Dr hab. Agnieszka Nawrocka
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Lublin, 04.09.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Sławskiego**
**pt. „Analiza transferu energii i elektronów w wieloskładnikowych układach bionanohydrydowych"**
**wykonanej w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**
**pod kierunkiem naukowym dr hab. Joanny Grzyb**

## Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały Nr 128/2023 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 22.06.2023 r., pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego dr hab. inż. Macieja Kadeja, prof. UWr (WBN.412.5.2021.2023.VT) oraz rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Sławskiego.

Podstawą prawną niniejszej recenzji są przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

## Ocena formalna recenzowanej rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji opublikowanych w latach 2019 – 2023 po uprzedniej ocenie merytorycznej recenzentów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, oraz manuskryptu czwartej publikacji, opublikowanej w formie tzw. preprintu. Tytuł rozprawy jest zgodny z przeprowadzonymi i opublikowanymi badaniami. W skład rozprawy wchodzą następujące publikacje:

1. Sławski, J., Grzyb, J. (2019). Nanoparticles as energy donor and acceptors in bionanohybrid systems. Acta Biochimica Polonica 66, 469-481, doi.org/10.18388/abp.2019_2887.
2. Sławski, J., Białek, R., Burdziński, G., Gibasiewicz, K., Worch, R., Grzyb, J. (2021). Competition between photoinduced electron transfer and resonance energy transfer in an example of substituted cytochrom c – quantum dot system. Journal of Physical Chemistry B 125, 3307-3320, doi.org/10.1021/acs.jpcb.1c00325.
3. Sławski, J., Szewczyk, S., Burdziński, G., Gibasiewicz, K., Grzyb, J. (2023). Time-resolved absorption measurements quantify the competition of energy and electron transfer between quantum dots and cytochrom c. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 295, 122627, doi.org/10.1016/j.saa.2023.122627.
4. Sławski, J., Maciejewski, J., Szukiewicz, R., Gieczewska, K., Grzyb J. Quantum dots assemled with photosynthetic antennae on a carbon nanotube platform – a

nanohybrid for enhancement of light energy harvesting – manuskrypt umieszczony w bazie *Social Science Research Network* jako tzw. preprint 14.04.2023 r.

Trzy artykuły zostały opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR). Prace są wieloautorskie. Publikacja I będąca artykułem przeglądowym to artykuł Doktoranta i Promotorki, Publikacje II, III i IV mają pięciu współautorów uwzględniając Doktoranta i Promotorkę. We wszystkich publikacjach mgr Jakub Sławski jest pierwszym autorem, a w jednej publikacji jest również autorem korespondencyjnym.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma typowy układ rozprawy doktorskiej powstałej na bazie spójnego tematycznie zbioru publikacji naukowych. Przedłożona dysertacja oprócz kopii opublikowanych artykułów oraz preprintu Publikacji IV zawiera również opracowanie liczące 25 strony maszynopisu, stanowiące uzasadnienie podjęcia badań oraz syntetyczny opis przeprowadzonych badań. Obejmuje ono streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp opisujący główne obszary badawcze podejmowane w pracy doktorskiej, cele badawcze i krótki opis publikacji naukowych. Rozprawę wieńczą wnioski z przeprowadzonych badań, bibliografia składająca się z 54 pozycji, oraz lista publikacji Doktoranta nieuwzględnionych w rozprawie doktorskiej.

Strona edytorska pracy jest jak najbardziej poprawna i nie budzi większych zastrzeżeń, a prezentacja wyników w publikacja jest czytelna. Doktorant swobodnie posługuje się fachowym językiem angielskim w opublikowanych pracach.

Reasumując, uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne ubiegania się o stopień naukowy doktora.

**Ocena wyboru tematu oraz zakresu pracy**

Obecnie rośnie zainteresowanie naukowców systemami bionanohybrydowymi, które mogłyby być częścią sond czy biosensorów wprowadzanych do żywych komórek lub symulujących komórki. Układy bionanohybrydowe złożone są z nanomateriałów oraz elementów biologicznych tj. białka, błony lipidowe czy kompleksy biomolekularne. Ze względu na zróżnicowaną budowę i stechiometrię poszczególnych składników układów bionanohybrydowych możliwe jest jednoczesne występowanie współzawodniczących ze sobą procesów transferu energii i elektronów indukowanych światłem. W naturze, tego typu procesy obserwowane są w błonach fotosyntetycznych, dla powiązanych ze sobą kompleksów barwnikowo-białkowych. Stworzenie systemów bionanohybrydowych symulujących proces fotosyntezy w warunkach laboratoryjnych byłby wielkim przełomem naukowym.

W rozprawie doktorskiej wykorzystano dwa rodzaje układów bionanohybrydowych pod względem użytego nanomateriału. Stworzono układy na bazie półprzewodnikowych kropek kwantowych z tellurku kadmu (CdTe) o średnicy 1.5 – 7 nm. Jako elementów biologicznych Doktorant użył białka posiadającego właściwości redoks – cytochromu c, form tego białka zmodyfikowanych pod względem właściwości luminescencyjnych i redoks, fikobilisomów oraz kompleksu antenowego LHCII. Do badania występowania procesów transferu energii i/lub transferu elektronów w kompleksach bionanohybrydowych

utworzonych z wymienionych wyżej komponentów użyto szeregu technik spektroskopowych tj. fluorescencja stacjonarna i czasowo-rozdzielcza, spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS), stacjonarna spektroskopia absorpcyjna, nanosekundowa i femtosekundowa spektroskopia absorpcji przejściowej, spektroskopia skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów, spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR), oraz spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania rentgenowskiego (XPS). W celu wyjaśnienia czy w wybranych układach bionanohybrydowych występują łącznie lub rozdzielnie procesy transferu zastosowano dodatkowe analizy z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM), konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM), filtracji żelowej i interferometrii warstw biologicznych (BLI).

Mając powyższe fakty na uwadze, tematyka rozprawy doktorskiej dotycząca określenia czy w wybranych układach bionanohybrydowych występują procesy transferu energii i/lub elektronów jest w pełni uzasadniona.

**Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

We Wprowadzeniu Doktorant podkreślił znaczenie półprzewodnikowych kropek kwantowych do konstruowania układów bionanohybrowych. Przedstawił również opis mechanizmów transferu energii i elektronów uwzględniając rezonansowy transfer energii poprzez mechanizm Förstera, transfer energii poprzez wymianę elektronów (mechanizm Dextera) oraz indukowany światłem transfer elektronów (fotoredukcja). Następnie Doktorant opisał właściwości optyczne i strukturę elektronową kropek kwantowych, oraz ich znaczenie dla zastosowania kropek kwantowych jako donorów/akceptorów energii i elektronów. Wprowadzenie kończy się charakterystyką składników biologicznych badanych układów bionanohybrydowych – cytochromu c i kompleksów antenowych – fikobilisomu i LHCII.

W sposób przejrzysty i zwięzły Doktorant sfomułował główny i dodatkowy cel badawczy oraz trzy cele szczegółowe. Doktorant nie sformułował hipotez badawczych. Celem głównym rozprawy doktorskiej była identyfikacja mechanizmów transferu energii i elektronów w układzie bionanohybrydowym złożonym z kropki kwantowej i cytochromu c oraz charakterystyka współzawodnictwa tych procesów. Dodatkowym celem było stworzenie i charakterystyka systemu bionanohybrydowego zdolnego do przekazu energii do naturalnego fotosyntetycznego centrum reakcji i zbadanie, w jakim stopniu zwiększa on aktywność fotosystemu oświetlanego w zielonym zakresie światła, które jest w niskim stopniu absorbowane przez naturalne kompleksy zbierające światło. Wśród celów szczegółowych wyróżniono:

- Określenie udziału poszczególnych procesów w wygaszaniu emisji kropki kwantowej.
- Regulacja udziału poszczególnych procesów poprzez dobór rozmiaru kropki kwantowej i wymianę jonu metalu w pierścieniu porfirynowym cytochromu c.
- Poznanie dynamiki przejść elektronowych i procesów relaksacji w badanym układzie na wczesnych etapach po wzbudzeniu światłem.

Po celu badań Doktorant zamieścił krótki opis badań wykonywanych w poszczególnych publikacjach oraz kopie trzech opublikowanych artykułów naukowych i manuskrypt czwartej publikacji, opublikowanej w formie tzw. preprintu.

W Publikacji I pt. *„Nanoparticles as energy donors and acceptors in bionanohybrid systems"* Doktorant wykonał przegląd literatury dotyczący systemów bionanohybrydowych opartych na nanocząstkach wykazujących właściwości fluorescencyjne i/lub oksydoredukcyjne. Nanocząstki tego rodzaju mogą pełnić rolę donora lub akceptora energii i elektronów. Do tej grupy nanocząstek można zaliczyć półprzewodnikowe kropki kwantowe, nanocząstki węglowe, nanocząstki metali, oraz domieszkowane lantanowcami nanocząstki wykazujące tzw. konwersję w górę (ang. *upconverting nanoparticles*). Wspólną cechą wymienionych wyżej nanocząstek jest relatywnie duża powierzchnia, pozwalająca na wiązanie wielu partnerów molekularnych, a przez to konstrukcję sieci i łańcuchów przekazu energii. Stąd w tego rodzaju układach bionanohybrydowych transfer nie opiera się na prostym schemacie jeden donor – jeden akceptor, tylko uwzględnia udział wielu donorów i akceptorów energii i elektronów. Ponadto nanocząstki mogą pełnić zarówno funkcję donora jak i akceptora w układzie bionanohybrydowym.

Publikacja II zatytułowana *„Competition between photoinduced electron transfer and resonance energy transfer in an example of substituted cytochrome c – quantum dot systems"* przedstawia badania dotyczące układów kropka kwantowa – cytochrom c oraz jego pochodne. Jako nanocząstek Doktorant użył kropek kwantowych z tellurku kadmu (CdTe) o średnicy 1.5 – 7 nm (QD510, QD550, QD630 i QD750). Jako elementy biologiczne zostały wykorzystane białko cytochrom c, oraz jego formy pozbawione właściwości oskydoredukcyjnych – zawierające jon $Zn^{2+}$, $Sn^{4+}$ lub pozbawione jonu metalu w pierścieniu porfirynowym. Stacjonarna i czasowo-rozdzielcza spektroskopia fluorescencyjna została użyta do pomiaru gaszenia fluorescencji kropki kwantowej, natomiast proces redukcji natywnego cytochromu c Doktorant analizował spektrofotometrycznie. Stopień oraz rodzaj wiązania kropki kwantowej z cytochromem c Doktorant określił wykorzystując filtrację żelową, spektroskopię korelacji fluorescencji (FCS) oraz interferometrię warstw biologicznych (BLI). Otrzymane wyniki pokazały, że przebieg poszczególnych procesów fotochemicznych w badanych układach bionanohybrydowych zależą od rozmiaru zastosowanych kropek kwantowych oraz struktury chemicznej elementu biologicznego. Ponadto, analiza gaszenia fluorescencji kropek kwantowych przez cytochrom c pokazała, że w zależności od stężenia cytochromu c zaobserwowano gaszenie statyczne lub dynamiczne. Gaszenie statyczne Doktorant powiązał z transferem elektronu, a dynamiczne z transferem energii. Jednakże, Doktorant zaznaczył, że dokładne przypisanie procesów transferu wymaga dalszych badań.

Publikacja III zatytułowana *„Time-resolved absorption measurements quantify the competition of energy and electron transfer between quantum dots and cytochrome c"* stanowi kontynuację badań przedstawionych w Publikacji II. Doktorant analizował kinetykę zachodzących procesów fotofizycznych, prowadzących do wygaszania fluorescencji kropki kwantowej i akumulacji zredukowanego cytochromu c w układzie bionanohybrydowym kropka kwantowa z tellurku kadmu – cytochrom c. W eksperymencie Doktorant zastosował dwie metody spektroskopowe: femto- i nanosekundową absorpcję przejściową oraz technikę

fotolizy błyskowej. Pomiary absorpcji przejściowej umożliwiły wyznaczenie stałych szybkości poszczególnych procesów fotoredukcji i transferu energii zachodzących po zaabsorbowaniu fotonu przez układ kropka kwantowa – cytochrom c. Analiza zmian absorpcji pokazała, że dominującym procesem jest przekaz energii z kropki kwantowej na cytochrom c, przy znaczącym udziale transferu elektronu, który wynosił 8%. Pomiary zmiany absorpcji w skali milisekundowej wykazały, że większość molekuł zredukowanego cytochromu c uległa re-oksydacji, a pewna frakcja cytochromu c została zakumulowana. Według Doktoranta otrzymane w Publikacji III wyniki badań stanowią podstawę do kontynuacji badań nad procesami transferu energii i elektronu w układach bionanohybrydowych.

W manuskrypcie Publikacji IV pt. *„Quantum dots assembled with photosynthetic antennae on a carbon nanotube platform – a nanohybrid for enhancement of light energy harvesting"* Doktorant przedstawił konstrukcję i charakterystykę układu bionanohybrydowego złożonego z kropki kwantowej (CdTe) oraz dwóch naturalnych kompleksów antenowych: fikobilisomów wyizolowanych z sinic i kompleksu LHCII wyizolowanego ze szpinaku. Rusztowaniem organizującym układ była nanonurka węglowa na powierzchni której znajdowały się kropki kwantowe i kompleksy antenowe. Tego rodzaju system został użyty jako donor energii wzbudzenia naturalnych fotosyntetycznych kompleksów białkowo – barwnikowych obecnych w pęcherzykach tylakoidowych wyizolowanych z sinic. Zastosowanie takiego układu bionanohybrydowego spowodowało efektywne wykorzystanie przekazanej energii oraz wzrost aktywności fotosystemu I. W przyszłości tego rodzaju układy bionanohybrydowe mogłyby być wykorzystane do stworzenia sztucznych kompleksów zbierających światło.

Przy czytaniu rozprawy doktorskiej nasuwają się pewne pytania oraz uwagi krytyczne, które należy traktować jako sugestie o charakterze dyskusyjnym.

1. Czy mógłby Pan omówić możliwe zastosowania tego rodzaju układów bionanohybrydowych w praktyce. Do czego mogą być one wykorzystane?
2. Które z badanych przez Pana układów bionanohybrydowych mogą być z większym prawdopodobieństwem zastosowane w praktyce? Proszę uzasadnić swój wybór otrzymanymi przez Pana wynikami badań.
3. W części eksperymentalnej Publikacji II pisze Pan, że zakupił cztery rodzaje kropek kwantowych (QD510, QD550, QD630 i QD750). Jednakże prezentuje Pan wyniki głównie dla kropek kwantowych QD510 i QD750. Proszę wyjaśnić dlaczego pominął Pan część wyników badań?
4. Proszę wyjaśnić dlaczego w Publikacji II podczas miareczkowania kropek kwantowych białkami użyto dwóch różnych stężeń kropek kwantowych tj. 0.5μM dla QD510 i 0.01μM dla QD750?
5. Proszę wyjaśnić w jaki sposób otrzymał Pan widma absorpcji i emisji fluorescencji przedstawione na rysunku 1 w Publikacji II. Jeżeli je Pan wyliczył, to proszę podać w jaki sposób?
6. Proszę podać z jakich powodów według Pana nie tworzą się kompleksy pomiędzy wybranymi białkami a kropkami kwantowymi QD510, a w przypadku kropek

kwantowych QD750 kompleksy utworzyły się tylko z dwoma białkami. Moje pytanie dotyczy wyników uzyskanych z filtracji żelowej (Publikacja II).

7. Proszę wyjaśnić dlaczego w pierwszej części Tabeli S1 (Publikacja II) kropki kwantowe QD510 i QD550 potraktował Pan jako donory, a białka jako akceptory, a w drugiej części Tabeli S1 kropki kwantowe QD630 i QD750 potraktował Pan jako akceptory a trzy wybrane białka jako donory?
8. Proszę wyjaśnić dlaczego w badaniach przedstawionych w Publikacji III używał Pan innych kropek kwantowych tj. QD570 i QD650 niż w badaniach przedstawionych w Publikacji II? Naturalne wydaje się kontynuowanie badań z wykorzystaniem kropek kwantowych tego samego rodzaju.
9. Proszę wyjaśnić z jakiego powodu w Publikacji III do określania struktury drugorzędowej cytochromu c używał Pan tylko spektroskopii dichroizmu kołowego. Spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia ramanowska uważane są za podstawowe metody używane do badania struktury białek. Ponadto, prawdopodobnie dichroizm kołowy w przypadku Pańskich badań może być techniką o zbyt małej czułości aby pokazać zmiany w strukturze drugorzędowej białka.
10. Na widmach FT-IR przedstawionych na rysunku 2 w Publikacji IV widoczne są duże zmiany zarówno w intensywności jak i położeniu niektórych pasm. Proszę wyjaśnić co mogą oznaczać te zmiany?
11. Na rysunku 3 w Publikacji IV wykonano dekonwolucję widma XPS. Na rysunku 3a jako tło użyto wielomianu któregoś stopnia, a na rysunku 3b linii prostej. Proszę wyjaśnić dlaczego zastosowano dwa różne tła?
12. Proszę wyjaśnić dlaczego w czasie przygotowywania kompleksów bionanohybrydowych dążył Pan do tego aby białka nie wytworzyły wiązań kowalencyjnych z kropkami kwantowymi? (Publikacja II i IV).
13. Przedstawione na końcu rozprawy doktorskiej wnioski są bardzo ogólne, pomimo tego, że Doktorant posiadał bardzo dużą ilość wyników. Proszę je uszczegółowić.

**Podsumowanie i wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska Pana mgr Jakuba Sławskiego jest kompleksowym studium uzupełniającym wiedzę na temat transferu energii i/lub elektronu w układzie bionanohybrydowym zawierającym kropki kwantowe i kompleksy białkowe.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669, z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Jakuba Sławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Nawrocka