

**dr Wojciech Pokora**

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku  
oraz osiągnięć naukowych**

**Uniwersytet Gdański  
Wydział Biologii  
Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin  
Gdańsk, 2018**

1. Pokora W., Tukał X., 2019. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of liverwort *Desmoussurus (Chlorophyta) species*. *Phytochemical Research*. 12(1): 1207-1213. DOI: 10.1002/PHYC.1207

2. Pokora W., Tukał X., 2013. Inhibition time of Fe-SOD synthesis and activity decrease of liverwort *Desmoussurus (green alga)* strains to chlorophyll *a* study with the synchronous cultures. *Plant Molecular Biology*. 107: 68-77. DOI: 10.1007/s11292-012-9111-1

3. Pokora W., Basak-Ramiszewska A., Tukał X., Kallinowski R., Pawlik-Skowrońska J., Tukał X., 2014. Adaptation strategies during cell cycle of two *Desmoussurus* strains (green microalgae) revealing different tolerance to cadmium. *A study with light*

1. Imię i nazwisko: **Wojciech Pokora**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, 2004 r., Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii.

Tytuł rozprawy doktorskiej, wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin:

„Rola dysmutaz ponadtlenkowych w adaptacji glonów z rodzaju *Scenedesmus* do stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem czynników abiotycznych pochodzenia antropogenicznego”.

Promotor: Prof. dr hab. Zbigniew Tukaj

Dyplom magistra biotechnologii w zakresie fitopatologia, 2000 r., Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku.

Tytuł pracy magisterskiej, wykonanej w Zakładzie Biotechnologii i Ochrony Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i AMG:

„Charakterystyka germplazmy dzikich gatunków z rodzaju *Solanum*, odmian hodowlanych ziemniaka *S.tuberosum* oraz mieszańców somatycznych *S.brevidens* x *S.tuberosum*”.

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Łojkowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Od 01.04.2004 do chwili obecnej: adiunkt w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański.

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego 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 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego: „**Znaczenie nadtlenu wodoru w adaptacji komórek mikroglonów do stresu związanego z zaburzeniami fotosyntezy oraz w przebiegu i regulacji ich cyklu komórkowego**”

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Pokora W.**, Tukaj Z., 2010. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus* (Chlorophyta) species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(6): 1207-1213. **IF: 2,34; MNiSW: 30**. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 75%.
2. **Pokora W.**, Tukaj Z., 2013. Induction time of Fe-SOD synthesis and activity determine deferent tolerance of two *Desmodesmus* (green algae) strains to chloridazon: a study with the synchronous cultures. *Pest. Biochem. Physiol.* 107: 68-77. **IF: 2,00; MNiSW: 25**. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 80%.
3. Pokora W., Baścik-Remisiewicz A., Tukaj S., Kalinowska R., Pawlik-Skowrońska B., Tukaj Z., 2014. Adaptation strategies during cell cycle of two *Desmodesmus armatus* strains (green microalgae) revealing different tolerance to cadmium: A study with light-

induced synchronized cultures of algae. *J. Phycol.* 171: 69-77. IF 2,84; MNiSW: 30. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 40%.

4. **Pokora W.**, Aksmann A., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Rykaczewski M., Gappa M., Tukaj Z., 2017. Changes in nitric oxide/hydrogen peroxide content and cell cycle progression: Study with synchronized cultures of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 208: 84-93. **IF 3,12; MNiSW: 35**. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 60%.

5. **Pokora W.**, Aksmann A., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Tukaj Z., 2018. Externally applied hydrogen peroxide modifies cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 230: 61-72. **IF 3,12; MNiSW: 35**. Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 75%.

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

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego zostało przedstawione w pięciu publikacjach, dotyczących roli jaką pełnią enzymy odpowiedzialne za powstawanie i neutralizację nadtlenu wodoru w adaptacji komórek mikroglonów do stresu wynikającego z zaburzeń procesu fotosyntezy oraz udziału nadtlenu wodoru oraz tlenu azotu w przebiegu i regulacji cyklu komórkowego zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. We wszystkich, pracach jestem pierwszym autorem, a w trzech z nich autorem korespondencyjnym. Sumaryczny **IF** wspomnianych publikacji wynosi **13,42**, suma punktów **MNiSW** wynosi **155**.

### **Znaczenie nadtlenu wodoru w adaptacji komórek mikroglonów do stresu związanego z zaburzeniami fotosyntezy oraz w przebiegu i regulacji ich cyklu komórkowego**

Jedną z przyczyn stresogenicznego wpływu czynników abiotycznych na rośliny jest modulacja „oksydoredukcyjnej homeostazy”, co może prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy powstawaniem, a neutralizacją reaktywnych form tlenu (RFT) (Mittler, 2017). Uważa się, iż niewielki stopień zakłócenia tej homeostazy ma istotne znaczenie w regulacji szeregu procesów fizjologicznych i biochemicznych (Foyer, 2018), a niektóre z RFT, zwłaszcza nadtlenek wodoru, ale także reaktywne formy azotu (RFA), takie jak tlenek azotu, pełnią rolę cząsteczek sygnałowych (Neill i wsp., 2002). Ekspozycja komórki roślinnej na subletalne dawki ksenobiotyków powoduje zwykle znaczący wzrost ilości generowanych RFT, co określane jest mianem stresu oksydacyjnego i manifestuje się między innymi wzrostem aktywności enzymów

antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza nadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) czy peroksydaza (PX) (Torres i wsp., 2008). Aktywność dysmutaz nadtlenków, katalaz i peroksydaz pozostaje w ścisłej wzajemnej zależności, głównie poprzez fakt, iż produkt jednego enzymu jest bezpośrednim substratem dla innych. Ponadto produkty pośrednie przekształcania anionorodnika nadtlenkowego do tlenu i wody pełnią szereg funkcji regulacyjnych i sygnalizacyjnych, a aktywność katalityczna ww. enzymów w dużej mierze decyduje o ilości obecnych w komórce roślinnej RFT, w tym nadtlenu wodoru. (Mittler, 2017). Uważa się, że nadtlenek wodoru pełni kluczową rolę w regulacji ekspresji genów kodujących szereg enzymów, zarówno biorących udział w neutralizacji RFT (SOD, GPX, APX), ale także w indukcji ekspresji białek PR (*ang.* pathogenesis related), białek z rodziny HSP (*ang.* heat shock proteins) czy białek związanych z przebiegiem i regulacją cyklu komórkowego (np. kinazy histonów). Produkcja i neutralizacja RFT wydaje się być kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania komórki. W związku z tym, sprawność enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów odpowiedzialnych za ich kontrolowanie ma istotny wpływ na prawidłowy rozwój komórki, przebieg procesów fotosyntezy i oddychania, ale także decyduje o zdolnościach adaptacyjnych komórki roślinnej do niekorzystnych warunków środowiskowych. W mojej pracy doktorskiej „Rola dysmutaz nadtlenkowych w adaptacji glonów z rodzaju *Scenedesmus* do stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem czynników abiotycznych pochodzenia antropogenicznego” zrealizowanej w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego, pod opieką Prof. dr hab. Zbigniewa Tukaja, badałem indywidualny oraz łączny wpływ ksenobiotyków na szereg szczepów zielenic jednokomórkowych. Analiza efektów działania toksykantów o różnych mechanizmach działania (metal ciężki – kadm, policykliczny węglowodór aromatyczny – antracen oraz herbicyd hamujący proces fotosyntezy – chlorydazon) wskazała zjawisko indukcji stresu oksydacyjnego jako uniwersalny mechanizm odpowiedzi komórki na te substancje, a wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza nadtlenkowa, katalaza czy peroksydaza askorbinianu interpretowałem jako wyraz adaptacji komórek mikroglonów do warunków indukowanego chemicznie stresu. Wykazałem także duże zróżnicowanie we wrażliwości (redukcja wzrostu populacji, aktywność fotosyntetyczna) na działanie badanych przeze mnie toksykantów w obrębie blisko spokrewnionych szczepów *Desmodesmus* (dawniej *Scenedesmus*) (praca doktorska, Pokora, 2003 oraz Pokora i wsp., 2003, Tukaj i Pokora, 2006).

Po zakończeniu doktoratu kontynuowałem badania nad efektami działania ksenobiotyków na komórki zielenic, koncentrując się na mechanizmie ich oddziaływania na proces fotosyntezy badany na poziomie populacyjnym (Pokora i wsp., 2010; praca nr 1), a także

na wskazaniu szczególnych cech fizjologicznych i biochemicznych komórek glonów, które decydują o ich wrażliwości lub tolerancji na nadmiar RFT generowanych w warunkach stresu. Poprzez zastosowanie modelu badawczego opartego na hodowlach synchronicznych, wyniki tych badań mogłem interpretować na poziomie zdarzeń zachodzących w pojedynczej komórce, z uwzględnieniem przebiegu jej cyklu komórkowego (Pokora i wsp., 2013, 2014; prace nr 2 i 3). Z kolei zastosowanie modelowej zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* umożliwiło mi charakterystykę cyklu komórkowego oraz powiązanych z nią zmian w wolnorodnikowej homeostazie komórki, analizowanej na poziomie fizjologicznym, biochemicznym oraz molekularnym (Pokora i wsp., 2017; praca nr 4). Wykazałem, iż modyfikacja wzajemnej proporcji NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zaindukowana w odpowiedniej fazie cyklu komórkowego *Chlamydomonas*, poprzez łagodną modyfikację homeostazy redoks, może przyspieszać lub opóźniać czas trwania cyklu komórkowego, zwiększać liczbę rund replikacji występujących w jednym cyklu komórkowym, modyfikować biomasę i objętość, a także przyspieszać uwalnianie komórek potomnych (Pokora i wsp., 2018; praca nr 5). Wymienione prace stanowią cykl opracowań przedstawiających rolę homeostazy wolnorodnikowej w adaptacji komórek glonów do warunków stresu, analizowanej zarówno na poziomie populacyjnym jak i komórkowym oraz jej roli w przebiegu i regulacji cyklu komórkowego zielenic, co stanowi przedmiot przedłożonego osiągnięcia naukowego.

#### Nadtlenek wodoru w adaptacji komórek mikroglonów do stresu związanego z zaburzeniami fotosyntezy – poziom populacyjny

Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych obecnych w komórkach glonów z rodzaju *Desmodesmus* traktowanych kadmem i antracenenem oraz ich kombinacją, interpretowałem jako kluczowy mechanizm ich adaptacji do indukowanego chemicznie stresu (Tukaj i Pokora, 2006). Fakt, iż wzrost ten dotyczył w największym stopniu białek typowych dla chloroplastu, wskazywał to organelum jako istotne miejsce toksycznego oddziaływania kadmu i antracenu. Ponieważ odpowiedź komórki na efekt działania kadmu i antracenu, aplikowanego indywidualnie oraz łącznie manifestowała się głównie poprzez indukcję mechanizmów ochronnych związanych z chloroplastem, wpływ tych dwóch substancji na proces fotosyntezy u szczepów *Desmodesmus* analizowałem poprzez szczegółową parametryzację wydzielania tlenu fotosyntetycznego oraz analizę parametrów kinetyki indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a* mierzonej metodą pulsacyjnej modulacji amplitudy (PAM), (Pokora i Tukaj, 2010; praca nr 1). Wyniki wskazały charakterystyczną zależność pomiędzy aktywnością dysmutaz ponadtlenkowych a wartością współczynnika qN, odpowiadającego niefotochemicznemu rozpraszaniu energii zabsorbowanej przez aparat fotosyntetyczny (Thiele i

wsp., 1997). U zielenic wartość współczynnika  $q_N$  związana jest przede wszystkim ze zmianą  $\Delta pH$  oraz przekształcaniem anteraksantyny i zeaksantyny w cyklu ksantofilowym (Garcia-Mendoza i wsp., 2002). W komórkach traktowanych tylko antracenenem lub tylko kadmem obserwowałem wzrost aktywności SOD lub zwiększone niefotochemiczne rozpraszanie energii. Natomiast pod wpływem jednoczesnego działania dwóch toksykantów aktywacji podlegały obydwie mechanizmy ochronne, przy czym wzrost aktywności SOD obserwowałem już w 2 h po ekspozycji, natomiast zmiana wartości  $q_N$  widoczna była po upływie około 6 h od ekspozycji komórek na toksykanty. Analiza intensywności wydzielania tlenu fotosyntetycznego oraz wydajności kwantowej PS II ( $\phi$  PS II, Genty i wsp., 1989) wykazała brak istotnego obniżenia wydajności procesu fotosyntezy. Zatem wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej lub/ oraz innych procesów warunkujących niefotochemiczne rozpraszanie energii zabsorbowanej przez fotosystem II, można było uznać za mechanizmy wystarczające, aby chronić aparat fotosyntetyczny glonów przed skutkami podwyższonego poziomu RFT, indukowanego działaniem kadmu oraz antracenu. Doświadczenia z wykorzystaniem hodowli okresowych (*ang.* batch-cultures), prowadzonych w optymalnych i suboptymalnych warunkach mają jednak pewne ograniczenia. W hodowli takiej komórki glonów rosną i dzielą się w sposób nieuporządkowany - asynchroniczny. Jednocześnie wrażliwość danego organizmu może zależeć od fazy jego rozwoju ontogenetycznego oraz stopnia dojrzałości aparatu fotosyntetycznego, a uzyskiwany w hodowlach asynchronicznych wynik jest wypadkową reakcji wszystkich stadiów rozwojowych organizmów w populacji. Aby analizować mechanizmy adaptacyjne mikroglonów do stresu indukowanego czynnikami abiotycznymi, na poziomie pojedynczej komórki, uwzględniając jednocześnie etap jej rozwoju ontogenetycznego oraz dojrzałość aparatu fotosyntetycznego, dalsze badania prowadziłem z zastosowaniem modelu badawczego bazującego na hodowlach synchronicznych.

#### **Nadtlenek wodoru w adaptacji komórek mikroglonów do stresu związanego z zaburzeniami fotosyntezy – poziom komórkowy**

W hodowli synchronicznej, mikroglony utrzymywane są w optymalnych warunkach wzrostu (bogate podłoże mineralne, wysoka podaż  $CO_2$ , natężenia światła bliskie punktowi wysycenia fotosyntezy  $E_k$ ). Przy naprzemiennie stosowanych okresach światła i ciemności, komórki rosną i dzielą się w sposób uporządkowany. Wszystkie organizmy znajdują się na tym samym etapie rozwoju ontogenetycznego – w tym samym momencie cyklu komórkowego (Andersen, 2005; Harris, 2009), który w przypadku badanych przeze mnie organizmów zamyka się w czasie 24 godzin. Hodowla taka umożliwia analizę próbek biologicznych o dużych liczebnościach, natomiast interpretacja uzyskiwanych wyników może być dokonywana na

poziomie jednej komórki, z uwzględnieniem zmian w przebiegu procesów fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych, wynikających z rozwoju komórki oraz ich skorelowania z poszczególnymi etapami cyklu komórkowego. W przypadku badanych przeze mnie glonów interpretacja wyników możliwa jest także na poziomie pojedynczego chloroplastu, ponieważ organizmy te posiadają jedno takie organellum (Andersen, 2005). Wcześniej przeprowadzone badania wskazywały na istotne różnice we wrażliwości blisko spokrewnionych szczepów *Desmodesmus* na działanie metali ciężkich i herbicydów (Tukaj i Pokora, 2006). Analiza wpływu wybranych przedstawicieli tych grup toksykantów – kadmu oraz chlorydazonu, aplikowanych do hodowli synchronicznie rosnących komórek glonów miała na celu zidentyfikowanie specyficznych cech badanych glonów, warunkujących ich zróżnicowaną tolerancję na stres oksydacyjny oraz ich powiązanie z przebiegiem cyklu komórkowego (Pokora i Tukaj, 2013; praca nr 2, Pokora i wsp., 2014; praca nr 3). Kompleksowa analiza mechanizmów adaptacji komórek dwóch szczepów *Desmodesmus* do stresu indukowanego kadmem (Pokora i wsp., 2014, praca nr 3) obejmowała, poza charakterystyką stanu fizjologicznego (tempo wzrostu, biomasa, aktywność fotosyntetyczna), pomiar aktywności oraz ilości obecnego w komórce białka poszczególnych izoform SOD, syntezy fitochelatyn oraz oznaczenia puli glutationu, a także indukcję biosyntezy białek opiekuńczych z rodziny HSP. Wzrost komórek szczepu odpornego nie był hamowany, natomiast ich aktywność fotosyntetyczna, obniżona w pierwszych godzinach po ekspozycji, powracała do poziomu notowanego w hodowlach kontrolnych. Było to skorelowane ze znacząco zwiększoną oraz indukowaną w zdecydowanie krótszym czasie, niż u szczepu wrażliwego, zdolnością komórek do detoksykacji reaktywnych form tlenu. Podwyższoną aktywność chloroplastowej izoformy SOD (Fe-SOD), a także zdecydowanie wyższy poziom glutationu wskazałem jako czynniki wyróżniające szczep bardziej odporny na działanie kadmu. Z kolei analizując dwa inne, blisko spokrewnione szczepy *Desmodesmus*, charakteryzujące się w hodowlach asynchronicznych zdecydowanie różną wrażliwością na działanie herbicydu hamującego fotosyntezę – chlorydazonu, także zastosowałem hodowle synchroniczne (Pokora i Tukaj, 2013, praca nr 2). W komórkach szczepu wrażliwego, chlorydazon powodował obniżenie liczby podziałów komórkowych, a tym samym prowadził do zmniejszenia liczby komórek potomnych uwalnianych na koniec cyklu komórkowego. W komórkach szczepu odpornego, herbicyd nie tylko nie hamował procesów wzrostu i podziału komórki, ale przyspieszał przebieg cyklu komórkowego prowadząc do zwiększenia liczby komórek potomnych, poprzez indukując dodatkowej rundy replikacji. Jednocześnie ilość energii absorbowanej przez pojedyncze centrum reakcji (RC) fotosystemu II była dwukrotnie większa w szczepie wrażliwym, a energia

pułapkowana w RC była podobna w obu szczepach, przez co niefotochemiczne rozpraszanie energii zachodzące w komórkach szczepu wrażliwego znacznie przekraczało wartość uzyskaną dla szczepu odpornego. Komórki kontrolne obu szczepów różniły się istotnie co do ilości obecnego w komórce białka dwóch izoform Fe-SOD: FSD 1 i FSD 2. Jednocześnie różnice w aktywności tych izoform były niewielkie. W komórkach szczepu wrażliwego aktywność enzymu była wprawdzie znacząco wyższa, jednak pod wpływem działania herbicydu nie odnotowałem wzrostu tej aktywności oraz przyrostu ilości nowo syntezowanego białka SOD. W komórkach szczepu odpornego, pomimo niższej początkowej zawartości izoform Fe-SOD, indukcja ich biosyntezy następowała w ciągu 2 godzin po ekspozycji na herbicyd, prowadząc do sprawnego przekształcania anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru. Jednocześnie w komórkach tego szczepu wzrost ilości i aktywności chloroplastowych izoform SOD korelował z przyrostem ilości aktywnych centrów reakcji PS II oraz przywróceniem wydajności procesu fotosyntezy do poziomu notowanego w komórkach kontrolnych. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały, iż w przypadku badanych mikroglonów „szybkość” indukcji mechanizmów adaptacyjnych może być czynnikiem nadrzędnym nad ich „konstytutywną” wydajnością. Powiązanie kinetyki zmian w biosyntezie i aktywności białek warunkujących produkcję nadtlenu wodoru z wydajnością procesu fotosyntezy, prowadzące do zmiany w profilu rozwojowym komórki – skrócenie/zwiększenie liczby rund replikacji lub zahamowanie cyklu komórkowego zielenic, stanowiło przesłankę do podjęcia badań nad związkiem pomiędzy kinetyką zmian stężenia wewnątrzkomórkowego nadtlenu wodoru oraz przebiegiem cyklu komórkowego zielenic.

#### Nadtlenek wodoru w przebiegu i regulacji cyklu komórkowego mikroglonów

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pełni funkcję cząsteczki sygnałowej (Alscher i wsp., 1997) u roślin oraz glonów (Petrov i Van Breusegem, 2012), a jego powstawanie w warunkach fizjologicznych oraz w odpowiedzi na działanie czynników stresowych sugeruje udział H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w wielokierunkowej transdukcji sygnału, prowadzącej do regulacji ekspresji szeregu białek. Obok nadtlenu wodoru, także tlenek azotu uznaje się za cząsteczkę sygnałową. W komórkach roślin wyższych NO powstaje głównie z argininy przy udziale syntazy tlenku azotu (NOS). W komórkach zielenic, w tym *Chlamydomonas*, przekształcanie NO<sub>2</sub> w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotanową (NR) (Sakihama i wsp., 2002) uznawane jest za widącą drogę powstawania NO. Jednoczesne powstawanie NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w odpowiedzi na stres sugeruje występowanie interakcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO w odpowiedzi komórek na bodźce środowiskowe. Dostępne dane literaturowe wskazują, że sygnałowa rola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO u roślin polega między innymi na modulacji ekspresji białek bezpośrednio związanych z regulacją cyklu komórkowego (cykliny i cyklino-zależne kinazy)



(Mittler, 2017). Moje dalsze doświadczenia prowadziłem z zastosowaniem modelowej zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*, u której poznanie całkowitej sekwencji genomu ([www.chlamy.org](http://www.chlamy.org)), sprawia, iż organizm ten znajduje powszechne zastosowanie w badaniach molekularnych oraz fizjologicznych (Grossman i wsp., 2000), także w warunkach hodowli synchronicznych, umożliwiając badanie cyklu komórkowego. W komórkach *Chlamydomonas* zachodzą wielokrotne podziały prowadzące do powstania 2<sup>n</sup> komórek potomnych, gdzie jeden cykl obejmuje „n” rund replikacyjnych, w trakcie których następuje podział jądra i chloroplastu. Każdy z etapów procesów podziałowych, w tym replikacja DNA, mitoza i cytokineza poprzedzony jest fazą wzrostu, w której następuje formowanie organelli komórkowych oraz gromadzone są rezerwy energetyczne (Cross i Umen, 2015). Mechanizm regulujący przejście fazy G1 w S (G1/S) związany jest z przejściem cyklu komórkowego przez punkt kontrolny G1/S. Decydujące znaczenie ma wielkość komórki, oraz prawdopodobnie czas trwania fazy G1 (Matsumara i wsp., 2003). Punkt ten nosi nazwę punktu kompetencyjnego, a po jego przejściu dalszy podział komórki, formowanie i uwolnienie komórek potomnych może zachodzić bez udziału energii świetlnej (Hirt, 1996). W tej części badań, moim pierwszym celem było kompleksowe scharakteryzowanie cyklu komórkowego *Chlamydomonas* pod kątem zachodzących w jego trakcie zmian w ilości generowanego w komórkach nadtlenu wodoru i tlenu azotu (Pokora i wsp., 2017, praca nr 4). W swoim modelu badawczym dobrałem warunki hodowli w taki sposób, aby komórki przechodziły 3 rundy replikacji w trakcie jednego cyklu komórkowego. Charakterystyki cyklu dokonałem w trzech obszarach: a) postępu cyklu komórkowego, analizowanego na poziomie ekspresji wybranych cyklin i cyklino-zależnych kinaz, co pozwoliło na wyznaczenie charakterystycznych faz (G1, S, M) oraz punktów cyklu (G1/S, S/M), momentu rozpoczęcia cytokinezy i sparometryzowanie kinetyki uwalniania komórek potomnych, b) funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego parametryzowanego przez pomiar wydajności wiązania i wykorzystania energii w procesach fotochemicznych oraz niefotochemicznego rozpraszania jej nadmiaru (analiza kinetyki indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo* - test OJIP) oraz wydajność wydzielania tlenu fotosyntetycznego i zmian ilościowych w składzie barwników fotosyntetycznych c) utrzymywanie homeostazy reaktywnych form tlenu i azotu oraz analizę ekspresji (ilość obecnego w komórce transkryptu oraz aktywność białka) enzymów zaangażowanych w ich powstawanie i neutralizację na terenie cytozolu, chloroplastu i mitochondrium. Moje badania wykazały występowanie okołodobowych oscylacji w produkcji NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach *Chlamydomonas*. Oscylacje te współgrały ze zmianami w aktywności oraz względnym poziomie transkryptów enzymów dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy w przypadku nadtlenu wodoru

oraz ze zmianami w aktywności fotosyntetycznej i aktywności oraz poziome ilości transkryptyu reduktazy azotanowej i azotynowej, w przypadku tlenu azotu. Wyniki te są zgodne z doniesieniami o okołodobowym rytmie ekspresji NR oraz enzymów metabolizujących  $H_2O_2$  (SOD, CAT, PX) u innych mikroglonów (Velasco i wsp., 1989). Wykazałem także istnienie zbieżności czasowej pomiędzy zmianami wartości stosunku  $NO/H_2O_2$  a szczególnymi momentami cyklu komórkowego takimi jak rozpoczęcie fazy G1, przejście punktu kontrolnego G1/S oraz S/M, indukcja cytokinezy oraz indukcja uwalniania komórek potomnych (Pokora i wsp., 2017; praca nr 4). Na podstawie uzyskanych wyników postawiłem oraz zweryfikowałem hipotezę zakładającą, iż zmiana wewnątrzkomórkowego stosunku ilościowego  $H_2O_2$  do  $NO$ , poprzez ich egzogenną aplikację i/lub wygaszanie, modyfikuje przebieg cyklu komórkowego *Chlamydomonas* (Pokora i wsp. 2018, praca nr 5). W tym celu modyfikacja proporcji  $H_2O_2/NO$  była indukowana poprzez dodanie stabilizowanego roztworu nadtlenu wodoru do hodowli synchronicznej, tak aby jego stężenie przypadające na jedną komórkę wynosiło 150% wartości notowanej w danym momencie cyklu komórkowego, w hodowli kontrolnej. Wybrałem cztery momenty rozwoju komórki:

- młode komórki potomne, rozpoczynające cykl komórkowy, przed ekspozycją na światło (wariant a)
- komórki o najniższej wartości stosunku  $NO/H_2O_2$ , przed osiągnięciem punktu kompetencji podziałowej, wykazujące jednocześnie wysoką aktywność fotosyntetyczną (wariant b),
- komórki o maksymalnej wartości stosunku  $NO/H_2O_2$ , przed rozpoczęciem procesu cytokinezy (wariant c),
- dojrzałe komórki macierzyste, w których notowana jest najwyższa w trakcie całego cyklu wartość stosunku  $NO/H_2O_2$  oraz rozpoczął się proces cytokinezy (wariant d).

Uzyskane wyniki wskazały, iż w zależności od fazy cyklu komórkowego *Chlamydomonas*,  $H_2O_2$ , poprzez łagodną modyfikację homeostazy redoks, może przyspieszać lub opóźniać czas trwania cyklu komórkowego, zwiększać liczbę rund replikacji występujących w jednym cyklu komórkowym, modyfikować biomasę i objętość, a także przyspieszać uwalnianie komórek potomnych. Odnotowane zmiany były wynikiem lepszej adaptacji komórek do ekspozycji na światło po okresie ciemności (wariant a). Zmiana proporcji  $NO/H_2O_2$  w momencie, gdy jej wartości jest najniższa (wariant b), przekładała się bezpośrednio na zwiększenie wydajności transportu elektronów pomiędzy PS II a PS I, przy niezmienionej ilości energii absorbowanej. Takie zwiększenie wydajności procesu fotosyntezy wraz z podwyższeniem potencjału komórek do neutralizowania powstających wówczas RFT oraz podwyższonym poziomem ilości transkryptyu cyklin (CYC) i cyklino-zależnych kinaz

białkowych (CDK) oraz ilości DNA skutkowało uzyskaniem przez komórki kompetencji do przejścia dodatkowej – czwartej rundy replikacji, a co za tym idzie zwiększenia liczby komórek potomnych uwalnianych na koniec cyklu. Z kolei zwiększenie ilości obecnego w komórce  $H_2O_2$  w momencie, gdy wartości stosunku  $NO/H_2O_2$  była najwyższa (wariant c), prowadziło do opóźnienia momentu rozpoczęcia procesu cytokinezy. W przypadku *Chlamydomonas*, z procesem cytokinezy skorelowany jest podział chloroplastu, w trakcie którego aktywność fotosyntetyczna komórki ulega znacznemu obniżeniu (Cross i Umen, 2015). W wyniku opóźnienia tych zdarzeń, wydłużony czas aktywności fotosyntetycznej nie był wprawdzie wystarczający do zaindukowania kolejnej rundy podziału komórki, jednak prowadził do zwiększenia biomasy komórek potomnych uwalnianych na koniec cyklu. Jednocześnie wykazałem, iż aplikacja nadtlenu wodoru po procesie cytokinezy (wariant d) może być istotnym elementem sekwencji zdarzeń prowadzącym do przyspieszenia momentu uwalniania komórek potomnych z komórek macierzystych. Uzyskane przeze mnie wyniki wydają się być niezwykle obiecujące w związku z rozwojem technologii opartych na hodowlach mikroglonów mających na celu zwiększenie wydajności hodowli masowych w bioreaktorach, produkcji biopaliw, a także uzyskiwania komórek glonów o cechach pożądanych np. w bioremediacji. Szczególnie interesującym wydaje się być powiązanie uzyskanych przez mnie wyników z fizjologicznymi podstawami zjawiska hormezy (Calabrese i wsp., 2007) i regulacją przebiegu cyklu komórkowego. Daje to potencjalną możliwość sterowania rozwojem populacji komórek mikroglonów oraz może przyczynić się do wyjaśnienia nieoczekiwanych efektów (stymulacja wzrostu populacji) notowanych w doświadczeniach toksykologicznych, gdzie analizowane są efekty niskich dawek toksykantów ( $EC_{10/24}$ ). Ponadto, wg. dostępnej mi wiedzy, badania dotyczące działania/współdziałania RFT i RFA w przebiegu cyklu komórkowego komórek glonowych są w pełni nowatorskie i nie były dotychczas prowadzone w żadnym innym zespole badawczym.

**Za najważniejsze elementy przedstawionego osiągnięcia naukowego, będącego podstawą o ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego uważam:**

1. Wskazanie chloroplastowych izoform dysmutazy nadadtlenkowej jako kluczowych enzymów decydujących o zdolności adaptacji komórek zielenic z rodzaju *Desmodesmus* i *Chlamydomonas* do stresu indukowanego toksykantami należącymi do grup zanieczyszczeń najczęściej notowanych w środowisku wodnym: metali ciężkich -

wykazane na przykładzie kadmu oraz herbicydów- wykazane na przykładzie chlorydazonu.

2. Wskazanie na „szybkość” indukcji mechanizmów adaptacyjnych jako czynnika nadrzędnego nad „stopniem” indukcji tych mechanizmów w przypadku blisko spokrewnionych szczepów zielenic, o znacząco zróżnicowanej wrażliwości na działanie danego toksykanta.
3. Wykazanie zbieżności czasowej pomiędzy zdarzeniami cyklu komórkowego, takimi jak przejście faz cyklu G1/S, S/M, indukcja uwalniania komórek potomnych, z oscylacjami poziomu cząsteczek sygnałowych – nadtlenku wodoru i tlenku azotu u modelowej zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*.
4. Wykazanie, iż indukowana zewnętrznie zmiana proporcji pomiędzy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO w wybranych momentach cyklu komórkowego może prowadzić do modyfikacji przebiegu cyklu komórkowego, co manifestuje się zwiększoną liczbą rund replikacyjnych, a co za tym idzie wyższą liczbą komórek potomnych uwalnianych z jednej komórki macierzystej, zwiększoną biomasą komórek potomnych oraz lepszą adaptacją młodych komórek potomnych do ekspozycji na intensywne światło.

Piśmiennictwo (zawiera pozycje nie wymienione w punkcie 4b):

1. Alscher, R. G., Donahue, J. L., & Cramer, C. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 224-233.
2. Andersen R.A. (2005). Algal culturing techniques. *Elsevier Academic Press*.
3. Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., ... & Cook, R. R. (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 122-128.
4. Cross, F. R., & Umen, J. G. (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *The Plant Journal*, 82(3), 370-392.
5. Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 154: 134-142.
6. Garcia-Mendoza, E., Matthijs, H. C., Schubert, H., & Mur, L. R. (2002). Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions. *Photosynthesis Research*, 74(3), 303.
7. Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1), 87-92.
8. Grossman, A.R., 2000. *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3, 132-137.
9. Harris, E. H. (2009). The *Chlamydomonas* source book (Vol. 1, pp. 293-302). D. B. Stern, & G. B. Witman (Eds.). San Diego, CA: Elsevier.
10. Hirt, H. (1996). In and out of the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology*, 31(3), 459-464.
11. Matsumura, K., Yagi, T., & Yasuda, K. (2003). Differential analysis of cell cycle stability in *Chlamydomonas* using on-chip single-cell cultivation system. *Japanese Journal of Applied Physics*, 42(7A), L784.
12. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
13. Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1237-1247.
14. Petrov, V. D., & Van Breusegem, F. (2012). Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*, <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls014>.
15. Sakihama, Y., Nakamura, S., & Yamasaki, H. (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant and Cell Physiology*, 43(3), 290-297.
16. Thiele, A., Winter, K., & Krause, G. H. (1997). Low inactivation of D1 protein of photosystem II in young canopy leaves of *Anacardium excelsum* under high-light stress. *Journal of Plant Physiology*, 151(3), 286-292.

17. Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1-15.
18. Velasco, P. J., Tischner, R., Huffaker, R. C., & Whitaker, J. R. (1989). Synthesis and degradation of nitrate reductase during the cell cycle of *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiology*, 89(1), 220-224.
19. Tukaj, Z., & Pokora, W. (2006). Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 323-331.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

### Publikacje naukowe

Poza publikacjami składającymi się na osiągnięcie naukowe przedstawione powyżej, dorobek mój składa się z 12 publikacji (łącznie **IF: 15,62**, **MNiSW: 270**), których jestem współautorem. Poniżej znajduje się krótkie omówienie tych prac.

5.1.1. Zakres tematyczny: Rola dysmutaz ponadtlennokowych w adaptacji zielenic z rodzaju *Desmodesmus* do stresu indukowanego czynnikami abiotycznymi.

1. **Pokora W.**, Reszke J., Tukaj Z., 2003. Changes in superoxide dismutases (SODs) activities and isoforms profiles during growth of some *Scenedesmus* species, strains and mutants grown in batch-cultures. *Acta Physiol. Plant.* 25: 375 - 384. **IF: 0,43; MNiSW: 20.**
2. Tukaj Z., **Pokora W.**, 2006. Individual and combined effect of anthracene, cadmium and chloridazon on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 65: 323-331. **IF: 3,19; MNiSW: 30.**
3. **Pokora W.**, Aksmann A., Tukaj Z., 2011 a. Functional characteristics of green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae): 276-6 wild type and its two photosystems deficient mutants cultured under photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions. *Phycol. Res.* 59: 259-268. **IF: 1,54; MNiSW: 20.**
4. **Pokora W.**, Detlaff-Pokora A., Tukaj Z., 2011 b. Expression of superoxide dismutase isoforms in *Desmodesmus subspicatus* cells exposed to anthropogenic contaminants. *Polish J. Environ. Stud.* (20: 605 - 610). **IF: 0,51; MNiSW: 15.**
5. Aksmann A., **Pokora W.**, Tukaj Z., 2001. SOD activity in *Scenedesmus armatus* cells treated with cadmium and two aromatic hydrocarbons. *Acta Physiol. Plant.*, 23: 31. **IF: 0,23; MNiSW: 20.**
6. Aksmann A., **Pokora W.**, Baścik-Remisiewicz A., Tukaj Z., 2004. Combined effect of anthracene and cadmium induces oxidative stress in algal cells. *Acta Physiol. Plant.* 26: 216. **IF: 0,43; MNiSW: 20.**
7. **Pokora W.**, Tukaj Z., 2007. The activity of SOD isoforms in cells of three *Desmodesmus obliquus* green alga strains grown under photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions. *Acta Biochim. Pol.* 54: 191. **IF: 1,49; MNiSW: 20.**

Przedstawiony powyżej cykl prac to prezentacja wyników badań dotyczących izoform enzymu: dysmutazy ponadtlennokowej (SOD), odpowiedzialnej za przekształcanie anionorodnika ponadtlennokowego do nadtlenu wodoru w komórkach zielenic z rodzaju *Desmodesmus* (dawniej *Scenedesmus*). Enzym ten stanowi tzw. pierwszą linię obrony w warunkach stresu

oksydacyjnego, a wydajność przekształcania powstającego w komórce anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru jest kluczowa w ochronie komórki przed skutkami bardziej toksycznych RFT takich jak rodnik hydroksylowy (Mittler, 2017). W pracach tych przedstawiłem charakterystykę szeregu szczepów zielenic z rodzaju *Desmodesmus* obejmującą parametryzację kinetyki ich wzrostu i powiązane z nim zmiany w aktywności fotosyntetycznej oraz zmiany w aktywności i profilu występujących izoform dysmutazy ponadtlenkowej w trakcie wzrostu populacji tych glonów w warunkach kontrolnych na podłożach mineralnych (Pokora i wsp., 2003) oraz w zróżnicowanych warunkach troficznych (Pokora i wsp. 2007, 2011 a). Analiza profilu białkowego dysmutaz ponadtlenków wskazuje na obecność u wszystkich badanych gatunków jednej izoformy Cu/Zn-SOD, 1-2 izoform Mn-SOD oraz 1-3 izoform Fe-SOD. Profil izoenzymatyczny SOD jest charakterystyczny dla każdego z gatunków i nie zmienia się w trakcie rozwoju populacji, występują natomiast różnice w profilu SOD u tych samych gatunków/szczepów w różnych typach hodowli (intensywne, napowietrzane oraz stacjonarne). Niezależnie od tempa wzrostu populacji, składu podłoża hodowlanego oraz badanego organizmu, dominuje oznaczona łącznie aktywność Fe- i Mn-SOD, a intensyfikacja hodowli oraz miksotroficzny wzrost glonów stymuluje w ich chloroplastach produkcję anionorodnika ponadtlenkowego, co może być powodem stresu oksydacyjnego. Zostało to wykazane na przykładzie szczepu dzikiego zielenicy *Desmodesmus obliquus* oraz dwóch wyprowadzonych od niego mutantów z zablokowaną funkcją odpowiednio PS II i PS I (Pratt i Bishop, 1968), które poddałem szczegółowej charakterystyce pod kątem funkcjonalności aparatu fotosyntetycznego (wydajność wydzielania tlenu fotosyntetycznego, analiza krzywych indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo* – test OJIP) w trakcie wzrostu w różnych warunkach troficznych, dobranych tak, aby proces fotosyntezy (fotoautotrofia) oraz oddychania mitochondrialnego (heterotrofia) były głównymi lub zrównoważonymi (miksotrofia) źródłami energii metabolicznej komórki (Pokora i wsp., 2011 a). Weryfikację aktywności fotosystemów u mutantów wykonałem poprzez ich porównanie ze szczepem dzikim traktowanym specyficznymi inhibitorami PS II (DCMU: (3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylomocznik)) oraz PS I (MV: dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowy). Rolę metabolizmu mitochondrialnego w komórkach, gdzie zahamowany jest przebieg fotosyntezy analizowałem z zastosowaniem hodowli prowadzonych w warunkach heterotroficznych, bez dostępu światła. Potwierdziłem brak funkcjonalności PS II u jednego z mutantów, natomiast analiza kinetyki indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a* wraz z zastosowaniem specyficznego inhibitora PS I (MV) wskazała, iż u mutantu opisanego jako organizm z niefunkcyjnym PS I, pewna frakcja fotosystemów I jest aktywna. Mutant PS I w warunkach heterotroficznych rósł dużo słabiej niż

szczep dziki i mutant PS II, co nasuwa wątpliwości, czy mutacja u tego szczepu dotyczy jedynie aktywności fotosyntetycznej. Doświadczenia potwierdziły także istotną rolę dysmutaz ponadtlenkowych w ochronie aparatu fotosyntetycznego zielenic, zwłaszcza w komórkach z zaburzeniami w obrębie PS I, gdzie prawdopodobieństwo generowania anionorodnika ponadtlenkowego jest znacząco wyższe (Allen, 2003).

Przedmiotem badań był także wpływ kadmu oraz węglowodorów aromatycznych i herbicydów blokujących proces fotosyntezy na aktywność SOD w komórkach *Desmodesmus* o zróżnicowanej wrażliwości na te substancje (Pokora i wsp., 2006, 2011 b). Badania te pozwoliły na określenie charakteru interakcji pomiędzy badanymi ksenobiotykami (Tukaj i Pokora, 2006). Wyznaczone wartości  $EC_{50/24}$  (stężenie hamujące wzrost populacji o 50% po 24 godzinach hodowli) dla kadmu, antracenu i chlorydazonu wskazywały na antracen jako najbardziej toksyczny, następnie chlorydazon, natomiast kadm wywoływał stosunkowo najmniejsze zahamowanie wzrostu populacji zielenic z rodzaju *Desmodesmus*. W środowisku naturalnym substancje te występują najczęściej łącznie (Babu i wsp., 2005), dlatego też analizowałem rodzaje interakcji pomiędzy tymi związkami stosowanymi w mieszaninach dwu i trzy-składnikowych, stosując formuły matematyczne opisane przez Wang i wsp. (1995) oraz Colby i wsp. (1967), pozwalające na określenie charakteru oraz kierunku interakcji pomiędzy badanymi czynnikami. Najczęściej występującą formą współdziałania dla badanych przeze mnie substancji był antagonizm (rzeczywisty efekt był mniejszy od oczekiwanego) oraz addycja (efekty powodowane przez pojedynczo stosowanie związku sumowały się). Te dwa typy oddziaływania charakterystyczne były dla mieszanin, których składnikiem był hamujący fotosyntezę herbicyd – chlorydazon. Kombinacja antracenu i kadmu prowadziła do wzajemnego wzmocnienia toksycznego działania tych substancji dając efekt synergizmu. Jednocześnie w komórkach pochodzących z hodowli traktowanych kadmem i antracem odnotowałem znaczący wzrost aktywności chloroplastowych izoform dysmutazy ponadtlenkowej, co wskazywało na zwiększoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego przekształcanego następnie do nadtlenu wodoru. Jedną z cyklu prac (Pokora i wsp., 2011 b) ma charakter bardziej opracowania metodycznego, gdzie na przykładzie hodowli kontrolnych oraz traktowanych toksykantami wykazałem aplikacyjność metody analizy aktywności izolowanych z komórek glonów, poszczególnych izoform SOD, rozdzielanych w natywnej elektroforezie poliakrylamidowej połączonej z barwieniem specyficznym dla aktywności tego enzymu. Technika oparta na densytometrycznej analizie intensywności wybarwienia prążków i porównaniu z wartościami referencyjnymi dla wzorca enzymatycznego umożliwiła mi

precyzyjne oznaczanie aktywności poszczególnych izoenzymów SOD w dalszych pracach badawczych.

1. Allen, J. F. (2003). State transitions--a question of balance. *Science*, 299(5612), 1530-1532.
2. Babu, T. S., Tripuranthakam, S., & Greenberg, B. M. (2005). Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1, 2-dihydroxyanthraquinone: Synergistic toxicity via reactive oxygen species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(12), 3030-3036.
3. Colby, S. R. (1967). Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds*, 15(1), 20-22.
4. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
5. Pratt, L. H., & Bishop, N. I. (1968). Chloroplast reactions of photosynthetic mutants of *Scenedesmus obliquus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 153(3), 664-674.
6. Wang, J., Zhang, M., Xu, J., & Wang, Y. (1995). Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kind of marine alga. *Water Research*, 29(1), 209-214.

5.1.2. Zakres tematyczny: Analiza mutantów *Chlamydomonas reinhardtii* z defektami funkcjonalnymi aparatu fotosyntetycznego pod kątem ich zdolności do tolerowania stresu indukowanego kadmem i antracenenem.

1. Aksmann A., Pokora W., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Wielgomas B., Dziadziuszko M., Tukaj Z., 2014. Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene. *Ecotox. Environ. Saf.* 110: 31-40 **IF: 2,76; MNiSW: 30.**
2. Aksmann, A., Pokora W., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Tukaj Z., 2016. High hydrogen peroxide production and antioxidative enzymes expression in the *Chlamydomonas reinhardtii* *cia3* mutant with an increased tolerance to cadmium and anthracene. *Phycol. Res.* 64: 300-311. **IF: 1,338; MNiSW: 25.**
3. Pokora W., Aksmann A., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Tukaj Z., 2014. Dysfunction of carbonic anhydrase Cah3 protein affects *Chlamydomonas* tolerance to Cd-induced oxidative stress. *Acta Biol. Cracov.* 56: 36. **IF: 0,73; MNiSW: 20.**
4. Aksmann A., Baścik-Remisiewicz A., Pokora W., Dettlaff-Pokora A., Tukaj Z., 2014. Photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and CC-2699 mutant under Cd-stress. *Acta Biol. Cracov.* 56: 49. **IF: 0,73; MNiSW: 20.**

Wymienione prace prezentują cykl doświadczeń, przeprowadzonych z zastosowaniem intensywnych hodowli *Chlamydomonas reinhardtii*, które pozwoliły wykazać, że zarówno antracenen (ANT), jak i kadm (Cd) powodują wzmożoną produkcję H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach glonów (Aksmann i wsp., 2014) oraz wskazać na rolę zaburzeń w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego na zdolność komórek do tolerowania chemicznie indukowanego stresu (Aksmann i wsp., 2016). W celu wyjaśnienia, w jaki sposób glony mogą zneutralizować skutki stresu oksydacyjnego, przeprowadzona została seria doświadczeń mających na celu prześledzenie sekwencji zmian molekularnych i fizjologicznych zachodzących w komórkach eksponowanych na działanie ANT i Cd, (Aksmann i wsp. 2014). Analiza parametrów



fluorescencji chlorofilu *a in vivo* wykazała, że zaburzenia fotosyntezy w komórkach traktowanych ANT i Cd mają charakter przejściowy: aktywność fotosyntetyczna, najsilniej obniżona w szóstej godzinie ekspozycji komórek na toksykanty, po kilkunastu godzinach ekspozycji wraca do poziomu porównywalnego jak w komórkach kontrolnych (Aksmann i wsp. 2014). Obserwowany spadek wydajności aparatu fotosyntetycznego i wzrost ilości energii rozpraszanej niefotochemicznie był spowodowany głównie około 50%-owym zmniejszeniem frakcji aktywnych centrów reakcji PS II. W tym samym czasie względna ilość transkryptów genów kodujących SOD i CAT rosła, po czym następował postępujący wzrost aktywności tych enzymów, co umożliwiło przywrócenie homeostazy redoks oraz późniejszy, stopniowy wzrost aktywności fotosyntetycznej komórek. W wyniku analizy zmian ilości transkryptów i aktywności poszczególnych izoform enzymów antyoksydacyjnych stwierdzono, że za ochronę mitochondrium przed RFT odpowiadają CAT oraz mitochondrialna izoforma Mn-SOD, podczas gdy chloroplastowa izoforma Mn-SOD jest głównym enzymem chroniącym chloroplast. Dysfunkcja aparatu fotosyntetycznego wydaje się prowadzić do zwiększenia wrażliwości komórek glonów na stres oksydacyjny, jednak badania przeprowadzone z wykorzystaniem mutantu *C. reinhardtii* *cia3* wskazały, że, co zaskakujące, jest on mniej wrażliwy na działanie ANT i Cd niż szczep dziki (WT) (Aksmann i wsp., 2015). Mutant *cia3* nie posiada jednej z izoform anhidrazy węglanowej (CAH3), należącej do enzymów odpowiedzialnych za wydajną asymilację CO<sub>2</sub> (Hanson i wsp., 2003, Shutova i wsp., 2008). Organizm ten odznacza się niewielkimi możliwościami aklimatyzacyjnymi do zmian stężenia CO<sub>2</sub> w środowisku, wskutek czego narażony jest na stres oksydacyjny wywołany zahamowaniem procesów fotosyntetycznych. Poszukiwanie przyczyn różnic we wrażliwości mutantu i szczepu dzikiego na działanie toksykantów skupiło się na oznaczeniu ilości produkowanego przez komórki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz na analizie ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. W warunkach kontrolnych produkcja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez komórki *cia3* przewyższała wartości notowane dla WT. Podobnie, poziomy transkryptów genów kodujących SOD oraz aktywność jej izoform były zdecydowanie, a APX i CAT tylko nieco wyższe niż w komórkach szczepu dzikiego. W tym ostatnim, w wyniku traktowania ANT i Cd pojawiały się symptomy stresu oksydacyjnego w postaci gwałtownego wzrostu produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podczas gdy w przypadku mutantu zmiany te były mniej znaczące. Uzyskane wyniki, sugerują, iż wysoki, konstytutywny poziom ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych związany jest z dużą ilością produkowanego przez te komórki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W komórkach tych obserwujemy „permanentny” stan łagodnego stresu oksydacyjnego, przez co organizm ten wykazuje większy potencjał do neutralizowania RFT generowanych w wyniku ekspozycji na działanie substancji toksycznych.

1. Hanson, D. T., Franklin, L. A., Samuelsson, G., & Badger, M. R. (2003). The *Chlamydomonas reinhardtii* cia3 mutant lacking a thylakoid lumen-localized carbonic anhydrase is limited by CO<sub>2</sub> supply to rubisco and not photosystem II function in vivo. *Plant Physiology*, 132(4), 2267-2275.
2. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., Chernyshov, S., ... & Junge, W. (2008). The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O<sub>2</sub> evolution rate by proton removal. *The EMBO Journal*, 27(5), 782-791.

### 5.1.3. Zakres tematyczny: Stres oksydacyjny w koleoptylach kukurydzy eksponowanych na działanie naftochinonów.

1. Kurtyka R., Pokora W., Tukaj Z., Karcz W., 2016. Effects of juglone and lawsone on oxidative stress in maize coleoptile cells treated with IAA. *AoB Plants* 8: plw073. **IF: 2,238; MNiSW: 30.**

Naftochinony to substancje wytwarzane przez bakterie i grzyby, a także produkty wtórnego metabolizmu roślin wyższych, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Ich aktywność biologiczna opiera się na dwóch głównych mechanizmach: jednym z nich jest indukcja stresu oksydacyjnego spowodowanego interakcją z chloroplastowymi i mitochondrialnymi przenośnikami elektronów (Cheniany i wsp., 2013), podczas gdy drugi polega na bezpośrednim oddziaływaniu z makrocząsteczkami, w którym chinony działają jako elektrofile. Homeostaza redoks jest uznawana za jeden z czynników zaangażowanych w regulację wzrostu roślin za pośrednictwem auksyny (Schopfer i wsp., 2002), jednak niewiele wiadomo na temat interakcji między auksyną (IAA) i RFT wytwarzanymi w komórce w wyniku ekspozycji na chinony. W prezentowanych badaniach porównano wpływ dwóch występujących naturalnie naftochinonów, juglonu (JG, 5-hydroksy-1,4-naftochinonu) i lawsonu (LW, 2-hydroksy-1,4-naftochinonu) na indukcję stresu oksydacyjnego w izolowanych segmentach koleoptyli kukurydzy. Koleoptyle kukurydzy stosowane są jako typowy model eksperymentalny do badań nad zależnym od auksyny mechanizmem wzrostu oraz potencjalnymi interakcjami pomiędzy auksyną i innymi czynnikami wpływającymi na wzrost komórek (Schopfer i wsp., 2002). Stwierdzono, że zwiększona produkcja nadtlenu wodoru oraz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, PX i CAT) w koleoptylach kukurydzy zachodził w znacznie większym stopniu pod wpływem lawsonu niż juglonu, niezależnie od obecności auksyny (IAA) w pożywce inkubacyjnej. Co więcej, oba naftochinony spowodowały wzrost aktywności izoenzymów Cu/Zn-SOD, co sugeruje, że pod wpływem juglonu i lawsonu nadtlenek wodoru był wytwarzany przede wszystkim w cytozolu i ścianie komórkowej, gdzie enzym ten jest zlokalizowany. Co ciekawe, potencjał komórki do neutralizacji nadtlenu wodoru, określony przez aktywność PX i CAT, wskazywał na aktywność katalazy, jako głównego enzymatycznego mechanizmu odpowiedzialnego za usuwanie nadtlenu wodoru,

który powstał w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego przez JG lub LW. Dlatego postawiliśmy hipotezę, że powstawanie nadtlenu wodoru, które było bardziej efektywnie indukowane przez LW, było głównym czynnikiem, który odpowiadał za różnice między toksycznością LW i JG w koleoptylach kukurydzy. Stres oksydacyjny indukowany przez JG i LW jest zatem jednym z mechanizmów działania allelopatycznego chinonów na rośliny, natomiast możliwe w takich warunkach utlenianie auksyny (IAA) prawdopodobnie nie odgrywa roli w tym procesie.

1. Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Vahdati, K., Preece, J. E., Masoudinejad, A., & Mirmasoumi, M. (2013). Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), 443-450.
2. Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214(6), 821-828.

## 5.2. Pozostałe przejawy aktywności naukowej

Wyniki moich badań prezentowałem, w formie posterów i referatów, uczestnicząc w **konferencjach** naukowych zarówno **krajowych** (8), jak i **międzynarodowych** (12).

Brałem udział w realizacji **11 projektów badawczych**, finansowanych przez Komitet Badań Naukowych (2 granty), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (1 grant), Uniwersytet Gdański (7 grantów) i Narodowe Centrum Nauki (1 grant). W 7 z tych projektów, w tym w granie MNiSW i KBN pełniłem rolę kierownika. Przygotowywałem i składałem wnioski o uzyskanie zgody Ministra Środowiska na zamknięte użycie GMO w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin (decyzja nr 13/2014, nr w rejestrze: 01-102/2013), w którym jestem osobą odpowiedzialną za nadzór nad prawidłowym postępowaniem z organizmami GMO w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin UG.

Dwukrotnie otrzymałem **zespołową nagrodę** Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za wieloautorski cykl publikacji naukowych.

W 2013 roku przebywałem na **stażu naukowym** w Umea Plant Science Center (Umea, Szwecja).

W latach 2013 – 2018 wykonałem łącznie **17 recenzji** manuskryptów publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Brałem udział w przygotowaniu dwóch rozdziałów „Przewodnika do ćwiczeń z fizjologii roślin”, pod redakcją Z. Tukaja. Ponadto, poza prowadzeniem ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu „Fizjologia roślin” opracowałem merytorycznie i graficznie prezentacje multimedialne wykładów oraz protokoły/instrukcje wykonywania doświadczeń laboratoryjnych, do szeregu autorskich, prowadzonych przeze mnie wykładów i ćwiczeń dla studentów Biologii UG. Są to między innymi: „Biotechnologia roślin” (30 h wykładów, 30 h ćwiczeń

laboratoryjnych, 30 h ćwiczeń audytoryjnych), „Metody kultur *in vitro*” (wykład 30 lub 15 h), „Metabolity wtórne roślin” (wykład 15 h), „Kultury *in vitro* w hodowli roślin” (wykład 15 h i 30 h ćwiczeń laboratoryjnych). Ponadto przygotowuję i prowadzę wykłady i ćwiczenia w ramach przedmiotów prowadzonych przez szersze grono osób, takie jak „Fizjologia roślin II”, „Substancje pochodzenia roślinnego w diagnostyce medycznej” czy „Badania naukowe na Wydziale Biologii UG”.

Dotychczas byłem opiekunem naukowym 14 magistrantów, w tym promotorem czworga z nich oraz promotorem czterech prac licencjackich. Byłem członkiem zespołu powołanego w celu przygotowania i wdrożenia nowych kierunków studiów na UG: „Biologia i Genetyka Eksperymentalna” oraz anglojęzyczny, międzywydziałowy kierunek „Bio-Innovation and Entrepreneurship”. Biorę także aktywny udział w popularyzacji nauki poprzez uczestniczenie jako organizator oraz wystawca w Bałtyckim Festiwalu Nauki, Nocy Naukowców, prowadzenie warsztatów naukowych w ramach programu „Poznaj pracę biologa” oraz wygłaszanie wykładów o charakterze popularno-naukowym w ramach programu „Zaproś naukowca do szkoły” oraz „Oliwska Akademia Sztuki”. Byłem także członkiem zespołu opracowującego i sprawującego nadzór merytoryczny nad projektem i realizacją koncepcji funkcjonalno-przestrzennej nowego budynku Wydziału Biologii UG (obecna siedziba Wydziału), dbając o stwarzanie optymalnych warunków do pracy i rozwoju naukowego Katedry.

Szczegółowy opis moich osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych znajduje się w osobnym załączniku (Załącznik nr 3).

Gdańsk, 27.09.2018

Wojciech Pokora