UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 16 sierpnia 2023

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Biofizyki Molekularnej
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Jakuba Macieja Sławskiego

zatytułowanej: „Analiza transferu energii i elektronów w wieloskładnikowych układach bionanohybrydowych".

Początki syntezy kropek kwantowych (QD) sięgają pierwszej połowy lat 80. ubiegłego wieku, kiedy udało się uzyskać pierwsze nanokryształy wykazujące własności kwantowe. Od tamtej pory badania naukowe oraz wdrażane technologie, w których zastosowanie znajdują QD, stają się coraz bardziej zaawansowane i wszechstronne. Obecnie z kropkami kwantowymi mamy kontakt w życiu codziennym, a to dzięki np. telewizorom w technologii QLED, gdzie kropki kwantowe są emiterami różnobarwnego światła, dzięki czemu oglądany obraz cechuje się doskonałymi kolorami i dużą dynamiką, przy jednoczesnym niskim zapotrzebowaniu na energię.

Same kropki kwantowe, o czym możemy przeczytać we wstępie do recenzowanej pracy doktorskiej, to nanoskalowe struktury półprzewodnikowe, których zachowanie znacząco różni się od materiałów makroskopowych. Jedną z kluczowych cech tych obiektów jest zdolność do absorpcji i emitowania światła o różnych, ściśle definiowalnych długościach fal. Ponadto w wyniku wzbudzenia mogą one stać się donorami lub akceptorami elektronów w aktywowanych światłem reakcjach redoks. To otwiera szereg potencjalnych zastosowań w badaniach podstawowych, a także w rozwoju np. technologii fotowoltaicznych. Właśnie w QD pokładana jest nadzieja na zwiększenie wydajności konwersji energii słonecznej na prąd elektryczny.

Z naukowego punktu widzenia warto zaznaczyć rolę QD w zastosowaniach biomedycznych, gdzie mogą one posłużyć do etykietowania poszczególnych celów terapeutycznych, np. komórek czy nawet tkanek. Niemniej jednak kropki kwantowe odgrywają obecnie dużą rolę w badaniach

Zakład Biofizyki Molekularnej
Marcin Sarewicz
ul. Gronostajowa 7, pok. A024
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

biologicznych i biofizycznych, w których ich własności fizyczne związane z absorpcją i emisją światła oraz procesami transferu energii stają się bardzo użytecznym narzędziem do badań oddziaływań i procesów zachodzących pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami biologicznymi, takimi jak nici DNA, białka, enzymy, a także w obrębie złożonych układów zawierających funkcjonalne kompleksy białkowo-błonowe.

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie zachowania się struktur bionanaohybrydowych, które w tym kontekście oznaczają układ QD-białko bądź bardziej złożone układy składające się z osadzonych na podłożach z nanorurek kropek kwantowych połączonych z aparatem fotosyntetycznym błon tylakoidów lub anten fikobilisomów. Najważniejszymi celami pracy mgr. Jakuba Sławskiego było zbadanie wydajności oraz określenie udziału poszczególnych typów procesów transferu energii wzbudzenia z QD na cząsteczki biologiczne oraz transferu elektronów z QD na aktywną redoksowo cząsteczkę hemu cytochromu c.

W tym celu Doktorant wykonał szereg eksperymentów, wykorzystując wiele nowoczesnych technik spektroskopowych, bazujących w szczególności na zjawisku fluorescencji, zarówno w fali ciągłej, jak i w trybach impulsowych. Spośród nich warto wymienić takie techniki, jak FCS (spektroskopia korelacji fluorescencji), FLIM (obrazowanie czasem życia fluorescencji) oraz femto- i pikosekundowe pomiary absorpcji przejściowej. Doktorant nie ograniczył się jedynie do pomiarów gotowych układów, ale zastosował szereg mniej lub bardziej standardowych metod biochemicznych, mających na celu uzyskanie odpowiedniego materiału biologicznego w postaci aktywnych jednostek fikobilisomów oraz tylakoidów. Ponadto do badań udziałów transferu energii i elektronów Doktorant wykorzystał dodatkowo zmodyfikowane formy cytochromu c, gdzie centralny jon żelaza hemowego został usunięty bądź wymieniony na inny jon, np. Zn^{2+}, Cu^{2+} itp. Dzięki tym zabiegom udało się uzyskać szereg interesujących wyników, stanowiących trzon publikacji naukowych oraz rozprawy doktorskiej.

Struktura pracy

Praca doktorska magistra Jakuba Sławskiego ma formę zbioru składającego się z 4 artykułów naukowych, z których każda jest poprzedzona krótkim wprowadzeniem, opisującym w sposób syntetyczny zagadnienia poruszane w danej publikacji. Rozprawę otwierają streszczenia oraz spis skrótów, po których następuje krótki i zwięzły wstęp teoretyczny. Znajdziemy w nim między

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

innymi opis mechanizmów transferu energii, opis własności QD oraz bardzo krótkie, półtora-stronicowe podsumowanie najważniejszych cech cytochromów (nie tylko z rodziny c) oraz fikobilisomów.

Po wstępie Doktorant umieścił publikacje w kolejności chronologicznej oraz, co warto podkreślić, także tematycznej. Pierwsza z nich to artykuł przeglądowy, w którym zebrane zostały przykłady zastosowań różnych typów QD w układach bionanohybrydowych. Kolejne dwie publikacje stanowią opis badań nad mechanizmem oraz udziałem poszczególnych procesów transferu energii oraz elektronów ze wzbudzonej kropki kwantowej CdTe na natywny oraz chemicznie zmodyfikowany cytochrom c. Przy czym pierwsza z nich skupia się na określeniu wzajemnego udziału tych dwóch procesów oraz wpływie struktury kompleksu QD-cytochrom c na omawiane procesy. Natomiast druga z nich skupia się głównie na aspektach kinetycznych tych procesów w obrębie bionanohybrydy QD-cytochrom c, przez co stanowi kontynuację poprzedniej pracy. Wreszcie czwarty z artykułów, który oczekuje jeszcze na publikację w czasopiśmie naukowym, stanowi ciekawe rozwinięcie koncepcji wykorzystania QD jako dodatkowych anten, które mogą absorbować niewykorzystane pasmo promieniowania światła i przekazywać energię wzbudzenia na naturalne układy biologiczne, takie jak PSI w błonach tylakoidów czy kompleksy fikobilisomów. Jest to przykład podstawowych badań biofizycznych, mających w przyszłości umożliwić konstrukcję takich hybryd chemiczno-biologicznych do zwiększania efektywności konwersji energii przez układy fotosyntetyczne.

Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Macieja Sławskiego jest bardzo obszerna i nie wliczając cytowań zawiera około 50 tysięcy słów, co stanowi dosyć rozbudowane opracowanie. Z racji tego, że praca jest zbiorem powiązanych tematycznie artykułów, nie posiada ona jednorodnej formy pod względem struktury, czcionek itp. i siłą rzeczy posiada osobne zbiory bibliograficzne. Poszczególne elementy tej pracy są dobrze zredagowane i nie znalazłem praktycznie żadnych błędów gramatycznych czy tzw. literówek. Nie oznacza to, że nie pojawiło się kilka drobnych błędów, wymienionych poniżej.

1. Str. 4[1], rys. 2B i 2C; w opisie rysunku przedstawiono proces transferu elektronu ze stanu wzbudzonego na LUMO utleniacza, przy czym podpis mówi o transferze „z LUMO

1 Numery stron odnoszą się do numeracji rozprawy doktorskiej, a nie numeru strony artykułu zamieszczonego w rozprawie.

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

wzbudzonego reduktora na LUMO utleniacza". W mojej opinii opis jest mylący, gdyż orbital obsadzony nawet jednym elektronem nie powinno się nazywać LUMO.

2. Podobnie na rysunku 2C znajduje się opis transferu elektronu z HOMO reduktora na HOMO utleniacza, co również budzi moje wątpliwości. Myślę, że lepiej sprawdziłoby się tutaj np. ponumerowanie poziomów podstawowych i wzbudzonych.

3. Str 9, akapit 4; w zdaniu mówiącym o szerokości pasma emisji dowiadujemy się, że wynosi ono 25-35 nm (FWHM 25-35 nm)". Jednakże na rys. 3 widać wyraźnie, że szerokości emisji zwiększają się wraz ze zwiększaniem długości fali emisji, osiągając dla światła czerwonego ponad 100 nm.

4. Str. 19, rys. 1 (publikacja nr 1); na rysunku przedstawiono dziurę h^+ oraz elektron e^+ na orbitalu wzbudzonym, przy czym elektron ma przypisany błędnie, jak sądzę po indeksie górnym, ładunek „+"

5. Str. 26, rys. 2 (publikacji nr 1); na lewej osi wykresu przedstawiono potencjał równowagowy redoks [V] natomiast nie zaznaczono gdzie są wartości dodatnie, a gdzie ujemne. Patrząc na oś energii po prawej, można wywnioskować, że skala osi z lewej jest odwrócona.

6. Ten sam rysunek. Zaznaczono zbiorczo kofaktory redoks dla enzymów oraz substratów i produktów w postaci jednego potencjału, który jak sądzę odpowiada terminalnemu kofaktorowi danego enzymu. Z drugiej strony poszczególne kofaktory redoks PSI zostały rozpisane. Według mnie jest to nieco mylące, gdyż np. w kompleksie III trudno wskazać konkretną wartość potencjału redoks ponieważ w jego obrębie występuje rozpiętość kilkuset miliwoltów nawet przy braku uwzględnienia oddziaływań kulombowskich i różnych stanów protonacji. Jeśli mamy tutaj na myśli potencjały ostatnich kofaktorów redoks enzymów to powinny one być w ten sposób opisane - np. cytochrom c_1 zamiast kompleks III.

7. Str 69, akapit 4; według recenzenta ośmioprocentowy udział transferu elektronu trudno jest uznać za znaczący, jak napisano. Wydaje się, że jest on raczej niewielki.

8. Str. 108, w trzeciej linijce od góry jest mowa o różnicach w zakresie od 275 do 3000 cm^{-1}; powinno być 2750-3000 cm^{-1}.

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

9. Str. 108; pojawiają się skróty „N1s” oraz Cd3d”, które nie są wytłumaczone. Czy chodzi o orbitale 1s i 3d odpowiednio azotu i kadmu? Na rysunku 3 (publikacja 4) pasmo Cd3d jest podpisane jako Cd-met. Czy chodzi o te same przejścia? Skąd ta różnica w opisie?
10. Brakuje wytłumaczenia skrótu ROI. Czy chodzi tutaj of „Region of Interest”?

Te niewielkie uwagi właściwie wyczerpują zagadnienia edytorskie niniejszej rozprawy i nie stanowią żadnej istotnej przeszkody w uznaniu wysokiej jakości przedstawionej pracy doktorskiej.

Pytania oraz sugestie

Przedstawiona w rozprawie magistra Jakuba Sławskiego tematyka nie tylko wzbudza ogromne zainteresowanie, lecz także posiada potencjał, który może stanowić znaczący fundament dla przyszłego rozwoju badań nad bionanohybrydami. Warto podkreślić, że jej inspirujący charakter, odczuwany w trakcie procesu recenzji, wzbudził liczne pytania i sugestie. Kilka z tych refleksji chciałbym teraz przytoczyć, w nadziei na ich krótkie rozwinięcie.

1. Dlaczego Doktorant wybrał akurat QD złożone z toksycznego kadmu i telluru?
2. Skoro słońce emituje najintensywniej w zakresie zielono-żółtym to jaki może być powód, nazwijmy to - „rezygnacji z niego” przez rośliny fotosyntetyzujące? Czy możliwe, że przy takim natężeniu fotosynteza byłaby już zbyt intensywna przez co nie do końca bezpieczna?
3. W pracy 2 pojawia się wątpliwość, że w niektórych procesach może uczestniczyć resztkowy tlen. Czy możliwe zatem, że w trakcie reakcji wzbudzenia QD redukcja cytochromu c zachodzi poprzez cykl utleniania O_2^- i redukcji O_2? Czy były robione kontrole redukcji cytochromu w obecności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)?
4. Większość metod wyznaczenia proporcji pomiędzy transferem energii, a elektronu opierała się o metody badania fluorescencji. Ponieważ transfer elektronu powinien powodować pojawienie się niesparowanych elektronów w obrębie QD to czy możliwe jest zastosowanie spektroskopii EPR jako uzupełniającej w stosunku do badań fluorescencyjnych w celu rozróżnienia pomiędzy tymi transferami? Czy takie badania były kiedyś przeprowadzane?
5. Na stronie 82 pojawia się równanie zaniku fluorescencji będący sumą 3 pojedynczych eksponent. Jakie jest uzasadnienie wyboru 3 funkcji różniących się czasem zaniku i czy

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

możliwe jest na tym poziomie rozróżnienie pomiędzy mechanizmem 3 eksponencjalnym, a rozkładem czasów skutkujących pojawieniem się funkcji rozciągniętej eksponenty?

6. Potencjały redoks wzbudzonych QD są stosunkowo niskie (rys. 2, str. 26), zbliżając się do - 1 V, przez co różnica w E_m pomiędzy QD a cyt. c jest znaczna z punktu widzenia typowych reakcji pomiędzy centrami redoks białek. Przyjmując typową energię reorganizacji ok 0,7 V to czy możliwe, że wkraczamy w tzw. odwrócony obszar Marcusa, gdzie dalsze zwiększanie ΔG reakcji będzie skutkować spadkiem szybkości transferu elektronu, a przy obecności konkurencyjnych procesów zmniejszać wydajność przeniesienia elektronu?
7. Z poprzednim pytaniem związane jest także to, czy niska wydajność transferu elektronu nie jest spowodowana bardzo krótkim czasem życia stanu wzbudzonego w stosunku do typowej szybkości transferu pomiędzy kofaktorami? Przykładowo dla dwóch kofaktorów w odległości 1,4 nm w białkach transfer może zachodzić w czasach z rzędu setek ns?
8. W równaniu na szybkość transferu elektronu kluczowym parametrem jest odległość. Jak ją liczyć dla układu QD – hem c. Czy będzie to odległość powierzchnia QD – krawędź hemu? Jakiego rzędu mogą to być wartości dla badanych bionanohybryd?

Wydaje się ponadto, że interesującym rozszerzeniem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej byłoby zbadanie zależności szybkości i wydajności transferu elektronów z QD na cząsteczkę białkową w funkcji różnicy w wartościach E_m. Doskonałym obiektem biologicznym do tego celu mogłoby być zastosowanie główki białka Rieske, dla której istnieje szereg możliwości ingerencji w potencjał redoks poprzez mutacje czy zmianę pH, a sposoby ekspresji tego białka zostały wcześniej opracowane i opisane.

Podsumowanie

W podsumowaniu niniejszej recenzji pragnę zaznaczyć, że pan mgr Jakub Sławski przedłożył pracę doktorską, która w ocenie recenzenta jest bardzo wartościowa oraz rozbudowana. Pan Jakub Sławski przy opracowaniu wyników swoich badań musiał wykazać się dużą wiedzą biofizyczną oraz głęboką znajomością procesów związanych z procesami luminescencyjnymi. W swoich badaniach wykorzystał wiele bardzo zaawansowanych technik spektroskopowych, których analiza

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl

wymagała krytycznego i formalnego podejścia analitycznego, co w przepadku spektroskopii jest niezwykle istotne. Wyniki badań stanowiących trzon rozprawy zostały już w większości opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych, a jedna z nich ma duże szanse na szybkie przyjęcie do dobrego periodyku. Warto tutaj nadmienić, że we wszystkich przedstawionych artykułach Kandydat był pierwszym autorem, co świadczy o jego istotnym wkładzie w prowadzone badania oraz przygotowanie opracowania do publikacji.

Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona przez pana mgr. Jakuba Sławskiego rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich określonych w art. 187. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 z późniejszymi zmianami). Dlatego wnoszę o dopuszczenie pana mgr Jakuba Macieja Sławskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w tym do publicznej obrony pracy. Przy okazji wnoszę o wyróżnienie rozprawy pana mgr Jakuba Sławskiego, co uzasadniam wysokim poziomem badań naukowych oraz wnikliwością analityczną, które stały się podstawą ocenianej przeze mnie pracy.

Zakład Biofizyki Molekularnej,
dr hab. Marcin Sarewicz, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6522
email: marcin.sarewicz@uj.edu.pl