadzenia do komórek roślinnych bakteryjnych genów *rol* oraz transgeny *txs* na wytwarzanie taksanów. Skutkowało to zwiększeniem o 170% akumulacji taksanów w hodowlach zawieszinowych komórek linii TXS w stosunku do hodowli komórek linii RolC, a w stosunku do hodowli komórek nietransformowanych o 265%.

Naftochinony

Naftochinony – barwne pochodne alkaniny/szikoniny były drugą grupą metabolitów wtórnych, które badałam w celu zwiększenia ich wytwarzania w roślinnych kulturach *in vitro* (Publikacja 4 i 5).

Naftochinony to pochodne naftalenu, zazwyczaj 1,4- lub 1,2-naftochinony (Babula et al., 2009). Prekursorami tych związków w komórkach roślinnych są: kwas p-hydroksybenzoesowy (PHB), wywodzący się ze szlaku szikimowego oraz pirofosforan geranylu (GPP), pochodzący ze szlaku izoprenoidowego. PHB jest produktem transformacji L-fenyloalaniny, która poprzez przekształcenie w kwas cynamonowy, a następnie kwas kumarowy daje ostatecznie PHB (Okamoto et al., 1995).

Szeroko opisanymi w piśmiennictwie naftochinonami, występującymi w rodzinie Boraginaceae, są alkanina i szikonina, odpowiednio S i R enancjomery oraz ich pochodne. Para chiralna alkanina/szikonina ma takie same właściwości biologiczne (Papageorgiou et al., 1999, Papageorgiou et al. 2006). Autorzy (l.c.) wymieniają 42 związki, pochodne alkaniny/szikoniny. Występują one w korzeniach co najmniej 150 gatunków z rodziny Boraginaceae. Enancjomery alkanina i szikonina oraz ich pochodne, są tworzone jednocześnie podczas biogenezy w korzeniach tych samych roślin i w ich kulturach tkankowych, ale w różnych proporcjach. Zależy to od miejsca pochodzenia roślin (Papageorgiou et al., 2006).

Barwne pochodne naftochinonu wykazują wielokierunkową aktywność farmakologiczną, szeroko opisaną w pracach przeglądowych Papageorgiou et al. (1999; 2006). Działają one przeciwzapalnie oraz przyspieszają gojenie ran i są wykorzystywane do leczenia ciężkich owrzodzeń, oparzeń skóry, obrzęków oraz odleżyn (Papageorgiou et al., 1999). Szikonina i jej pochodne wykazują też aktywność antybakteryjną, przeciwgrzybiczą (Honda et al., 1988; Shen et al., 2002; Sasaki et al., 2002; Pietrosiuk et al., 2003; Karyagina et al., 2001), przeciwwirusową wobec wirusa zapalenia wątroby HCV (Ho et al., 2003) a szikonina działa supresyjnie wobec wirusa HIV-1 (Chen et al., 2003). Niektóre naftochinony wykazują skuteczność wobec pierwotniaków pasożytniczych, takich jak: *Toxoplasma gonidii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* oraz *Plasmodium* sp. (Ferreira et al., 2002).

Wykazano również przeciwnowotworowe właściwości szikoniny i jej pochodnych (Gao et al. 2002). Związki te hamują także angiogenezę nowotworową (Hisa et al., 1998; Pietrosiuk et al., 2004a), działają przeciwzakrzepowo, antyoksydacyjne i mają zdolność wymiatania wolnych rodników (Gao et al., 2000). Są też inhibitorami ludzkiej acetylotransferazy cholesterolowej hACAT i mogą przyczyniać się do ograniczenia rozwoju miażdżycy (An et al., 2007). Szikonina stymuluje również wychwyt glukozy, z wykorzystaniem szlaku zależnego od kinazy tyrozynowej, w komórkach tłuszczowych 3T3-L1 (Kamei et al., 2002). Barwne pochodne szikoniny wykazują także zdolność pochłaniania, szkodliwego dla skóry, promieniowania UVA i UVB (Feng et al., 2007; Ishida et Sakaguchi, 2007). Wykazują również działanie immunomodulujące – w małych dawkach pochodne szikoniny stymulują, natomiast w dużych działają supresyjnie na układ odpornościowy (Pietrosiuk et al., 2004b).

Lecznicze działanie korzeni *Lithospermum erythrorhizon* i *Alkanna tinctoria* zawierających alkaninę/szikoninę i ich pochodne, było znane i wykorzystywane już w starożytnej medycynie europejskiej i tradycyjnej medycynie chińskiej. Ponadto ekstrakty przygotowywane z korzeni tych roślin stosowane były i są do barwienia tkanin (Papageorgiou et al. 1999). Preparaty zawierające pochodne alkaniny/szikoniny nadal stosuje się w celach leczniczych w Chinach, Korei i Japonii. Co więcej, obecnie opatentowano wiele preparatów

zawierających alkaninę/szikoninę lub ekstrakty z korzeni *L. erythrorhizon* i *A. tinctoria*. Wchodzą one m.in. w skład kosmetyków do pielęgnacji jamy ustnej i chroniących skórę przed działaniem promieni UV, preparatów stosowanych w chorobach skórnych i maściach gojących (Papageorgiou et al., 2006).

W publikacjach przedstawionych w niniejszym postępowaniu habilitacyjnym, prowadziłam badania nad zwiększeniem wytwarzania szikoniny, acetyloszikoniny (ACS) oraz izobutyryloszikoniny (IBS) w kulturze trzech linii korzeni transformowanych *Lithospermum canescens* (**Publikacja 4**). Zastosowano strategię wymiany pożywki wzrostowej na produkcyjną w różnych fazach wzrostu kultur oraz ich suplementację jasmonianem metylu (JM; 100 μ M).

Przeanalizowano przebieg przyrostów biomasy korzeni i akumulacji pochodnych szikoniny w kulturach korzeni hodowanych w pożywce LS (Linsmaier et Skoog, 1965) bez regulatorów wzrostu przez 42 dni (pożywka wzrostowa). Materiał badawczy stanowiły linie korzeni transformowanych Lc1A, Lc1D i Lc1G.

Najwyższe przyrosty suchej biomasy w hodowlach korzeni linii Lc1A, Lc1D i Lc1G wyniosły odpowiednio 10,4 g/l, 3,2 g/l i 4,8 g/l w 32, 36 i 42 dniu hodowli.

Badania fitochemiczne wykazały, że głównym naftochinonem wytwarzanym w analizowanych hodowlach korzeni była ACS. Szikoniny nie wykryto w żadnej z linii korzeni ani w żadnej ze stosowanych modyfikacji pożywek, w której rosły.

Najwyższą całkowitą zawartość ACS i IBS w pożywce LS (oznaczoną w korzeniach i podłożach pohodowlanych) zanotowano w hodowli korzeni linii Lc1G – 31,27 mg/l w 36 dniu hodowli, w kulturze korzeni linii Lc1A – 24,32 mg/l w dniu 25. Natomiast w kulturze korzeni linii Lc1D – 21,92 mg/l w 32 dniu hodowli.

W kolejnym etapie badań, korzenie przenoszono do pożywki produkcyjnej M9 opracowanej w celu intensyfikacji produkcji szikoniny w kulturach zawieszinowych *L. erythrorhizon* (Fujita et al., 1981).

Ponieważ wytwarzanie badanych metabolitów korelowało z przebiegiem przyrostów suchej biomasy korzeni, zmiany podłoża hodowlanego dokonywano w 25 lub 32 dniu hodowli i hodowano przez kolejne trzy tygodnie w pożywce M9. Zmiana podłoża na pożywkę M9 spowodowała znaczny wzrost wytwarzania ACS i IBS w kulturach badanych linii korzeni. Korzystniej na wydajność hodowli korzeni wpłynęła wymiana podłoża LS na M9 przeprowadzana w 32 dniu hodowli. Najwyższą całkowitą zawartość ACS i IBS stwierdzono w kulturze korzeni linii Lc1D – 182,01 mg/l po trzech tygodniach hodowli w pożywce M9. Był to ośmiokrotny wzrost wytwarzania tych związków w stosunku do poziomu ich akumulacji w pożywce LS.

Wyższe wydzielanie ACS i IBS do podłoża hodowlanego obserwowano w hodowli, w której korzenie przenoszono do pożywki M9 w 25 dniu pasażu niż w tej, w której dokonywano wymiany w 32 dniu, jakkolwiek wysokość ekskrecji nigdy nie była wyższa niż 31% (dla linii Lc1G) całkowitej zawartości oznaczanych naftochinonów.

Jednoczesne zastosowanie pożywki M9 i elicytora JM spowodowało zahamowanie biosyntezy badanych pochodnych szikoniny we wszystkich badanych liniach korzeni, niezależnie od dnia wymiany podłoża LS na M9.

Badano także aktywność cytotoksyczną ekstraktów przygotowanych z korzeni hodowanych w pożywce M9 przez 3 tygodnie, a przeniesionych do niej w 32 dniu pasażu. Wykazano ich znaczną cytotoksyczność w hodowli komórek HL-60 ($IC_{50} = 4 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$). Natomiast w hodowlach komórek HeLa i HaCaT była ona znacznie niższa i wyniosła odpowiednio $IC_{50} = 20 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ oraz $45 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$.

Analiza przyrostów biomasy korzeni i akumulacji pochodnych szikoniny pozwoliła określić optymalny, dla zwiększenia ich wytwarzania, dzień wymiany podłoża z wzrostowego na produkcyjne. Opracowana strategia intensyfikacji wytwarzania naftochinonów pozwoliła na 8-krotny wzrost wydajności badanych hodowli korzeni transformowanych *L. canescens*.

Arnebia euchroma była kolejnym gatunkiem z rodziny Boraginaceae, w kulturach *in vitro* którego badałam możliwości zwiększenia potencjału produkcyjnego komórek (**Publikacja 5**).

W celu zwiększenia wytwarzania ACS i IBS w kulturze zawiesinowej *A. euchroma* stosowano pożywkę MSA (Davydenkov et al., 1991) uzupełnione L-feniloalaniną (FEN) w trzech stężeniach: 0,01, 0,1 i 1 mM. L-feniloalanina jest prekursorem w szlaku biosyntezy szikoniny. Najwyższą łączną zawartość ACS i IBS stwierdzono w 32 dniu hodowli kontrolnej – 9,5 mg/kolbę (tj. 50 ml pożywki MSA w 250 ml kolbie Erlenmeyera). Uzupełnienie pożywek FEN skutkowało zmniejszeniem wytwarzania ACS i IBS w stosunku do hodowli kontrolnej.

W hodowlach prowadzonych w obecności FEN, najwyższą zawartość badanych związków wykryto także w 32 dniu hodowli. Spośród zastosowanych stężeń FEN, najkorzystniejsze dla akumulacji naftochinonów okazały się stężenia 0,01 i 1 mM, w obecności których łączna zawartość ACS i IBS wyniosła, odpowiednio 1,0 i 0,8 mg/kolbę.

Głównym związkiem wykrytym w ekstraktach pochodzących z kultur *in vitro* była ACS. Występowanie szikoniny odnotowano jedynie w podłożach po 32 dniu, w hodowlach suplementowanych 0,01 i 0,1 mm FEN.

ACS i IBS wydzielane były do podłoża hodowlanego z różną intensywnością zależnie od modyfikacji pożywki. Najwięcej ACS i IBS stwierdzono w podłożu pohodowlanym z hodowli kontrolnej, odpowiednio 0,5 i 0,25 mg/kolbę w 32 i 28 dniu pasażu.

Jednocześnie z badaniem wytwarzania naftochinonów przeprowadzono analizę aktywności amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL), enzymu biorącego udział w biosyntezie szikoniny i jej pochodnych na drodze szlaku szikimowego.

W badanych hodowlach zawiesinowych nie obserwowano bezpośredniej korelacji pomiędzy aktywnością PAL a wysokością akumulacji pochodnych szikoniny. Jednakże wyższą aktywność PAL zanotowano w hodowli kontrolnej w porównaniu do hodowli uzupełnionych FEN.

Badania aktywności cytotoksycznej ekstraktów z komórek z hodowli kontrolnej oraz hodowli prowadzonych z dodatkiem FEN wobec komórek białaczki HL-60, raka szyjki macicy HeLa oraz raka piersi MCF-7 wykazały, że najwyższą aktywnością charakteryzowały się ekstrakty pochodzące z hodowli kontrolnej. Aktywność cytotoksyczna tych ekstraktów wynosiła, odpowiednio $IC_{50} = 4 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50} = 13 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ oraz $IC_{50} = 8 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$.

Podsumowując przeprowadzone badania można stwierdzić, że w warunkach przeprowadzonych doświadczeń suplementacja pożywki hodowlanej prekursorem w szlaku biosyntezy szikoniny i jej pochodnych – L-fenyloalaniną, w stężeniach 0,01, 0,1, i 1 mM, nie sprzyjała zwiększeniu akumulacji pochodnych szikoniny w hodowlach zawiesinowych *A. euchroma*.

Natomiast zastosowanie ekstrakcji *in situ* z wykorzystaniem perfluorozwiązku - perfluorodekaliny (PFD) pozwoliło na zwiększenie wytwarzania alkaniny/szikoniny o 50% w stosunku do kontroli w hodowli zawiesinowej *A. euchroma* (**Publikacja 7**).

Analizowano wpływ PFD odgazowanej, nasycanej powietrzem lub etylenem na wzrost komórek w hodowli zawiesinowej oraz przebieg akumulacji i wydzielania do podłoża pohodowlanych alkaniny/szikoniny i ich pochodnych. Kontrolę stanowiła hodowla bez dodatku PFD.

Ciekłe perfluorozwiązki to syntetyczne pochodne alifatycznych lub cyklicznych węglowodorów, w których większość lub wszystkie atomy wodoru zostały zastąpione podstawnikami fluorkowymi. Ciekłe perfluorozwiązki nie mieszają się z mediami hodowlanymi i pożywkami oraz charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną, chemiczną i biologiczną (Pilarek et Szewczyk, 2005; 2008). W biotechnologii roślin ciekłe perfluorozwiązki były dotychczas stosowane jedynie jako nośniki gazów oddechowych oraz innych niepolarnych gazów. Niniejsze opracowanie jest pierwszym wykorzystującym ciekły perfluorozwiązek nie tylko jako nośnik gazów ale także jako ekstrahent *in situ*.

Perfluorodekalina, stosowana w przeprowadzonych doświadczeniach, jest pochodną dwupierscieniowego węglowodoru nasyconego - dekaliny i powstała w wyniku wysycenia

szkieletu węglowego podstawnikami fluorkowymi. Jest bezbarwną i bezzapachową cieczą o gęstości prawie dwukrotnie większej od gęstości wody a po dodaniu do układu hodowlanego, nie mieszała się z ciekłą pożywką tworząc na dnie naczynia odrębną warstwę perfluorowaną.

W kontroli oraz wariantach hodowli z PFD odgazowaną i napowietrzaną uzyskano podobne wskaźniki przyrostu świeżej i suchej biomasy (7-krotne i 4-krotne). Wyjątek stanowiła hodowla uzupełniana PFD nasycaną etylenem, w której wskaźnik przyrostu był 5-krotny.

Techniką HPLC-UV-DAD analizowano zawartość barwnych naftochinonów w ekstraktach przygotowanych z komórek, fazy wodnej - pożywek oraz fazy perfluorowanej. W ekstraktach tych stwierdzono obecność od trzech do ośmiu pochodnych alkaniny/szikoniny. W największej ilości występowała prawdopodobnie acetyloszikonina ale analiza ilościowa tą techniką nie była możliwa. Przyczyną było pojawienie się związku o takim samym czasie retencji co acetyloszikonina ale o odmiennym widmie UV. Dlatego też wykonano hydrolizę zasadową przygotowanych ekstraktów a zawartość alkaniny/szikoniny zbadano spektrofotometrycznie. Ponadto przeprowadzono także analizę chiralną, która pozwoliła stwierdzić występowanie zarówno alkaniny, jak i szikoniny w ekstraktach.

Najwyższą całkowitą zawartość alkaniny/szikoniny (tj. łącznie w suchej masie komórek, warstwie wodnej i perfluorowanej) zanotowano w hodowli uzupełnianej napowietrzaną PFD – 23,23 mg/kolbę i była ona o 50% wyższa niż w kontroli. Ponadto w wariantach hodowli z PFD odgazowaną i napowietrzaną większe ilości barwnych naftochinonów były wydzielane do podłoża niż akumulowane przez komórki, przy czym do trzeciego tygodnia hodowli więcej badanych związków stwierdzano w fazie perfluorowanej niż wodnej.

Występowały różnice we wzajemnych proporcjach w zawartości alkaniny i szikoniny w poszczególnych wariantach hodowli. W komórkach z hodowli kontrolnej zanotowano 8-razy więcej alkaniny niż szikoniny, natomiast w fazie wodnej pożywki przeważała szikonina. W hodowlach uzupełnionych PFD napowietrzaną i nasycaną etylenem dominującym enancjomerem była alkanina, w tym ostatnim przypadku jej ilość była 26-krotnie wyższa niż szikoniny. W wariantach z PFD napowietrzaną alkanina i szikonina były wykrywane w komórkach i fazie PFD w równych ilościach. Natomiast w fazie wodnej pożywki alkanina 6-krotnie przewyższała zawartość szikoniny.

Zastosowanie fazy perfluorowanej jako nośnika gazów i ekstrahenta *in situ*, okazało się niezwykle skutecznym podejściem pozwalającym na 50% zwiększenie akumulacji barwnych naftochinonów w hodowlach zawieszinowych *A. euchroma* bez zahamowania w przyrostów biomasy komórek.

Prowadzone badania dotyczące zwiększenia wytwarzania metabolitów wtórnych w kulturach komórek i tkanek roślinnych *in vitro* zaowocowały przygotowaniem **zgłoszenia patentowego nr P.404726**.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie perfluorozwiązków do ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów z hodowli biomasy roślinnej prowadzonej w warunkach *in vitro*.

Ekstrakcja *in situ* stosowana jest w celu usuwania nagromadzonego w medium hodowlanym produktu (lub produktów) metabolizmu komórek. Bezpośrednie usuwanie metabolitów w trakcie prowadzenia hodowli wymaga zastosowania jako ekstrahentów inertnych związków chemicznych, które nie powodują zmian patologicznych w fizjologii oraz morfologii hodowanych komórek, tkanek, organów roślinnych czy też całych roślin.

Zgodnie ze zgłoszeniem patentowym w charakterze medium do ekstrakcji stosuje się ciekłe perfluorozwiązki, które dodaje się do układu hodowlanego na początku hodowli i następnie prowadzi się hodowlę znanymi metodami. Możliwe jest także dodanie perfluorozwiązku w dowolnym momencie trwania hodowli.

Inertne biologicznie perfluorozwiązki nie mają żadnego negatywnego wpływu na komórki hodowanej biomasy roślinnej. Zważywszy że składniki medium hodowlanego nie rozpuszczają się w perfluorozwiązkach, ich dodatek do układu hodowlanego nie wpływa na ilościowy skład medium hodowlanego. Usytuowanie fazy perfluorowanej na dnie naczynia hodowlanego nie ogranicza wymiany masy pomiędzy pożywką a fazą gazową obecną w naczyniu hodowlanym nad pożywką. PFC są stabilne w pełnym zakresie temperatur wykorzystywanych w hodowlach *in vitro* roślinnego materiału biologicznego.

Badania fitochemiczne i biologiczne

Ekstrakty n-heksanowe uzyskane z hodowanych *in vitro* trzech linii korzeni transformowanych *L. canescens* analizowano stosując techniki chromatograficzne i spektralne: GC-MS, ESI-MS oraz NMR (**Publikacja 3**). Ekstrakty przygotowano z korzeni rosnących w pożywkach LS (0,604 g) i M9 (0,425 g).

Z ekstraktów tych wyizolowano pochodne alkaniny: izobutyryloalkaninę, β,β -dimetyloakryloalkaninę, acetyloalkanina, β -hydroksyizowaleryloalkaninę, dwa związki sterolowe: stigmasterol i sitosterol, mieszaninę szikonofuranów C i D oraz estry metylowe kwasu palmitynowego i oleinowego.

Określenie struktury wyizolowanych pochodnych alkaniny wykonano metodą NMR (COSY, HMQC, HMBC i NOESY).

Przedstawione badania wykazały, po raz pierwszy, obecność sigma- i sitosterolu oraz estrów metylowych kwasów oleinowego i palmitynowego w materiale roślinnym jakim były korzenie transformowane *L. canescens*.

Po raz pierwszy wykazano również obecność, w ekstraktach z korzeni transformowanych *L. canescens*, pochodnych alkaniny: acetyloalkaniny, β,β -dimetyloakryloalkaniny oraz szikonofuranów C i D. Do tej pory związki te wykrywano i identyfikowano tylko w korzeniach *L. erythrorhizon*. Również, wykryta w analizowanych ekstraktach β -hydroksyizowaleryloalkanina, była dotychczas opisywana jako składnik korzeni *Arnebia euchroma* i *A. hispidissima*.

Z tkanki kalusowej oraz hodowli zawiesinowych *A. euchroma in vitro* otrzymano ekstrakty n-heksanowe (**Publikacja 5**), odpowiednio 0,59 g i 0,91 g. Wyizolowano i zidentyfikowano związki występujące ww. ekstraktach. Przeprowadzono badania aktywności cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej wyodrębnionych związków (**Publikacja 6**).

Z ekstraktów uzyskanych z hodowli zawiesinowych wyizolowano: deoksyalkaninę, linolan metylu, 2''-(S)- α -metylobutyryloalkaninę, mieszaninę trójglicerydów kwasów tłuszczowych, w tym palmitynowego, stearynowego i 8-Z- lub 9-Z- lub 11-Z lub 9-E-oktadekanowego, izobutyryloalkaninę, propionyloalkaninę, acetyloalkaninę, kwas linolenowy, β -sitosterol, jasmonianu metylu, terakryloalkaninę β -hydroksyizowaleryloalkaninę, mieszaninę 1-monoglicerydów (w jej skład wchodziły kwasy: palmitynowy (73,8%), stearynowy (17,3%) i oleinowy (8,9%).

Z tkanki kalusowej wyodrębniono: deoksyalkaninę, izobutyryloalkaninę, 2''-(S)- α -metylobutyryloalkaninę, acetyloszikoninę, kwas linolenowy i β -sitosterol.

Identyfikację wymienionych związków wykonano metodą NMR (COSY, HMQC, HMBC i NOESY) oraz GC-MS.

Alkaninę, acetyloalkaninę, izobutyryloalkaninę, β -hydroksyizowaleryloalkaninę, 2''-(S)- α -metylobutyryloalkaninę, propionyloalkaninę i terakryloalkaninę wyizolowano po raz pierwszy z komórek *A. euchroma* hodowanych *in vitro*. Natomiast β -hydroksyizowaleryloalkanina i terakryloalkanina zostały po raz pierwszy stwierdzone wśród metabolitów gatunków należących do rodzaju *Arnebia*.

Porównano aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów przygotowanych z kalusa i komórek z hodowli zawiesinowej oraz wyizolowanych z nich naftochinonów. Ich aktywność badano wobec następujących szczepów bakterii gramdodatnich: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) oraz gramujemnych: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)

i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853). Ponadto wobec patogennych grzybów: *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 13801) i *C. glabrata* (ATCC 28838).

Obydwa rodzaje ekstraktów roślinnych wykazywały bardzo szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego. Spośród wyizolowanych związków najbardziej aktywne były, zgodnie z przedstawioną kolejnością, alkanina, acetyloszikonina, β -hydroksyizowaleryloalkanina i izobutyryloalkanina. Interesującym jest, że acetyloszikonina była znacznie bardziej aktywna w przeprowadzonych testach, niż jej enancjomer – acetyloalkanina.

Wykonano również badania aktywności cytotoksycznej wyizolowanych związków w hodowlach komórek białaczki (CCRF-CEM), nowotworu piersi (MDA-MB-231), glejaka wielopostaciowego (U251) oraz raka jelita grubego (HCT 116). Spośród dziewięciu przebadanych związków, najwyższą aktywność we wszystkich hodowlach komórkowych wykazywała 2''-(S)- α -metylobutyryloalkanina. Była ona nawet bardziej aktywna niż alkanina, która jest uważana za najbardziej cytotoksyczną wśród tej grupy związków. Również acetyloalkanina i izobutyryloalkanina wykazywały wyższą aktywność cytotoksyczną niż alkanina. Natomiast deoksyalkanina, β -hydroksyizowaleryloalkanina, propionyloalkanina i acetyloszikonina charakteryzowały się podobną cytotoksycznością w badanych hodowlach komórek nowotworowych. Aczkolwiek propionyloalkanina nie działała cytotoksycznie na komórki glejaka wielopostaciowego.

Podsumowanie

Osiągnięciem naukowym zaprezentowanym w niniejszym opracowaniu było znaczne zwiększenie wydajności metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* komórek i organów roślinnych poprzez zastosowanie różnych strategii intensyfikacji ich wytwarzania.

Uzyskano 8-krotne zwiększenie wytwarzania pochodnych szikoniny w hodowli korzeni transformowanych *L. canescens* w wyniku określenia optymalnego dnia wymiany pożywki, ze stymulującej przyrosty biomasy na pożywkę produkcyjną.

Otrzymano 2-krotnie wyższą wydajność alkaniny/szikoniny w hodowlach zawiesinowych *A. euchroma* dzięki zastosowaniu perfluorozwiązku - perfluorodekaliny, jako nośnika gazów i ekstrahenta *in situ*.

Jednoczesne użycie prekursora biosyntezy taksanów (L-feniloalaniny) oraz elicytora (jasmonianu metylu) pozwoliło na 14-krotne zwiększenie akumulacji paklitakselu w hodowli korzeni transformowanych *T. x media* var. *Hicksii*. Natomiast w przypadku hodowli zawiesinowych *A. euchroma*, w warunkach przeprowadzonych doświadczeń, uzupełnienie

podłoża prekursorem biosyntezy alkaniny/szikoniny i ich pochodnych (L-fenyloalaninę) nie powodowało zwiększenia akumulacji tych związków.

Istotnym osiągnięciem było wprowadzenie po raz pierwszy transgeny syntazy taksadienowej (geny *txs*) do komórek *T. x media*. Wykazano, że jednoczesna obecność genów *rol* i genu *txs* skutkuje najwyższą wydajnością taksanów w hodowli zawieszinowej, prowadzonej w pożywce produkcyjnej i w obecności jasmonianu metylu.

Ponadto z korzeni transformowanych *L. canescens* wyizolowano związki, które dotychczas opisywano jedynie w korzeniach naturalnych gatunku *L. erythrorhizon*, np. acetyloalkaninę, β,β -dimetyloakryloalkaninę oraz szikonofurany C i D. Oznaczono także związki opisane po raz pierwszy wśród metabolitów rodzaju *Arnebia*, np. β -hydroksyizowaleryloalkaninę czy terakryloalkaninę.

Wykazano także działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe wyizolowanych związków naftochinonowych.

Zaprezentowane badania pozwoliły na określenie wpływu różnych parametrów, np. aktywności dodatkowo wprowadzonego genu szlaku biosyntezy taksanów, ekstrakcji *in situ*, na poziom wytwarzania pożądaných metabolitów w badanych rodzajach roślinnych kultur *in vitro*. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań istotnie poszerzyły aktualny stan wiedzy na temat wytwarzania taksanów i barwnych pochodnych alkaniny/szikoniny w roślinnych kulturach *in vitro* oraz zaowocowały przygotowaniem zgłoszenia patentowego dotyczącego zastosowania perfluorozwiązków do ekstrakcji *in situ*.

Piśmiennictwo cytowane:

- An S., Park Y.D., Paik Y.K., Leong T.S., Lee W.S. (2007). Human ACAT inhibitory effects of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17 (4): 1112-1116.
- Babula P., Adam V., Havel L., Kizek R. (2009). Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones – their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5: 47-68.
- Baloglu E., Kingston D.G.I. (1999). The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products*, 62: 1448-1472.
- Chandra S., Chandra R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, 10: 371-395.
- Chen X., Yang L., Hang N., Turbin J.A., Buckheit R.W., Sterling C., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. (2003). Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses Human Immunodeficiency Virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (9): 2810-2816.
- Czernek U., Potemski P., Płużańska A. (2009). Ocena skuteczności leczenia skojarzonego pierwszego rzutu chorych na raka jajnika. *Onkologia Polska*, 12 (1): 7-11.
- Davydenkov VN, Patudin AV, Popov YuG, Rabinovich SA, Miroshnikov AI (1991). Cell culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. – novel source of shikonin production. *Him Farm Zh*, 1: 53-55. [in Russian]
- Ehrlich A., Booher S., Becerra Y., Borris D.L., Figg W.D., Turner M.L. (2004). Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50 (4): 533-54.
- Feng X.X., Zhang L.L., Chen J.Y. Zhang J.C. (2007). New insights into solar UV-properties of natural dye. *Journal of Cleaner Production*, 15 (4): 366-372.
- Ferreira R.A., Oliveira A.B., Gualberto S.A., Vitor R.W.A. (2002). Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, *in vitro* and in murine model of infection. *Parasite*, 9: 261-269.
- Frense D. (2007). Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 1233-1240.

- Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto T. (1981). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, 1: 61-63.
- Furmanowa M., Sykłowska-Baranek K. (2000). Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. *Biotechnology Letters*, 22: 683-686.
- Gao D., Hiromura M., Yasui H., Samuray H. (2002). Direct reaction between shikonin and thiols induces apoptosis in HL60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (7): 827-832.
- Gao D., Kakuma M., Oka S., Sugino K., Sakurai H. (2000). Reaction of β -alkannin (shikonin) with reactive oxygen species: detection of β -alkannin free radicals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8: 2561-2569.
- Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, 30:528-537.
- Grajek W. (2001). Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. W: *Biotechnologia roślin, praca zbiorowa* pod red. Stefana Malepszego, Wydawnictwo Naukowe PWN, 306-341.
- Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. (2006a). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 341-346.
- Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. (2006b). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology*, 24 (9): 403-409.
- Hisa T., Kimura Y., Takada K., Suzuki F., Takigawa M. (1998). Shikonin an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon* inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Anticancer Research*, 18 (2A): 783-790.
- Ho T.Y., Wu S.L., Lai I.L., Cheng K.S., Kao S.T., Hsiang C.Y. (2003). An *in vitro* system combined with an in-house quantitation assay for screening hepatitis C virus inhibitors. *Antiviral Research*, 58: 199-208.
- Honda G., Sakakibara F., Yazaki K., Tabata M. (1988). Isolation of deoxyshikonin, an antidermatophytic principle from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 51 (1): 152-154.
- <http://www.ema.europa.eu>
- <http://www.fda.gov>
- Ishida T., Sakaguchi I. (2007). Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30 (5): 928-934.
- Kamei K.R., Kitagawa Y., Kadokura M., Hattori F., Hazeki O., Emina Y., Nishihara T., Oikawa S. (2002). Shikonin stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes *via* an insulin-independent tyrosine kinase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 642-651.
- Karyagina T.B., Arzumanyan V.G., Timchenko T.V., Bairamashvili D.I. (2001). Antimicrobial activity of shikonin preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35: 30-31.
- Kolewe M.E., Gaurav V., Roberts S. C. (2008). Pharmaceutically active natural product synthesis supply *via* plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics*, 5 (2): 243-256.
- Kręcki R., Krzemińska-Pakuła M., Kasprzak J.D., Peruga J.Z. (2009). Zastosowanie cewnika balonowego DIOR uwalniającego paklitaksel w leczeniu rozlanej restenozy w stentach metalowych – opis przypadku. *Angiogram* miesiąca, 67: 1406-1409.
- Kurose A., Yoshida W., Yoshida M., Sawai T. (2001). Effects of paclitaxel on cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Cytometry*, 44: 349-354.
- Linsmaier E.F., Skoog F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1): 100-127.
- Okamoto T., Yakazaki K., Tabata M. (1995). Biosynthesis of shikonin derivatives from L-phenylalanine *via* deoxyshikonin in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures and cell-free extracts. *Phytochemistry*, 38 (1): 83-88.
- Oksman-Caldentey K.-M., Inzé D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*, 9: 433-440.
- Papageorgiou V.P., Assimpoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaou K.C. (1999). The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie International Editio*, 38: 270-300.
- Papageorgiou V.P., Assimpoulou A.N., Samanidou V.F., Papadoyannis I.N. (2006). Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannins and shikonins. *Current Organic Chemistry*, 10: 2123-2142.
- Park S.-J., Shim W.H., Ho D.S., Raizner A.E., Park S.-W., Hong M.-K., Lee C.W., Choi D., Jang Y., Lam R., Weissman N.J., Mintz G.S. (2003). A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *New England Journal of Medicine*, 348: 1537-1545.
- Parmar V.S., Jha A., Bisht K.S., Taneja P. Singh S.K., Kumar A., Poonam, Jain R., Olsen C.E. (1999). Constituents of the yew trees. *Phytochemistry*, 50: 1267-1304.
- Pietrosiuk A., Furmanowa M., Skopińska-Różewska E., Sommer E., Skurzak H., Bany J. (2004a). The effect of acetylshikonin isolated from *Lithospermum canescens* roots on tumor-induced cutaneous angiogenesis. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 61 (3): 379-382.
- Pietrosiuk A., Kędzia B., Hólderna-Kędzia E., Wiedenfeld H., Malinowski M., Furmanowa M. (2003). Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Lithospermum canescens* Lehm. *Herba Polonica*, 49 (3/4): 209-215.

- Pietrosiuk A., Skopińska-Różewska E., Furmanowa M., Wiedenfeld H., Sommer E., Skolnicka I., Rogala E., Radomska-Leśniewska D., Bany J., Malinowski M. (2004b). Immunomodulatory effect of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum canescens* on cellular and humoral immunity in Balb/c mice. *Die Pharmazie*, 59 (8): 640-642.
- Pietrosiuk A., Sykłowska-Baranek K., Wiedenfeld H., Wolinowska R., Furmanowa M., Jaroszyk E. (2006). The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. *Plant Cell Reports*, 25 (10): 1052-1058.
- Pietrosiuk A., Urmantseva V., Furmanowa M. (1999). Some naphthoquinones and pyrrolizidine alkaloids in cell culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. *Herba Polonica*, 45 (4): 354-360.
- Pilarek M., Szewczyk K. W. (2005). Zastosowania perfluorow związków jako ciekłych nośników gazów oddechowych w medycynie i biotechnologii. *Biotechnologia*, 2 (69): 125-150.
- Pilarek M., Szewczyk K. W. (2008). Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 41: 38-42.
- Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. (2002). *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25 (5): 669-670.
- Shen C.C., Syu W.J., Li S.Y., Lin C.H., Lee G.H., Sun C.M. (2002). Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 65 (12): 1857-1862.
- Shilpa K., Varun K., Lakshmi B.S. (2010). An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5 (3): 22-247.
- Standridge J.B. (2006). Current status and future promise of pharmacotherapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Directors Association*, 7 (Suppl. 3): S46-51, 45.
- Szpitter A., Królicka A. (2010). Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia*, 4 (71): 82-108.
- Szydłowska-Pazera K., Potemski P., Płużańska A. (2004). Docetaksel w leczeniu chorych na raka piersi – przegląd piśmiennictwa. *Onkologia Polska*, 7 (4): 187-192.
- Tabaczar S., Koceva-Chyła A., Matczak K., Gwoździński K. (2010). Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów. I. Oddziaływanie docetakselu na mikrotubule. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64: 568-581.
- Vijaya Sree N., Udayasri P., Aswani kumar Y., Ravi Babu B., Phani kumar Y., Vija Varma M. (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, 3: 112-123.
- Wasilewska A., Królicka A. (2005). Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia*, 4 (71): 173-188.
- Williams D.C., Wildung M.R., Jin A.Q., Dalal D., Oliver J.S., Coates R.M., Croteau R. (2000). Heterologous expression and characterization of a "pseudomature" form of taxadiene synthase involved in paclitaxel (taxol) biosynthesis and evaluation of a potential intermediate and inhibitors of the multistep diterpene cyclization reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379 (1): 137-146.
- Wilson S.A., Roberts S.C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 249-268.
- Wozakowska-Kapłon B., Młodnicki M., Gutkowski W. (2009). Późna zakrzepica w stencie pokrywanym paklitakselem po odstawieniu kłopidogrelu, obserwacja 2-letnia – opis przypadku. *Chorzy trudni typowi/Case report*, 67: 299-303.
- Wysokińska H., Chmiel A. (2006). Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia*, 4 (75): 124-135.
- Yared J.A., Tkaczuk K.H.R. (2012). Update on taxane development: New analogs and New formulations. *Drug Design, Development and Therapy*, 6: 371-384.
- Zhang B., Maiti A., Shively S., Lakhani F., McDonald-Jones G., Bruce J. (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 102: 227-231.
- Zhou M.-L., Zhu X.-M., Shao J.-R., et al. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1229-39.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja cała droga zawodowa związana jest z biotechnologią roślin leczniczych. Zajmowałam się badaniami nad wykorzystaniem potencjału komórek, tkanek i organów roślinnych hodowanych *in vitro*, do wytwarzania metabolitów wtórnych należących do różnych grup chemicznych.

5.1 Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Wraz z rozpoczęciem pracy w zespole Pani prof. dr hab. dr h.c. Mirosławy Furmanowej, zostałam zaangażowana w prowadzenie badań nad otrzymywaniem hodowli komórek, tkanek i organów dwóch odmian cisu *Taxus x media*.

W rezultacie prowadzonych prac uzyskałam hodowle tkanki kalusowej nieróżnicującej i różnicującej korzenie, hodowle zawieszinowe w kolbach i bioreaktorze oraz hodowlę jednej linii korzeni transformowanych (linia KT). Jest to jedyna linia korzeni transformowanych gatunku *T. x media* opisywana dotychczas w dostępnych publikacjach naukowych. Otrzymanie tej linii było jednym z najtrudniejszych etapów mojej pracy, co wynika z małej podatności roślin nagozłazkowych na transformację za pomocą *A. rhizogenes*.

Wyniki tych badań stanowiły treść mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam 20.06.2001 r., i która uzyskała wyróżnienie decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego AM.

W czasie realizacji badań związanych z pracą dokorską, odbyłam staż na Wolnym Uniwersytecie w Brukseli pod kierunkiem prof. Mondhera Jaziriego. Zapoznałam się z zastosowaniem immunochemicznego testu ELISA do wykrywania 10-deacetylobakkatyny III w tkankach cisów. Jednocześnie, pod kierunkiem dr Gregorego Laskarisa, w The Natural Products Laboratory of the IBL (Institute Biology Leiden), nabyłam umiejętności detekcji taksanów techniką HPLC.

Ukończyłam również kurs dotyczący techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC zorganizowany przez Akademię Medyczną w Lublinie oraz kurs embriologii eksperymentalnej roślin na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

Ponadto zapoznałam się techniką PCR na kursie zorganizowanym przez firmę DNA-Gdańsk i Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej we współpracy z A & A Biotechnology.

W 1998 r. brałam udział w przygotowaniu i obsłudze międzynarodowego seminarium pt: „Seminar on taxoids” zorganizowanego przez naszą Katedrę. Ponadto w 2005 r. brałam udział w przygotowaniu i obsłudze międzynarodowego seminarium pt: “International Symposium on Polish-German Cooperation in Natural Drug Research” organizowanego przez Komitet Terapii i Nauk o Leku Polskiej Akademii Nauk.

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałam prace nad zastosowaniem metod biotechnologicznych do pozyskiwania taksanów w kulturze korzeni transformowanych *Taxus x media* var. *Hicksii* linii KT. Podjęłam również badania nad wytwarzaniem naftochinonów w kulturach korzeni transformowanych *Lithospermum canescens* oraz w hodowli tkanki kalusowej i hodowli zawieszinowej *Arnebia euchroma* z rodziny Boraginaceae.

Prace te zaowocowały publikacjami przedstawionymi do niniejszego postępowania habilitacyjnego.

Ponadto zajmowałam się opracowaniem warunków mikrorozmnażania gatunków: *Onosma paniculatum*, *Lithospermum canescens*, *Rindera graeca*. Wyniki tych badań zostały opublikowane lub też były prezentowane na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych.

Otrzymałam również hodowle korzeni naturalnych, naturalnych regenerowanych z tkanki kalusowej oraz transformowanych *R. graeca*. Są one przedmiotem intensywnych badań fitochemicznych, których celem jest opracowanie ich profilu chemicznego.

W roślinach *R. graeca* rozmnażanych *in vitro* oraz w korzeniach tego gatunku różnego pochodzenia, określałam zawartość kwasów fenolowych: rozmarynowego, litospermowego i litospermowego B. Te ostatnie badania stanowiły tematykę dwóch prac magisterskich, których byłam naukowym opiekunem.

W celu poszerzenia tematyki moich prac badawczych o techniki biologii molekularnej, ukończyłam szereg kursów organizowanych przez Katedrę Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW i współfinansowanych ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”, przez Instytut Zoologii w Warszawie oraz CMKP w Warszawie. Zapoznałam się także z techniką western blot na kursie przeprowadzonym w CMKP w Warszawie.

Korzystając ze środków grantu (N N405 362537), którego jestem kierownikiem, przystąpiłam także do organizowania pracowni biotechnologii molekularnej w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych WUM.

5.3. Projekty badawcze

1. N N405 362537. **Kierownik projektu ze współwykonawcą zagranicznym:** dr Katarzyna Sykłowska-Baranek. Tytuł projektu: „Wytwarzanie taksanów i innych związków w organach transformowanych *Taxus x media* var. *Hicksii* z hodowli *in vitro*” (2009-2014);

2. Nr 3499/B/P01/2007/33. Kierownik projektu ze współwykonawcą zagranicznym: dr hab. Agnieszka Pietrosiuk. Tytuł projektu: „Wybrane rośliny lecznicze z rodziny Boraginaceae jako źródło naftochinonów – badania biotechnologiczne, fitochemiczne i biologiczne” (2007-2013) – **główny wykonawca**;
3. Nr PBZ-KBN-092/P05/2003. Kierownik projektu: prof. dr hab. Mirosława Furmanowa. Tytuł projektu: „Poszukiwanie nowych źródeł produktów naturalnych o aktywności biologicznej: przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, przeciwutleniającej i cytostatycznej – pozyskiwanych z wybranych gatunków roślin z hodowli *in vivo* i *in vitro*, z wykorzystaniem metod biotechnologicznych” (2003-2006) – **wykonawca**;
4. Nr 4 P05F 028 18. Kierownik projektu: dr Agnieszka Pietrosiuk. Tytuł projektu: „Poszukiwanie związków barwnych - pochodnych naftochinonów i alkaloidów pirolizydynowych w roślinach i kulturach *in vitro* trzech gatunków: *Lithospermum canescens*, *Onosma paniculatum* i *Arnebia euchroma*”. (2000-2003) – **wykonawca**;
5. N P05F02812. Kierownik projektu: dr Olga Olszowska. Tytuł projektu: „Wykorzystanie różnych metod biotechnologii roślinnej do otrzymywania paklitakselu i jego pochodnych - hodowla tkankowa i badania analityczne” (1997-2001) - **wykonawca**;
6. 01.01.-31.12.1997 – **indywidualna subwencja działalności statutowej S/137**: "The influence of medium composition and elicitors feeding on production of 10-deacetylbaicatin III and paclitaxel in tissue culture of two varieties of *Taxus x media* Rehd.";
7. 01.10.1995 - 30.09.1996 – **indywidualna subwencja działalności statutowej S/59**: "*In vitro* culture of two varieties of *Taxus x media*: *T. x media* var. *Hicksii* and *Taxus. x media* var. *Hatfieldii*";
8. Nr 6 P206 003 05. Kierownik projektu: prof. dr hab. Mirosława Furmanowa. Tytuł projektu: „Wykorzystanie metod biotechnologii roślinnej do otrzymywania taksolu i jego pochodnych” (1993 -1995) – **wykonawca**.

5.4. Szkolenia

1. 10-11.04.2014r. – Kurs: „PCR czasu rzeczywistego – zastosowania w biologii i medycynie – kurs praktyczny”. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa.
2. 1-03.10.2013 r. – Kurs: “Charakterystyka białek: elektroforeza SDS PAGE i „western blotting”. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa.

3. 26–28.09.2013 r. – Kurs: „Tradycyjny i digital Real Time PCR”. Muzeum i Instytut Zoologii, Warszawa.
4. 14-16.01.2011 r. – Kurs: „Metody wykrywania mutacji punktowych”. SGGW, szkolenie zorganizowane w ramach projektu „Nowoczesne metody ochrony zasobów genowych oraz aplikacja technik molekularnych w naukach przyrodniczych – cykl szkoleń” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”.
5. 11-13.06.2010 r. – Kurs: „Bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR”. SGGW, szkolenie zorganizowane w ramach projektu „Nowoczesne metody ochrony zasobów genowych oraz aplikacja technik molekularnych w naukach przyrodniczych – cykl szkoleń” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”.
6. 19-21.03.2010 r. – Kurs: „Wykorzystanie programu MS EXCEL w opracowaniu wyników badań przyrodniczych”. SGGW, szkolenie zorganizowane w ramach projektu „Nowoczesne metody ochrony zasobów genowych oraz aplikacja technik molekularnych w naukach przyrodniczych – cykl szkoleń” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”.
7. 5-7.03.2010 r. – Kurs: „Metody izolacji DNA oraz polimorfizm STR w genotypowaniu”. SGGW, szkolenie zorganizowane w ramach projektu „Nowoczesne metody ochrony zasobów genowych oraz aplikacja technik molekularnych w naukach przyrodniczych – cykl szkoleń” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”.
8. 29-30.01.2010 r. – Kurs: „Real-Time PCR reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym”. SGGW, szkolenie zorganizowane w ramach projektu „Nowoczesne metody ochrony zasobów genowych oraz aplikacja technik molekularnych w naukach przyrodniczych – cykl szkoleń” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności”.
9. 3-5.02.1999 r. – Kurs „Technika PCR (Polymerase Chain Reaction) i jej zastosowania”. DNA-Gdańsk i Katedra Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej we współpracy z A & A Biotechnology.
10. 2-6.06.1997 r. – Kurs „Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa (HPLC) - teoria, metodyka i metody optymalizacji warunków analizy”. Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego AM w Lublinie.

11. 23-28.09.1994 r. - Kurs „Embriologia Eksperymentalna Roślin”. Zakład Botaniki Ogólnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu - w programie Tempus IEP 2349-92.

5.5. Staże zagraniczne

7.09 - 4.10.1997 r. – pobyt mający na celu szkolenie w zakresie wykorzystania metody ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) do oznaczania związków naturalnych, odbyte pod kierunkiem prof. dr M. Jaziriego, w Laboratory of Plant Morphology and Biotechnology Free University of Brussels.

Równocześnie, w dniach 19-21.09.1997 r., pod kierunkiem dr Gregorego Laskarisa, w the Natural Products Laboratory of the IBL (Institute Biology Leiden) kierowanym przez prof. Roba Verpoorte, odbyłam szkolenie w zakresie ekstrakcji, oczyszczania techniką SPE oraz analizy HPLC UV-DAD próbek przygotowywanych z różnych organów i tkanek cisów.

5.6. Członkostwo towarzystw naukowych:

1. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne,
2. Society for Medicinal Plant Research (Gesellschaft für Arzneipflanzen Forschung),
3. The Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB).

5.7. Działalność edukacyjna i popularyzatorska

Działalność edukacyjna:

1. Prowadzenie ćwiczeń i seminariów z dwóch przedmiotów: biologii z genetyką oraz botaniki farmaceutycznej z podstawami biotechnologii roślin, dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego Kierunku Farmacja;
2. Kierownik ćwiczeń z przedmiotu „Botanika farmaceutyczna” w latach 2008-2013;
3. Członek Rady Pedagogicznej I roku Wydziału Farmaceutycznego Kierunku Farmacja (2008-2013);
4. Prowadzenie wykładów i ćwiczeń w bloku fakultatywnym „Biotechnologia w ochronie zdrowia” dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego;
5. Prowadzenie ćwiczeń dotyczących kultur komórek, tkanek i organów roślin *in vitro* organizowanych dla studentów III roku Międzywydziałowego Centrum Biotechnologii Politechniki Warszawskiej;
6. Opiekun naukowy ośmiu prac magisterskich na Kierunku Farmacja oraz dwóch na Kierunku Biotechnologia Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej,

7. Promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr farm. Marty Grech-Baran pt.: „Biotransformacja glikozydów fenolowych w kulturach korzeniowych *Rhodiola kirilowii* (Regel) Regel et Maximowicz”, promotor dr. hab. Agnieszka Pietrosiuk.

Działalność popularyzatorska:

- 1) – wykład pt.: „Biotechnological methods applied for taxanes production in *Taxus x media* cells and organs” wygłoszony na posiedzeniu Komitetu Terapii i Nauk o Leku PAN, Warszawa (13.10.2010). Autorzy: K. Sykłowska-Baranek, M. Bonfill, A. Pietrosiuk, M. Furmanowa;
- 2) - wykład pt.: ”Inżynieria metaboliczna w pozyskiwaniu związków naturalnych pochodzenia roślinnego” wygłoszony na posiedzeniu referatowym Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego O/Warszawa (13.01.2009);
- 3) komunikat ustny pt.: „Wpływ jasmonianu metylu na wytwarzanie taksanów w kulturach zawieszinowych transformowanych i niezmienionych genetycznie komórek *Taxus x media*” – 3-cia Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego, Warszawa, 17.12.2010;
- 4) współautorstwo 48 plakatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik 5).

5.7.1. Działalność organizacyjna

Zaangażowana jestem w prace organizacyjne na rzecz WUM oraz Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM.

Jestem członkiem następujących komisji lub zespołów:

- 1) Komisja Dyscyplinarna dla Doktorantów WUM: w latach 2008 – 2012 r.,
- 2) Komisja Stypendialna dla Doktorantów WUM : od 2009 r. - obecnie,
- 3) Wydziałowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia: w latach 2011 – 2012 oraz zostałam powołana na kadencję w latach 2012-2016. Ponadto brałam udział w pracach Uczelnianego zespołu ds. Jakości Kształcenia, w Zespole roboczym ds. systemu E-sylabus: w 2013 r.,
- 4) Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Farmaceutycznego: od 2009 r. - obecnie,
- 5) Komisji Uczelnianego Egzaminu Wstępnego na studia – od 2005 r. – obecnie.

Ponadto uzyskałam uprawnienia egzaminatora maturalnego z przedmiotu biologia (OKE w Warszawie) i biorę udział w sprawdzaniu egzaminu wstępnego na studia w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

5.8. Recenzje

W czasopismach:

- International Journal of Biotechnology – 1
- Applied Microbiology and Biotechnology – 3
- Engineering in Life Sciences – 1
- New Biotechnology -1
- Critical Reviews in Biotechnology – 1
- Journal of Agricultural Science and Technology – 1
- Acta Physiologiae Plantarum – 1
- British Biotechnology Journal - 1
- Biologia Plantarum – 1.

5.9. Otrzymane nagrody

Nagrody Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego:

1. 28.10.2013 r. nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących badań fitochemicznych i biologicznych pochodnych naftochinonu w kulturach wybranych gatunków z rodziny Boraginaceae;
2. 28.10.2013 r. nagroda organizacyjna trzeciego stopnia za efektywną pracę przy wdrożeniu programów kształcenia dla kierunku Farmacja oraz kierunku Analityka Medyczna na rok akademicki 2012-2013;
3. 24.10.2011 r. nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za współautorstwo cyklu publikacji dotyczących biotechnologii roślin leczniczych;
4. 29.10.2007 r. nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia publikacje z dziedziny biotechnologii roślin leczniczych;
5. 09.10.2006 r. nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za współautorstwo cyklu publikacji dotyczących biotechnologii roślin leczniczych;
6. 20.06.2005 r. nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za współautorstwo publikacji dotyczących biotechnologii roślin leczniczych;
7. 08.11.2004 r. nagroda zespołowa naukowa pierwszego stopnia za współautorstwo cyklu publikacji anglojęzycznych dotyczących biotechnologii roślinnej;
8. 6.11.2002 r. nagroda zespołowa dydaktyczna pierwszego stopnia za osiągnięcia dydaktyczne;
9. 12.11.2001 r. nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za osiągnięcia w zakresie biotechnologicznych badań trzech gatunków cisów hodowanych w Polsce;

10. 25.10.1999 r. nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za cykl prac poświęconych biotechnologii roślin leczniczych gatunków: *Rhodiola rosea*, *Taxus x media* var. *Hicksii* i *Withania somnifera*;
11. 26.10.1998 r. nagroda naukowa zespołowa drugiego stopnia za publikację: „Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*” oraz “Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*”.

6. Współpraca naukowa

I. Naukowa współpraca międzynarodowa:

- 1) z prof. Mercedes Bonfill i jej współpracownikami z Laboratorium Fizjologii Roślin Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Barcelonie (Hiszpania). Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja i prezentacje plakatowe dotyczące hodowli korzeni i tkanek transformowanych cisów.
- 2) z prof. Ioanną Chinou i jej współpracownikami z Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Atenach (Grecja). Wynikiem tej współpracy są wspólne publikacje i prezentacje plakatowe dotyczące badań nad barwnymi naftochinonami pochodnymi naftazaryny.

II. Naukowa współpraca krajowa:

- 1) z dr Maciejem Pilarkiem z Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja i zgłoszenie patentowe dotyczące badań nad wykorzystaniem ciekłych perfluorozwiązków w biotechnologii roślin leczniczych.
- 2) z prof. Ewą Łojkowską i dr Anną Kawiak z Katedry Biotechnologii, Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed. Wynikiem tej współpracy są wspólne publikacje i prezentacje plakatowe dotyczące badań nad aktywnością barwnych naftochinonów pochodnych naftazaryny.
- 3) z dr Łukaszem Kuźmą z Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wynikiem tej współpracy są wspólne prezentacje plakatowe dotyczące badań nad hodowlami korzeni transformowanych w bioreaktorach.

- 4) z dr Marcinem Naliwajskim Katedry Fizjologii i Biochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja i prezentacja posterowa dotyczące badań nad aktywnością amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL).

7. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje łącznie:

- 1) Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe: 16, IF = 24,262; 299 pkt. MNiSW/KBN; 122,73 pkt. IC oraz 3 prace z listy MNiSW (6 pkt.).
- 2) Jedną pracę poglądową i jedną popularnonaukową.
- 3) 48 wystąpień na międzynarodowych i krajowych zjazdach: 32 komunikatów na zjazdach międzynarodowych, 16 na krajowych.
- 4) Dziesięć recenzji publikacji w czasopismach z IF oraz jedną w czasopiśmie bez IF.
- 5) Udział w realizacji 6 grantów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN oraz dwóch własnych projektów badawczych finansowanych ze środków WUM (dawniej AM w Warszawie).
- 6) **Łączna liczba punktów MNiSW**, jaką uzyskały prace z moim udziałem wynosi **305**, **łączny IF = 24,262**, **liczba cytowań = 74** (bez autocytowań), **indeks Hirscha $h = 5$** .

Katarzyna Sykowska-Borucka