

## Autoreferat

- I. Imię i Nazwisko:** Dorota Kowalska
- II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.**

- tytuł magistra fizyki w zakresie fizyki ziemi i atmosfery,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Fizyki, 1999  
*„Dynamika dezaktywacji benzopyrantionu i jego pochodnych w stanie trypletowym”*

- stopień naukowy doktora nauk fizycznych w zakresie fizyki,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Fizyki, 2006  
*„Własności spektralne i fotofizyczne wybranych cząsteczek wieloatomowych w wyższych stanach wzbudzonych elektronowo i wibracyjnie”.*

- III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

2006/08 – 2008/05      uczestnik stażu podoktorskiego  
Department of Chemistry/ Laser Chemistry Group  
University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada

2008/06 – 2009/05      stypendium programu *“Beca de Investigacion CajaCanarias”*  
Universidad de La Laguna, Teneryfa, Hiszpania

2009/11 – 2010/10      stypendium programu *“Beca de Investigacion CajaCanarias”*  
Universidad de La Laguna, Teneryfa, Hiszpania

2011/10 – 2014/12      adiunkt naukowy  
Instytut Fizyki, UMK, Toruń

2015/02 – obecnie      adiunkt/adiunkt naukowy  
Instytut Fizyki, UMK, Toruń

- IV. 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

**„Nanodrutry srebra jako struktury wzmacniające odpowiedź optyczną białek fotosyntetycznych”**

Osiągnięcie naukowe zostało opisane w cyklu 5 publikacji wymienionych w p. IV.b

**b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictw)**

- [H1] M. Olejnik, B. Krajnik, D. Kowalska, M. Twardowska, N. Czechowski, E. Hofmann, S. Maćkowski,  
*"Imaging of fluorescence enhancement in photosynthetic complexes coupled to silver nanowires"*,  
2013, Applied Physics Letters, 102, strony: 083703/1-083703/5, IF: 3,515
- [H2] D. Kowalska, B. Krajnik, M. Olejnik, M. Twardowska, N. Czechowski, E. Hofmann, S. Maćkowski,  
*"Metal - enhanced fluorescence of chlorophylls in light-harvesting complexes coupled to silver nanowires"*,  
2013, The Scientific World Journal, 2013, strony: 670412/1-670412/12, IF: 1,219
- [H3] M. Szalkowski, K. Sulowska, J. Grzelak, J. Niedziółka-Jönsson, E. Rozniecka, D. Kowalska, S. Maćkowski,  
*"Wide-field fluorescence microscopy of real-time bioconjugation sensing"*,  
2018, Sensors 18, 290, strony: 1-10, IF: 2,475
- [H4] D. Kowalska, M. Szalkowski, K. Ashraf, J. Grzelak, H. Lokstein, J. Niedziolka-Jonsson, R. Cogdell, S. Maćkowski,  
*"Spectrally selective fluorescence imaging of Chlorobaculum tepidum reaction centers conjugated to chelator modified silver nanowires"*,  
2018, Photosynthesis Research, 135, strony: 329-336, IF: 3,091
- [H5] M. Szalkowski, J. Olmos, D. Buczyńska, S. Maćkowski, D. Kowalska, J. Kargul,  
*"Plasmon-induced absorption of blind chlorophylls in photosynthetic proteins assembled on silver nanowires"*,  
2017, Nanoscale, 9, strony: 10475-10486, IF: 7,233

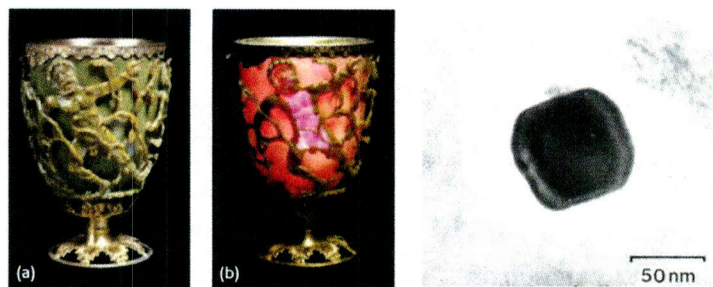
**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## 1. Wprowadzenie

Światowe roczne zapotrzebowanie na energię, jak podaje Międzynarodowa Agencja Energetyczna (International Energy Agency), wynosi 15 TW<sup>1</sup>. W ciągu bezchmurnego dnia średnio każdy metr kwadratowy powierzchni Ziemi jest eksponowany przez godzinę na światło słoneczne o mocy około 1 kW<sup>2</sup>. Oznacza to, że ilość energii słonecznej docierającej do powierzchni Ziemi w ciągu jednej godziny przekracza roczne zapotrzebowanie całej ludzkości na energię. Fakt ten powoduje, że energia słoneczna jest jednym z najatrakcyjniejszych źródeł odnawialnej energii i inspiracją dla naukowców w poszukiwaniu oraz rozwijaniu sposobów jej detekcji, przetwarzania na użyteczną formę energii elektrycznej i magazynowania.

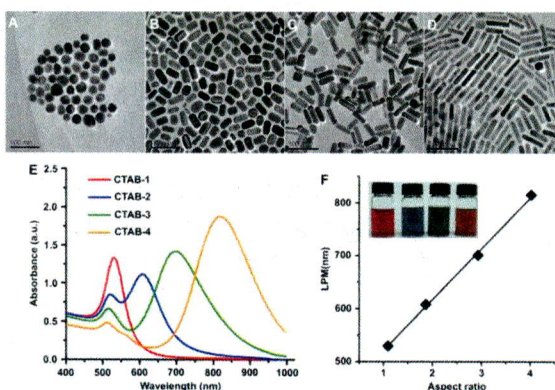
Zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy posiadają prawie wszystkie rośliny, niektóre proste organizmy eukariotyczne (np. bruzdnice, okrzemki czy brunatnice) oraz część bakterii takich jak sinice, bakterie zielone czy purpurowe. Proces ten w fazie jasnej rozpoczyna się od absorpcji promieniowania słonecznego przez cząsteczki organiczne znajdujące się w tylakoidach, podstawowych elementach chloroplastu komórki roślinnej lub autotroficznej komórki prokariotycznej, zwane barwnikami asymilacyjnymi. Cząsteczki te ułożone są w matrycach białkowo-lipidowych tworząc mniej lub bardziej rozbudowane białkowe kompleksy fotosyntetyczne. Organizmy fotosyntetyczne używają kompleksów pigmentowo-białkowych do absorbowania światła słonecznego, wydajnego przekazu energii oraz do separacji ładunku w poprzek błony fotosyntetycznej. Natura tak zoptymalizowała ten proces, że wydajność jednego cyklu separacji elektronów na jeden zaabsorbowany foton światła słonecznego jest bliska jedności. Separacja ładunku zachodzi w centrach reakcyjnych (RC, z ang. *Reaction Center*) układów fotosyntetycznych: fotosystemu I (PSI, z ang. *Photosystem I*) i fotosystemu II (PSII, z ang. *Photosystem II*)<sup>3</sup>. Ze względu na swoje unikalne własności, kompleksy te znalazły zastosowanie jako składniki układów takich jak fotosensory<sup>4,5</sup>, biosensory do detekcji herbicydów<sup>6</sup> czy urządzenia fotowoltaiczne<sup>7,8</sup>.

Nanocząstki metali charakteryzują się silną absorpcją promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym i ultrafiolecie, dzięki czemu z powodzeniem były wykorzystywane od tysiącleci przy produkcji witraży czy naczyń ceramicznych. Znany przykładem może być starorzyski puchar Likurga, prawdopodobnie pochodzący z IV wieku naszej ery, a obecnie znajdujący się w Muzeum Brytyjskim w Londynie. Naczynie to zmienia barwę w zależności od oświetlenia, a mianowicie w świetle odbitym ma kolor zielony, a w świetle przezeń transmitowanym ma barwę czerwoną (Rys. 1a, b). I chociaż to niezwykle naczynie powstało setki lat temu, to dopiero rozwój technik mikroskopowych pozwolił naukowcom w 1990 roku zastosować transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) do wyjaśnienia tego zjawiska. Materiał, z którego puchar został wykonany to szkło dichroiczne, zawierające drobinki złota (Au) i srebra (Ag) o średnicy około 50-100 nanometrów (Rys. 1c)<sup>9</sup>.



Rys. 1. Puchar Likurga w świetle odbitym (a), w świetle transmitowanym (b) oraz zdjęcie nanocząstki stopu metali srebra i złota wykonane techniką TEM (c)<sup>9</sup>.

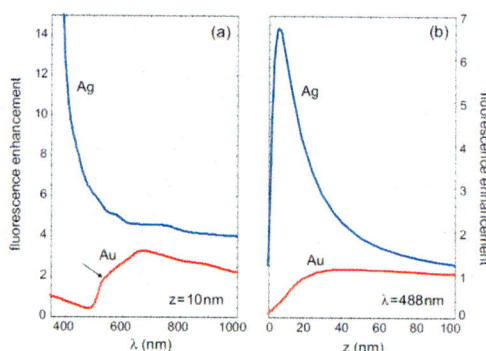
Zmiany koloru naczynia zachodzą dzięki powstającemu w nanocząstkach metalicznych zlokalizowanemu rezonansowi plazmonów powierzchniowych (LSPR, z ang. *Localized Surface Plasmon Resonance*). W wyniku oddziaływania fali elektromagnetycznej ze swobodnymi elektronami z pasma przewodnictwa Ag i Au dochodzi do wzbudzenia oscylacji gazu swobodnych elektronów. Kwazicząstka będąca kwantem takich oscylacji nazywa się plazmonem. Położenie plazmonowego pasma rezonansowego jest zależne od materiału, z jakiego wykonana jest nanocząstka metaliczna (złoto, srebro, platyna, etc.), jej kształtu i wielkości. Przykładowo, na Rys. 2 przedstawiono zdjęcia TEM nanoprętów złota powlekanych polimerem CTAB, o różnym współczynniku proporcji długości do średnicy (a-d), odpowiadające im w widmie absorpcji pasma rezonansu plazmonowego (e) oraz zależność współczynnika proporcji od położenia maksimum pasma rezonansu plazmonowego (f)<sup>10</sup>.



Rys. 2. Zdjęcia TEM nanoprętów złota o różnym współczynniku proporcji („długość” x „średnica” [nm]): 33x30 (a), 40x21 (b), 50x17 (c) i 55x14 (d) oraz odpowiadające im widma absorpcji (e) i zależność współczynnika proporcji od położenia maksimum pasma rezonansu plazmonowego (f)<sup>10</sup>.

Zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, z ang. *Surface Plasmon Resonance*) wykorzystywane jest w hybrydowych nanostrukturach plazmonowych, które składają się z co najmniej dwóch elementów, gdzie jednym jest nanocząstka metaliczna, a drugim dowolny emiter promieniowania światła, np. cząsteczka barwnika czy białkowy kompleks fotosyntetyczny. Jednym z głównych celów konstrukcji takich hybryd jest uzyskanie układu o usprawnionych własnościach optycznych. Modyfikacja ta może polegać między innymi na zwiększeniu prawdopodobieństwa absorpcji światła przez molekuly

znajdujące się w pobliżu nanocząstki metalicznej, wzmocnieniu ich fluorescencji (MEF, z ang. *metal enhanced fluorescence*) bądź jej wygaszeniu. Zjawisko MEF silnie zależy od długości fali i wzajemnej odległości pomiędzy emiterym a nanocząstką metaliczną<sup>11</sup>. Na Rys. 3a przedstawiono zależność współczynnika wzmocnienia fluorescencji (EF, z ang. *enhancement factor*) w funkcji długości fali przy zachowaniu stałej odległości 10 nm pomiędzy emiterym a nanocząstką srebra i złota. Wyznaczona na podstawie obliczeń teoretycznych zależność współczynnika wzmocnienia fluorescencji w funkcji wzajemnej odległości komponentów plazmonowej nanostruktury hybrydowej jest pokazana na Rys. 3b.



Rys. 3 Obliczony współczynnik wzmocnienia natężenia fluorescencji pojedynczej cząsteczki barwnika w otoczeniu srebrnej i złotej nanocząstki sferycznej o średnicy 80 nm: w funkcji (a) długości fali wzbudzenia przy stałej wzajemnej odległości 10 nm; (b) wzajemnej odległości przy stałej wartości długości fali wzbudzenia<sup>11</sup>.

Zbyt mała odległość pomiędzy emiterym a nanocząstką metaliczną prowadzi do wygaszenia fluorescencji emitery. Dzieje się tak w wyniku występowania bezpromienistego przekazu energii wzbudzenia do nanocząstki metalicznej, a następnie jej dyssypacji. MEF najefektywniej zachodzi w odległości około 10 – 15 nm pomiędzy emiterym a nanocząstką metaliczną, natomiast dla większych odległości efekt ten maleje do zera. Zjawisko MEF wykorzystuje się do zwiększenia wydajności kwantowej fluorescencji molekuł, których wydajność kwantowa emisji jest znacznie niższa od jedności.

## 2. Motywacja i cel badań

Zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego znajduje zastosowanie aplikacyjne w medycynie<sup>12</sup> czy urządzeniach optoelektronicznych<sup>13</sup> pozwalając znacząco poprawić czułość i wydajność urządzenia bez zwiększania jego wielkości. Sprzęgnięcie białkowych kompleksów fotosyntetycznych z nanocząstkami metalicznymi może prowadzić do modyfikacji ich własności optycznych i elektrochemicznych. Govorov i Carmeli w 2007 roku analizowali wpływ obecności sferycznej nanocząstki metalicznej na wydajność generacji elektronów przez PSI<sup>4</sup>. Obliczenia teoretyczne wskazują, że dla kompleksu PSI połączonego z nanocząstką srebra, możemy oczekiwać silnej zależności spektralnej fotoprądu oraz dużego, czterokrotnego wzmocnienia fotoprądu dla energii wzbudzenia odpowiadającej rezonansowi plazmonowemu w nanocząstce. Ponadto Raoul Frese ze współpracownikami przedstawił w 2016 roku wyniki badań eksperymentalnych ukazujące ponad dwukrotne wzmocnienie fotoprądu generowanego przez bakteryjne centrum

reakcyjne RC-LHI osadzone na nanostrukturyzowanym podłożu srebrnym<sup>14</sup>. W obliczu tak obiecujących wyników zarówno prac teoretycznych jak i pierwszych prac doświadczalnych, godnym uwagi staje się temat poznania i wyjaśnienia wpływu oddziaływania nanocząstek metalicznych na własności optyczne białkowych kompleksów fotosyntetycznych.

Głównym celem moich badań było poznanie wpływu obecności nanocząstek srebra na własności optyczne kompleksów fotosyntetycznych. W tym celu do badań wybrano jeden typ nanocząstek metalicznych – nanodruły srebra (AgNW, z ang. *Silver Nanowire*) i białka fotosyntetyczne o różnej kompleksowości białkowej i liczbie chlorofilu *a* (Chl *a*). W pierwszej kolejności przestudiowano oddziaływanie prostego modelowego kompleksu białkowego perydynina-chlorofil (PCP, z ang. *Peridinin-chlorophyll-protein*), którego monomer składa się z dwóch cząsteczek Chl *a*, z nanodrutami srebra. W kolejnym kroku obserwowano proces biokoniugacji kompleksu PCP ze zmodyfikowaną powierzchnią AgNW, polegający na formowaniu trwałego połączenia streptawidyna-biotyna. Dalsze badania prowadzono na kompleksach funkcjonalnych (zdolnych do separacji elektronu) i jednocześnie o większym stopniu kompleksowości białka fotosyntetycznego. Przygotowano koniugaty bakteryjnego centrum reakcyjnego oraz roślinnego fotosystemu I ze zmodyfikowaną powierzchnią nanodrutów srebra wykorzystując połączenie histydyna-NTA. Otrzymane struktury hybrydowe badano głównie technikami mikroskopii fluorescencyjnej.

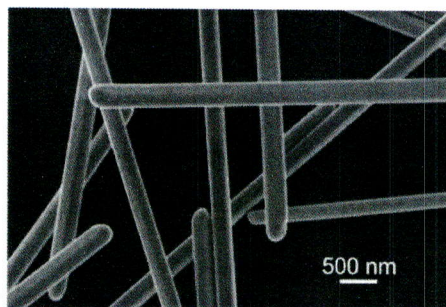
Moje zainteresowanie sprzęgnięciem kompleksów fotosyntetycznych z metalicznymi nanostrukturami plazmonicznymi zostało zainicjowane przez prof. dr. hab. Sebastiana Maćkowskiego kierującego Zespołem Optyki Nanostruktur Hybrydowych (ZONH) na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, który w 2011 roku zaproponował mi dołączenie do jego grupy badawczej. Współpraca ta zaowocowała poznaniem: nowych metod eksperymentalnych opartych na mikroskopii fluorescencyjnej, procedur dotyczących syntez nanocząstek i nanostruktur srebra a także badaniami nad poznaniem własności optycznych białek fotosyntetycznych w obecności nanocząstek metalicznych.

Badania prowadzące do poznania własności optycznych biohybrydowych nanostruktur plazmonicznych wymagały również organizacji nowego laboratorium chemicznego oraz konstrukcji komory rękawicowej do przeprowadzania reakcji chemicznych w warunkach beztlenowych. Były one również inspiracją do podjęcia próby rozszerzenia funkcjonalności fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola, łącząc go z oscylatorem kwarcowym, który umożliwił precyzyjne pomiary elektryczne wykorzystując technikę mikroskopii sił atomowych z sondą Kelvina (KPFM, z ang. *Kelvin Probe Force Microscopy*).

### 3. Metodyka badań

Badania dotyczące wpływu oddziaływań plazmonowych na własności optyczne kompleksów fotosyntetycznych w nanostrukturach hybrydowych były prowadzone głównie z wykorzystaniem fluorescencyjnej mikroskopii optycznej. Podstawowe pomiary mające na celu ustalenie stężenia czy kontrolę degradacji białek fotosyntetycznych w roztworach wodnych były wykonane metodami spektroskopii stacjonarnej przy użyciu jednowiązkowego spektrofotometru Cary50 (Varian) oraz spektrofluorymetru Fluorolog 3 (Jobin-Yvon).

Struktury będące przedmiotem mojego osiągnięcia naukowego składają się z nanocząstek metalicznych (nanodrutów srebra) oraz kompleksów fotosyntetycznych. Nanodrutu srebra zostały uzyskane na drodze syntezy chemicznej metodą poliolową<sup>15</sup>. Ich średnia długość wynosi około 10 mikrometrów, a typowe średnice są rzędu setek nanometrów. Przykładowe zdjęcie nanodrutów wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, z ang. *scanning electron microscope*) przedstawiono na Rys. 4.



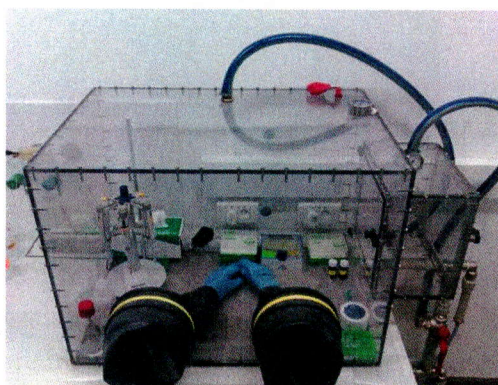
Rys. 4 Zdjęcie SEM uzyskane dla nanodrutów srebra.

Maksimum pasma rezonansu plazmonowego AgNW przypada na długość fali około 380 nm i rozciąga się aż ku podczerwieni dzięki czemu pokrywa się z widmami absorpcji i emisji kompleksów fotosyntetycznych. Natomiast mikrometryczne wartości długości nanodrutów zapewniają ich proste i precyzyjne zlokalizowanie w pomiarach przy użyciu optycznego mikroskopu fluorescencyjnego. Sposób osadzenia kompleksów białkowych w otoczeniu AgNW był zależny od przeprowadzanego eksperymentu:

- a) PCP mieszane (z ang. *mixed*) – roztwór PCP z AgNW w PVA wymieszany i naniesiony na podłoże szklane,
- b) PCP warstwowe (lbl, z ang. *layer by layer*) – na podłoże szklane naniesiono najpierw warstwę AgNW, a następnie pokryto ją warstwą PCP w polimerze PVA,
- c) PCP@AgNW – biokoniugat PCP z AgNW. Kompleksy PCP z wbudowaną węć streptawidyną zostały skoniugowane ze zmodyfikowaną przy pomocy biotyny powierzchnią AgNW i naniesione na podłoże szklane,
- d) RC@AgNW – biokoniugat bakteryjnego centrum reakcyjnego (RC) wyposażonego w mostek histydynowy (His-Tag) ze zmodyfikowaną kwasem nitrylotrioctowym (NTA) i solą niklu Ni(II) powierzchnią nanodrutów srebra za pomocą wiązania koordynacyjnego pomiędzy jonami niklu a histydyną (Ni-His),
- e) PSI-LHCI@AgNW – biokoniugat superkompleksu fotosystemu I z systemem antenowym LHCI, wyizolowanego z czerwonych alg, ze zmodyfikowaną NTA-Ni powierzchnią AgNW za pośrednictwem cytochromu *c<sub>553</sub>*,
- f) PSI-LHCI+AgNW – kompleksy PSI-LHCI osadzone w otoczeniu zmodyfikowanej NTA-Ni powierzchni AgNW w wyniku adsorpcji fizycznej w nieobecności cytochromu *c<sub>553</sub>*.

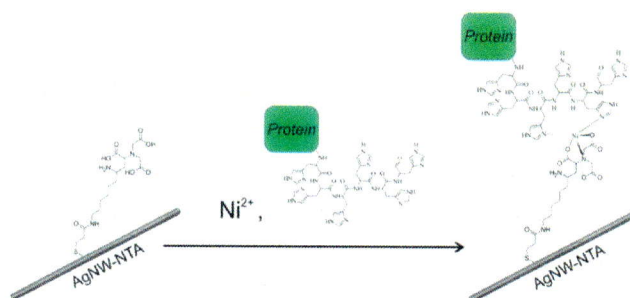
Jednym z moich istotnych osiągnięć naukowych jest opracowanie protokołu funkcjonalizowania grupami NTA-Ni powierzchni srebrnych nanostruktur i koniugacja z nimi histagowanych białek fotosyntetycznych. Po wnikliwym zapoznaniu się z literaturą dotyczącą procesu modyfikowania powierzchni metalicznych wybrano trzy procedury o zróżnicowanym składzie reagentów. Pierwsza z nich jest metodą dwustopniową, polegającą

na zmodyfikowaniu powierzchni nanostruktury metalicznej kwasem nitrylotrioctowym (*3,3'-Dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-N,N'-diaceticacid] dihydrochloride*) i solą nikiel Ni(II) <sup>16</sup>. W drugiej metodzie powierzchnia nanocząstek najpierw jest modyfikowana amino-reaktywnym środkiem sieciującym DSP, następnie amino-nitrylotrioctowym kwasem (ANTA) i solą nikiel Ni(II) <sup>17</sup>. Natomiast trzecia metoda sprowadza się do utworzenia na powierzchni metalicznej nanocząstki grupy NTA-Ni w pięciu krokach <sup>18</sup>. Ponieważ używane związki chemiczne są reaktywne z tlenem, dla osiągnięcia lepszych rezultatów zbudowano we własnym zakresie komorę rękawicową (Rys.5), w której w środowisku gazu obojętnego (argonu) przeprowadzono poszczególne etapy modyfikacji powierzchni nanocząstek srebra. Najlepsze efekty biokoniugacji AgNW z białkami fotosyntetycznymi RC i PSI uzyskano przy zastosowaniu drugiej procedury.



Rys. 5 Komora rękawicowa wg mojego projektu wykonana na WFAiS UMK.

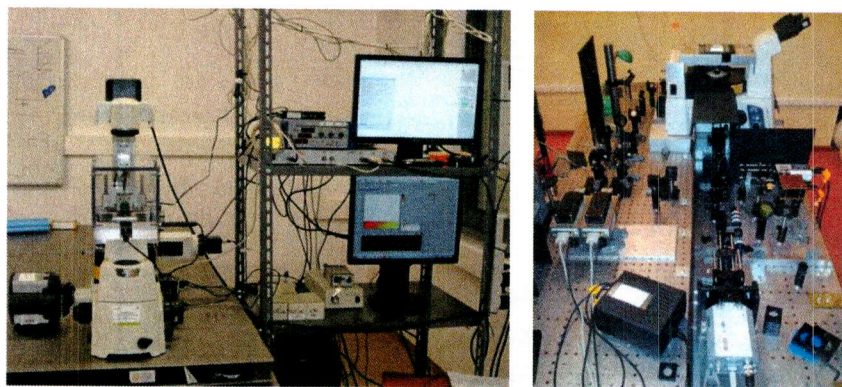
W pierwszym kroku 250  $\mu$ l wodnego roztworu AgNW, o wartości gęstości optycznej OD = 8.0 dla długości fali  $\lambda = 380$  nm, zostało odwirowane na wirówce laboratoryjnej, odsączone i przepłukane dimetylosulfotlenkiem (DMSO). Następnie nanodrutki srebra zostały umieszczone w roztworze środka sieciującego DSP (*dithiobis succinimidyl propionate*) w DMSO o stężeniu 1 mg/ml. Po czasie inkubacji trwającym 60 minut AgNW odwirowano i przepłukano pół molowym roztworem wodnym węglanu potasu (pH 9,8) i pozostawiono na 90 minut w mieszaninie 150 milimoli czynnika chelatującego (N $\alpha$ ,N $\alpha$ -Bis(carboxyMethyl)-L-lysine) w 0,5 mol/dm<sup>3</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Opisana procedura modyfikacji powierzchni nanodrutków została przeprowadzona w komorze rękawicowej w atmosferze argonu, a jej schemat przedstawiono na Rys. 6. Finalnie, po odwirowaniu roztworu, AgNW zostały umieszczone w ultra czystej wodzie destylowanej. Inkubowanie kompleksów fotosyntetycznych ze zmodyfikowanymi nanodrutkami zostanie opisane w części wynikowej autoreferatu.



Rys. 6 Uproszczony schemat modyfikowania powierzchni AgNW grupami NTA-Ni oraz koniugacji z kompleksem fotosyntetycznym wyposażonym w mostek histydynowy.



Eksperymenty dotyczące poznania i zrozumienia wpływu nanocząstek metalicznych na własności optyczne kompleksów fotosyntetycznych zostały przeprowadzone przy użyciu dwóch technik fluorescencyjnej mikroskopii optycznej: mikroskopii szerokiego pola i mikroskopii konfokalnej. Oba mikroskopy znajdujące się w ZONH oparte są na komponentach i szkieletach firmy Nikon. Fluorescencyjny mikroskop szerokiego pola zintegrowano z mikroskopem sił atomowych (AFM) działającym w oparciu o rezonator kwarcowy wraz z jego kontrolerem. Modyfikacja fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola została wykonana w ramach kierowanego przeze mnie projektu OPUS 6 (Narodowe Centrum Nauki, grant nr 2013/11/B/ST3/0398, 478 320 PLN). Układ mechaniczny do integracji mikroskopów składa się z podstawy mikroskopu AFM, przesuwanego w dwóch osiach (x, y) stolika wyposażonego w posuw wraz z kontrolerem i uchwytu do próbki oraz układu mechanicznego mikroskopu AFM, w skład którego wchodzi uchwyt rezonatora kwarcowego, trójosiowy (x, y, z) stolik piezoelektryczny i posuw wyposażony w śrubę piezoelektryczną wraz z kontrolerem. Opisany układ jest zaprezentowany na Rys. 7.



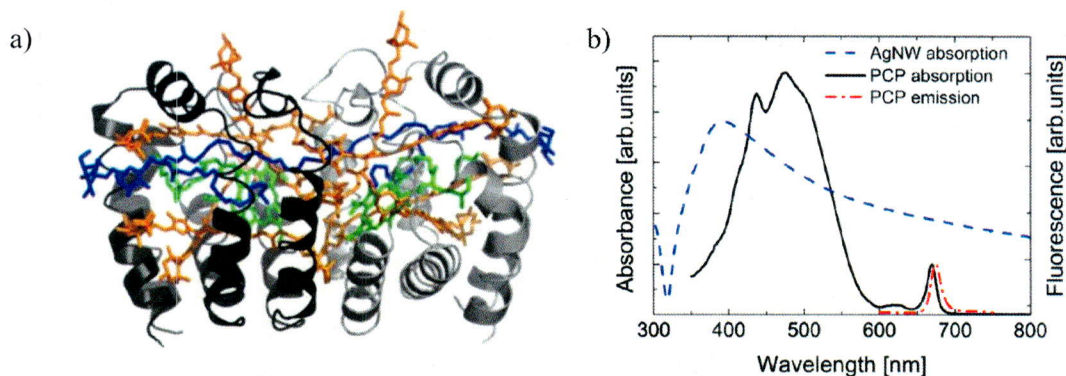
Rys. 7 Zdjęcie mikroskopu szerokiego pola rozbudowanego o przystawkę skanującą AFM (po lewej) i mikroskopu konfokalnego (po prawej).

Mikroskop szerokiego pola umożliwił pomiary map natężenia fluorescencji nanostruktur biohybrydowych oraz ich topografii metodą AFM. Konfokalny mikroskop fluorescencyjny został wykorzystany do badania zarówno map natężenia fluorescencji układów hybrydowych wraz z ich widmami emisji i krzywymi zaniku fluorescencji z użyciem metody pojedynczego zliczania fotonów (TCSPC, z ang. *Time Correlated Single Photon Counting*). Połączenie dwóch technik mikroskopii, fluorescencyjnej szerokiego pola z mikroskopią atomową, pozwoliło na zbadanie topografii omawianych nanostruktur hybrydowych, precyzyjnego zlokalizowania położenia nanodrutów srebra, oszacowania ich rozmiarów, etc., a zarazem przestudiowanie wzmocnienia natężenia fluorescencji kompleksów fotosyntetycznych sprzężonych z nanodrutami. Ponadto użycie konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego pozwoliło na uzyskanie dodatkowych informacji na temat natury oddziaływania kompleksów białkowych z nanodrutami srebra.

#### 4. Wyniki badań

[H1] "Imaging of fluorescence enhancement in photosynthetic complexes coupled to silver nanowires", 2013, Applied Physics Letters, 102, strony: 083703/1-083703/5

Kompleks perydynina-chlorofil-białko (PCP) jest kompleksem fotosyntetycznym izolowanym z alg *Amphidinium carterae* z rodziny bruzdnic<sup>19</sup>. Na rysunku 8a przedstawiono strukturę krystalograficzną monomeru PCP na którą składają się dwa łańcuchy białkowe osadzone w białkowo – lipidowej matrycy (kolor niebieski).

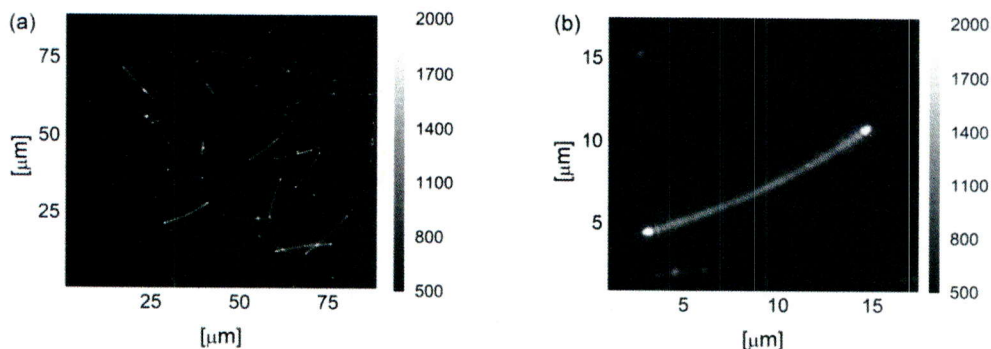


Rys. 8 Struktura krystalograficzna monomeru PCP<sup>20</sup> (a) oraz widmo absorpcji (czarna linia) i widmo fluorescencji (czerwona linia) PCP dla długości fali wzbudzenia 532 nm<sup>21</sup> (b).

W każdym z łańcuchów osadzone są cztery perydyniny połączone wiązaniami van der Waalsa (kolor pomarańczowy) i otaczające jedną molekułę chlorofilu *a* (kolor zielony). Kompleks fotosyntetyczny PCP charakteryzuje się widmem absorpcji przedstawionym na rys. 8b kolorem czarnym. Perydynina absorbuje promieniowanie słoneczne w zakresie od 400 nm do 550 nm i przekazuje energię do cząsteczki Chl *a*, który zbiera światło w zakresie pasma Soreta z maksimum w okolicy 440 nm oraz w obszarze od 600 nm do 670 nm. Widmo fluorescencji zaznaczone na rysunku kolorem czerwonym ma maksimum przy długości fali 673 nm co odpowiada emisji Chl *a*. Dzięki swojej prostocie w budowie, czyli stosunkowo niskiej kompleksowości białkowej oraz niewielkiej ilości barwników fotosyntetycznych, PCP jest dobrym kompleksem modelowym. Na rysunku 8b zaznaczono również niebieską przerywaną linią widmo ekstynkcji nanodrutów srebra, które pokrywa się z widmem absorpcji i emisji kompleksu PCP, a maksimum pasma rezonansu plazmowego jest położone na około 380 nm.

W celu zbadania wpływu obecności nanodrutów srebra na własności optyczne kompleksów PCP przygotowano mieszaninę wodnego roztworu białka z wodnym roztworem AgNW zawierającym polimer PVA. Uzyskano w ten sposób mieszaninę wodną AgNW z PCP o stężeniu białka 1  $\mu\text{g/ml}$  w 1% PVA, którą rozwirowano na szkiełku nakrywkowym z prędkością 60 obrotów na sekundę przy użyciu powlekkarki obrotowej. Otrzymaną w ten sposób próbkę umownie nazwano „mieszana” (z ang. „mixed”), natomiast próbkę referencyjną otrzymano w analogiczny sposób dodając do mieszaniny wodę destylowaną zamiast roztworu AgNW. Zastosowanie polimeru PVA miało na celu wytworzenie jednorodnej warstwy PCP, a także zmniejszało efekt fotowycierania PCP czyli fotochemicznego nieodwracalnego procesu przejścia cząsteczek Chl *a* w stan

niefluoryzujący. Próbkę wzbudzano oświetlaczem LED-owym o długości fali 405 nm i 480 nm (w przypadku pomiarów na fluorescencyjnym mikroskopie szerokiego pola) i laserem o długości fali 485 nm (w przypadku eksperymentów na mikroskopie konfokalnym). Jest to długość fali odpowiadająca okolicy maksimum pasma absorpcji kompleksów PCP, a zarazem znajduje się tuż za maksimum pasma rezonansu plazmonowego nanodrutów srebra.

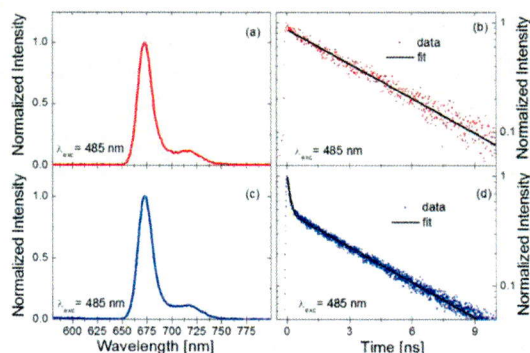


Rys. 9 Przykładowa mapa natężenia fluorescencji PCP dla próbki „mieszanej”,  $\lambda_{wzb} = 405$  nm (a) oraz pochodzące z tej samej mapy przybliżenie na jeden nanodrut (b).

Przykładowa mapa natężenia fluorescencji kompleksów PCP dla próbki „mieszanej” jest pokazana na Rys. 9a. Mapa ta jest zarejestrowana wyjątkowo dla długości fali wzbudzenia 405 nm, która jest położona bliżej maksimum pasma rezonansowego AgNW. Cała reszta eksperymentów i analiza danych dotyczyła wzbudzenia struktury hybrydowej długością fali 480 nm. Zauważyć można, że emisja kompleksów PCP jest wyraźnie wzmocniona w obszarze AgNW w porównaniu z emisją PCP na szkłe. Na Rys. 9b pokazano przybliżenie na jeden nanodrut srebra pokryty białkiem PCP. Natężenie emisji kompleksów fotosyntetycznych znajdujących się w dalszej odległości od AgNW jest znacznie mniejsze niż kompleksów w bliskim sąsiedztwie AgNW. Co więcej, natężenie tej emisji jest wyraźnie większe na końcach nanodrutu. Sytuacja taka została zaobserwowana dla ponad 90% analizowanych nanodrutów srebra pokrytych PCP. Odpowiedzialna za to może być geometria zakończeń nanodrutów (trapezowaty kształt), prowadząca do zwiększonej koncentracji kompleksów PCP, a także do zwiększenia natężenia pola elektromagnetycznego w tych miejscach (tzw. efekt antenowy) jak również wzmocnione rozpraszanie światła. Z przeprowadzonej analizy danych uzyskano współczynniki wzmocnienia natężenia emisji kompleksów PCP ułożonych wzdłuż nanodrutu o wartości 1,1 oraz o wartości 2,2 dla białek umieszczonych na końcach AgNW. Analiza polegała na wyznaczeniu wartości natężenia emisji PCP punkt po punkcie z krzywej poprowadzonej dokładnie wzdłuż kształtu danego nanodrutu, a następnie przeniesieniu tej krzywej w pobliże analizowanego AgNW (wyznaczenie wartości natężenia PCP na szkłe). Uzyskany w ten sposób stosunek natężeń emisji PCP jest współczynnikiem wzmocnienia plazmonowego (EF, z ang. *Enhancement Factor*) emisji PCP w obecności nanodrutów srebra. Końce nanodrutów analizowano analogicznie z pojedynczych, najjaśniejszych punktów.

Pomiary map natężenia emisji PCP dla próbki „mieszanej” uzyskane techniką fluorescencyjnej mikroskopii szerokiego pola wykazały wzmocnienie emisji kompleksów fotosyntetycznych znajdujących się w bliskim otoczeniu nanocząstek metalicznych. Niestety technika ta nie pozwala jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie co jest przyczyną takiego

stanu, czy wzmocnienie to było wynikiem tylko wzmocnienia absorpcji światła w układzie hybrydowym, a może nastąpiła degradacja białka. W celu uzyskania odpowiedzi na te pytania wykonano dalsze pomiary próbek wykorzystując technikę konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. Następnie w trybie konfokalnym wzbudzano kompleksy PCP zlokalizowane dokładnie wzdłuż wybranego nanodrutu, na jego końcu czy w dalszym, nieoddziałującym z AgNW sąsiedztwie i dla tego konkretnego ustawienia rejestrowano widmo emisji oraz krzywe zaniku fluorescencji PCP.



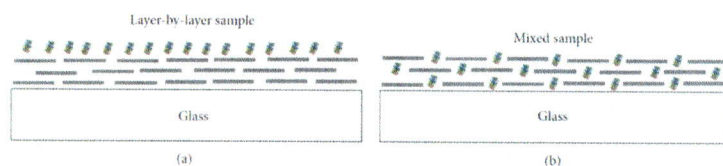
Rys. 10 Widma emisji (po lewej) i odpowiadające im krzywe zaniku fluorescencji (po prawej) dla kompleksów PCP znajdujących się poza AgNW (a i b) i na AgNW (c i d) przy wzbudzeniu 485 nm. Czarną linią zaznaczono dopasowania funkcji eksponencjalnej (jedno i dwu wykładniczej).

Na Rys. 10 przedstawiono kolorem czerwonym wyniki dla próbki referencyjnej i niebieskim dla kompleksów fotosyntetycznych znajdujących się w bliskim otoczeniu nanodrutu srebra. Widać wyraźnie, że widma emisji PCP nie zmieniają swojego kształtu, co oznacza, że białko w kontakcie z nanocząstką metaliczną pozostaje nienaruszone, to znaczy nie zmienia się jego struktura oraz nie ulega ono uszkodzeniu. Wyraźna różnica dostrzegalna jest dla krzywych zaniku fluorescencji PCP. W przypadku nieobecności nanocząstki metalicznej, emisja kompleksów PCP zanika monowykładniczo z czasem około 4 ns, pozostając w zgodzie z wcześniejszymi badaniami<sup>22</sup>. Dla kompleksów PCP sprzężonych z nanodrutami obserwuje się dwuwykładniczy zanik fluorescencji. Jedną składową tego zaniku jest charakterystyczna dla czasu życia PCP w nieobecności nanocząstki metalicznej, natomiast druga składowa ma wartość mniejszą rzędu około 0,3 ns. Ponad dziesięciokrotne zmniejszenie wartości stałej przejścia promienistego dla molekuł Chl *a* w kompleksie PCP jest wynikiem interakcji ze wzbudzeniami plazmonowymi indukowanymi w nanodrutach srebra pod wpływem padającego promieniowania wzbudzającego.

Podsumowując, w niniejszej pracy sprzęgnięto modelowy kompleks fotosyntetyczny PCP z nanodrutami srebra i zaobserwowano wzmocnienie emisji białka. Oddziaływania pomiędzy kompleksami PCP a AgNW skutkowały zwiększoną wartością natężenia fluorescencji i skróceniem czasu życia kompleksów fotosyntetycznych. Były to pierwsze tego typu wyniki na skalę światową.

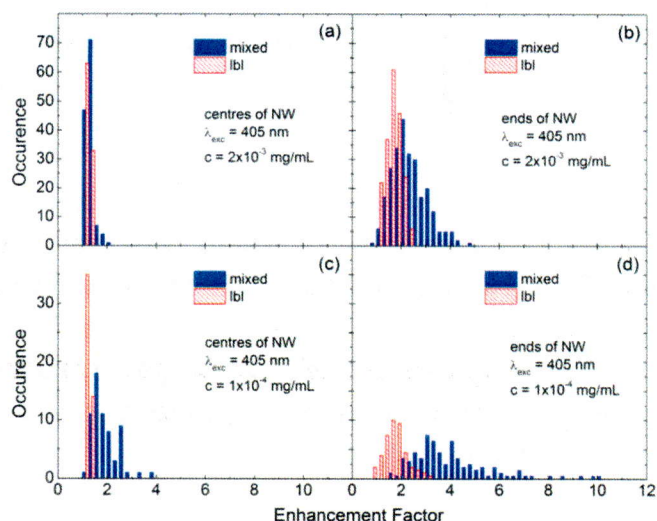
[H2] "Metal - enhanced fluorescence of chlorophylls in light-harvesting complexes coupled to silver nanowires", 2013, The Scientific World Journal, strony: 670412/1-670412/12

Badania dotyczące sprzężenia kompleksu PCP z nanodrutami srebra kontynuowano dla dwóch stężeń kompleksów PCP różniących się o rząd wielkości ( $c_1 = 2 \mu\text{g/ml}$  i  $c_2 = 0,1 \mu\text{g/ml}$ ), dwóch długości fal wzbudzenia (405 nm i 480 nm) oraz dwóch geometrii próbek – „mieszanej” („mixed”) i „warstwowej” (lbl – layer by layer). Długości fal wzbudzenia nanostruktur hybrydowych zostały dobrane tak aby wzbudzać kompleksy PCP w okolicach maksimum ich pasma absorpcji (480 nm) oraz w okolicach maksimum pasma rezonansu plazmonowego nanodrutów srebra (405 nm). Poszukiwanie optymalnego zagęszczenia kompleksów PCP wokół nanocząstek metalicznych dla obserwacji jak najwydajniejszego zjawiska MEF było powodem doboru dwóch (różniących się o rząd wielkości) stężeń PCP (przy zachowaniu jednakowego stężenia AgNW). Ponieważ zjawisko MEF silnie zależy od odległości pomiędzy nanocząstką metaliczną a emiterym, w eksperymencie wykorzystano dwa rodzaje geometrii próbki zaprezentowane na Rys. 11. W przypadku próbki „warstwowej” na powierzchnię szkła najpierw naniesiono warstwę nanodrutów, a następnie warstwę PCP (Rys. 11 a), natomiast próbka „mieszana” była mieszaniną obu tych składników, naniesioną na szkło (Rys. 11 b).



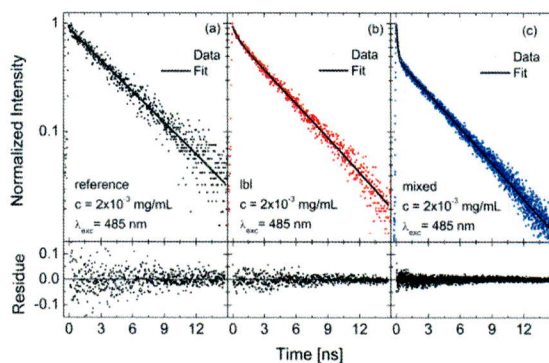
Rys. 11 Schemat geometrii próbki „warstwowej” (a – po lewej) i „mieszanej” (b – po prawej) na szkło. Szare poziome kreski przedstawiają AgNW, a kolorowe obiekty to kompleksy PCP.

Przeprowadzone pomiary map natężenia emisji kompleksów PCP dla omawianych struktur hybrydowych wykazały wzrost natężenia fluorescencji białka znajdującego się w bliskim otoczeniu AgNW. Analizę map natężenia fluorescencji PCP przeprowadzono analogicznie jak we wcześniejszej publikacji. Na Rys. 12 przedstawiono histogramy współczynnika wzmocnienia fluorescencji kompleksów PCP sprzężonych z AgNW i wzbudzanych światłem o długości fali 405 nm. Kolorem niebieskim oznaczono próbkę „mieszaną”, a czerwonym próbkę „warstwową”. Z uwagi na fakt, że na zakończeniach nanodrutów kompleksy fotosyntetyczne wykazują znacznie większe natężenie emisji, wyznaczone wartości EF zostały zamieszczone na oddzielnych histogramach (Rys. 12 b i d). Górny panel rysunku dotyczy stężenia  $2 \mu\text{g/ml}$  białka, a dolny stężenia mniejszego. Średnie wartości współczynnika wzmocnienia emisji PCP dla próbki „mieszanej” („warstwowej”) o większym stężeniu białka wynoszą odpowiednio 1,32 (1,22) dla kompleksów ulokowanych wzdłuż nanodrutów i 2,40 (1,67) na ich końcach. Wpływ geometrii próbki na wartości EF jest bardziej widoczny dla próbek o stężeniu niższym. W tym przypadku średnie wartości współczynnika wzmocnienia natężenia emisji PCP dla próbki „mieszanej” („warstwowej”) wynoszą odpowiednio 1,93 (1,22) wzdłuż AgNW i 4,11 (1,73) na jego końcach.



Rys. 12 Histogramy współczynnika wzmocnienia emisji PCP dla próbek „mieszanych” (kolor niebieski) i „warstwowych” (kolor czerwony). Po prawej analiza przeprowadzona dla kompleksów znajdujących się na zakończeniach AgNW, po lewej dla białek znajdujących się wzdłuż AgNW. Stężenie PCP: 2  $\mu\text{g/ml}$  (a i b) i 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (c i d);  $\lambda_{\text{wzb}} = 405 \text{ nm}$ .

Analogiczna analiza została przeprowadzona dla próbek wzbudzanych światłem o długości fali 480 nm. W tym przypadku wyznaczone średnie wartości EF dla próbki „mieszanej” („warstwowej”), o większym stężeniu białka, wzdłuż AgNW wynosiły 1,35 (1,25) i na końcach nanodrutów 2,32 (1,76), natomiast dla próbki o stężeniu mniejszym wynosiły odpowiednio 2,10 (1,27) wzdłuż nanocząstek metalicznych i 4,83 (2,04) na ich końcach. Uzyskane wyniki badań techniką mikroskopii szerokokopowej mają tylko jakościowy i przybliżony charakter, a otrzymane wartości współczynnika wzmocnienia emisji PCP są zazwyczaj niedoszacowane. W celu oszacowania bardziej ilościowego charakteru oddziaływań PCP z AgNW zmierzono widma emisji kompleksów fotosyntetycznych odizolowanych od nanocząstek metalicznych oraz sprzężonych z nanodrutami srebra jak również ich krzywe zaniku emisji. Widma emisji PCP sprzężonych z AgNW, niezależnie od geometrii próbki, mają ten sam kształt i położenie co widma fluorescencji białka w nieobecności nanocząstek metalicznych. Oznacza to, że sprzężony z AgNW kompleks fotosyntetyczny zachowuje swoją funkcjonalność i nie ulega uszkodzeniu.



Rys. 13 Krzywe zaniku fluorescencji PCP wraz z dopasowaniem funkcji wykładniczych i residuami dla próbki referencyjnej (a), „warstwowej” (b) i „mieszanej” (c). Stężenie PCP: 2  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\lambda_{\text{wzb}} = 485 \text{ nm}$ .

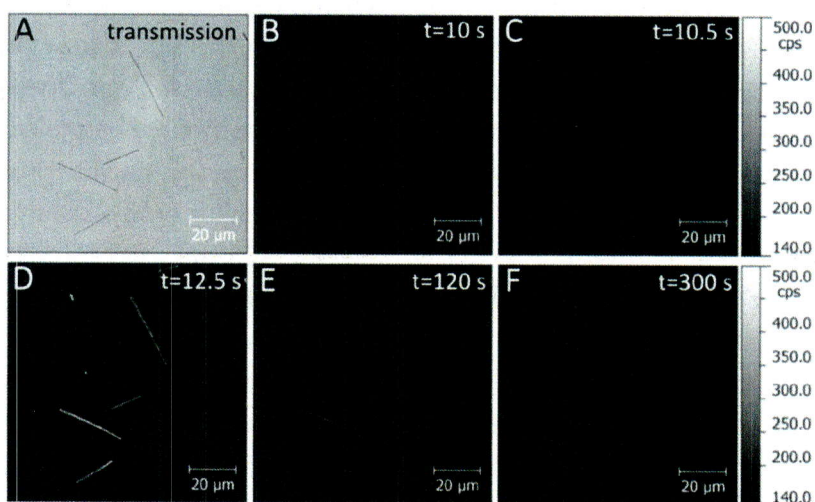
Na rysunku 13 przedstawiono krzywe zaniku emisji PCP. W przypadku próbki referencyjnej widoczny jest jednowykładniczy zanik emisji z wyznaczoną wartością czasu życia fluorescencji 4 ns niezależnie od użytej długości fali wzbudzenia – 405 nm i 485 nm. W przypadku obu nanostruktur hybrydowych obserwuje się dwuwykładniczy zanik fluorescencji kompleksów PCP. Otrzymane z dopasowania funkcji dwuwykładniczej do krzywych zaniku emisji PCP czasy życia fluorescencji kompleksów białkowych sprzężonych z nanodrutami srebra wynoszą około 4 ns i 0,3 ns dla próbki „mieszanej” niezależnie od użytej długości fali wzbudzenia. W przypadku próbki „warstwowej” krótszy czas życia przyjmował wartość 0,2 ns dla wzbudzenia 405 nm i 0,5 ns dla wzbudzenia 485 nm. Ponadto w przypadku próbki „mieszanej” wartość amplitudy związanej z dopasowaniem funkcji dwuwykładniczej dla mniejszej wartości stałej czasowej zaniku jest dwa razy większa niż w przypadku próbki „warstwowej”. Wynika stąd, że liczba kompleksów PCP oddziałujących z nanodrutami jest większa w przypadku próbki „mieszanej”. Dwuwykładniczy charakter krzywej zaniku emisji kompleksów białkowych sprzęgniętych z nanocząstkami metalicznymi wynika z faktu iż wiązka lasera wzbudzającego miała średnicę około 1  $\mu\text{m}$ , co przy średnicy AgNW poniżej 200 nm oznacza, że rejestrowany sygnał pochodził zarówno od kompleksów PCP sprzężonych z AgNW jak również kompleksów białkowych oddalonych i nieoddziałujących z nanocząstką metaliczną.

Podsumowując, w niniejszej pracy zaobserwowano plazmonowo wzmocnioną fluorescencję kompleksów PCP sprzężonych z nanodrutami srebra. Wartości współczynnika EF w granicach błędów nie zależą od użytej długości fali wzbudzenia. Na obserwowane wzmocnienie natężenia emisji kompleksów PCP wpływa geometria próbki oraz stężenie kompleksów fotosyntetycznych. W przypadku próbki „mieszanej” większa liczba kompleksów białkowych oddziałuje z nanocząstkami metalicznymi. Skrócenie czasu życia fluorescencji PCP wskazuje, że wzrost wartości stałej radiacyjnej odgrywa ważną rolę w prezentowanej nanostrukturze hybrydowej. Otrzymane wyniki mogą być wykorzystane do opracowania sposobów plazmonicznej kontroli zdolności zbierania światła przez kompleksy fotosyntetyczne.

[H3] *"Wide-field fluorescence microscopy of real-time bioconjugation sensing"*, 2018, Sensors 18, 290, strony: 1-10

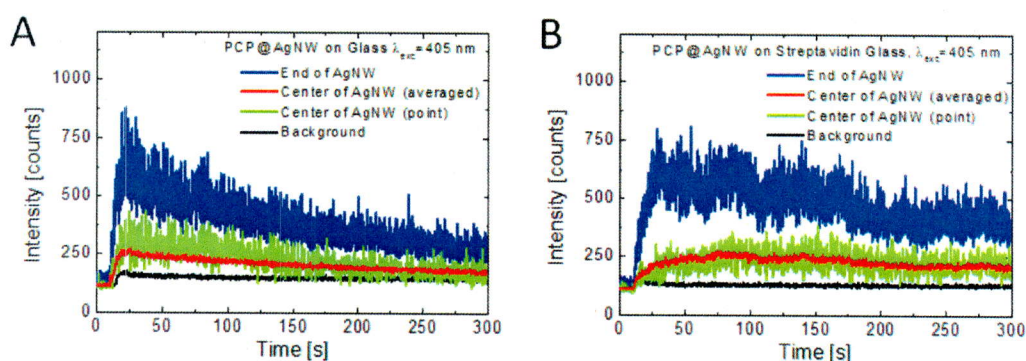
Jak już wspomniano wcześniej, oddziaływanie plazmonowe pomiędzy emiterym a nanocząstką metaliczną ściśle zależy od odległości pomiędzy nimi, a zjawisko wzmocnionej fluorescencji wymaga ich wzajemnego dystansu w granicach 10 nm – 30 nm. W związku z powyższym postawiono sobie kolejne wyzwania badawcze, które miało na celu kontrolę odległości pomiędzy kompleksami PCP a nanodrutami srebra. Protokół modyfikacji powierzchni nanodrutów srebra przy pomocy biotyny został opracowany w ramach pracy doktorskiej M. Olejnik<sup>23</sup>. Kompleksy PCP z przyłączonym białkiem streptawidyny (PCP-strept) koniugowano z AgNW za pomocą wiązania streptawidyna – biotyna. Wykorzystując fluorescencyjny mikroskop szerokiego pola zbadano szybkość zachodzenia omawianego procesu biokoniugacji. Na Rys. 14 (a) przedstawiono zdjęcie transmisji światła białego dla próbki z nanodrutami srebra osadzonymi na czystym szkle. Po czasie 10 s od momentu

rozpoczęcia rejestracji natężenia emisji zaaplikowano 5  $\mu\text{l}$  roztworu PCP-strept z o stężeniu 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i obserwowano zmiany natężenia fluorescencji kompleksu białkowego.



Rys. 14 Zdjęcie transmisji AgNW przed aplikacją roztworu PCP (a), mapa natężenia fluorescencji PCP wprost po aplikacji roztworu PCP (b) oraz mapy natężenia emisji PCP zarejestrowane w opisanym czasie rejestracji pomiaru. Skala natężenia emisji PCP na wszystkich mapach jest identyczna;  $\lambda_{\text{wzb}} = 405 \text{ nm}$ .

Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że natężenie światła pochodzące od emisji kompleksów PCP osadzonych na zmodyfikowanej powierzchni nanodrutów zaczyna pojawiać się już po czasie 0,5 s od momentu zaaplikowania roztworu. Natężenie to osiąga wartość maksymalną po czasie 2,5 s od aplikacji, a następnie zaczyna maleć na skutek powolnego procesu fotowysielania. W celu zbadania wpływu podłoża, na którym umieszczona została badana próbka, na dynamikę procesu koniugacji, użyto zmodyfikowane streptawidyną podłoża szklane (szkło-strept) i powtórzono eksperyment. Zmodyfikowane biotyną nanodruły srebra naniesiono na szkiełko ze streptawidyną i zaaplikowano roztwór PCP-strept.



Rys. 15 Kinetyka zmian natężenia emisji PCP koniugowanego z AgNW na szkłe (a) i szkłe ze streptawidyną (b). Zmiany natężenia emisji kompleksów PCP ulokowanych: na końcach AgNW (kolor niebieski), wzdłuż AgNW (kolor czerwony – wartość średnia z całej długości nanodrutu; kolor zielony – wartość z jednego punktu na nanodrucie), poza obszarem AgNW (kolor czarny).

Na Rys. 15 przedstawiono kinetyki zmian natężenia fluorescencji kompleksów PCP koniugowanych z nanodrutami osadzonymi na czystym szkłe i na szkłe-strept. Kolorem



niebieskim zaznaczono zmiany natężenia emisji białka zlokalizowanego na końcach nanodrutów, natomiast emitery osadzone na szkle poza obszarem oddziaływania z nanocząstkami srebra oznaczono kolorem czarnym. W przypadku PCP zlokalizowanego wzdłuż nanodrutów użyto koloru czerwonego dla średniej wartości natężenia emisji zebranej z całej długości AgNW, a kolorem zielonym wartość natężenia fluorescencji zebrana z jednego punktu na nanodrucie. W obu przypadkach użytego podłoża zarejestrowano wzrost natężenia emisji PCP koniugowanego z AgNW, a następnie jego spadek na skutek procesu fotowysielania chlorofili *a*. Warto zauważyć, że w przypadku podłoża szkło-strept nie obserwuje się sygnału pochodzącego od emisji wolnych kompleksów PCP (referencyjnych spoza obszaru interakcji z AgNW). Tłumaczyć to można odpychającym działaniem podłoża szklanego, na którym osadzone są cząsteczki białka streptawidyny w stosunku do kompleksu PCP, który również ma przyłączoną streptawidynę. Możliwe, że kompleksy PCP pozostają dłużej czas w zaaplikowanym roztworze niejako „oczekując” na przyłączenie do zmodyfikowanej powierzchni AgNW, czym można by tłumaczyć dłuższy czas narastania natężenia emisji PCP zlokalizowanych na AgNW na podłożu streptawidynowanym w porównaniu z sytuacją na podłożu szklanym. Ponadto szczegółowa analiza około 60 dobrze odseparowanych nanodrutów na obu podłożach wykazała, że średnie natężenie emisji PCP wzdłuż AgNW (na końcach AgNW) na czystym podłożu szklanym wynosi  $540 \pm 190$  ( $1700 \pm 600$ ) podczas gdy na podłożu modyfikowanym streptawidyną wynosi  $230 \pm 60$  ( $700 \pm 300$ ).

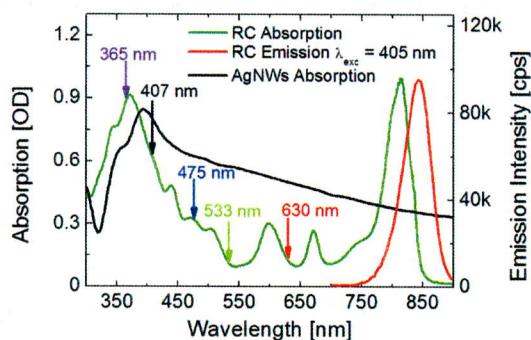
Podsumowując, w opisaney pracy zastosowano technikę fluorescencyjnej mikroskopii szerokiego pola do monitorowania procesu biokoniugacji nanocząstek srebra z kompleksami fotosyntetycznymi. Proces biokoniugacji jest bardzo wydajny i zachodzi w czasie zaledwie kilku sekund. Szybkość procesu biokoniugacji na podłożu modyfikowanym streptawidyną jest mniejsza w porównaniu z czystym szkłem. Na obu podłożach zachodzi zjawisko plazmonowo wzmocnionej emisji kompleksów PCP koniugowanych z AgNW. Opisana metoda może być powszechnie stosowana do biochemicznego wykrywania bardzo niskiego stężenia białka (przypuszczalnie do poziomu pojedynczych molekuł) w czasie rzeczywistym, z użyciem plazmonowo aktywnych nanostruktur.

**[H4] "Spectrally selective fluorescence imaging of *Chlorobaculum tepidum* reaction centers conjugated to chelator modified silver nanowires", 2018, Photosynthesis Research, 135, strony: 329-336.**

Zaprezentowane wcześniej badania pozwoliły na opisanie wpływu obecności nanocząstek metalicznych na własności optyczne prostego kompleksu białkowego. Centrum reakcyjne (RC) jest naturalnym przetwornikiem optyczno – elektrycznym występującym w komórkach organizmów fotosyntetycznych. Wykazuje ono prawie stuprocentową wydajność kwantową konwersji światła. Fakt ten powoduje, że wielu naukowców na całym świecie podejmuje próby wbudowania tego typu kompleksów białkowych w różnego rodzaju elektrody celem konstrukcji tanich i efektywnych fotoogniw. Sprzęgnięcie takich kompleksów białkowych z nanocząstkami srebra może prowadzić do modyfikacji ich własności optycznych. To z kolei może się przekładać na zwiększenie wydajności absorbowanego promieniowania słonecznego czy efektywności generacji fotoprądów przez

bioelektrody skonstruowane na bazie funkcyjnych kompleksów fotosyntetycznych. Ponadto w wyniku takiego połączenia powinna powstać struktura o zorientowanym położeniu kompleksów fotosyntetycznych, pracująca jako anoda lub katoda, w zależności od zorientowania funkcyjnych kompleksów fotosyntetycznych do jej powierzchni.

W niniejszej pracy wykorzystano centrum reakcji (RC) z zielonej bakterii *Chlorobaculum (Cb.) tepidum*, które jest transbłonowym super kompleksem pigmentowo – białkowym i zarazem prostszym analogiem fotosystemu I (PSI). Na Rys. 16 zaprezentowano widmo absorpcji RC (kolor zielony) i AgNW (kolor czarny) oraz widmo emisji centrów reakcyjnych (kolor czerwony).

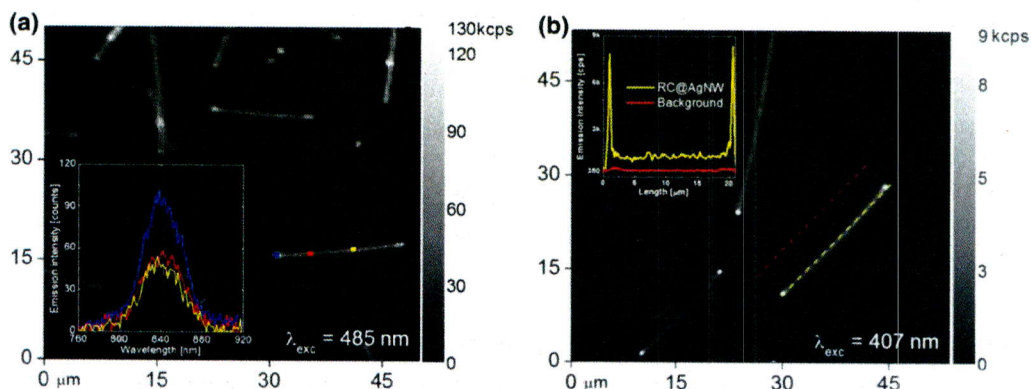


Rys. 16 Widmo absorpcji RC (kolor zielony) i AgNW (kolor czarny) oraz emisji RC (kolor czerwony). Strzałkami zaznaczono wartości długości fali wzbudzenia użyte w eksperymencie.

Karotenoidy absorbują światło w zakresie pomiędzy 430 nm a 540 nm. Udział bakteriochlorofilu *a* (BChl *a*) w widmie absorpcji RC jest widoczny w dwóch zakresach spektralnych od 300 nm do 430 nm i pomiędzy 540 nm a 850 nm (pasma  $Q_x$  i  $Q_y$  są widoczne na około 600 nm i 810 nm). Pasmo absorpcji, którego maksimum przypada na około 670 nm należy do pochodnej Chl *a*. Do kompleksu RC przyłączony jest kompleks FMO (Fenna-Matthews-Olson), którego BChl *a* absorbuje światło w zakresie spektralnym od 550 nm do 645 nm. Promieniowanie słoneczne zaabsorbowane przez kompleks białkowy FMO jest w głównej mierze przekazywane do RC. Widmo emisji RC charakteryzuje się szerokim pasmem z maksimum położonym na ok. 840 nm. Niesymetryczność pasma emisji RC uwidaczniająca się jego poszerzeniem na krótkofalowym zboczku może być wynikiem fluorescencji FMO. Na rysunku zaprezentowano również widmo absorpcji nanodrutów srebra, które pokrywa się z widmem absorpcji i emisji RC. Kompleksy RC są wyposażone w mostek polihistydynowy (His-Tag), który umożliwia ich przyłączenie w specyficzny sposób do zmodyfikowanej powierzchni nanodrutów. Proces modyfikacji powierzchni AgNW kwasem NTA i solą niklu został opisany w części dotyczącej metodyki pomiarów. Zmodyfikowane AgNW-NTA były inkubowane w roztworze buforowym z RC przez 60 minut, a następnie kilkakrotnie płukane i odwirowywane. Procedura taka zapewniała, że finalnie w roztworze znajdowały się praktycznie tylko kompleksy RC związane z powierzchnią AgNW (RC@AgNW).

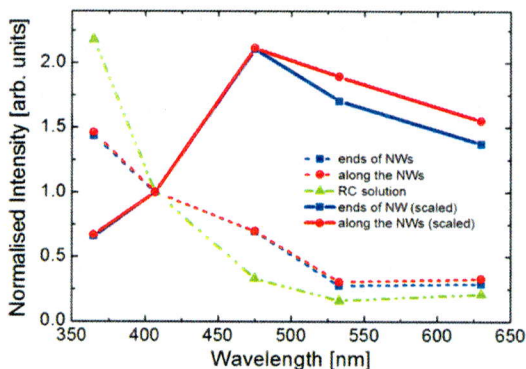
Na Rys. 17 przedstawiono mapy natężenia emisji kompleksów RC przyłączonych do nanodrutów srebra zarejestrowane przy użyciu (a) mikroskopu konfokalnego i (b) mikroskopu szerokiego pola. Zmierzone widma emisji kompleksów RC przyłączonych do AgNW w różnych pozycjach na nanodrucie charakteryzują się różną wartością natężenia

fluorescencji, ale ich kształt i położenie jest takie samo jak dla kompleksów RC w buforze. Oznacza to, że w procesie biokoniugacji i w otoczeniu nanocząstek metalicznych kompleksy RC nie ulegają uszkodzeniu czy denaturyzacji i zachowują swoją funkcjonalność.



Rys. 17 Mapy fluorescencji kompleksów RC przyłączonych do AgNW zarejestrowane przy użyciu (a) mikroskopu konfokalnego (plus widma emisji RC z poszczególnych miejsc na AgNW) i (b) mikroskopu szerokiego pola (plus rozkład natężenia emisji wzdłuż zaznaczonego nanodrutu (kolor żółty) i w jego pobliżu (kolor czerwony)).

Rys. 17 b pokazuje jak kompleksy RC jednorodnie przyłączyły się do powierzchni AgNW – wyraźna emisja RC odwzorowująca kształt nanodrutu, wraz z jaśniejszymi zakończeniami. Zaprezentowano również, kolorem żółtym, rozkład natężenia emisji RC wzdłuż nanodrutu i praktycznie jej brak w otoczeniu AgNW (kolor czerwony), co oznacza, że w finalnym roztworze wszystkie kompleksy RC były związane z powierzchnią AgNW. Ponadto odległość pomiędzy nanodrutem a kompleksem białkowym była na tyle duża, że nie zachodziło wygaszenie fluorescencji RC. W celu dokładnego zbadania wpływu obecności nanocząstek metalicznych na własności optyczne kompleksów RC zastosowano pięć długości fali wzbudzenia z całego zakresu widma absorpcji białka fotosyntetycznego. Pomiary wykonywano w ten sposób, że dokładnie to samo miejsce na próbce było oświetlane światłem o długości fali od 630 nm do 365 nm o tej samej mocy i rejestrowano mapy natężenia emisji RC@AgNW. Sposób wykonywania pomiarów pozwalał na wyznaczenie relatywnych wartości natężenia emisji RC przyłączonych do konkretnego nanodrutu w funkcji długości fali wzbudzenia. Analizie poddano ponad sto pojedynczych, dobrze odseparowanych nanodrutów.



Rys. 18 Porównanie unormowanych wartości natężenia emisji RC w buforze (zielony) i średnich wartości natężenia fluorescencji RC@AgNW na końcach nanodrutów (niebieskie kwadraty) i wzdłuż nanodrutów

(czerwone kropki). Linia ciągła przedstawia wartości natężenia emisji RC@AgNW przeskalowane do wartości natężenia emisji RC z widma wzbudzenia emisji roztworu białka.

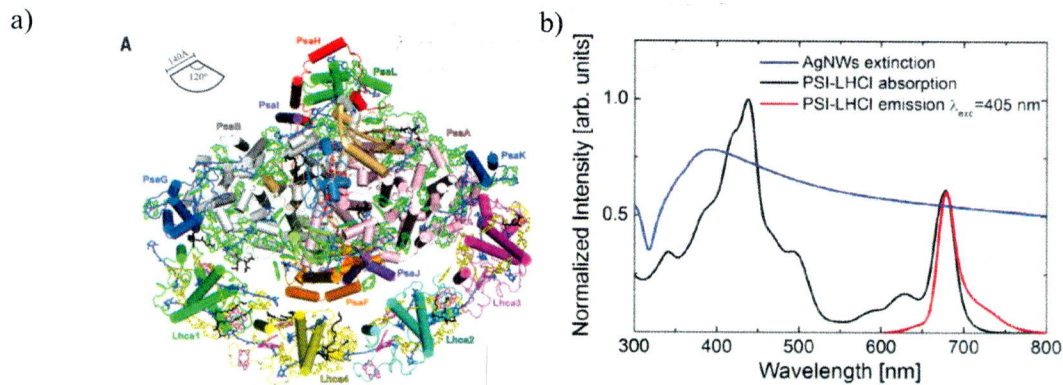
Na Rys. 18 przedstawiono zielonym kolorem wartości natężenia emisji roztworu RC w buforze wyznaczone z widma wzbudzenia emisji zmierzonego przy stałej wartości natężenia światła wzbudzającego. Wartości natężenia emisji RC@AgNW zostały zmierzone przy pomocy mikroskopu szerokiego pola dla jednakowego natężenia światła wzbudzającego wszystkich pięciu użytych oświetlaczy LED-owych. Średnie wartości natężenia emisji RC@AgNW wyznaczone wzdłuż nanodrutu (czerwone kropki) i na jego końcach (niebieskie kwadraty) oznaczono linią przerywaną. Wszystkie wykresy zostały unormowane do wartości natężenia emisji RC przy wzbudzeniu 407 nm. Zauważyć można, że zależność natężenia emitowanego światła przez kompleksy RC od długości fali wzbudzenia jest różna dla przypadku roztworu buforowego i koniugatów RC z nanodrutami. Podczas gdy natężenie emisji roztworu RC ma wartość wyższą dla  $\lambda_{wzb} = 365$  nm w porównaniu z RC@AgNW, to sytuacja ta jest odwrotna dla  $\lambda_{wzb} = 485$  nm. Dla czytelniejszego zaprezentowania wpływu obecności nanodrutów na własności optyczne RC, wartości natężenia emisji RC@AgNW unormowano do jednakowej wartości natężenia światła absorbowanego czyli podzielono przez wartości natężenia emisji z widma wzbudzenia RC w buforze. W ten sposób otrzymano czerwone i niebieskie ciągłe krzywe. Widać z nich wyraźnie wpływ wzbudzeń plazmonowych indukowanych w nanodrutach srebra na wzmocnienie natężenia emisji kompleksów RC przyłączonych do nich w sposób specyficzny. Dodatkowe pomiary dla koniugatów RC@AgNW wykonane metodami spektroskopii czasowo rozdzielczej wykazały, że krzywe zaniku fluorescencji zmierzone dla długości fali wzbudzenia 485 nm i 640 nm nie różnią się od krzywych zaniku emisji dla próbki referencyjnej (roztworu RC w buforze). Skoro nie obserwuje się skrócenia czasu życia kompleksu białkowego sprzężonego z nanodrutami można wnioskować, że wzmocnienie natężenia emisji RC przyłączonego do AgNW jest wynikiem głównie wzmocnienia absorpcji światła przez RC.

Podsumowując, w niniejszej pracy przyłączono w sposób specyficzny centra reakcyjne do nanodrutów srebra. Biokoniugacja nie spowodowała wygaszenia emisji RC, a wręcz ją wzmocniła. Plazmonowe wzmocnienie emisji RC jest głównie wynikiem wzmocnienia absorpcji kompleksów fotosyntetycznych. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane przy konstrukcji, opartych o kompleksy fotosyntetyczne i nanocząstki metaliczne, ulepszonych konwerterów światła słonecznego na energię elektryczną. Opisane poniżej badania prowadzone były w ramach europejskiego projektu BoldCats („Bioinspired Oxygen evolving Light Driven CATalystS (BOLDCATS)”, 2011 – 2014, 650 000 PLN), którego byłam głównym wykonawcą i koordynatorem współpracy z laboratorium prof. R. Cogdella.

**[H5] "Plasmon-induced absorption of blind chlorophylls in photosynthetic proteins assembled on silver nanowires", 2017, Nanoscale, 9, strony: 10475-10486**

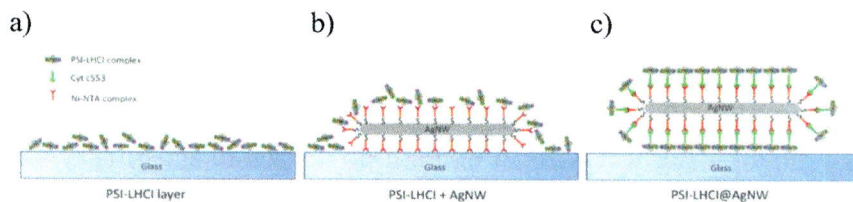
Photosystem I z kompleksem antenowym LHCI (PSI-LHCI) jest super kompleksem białkowym wyizolowanym z czerwonych alg *Cyanidioschyzon merolae*. Charakteryzuje się on wysoką odpornością na ekstremalne warunki takie jak ekspozycja na światło, temperatura (20° C - 60° C) czy pH (4 – 11), dzięki czemu jest on interesującym białkiem

fotosyntetycznym do wykorzystania np. w konwerterach światła słonecznego na energię elektryczną<sup>24</sup>. Wcześniejsze badania wykazały, że zorientowane przyłączenie centrów reakcyjnych RC do nanodrutów srebra skutkuje modyfikacją ich własności optycznych. W związku z tym w niniejszej pracy skoniugowano superkompleks PSI-LHCI z nanodrutami srebra za pomocą cytochromu  $c_{553}$ , który jest naturalnym donorem elektronów. Struktura krytalograficzna PSI-LHCI jest dobrze poznana i została przedstawiona na Rys.1a. Kompleks ten występuje w formie monomeru, ma rozmiary rzędu 15 nm i zawiera około 157 – 159 molekuł Chl  $a$  oraz 35 molekuł karotenoidów. Na Rys. 1b zaprezentowano widmo absorpcji (kolor czarny) i emisji (kolor czerwony) superkompleksu białkowego wraz z widmem absorpcji nanodrutów srebra (kolor niebieski).



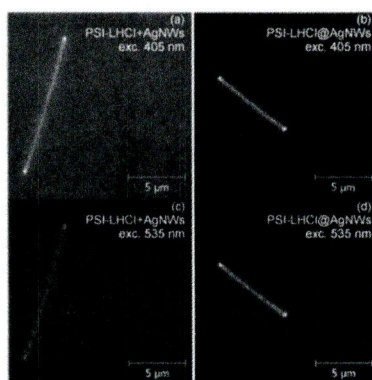
Rys. 19 Struktura krytalograficzna monomeru PSI-LHCI<sup>25</sup> (a); widmo absorpcji (czarna linia) i widmo fluorescencji (czerwona linia) PSI-LHCI dla długości fali wzbudzenia 405 nm oraz widmo absorpcji AgNW (niebieska linia) (b).

Widmo absorpcji super kompleksu charakteryzuje się kilkoma szerokimi pasmami, które odpowiadają absorpcji światła przez różne pigmenty fotosyntetyczne. Cząsteczki Chl  $a$  absorbują promieniowanie w zakresie pasma Soreta leżącego w części światła ultrafioletowego i niebieskiego, a w bliskiej podczerwieni znajduje się ich pasmo  $Q_y$ . Absorpcja karotenoidów charakteryzuje się mniejszymi pasmami w zakresie światła zielonego. Maksimum widma emisji PSI-LHCI przypada na 678 nm, a jego poszerzenie w stronę dłuższych fal jest przypisane emisji tzw. „czerwonych” chlorofili. Wyizolowane natywne kompleksy PSI-LHCI nie posiadają mostka histydynowego umożliwiającego przyłączenie ich w zorientowany sposób do zmodyfikowanej powierzchni nanocząstek srebra. W takiej sytuacji wykorzystano białko będąc mediatorem elektronów – cytochrom  $c_{553}$  wyposażony w His-Tag.



Rys. 20 Schemat badanych próbek: (a) warstwa PSI-LHCI, (b) kompleksy PSI-LHCI osadzone na AgNW bez użycia cytochromu, (c) PSI-LHCI osadzone na AgNW z zastosowaniem cytochromu.

Na Rys. 20 przedstawiono schemat geometrii badanych próbek. Główną różnicą pomiędzy próbkami jest występowanie cytochromu  $c_{553}$  (PSI-LHCI@AgNW) lub jego brak (PSI-LHCI+AgNW). W przypadku próbki gdzie nie użyto cytochromu kompleksy białkowe nie mogły się przyłączyć w zorientowany sposób do powierzchni nanodrutów srebra, a jedynie zostały na nich osadzone w wyniku adsorpcji fizycznej. Zmodyfikowane nanodruły srebra były najpierw inkubowane w roztworze buforowym cytochromu  $c_{553}$  przez pół godziny, a następnie dokładnie przepłukane i odwirowane. Otrzymane w ten sposób nanodruły miały całą powierzchnię pokrytą cytochromami oczekującymi na przyjęcie i związanie ze sobą super kompleksów PSI-LHCI. Zbadano czas po którym kompleksy PSI-LHCI łączą się z cytochromem. Do próbki zawierającej AgNW-cyt dodano roztwór PSI-LHCI i po czasie 10 min, 30 min i 60 min pobierano mieszaninę i rejestrowano mapy natężenia emisji PSI-LHCI wzbudzając je światłem o długości fali 405 nm. Otrzymane wyniki pokazały, że już po czasie dziesięciu minut kompleksy PSI-LHCI sprzężone z AgNW-cyt emitują wzmocnioną fluorescencję, jednak natężenie tej emisji jest słabe i niejednorodne wzdłuż nanodrutu. Znacznie lepszy efekt był widoczny po 30 minutach, a po 60 minutach emisja kompleksów PSI-LHCI na AgNW-cyt była znacznie intensywniejsza i jednorodna. Czas ten uznano za optymalny czas inkubacji mieszaniny PSI-LHCI z AgNW-cyt i zastosowano do dalszych badań. Następnie przygotowano dwie mieszaniny PSI-LHCI, jedną zawierającą zmodyfikowane nanodruły srebra i drugą z nanodrutami pokrytymi cytochromem. Obie mieszaniny inkubowano 60 minut, kilkakrotnie odwirowano i przepłukano, a następnie rozwirowano na szkle. Zmierzone dla tych próbek mapy natężenia emisji PSI-LHCI zaprezentowano na Rys. 21.



Rys. 21 Mapy natężenia emisji PSI-LHCI+AgNW (a, c) i PSI-LHCI@AgNW (b, d) dla długości fali wzbudzenia 405 nm (a, b) i 535 nm (c, d). Wszystkie mapy znajdują się w jednakowej skali natężenia emisji.

Próbki wzbudzano dwoma długościami fali: 405 nm – odpowiada okolicy położenia maksimum pasma rezonansowego AgNW oraz 535 nm – obszar, w którym kompleksy PSI-LHCI prawie nie absorbują światła. Zauważyć można, że obecność nanocząstek metalicznych w obu próbkach nie wygasza emisji super kompleksów białkowych. Zdecydowana różnica polega na intensywności emisji PSI-LHCI. Stosunek natężenia emisji PSI-LHCI przy długości fali wzbudzenia 405 nm do natężenia emisji przy wzbudzeniu 535 nm wynosi: około 5 (PSI-LHCI+AgNW) dla próbek, gdzie białka fotosyntetyczne zostały osadzone na powierzchni nanodrutów w wyniku adsorpcji fizycznej, prawie 2 (PSI-LHCI@AgNW) dla koniugatu i ponad 6 dla próbki referencyjnej (PSI-LHCI). Ten ważny wynik pokazuje, że przyłączenie kompleksów PSI-LHCI w zorientowany sposób do

nanodrutów srebra silnie modyfikuje własności optyczne tych super kompleksów. Wyniki czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej dla omawianych nanostruktur hybrydowych wykazały skrócenie czasu życia kompleksów PSI-LHCI sprzężonych z nanodrutami srebra. Skrócenie to jest silniejsze w przypadku próbki z uporządkowaną (zorientowaną) strukturą. Z otrzymanych wyników wynika, że super kompleksy PSI-LHCI przyłączone do nanodrutów srebra w zorientowany sposób charakteryzują się wzmocnioną absorpcją promieniowania zielonego, którego w naturalnych warunkach prawie nie pochłaniają. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest silna modyfikacja własności optycznych tych kompleksów fotosyntetycznych. Należy dodać, że oświetlanie PSI-LHCI światłem o długości fali powyżej 500 nm wzbudza obecne w super kompleksie tzw. „czerwone” chlorofile, które tworzą pułapkę energetyczną głównie w systemie antenowym LHCI, ale również w rdzeniu PSI. Przyłączenie kompleksów PSI-LHCI do nanodrutów srebra ich stroną donorową powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa absorpcji światła czerwonych chlorofili.

Podsumowując, w powyższej pracy przyłączono w zorientowany sposób fotosystemy I z kompleksami antenowymi do zmodyfikowanej powierzchni nanodrutów srebra za pośrednictwem cytochromu  $c_{553}$ . Wyznaczono czas, po którym cytochrom  $c_{553}$  zostaje wchłonięty przez kompleksy PSI-LHCI. Sprzężenie kompleksów PSI-LHCI od strony donorowej (P700) z nanodrutami srebra modyfikuje własności optyczne tych kompleksów. Modyfikacja ta polega na silnym wzmocnieniu absorpcji światła zielonego, w rejonie gdzie w naturalnych warunkach światło to nie jest prawie pochłaniane przez PSI-LHCI. To nowatorskie na skalę światową podejście, połączenia fotosyntetycznego kompleksu funkcyjnego w sposób zorientowany z plazmonicznie aktywną nanostrukturą metaliczną, może zostać wykorzystane przy konstrukcji nowych, wydajnych i ekologicznie czystych ogniw fotowoltaicznych. Opisane poniżej badania prowadzone były w ramach polsko-tureckiego projektu GraphESol („Konstrukcja biohybrydowych fotoelektrod grafenowych dla fotoogniw paliwowych”, 2016 – 2019, POLTUR-1, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, grant nr DZP/POLTUR-1/50/2016, (370 000 PLN), którego byłam głównym wykonawcą i koordynatorem współpracy z prof. J. Kargul z UW i prof. K. Ocaoglu z MU w Turcji.

## 5. Podsumowanie

Najważniejszymi wynikami wchodzącymi w skład mojego osiągnięcia naukowego są:

- obserwacja plazmonowo wzmocnionej fluorescencji prostego modelowego kompleksu fotosyntetycznego PCP, sprzężonego w wyniku adsorpcji fizycznej z nanodrutami srebra,
- zwiększenie efektu zjawiska MEF dla kompleksów PCP sprzężonych z nanodrutami srebra poprzez kontrolę geometrii próbki (zwiększenie liczby kompleksów białkowych oddziałujących z nanodrutami),

- zastosowanie techniki fluorescencyjnej mikroskopii szerokiego pola do monitorowania procesu biokonjugacji nanocząstek srebra z kompleksami fotosyntetycznymi w czasie rzeczywistym,
- wzmocnienie absorpcji światła przez bakteryjne centra reakcyjne (zdolne do separacji ładunku) przyłączone w zorientowany sposób do nanodrutów srebra,
- opracowanie protokołu modyfikacji powierzchni nanodrutów srebra i skoniugowanie z nimi super kompleksu białkowego PSI-LHCI za pośrednictwem cytochromu i wzmocnienie absorpcji światła zielonego przez wytworzoną nanostrukturę hybrydową.

Zaprezentowane wyniki badań spotkały się z dużym zainteresowaniem środowiska naukowego w kraju i za granicą. Zostały one zaprezentowane w postaci wystąpień ustnych i plakatów na kilku zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych, gdzie były przyjmowane pozytywnie. Potencjalne zastosowanie otrzymanych wyników to:

- wykorzystanie do opracowania sposobów plazmonicznej kontroli zdolności zbierania światła przez kompleksy fotosyntetyczne,
- biochemiczne wykrywanie bardzo niskiego stężenia białka (przypuszczalnie do poziomu pojedynczych molekuł) w czasie rzeczywistym, z użyciem plazmonowo aktywnych nanostruktur.
- przy konstrukcji nowych, wydajnych i ekologicznie czystych ogniw fotowoltaicznych opartych na funkcyjnych kompleksach fotosyntetycznych zdolnych do separacji ładunku przyłączonych w zorientowany sposób do plazmonicznie aktywnych nanostruktur metalicznych

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

Zaraz po ukończeniu doktoratu wyjechałam na staż podoktorski na uczelnię do Kanady (University of Saskatchewan) gdzie pracowałam pod opieką profesora RONALDA STEERA. Zakres prowadzonej tam działalności naukowej stanowił kontynuację tematyki mojej rozprawy doktorskiej. Pierwsze eksperymenty przeprowadzone w Kanadzie dotyczyły wygaszania fluorescencji tertrafenyloporfiryny magnezowej i cynkowej przez tlen molekularny<sup>26</sup> jak również własności fotofizycznych tych porfiryn<sup>27</sup> w roztworach. Kolejnym tematem były korole – pochodne porfiryn. Nagły wzrost zainteresowania tymi związkami pojawił się gdy odkryto prostą metodę ich syntezy. Pod opieką prof. R. Steera badałam własności spektralne i fotofizyczne dwóch metalokoroli w mieszaninie benzenu z pirydyną w stanie podstawowym i wyższych stanach wzbudzonych<sup>28</sup>. Po ukończeniu stażu na UofS w Kanadzie wyjechałam do Hiszpanii, gdzie na uczelni Universidad de La Laguna na Teneryfie współpracowałam naukowo z grupą prof. I. MARTINA. Zajmowałam się tam fabrykacją szkielek i szkielek



ceramicznych domieszkowanych jonami ziem rzadkich i badaniami ich własności optycznych metodami czasowo-rozdzielczej spektroskopii laserowej<sup>29,30</sup>. Po powrocie do kraju prof. dr hab. S. Maćkowski zaproponował mi pracę w swojej grupie badawczej, w której przebywam do dnia dzisiejszego. Współpraca z prof. dr hab. S. Maćkowskim okazała się niezwykle interesująca i interdyscyplinarna, a tematyka badawcza którą się tutaj zajmuję skupia się na nanostrukturach hybrydowych. Poza badaniami dotyczącymi wpływu oddziaływania kompleksów fotosyntetycznych z nanodrutami srebra brałam również udział w eksperymentach wykorzystujących inne nanocząstki i nanostruktury plazmonowe w układach hybrydowych. Jedną z pierwszych prac dotyczyła sprzężenia kropek kwantowych z kompleksami PCP<sup>31</sup>. Badano również wpływ oddziaływań plazmonowych indukowanych w warstwie srebrnych wysp na własności optyczne kompleksów fotosyntetycznych o różnym stopniu kompleksowości białka i liczbie emiterów, jak FMO<sup>32</sup>, bakteryjne centrum reakcji<sup>33</sup> czy cyjanobakteryjny fotosystem I<sup>34</sup>. Syntezowane przeze mnie nanodruły srebra były wykorzystywane z powodzeniem w licznych eksperymentach prowadzonych przez magistrantów, doktorantów i innych pracowników naukowych Zespołu Optyki Nanostruktur Hybrydowych<sup>35</sup>. Interdyscyplinarny charakter pracy ZONH był wynikiem również precyzyjnego wyznaczenia wartości wydajności kwantowych emisji tioksantonów syntezowanych w laboratorium prof. D. Gryko<sup>36</sup> czy pomiarach metodami spektroskopii stacjonarnej własności optycznych organicznych związków domieszkowanych renem i wykorzystywanych w konstrukcji organicznych emiterów światła<sup>37</sup>. Byłam również wykonawcą w kilku grantach kierowanych przez prof. dr hab. S. Maćkowskiego. Aktualnie pracujemy nad kończącym się już projektem polsko – tureckim dotyczącym badań nad własnościami optycznymi i elektrochemicznymi nanostrukturyzowanych bioelektrod złożonych z wielowarstwy PSI-LHCI przyłączonej w zorientowany sposób do powierzchni grafenu<sup>38</sup> i wpływu warstwy srebrnych wysp znajdującej się pod grafenem na wydajność elektrochemiczną takiej bioelektrody.

## Literatura:

- (1) Statistics | World - Total Primary Energy Supply (TPES) by source (chart) <https://www.iea.org/statistics> (accessed Jan 24, 2019).
- (2) Blankenship, R. E.; Tiede, D. M.; Barber, J.; Brudvig, G. W.; Fleming, G.; Ghirardi, M.; Gunner, M. R.; Junge, W.; Kramer, D. M.; Melis, A.; et al. Comparing Photosynthetic and Photovoltaic Efficiencies and Recognizing the Potential for Improvement. *Science* **2011**, 332 (6031), 805–809. <https://doi.org/10.1126/science.1200165>.
- (3) *Handbook of Photosynthesis, Second Edition*, 2nd ed.; Pessarakli, M., Ed.; CRC Press, 2005.
- (4) Govorov, A. O.; Carmeli, I. Hybrid Structures Composed of Photosynthetic System and Metal Nanoparticles: Plasmon Enhancement Effect. *Nano Lett.* **2007**, 7 (3), 620–625. <https://doi.org/10.1021/nl062528t>.
- (5) Terasaki, N. PS-I and PS-II on Electrodes for Energy Generation and Photo-Sensor. *Lecture Notes in Energy* **2016**, 32, 419–449. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25400-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25400-5_25).
- (6) Swainsbury, D. J. K.; Friebe, V. M.; Frese, R. N.; Jones, M. R. Evaluation of a Biohybrid Photoelectrochemical Cell Employing the Purple Bacterial Reaction Centre as a Biosensor for Herbicides. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 58, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.050>.
- (7) Ocakoglu, K.; Krupnik, T.; Van, D. B.; Harputlu, E.; Gullo, M. P.; Olmos, J. D. J.; Yildirimcan, S.; Gupta, R. K.; Yakuphanoglu, F.; Barbieri, A.; et al. Photosystem I-Based Biophotovoltaics on

- Nanostructured Hematite. *Advanced Functional Materials* **2014**, *24* (47), 7467–7477. <https://doi.org/10.1002/adfm.201401399>.
- (8) Nguyen, K.; Bruce, B. D. Growing Green Electricity: Progress and Strategies for Use of Photosystem I for Sustainable Photovoltaic Energy Conversion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2014**, *1837* (9), 1553–1566. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.013>.
  - (9) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman Nanotechnology. *Gold Bull* **2007**, *40* (4), 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>.
  - (10) Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface Chemistry and Aspect Ratio Mediated Cellular Uptake of Au Nanorods. *Biomaterials* **2010**, *31* (30), 7606–7619. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.051>.
  - (11) Bharadwaj, P.; Novotny, L. Spectral Dependence of Single Molecule Fluorescence Enhancement. *Opt. Express* **2007**, *15* (21), 14266–14274. <https://doi.org/10.1364/OE.15.014266>.
  - (12) Masson, J.-F. Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. *ACS Sens.* **2017**, *2* (1), 16–30. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00763>.
  - (13) Liang, Z.; Sun, J.; Jiang, Y.; Jiang, L.; Chen, X. Plasmonic Enhanced Optoelectronic Devices. *Plasmonics* **2014**, *9* (4), 859–866. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9682-7>.
  - (14) Friebe, V. M.; Delgado, J. D.; Swainsbury, D. J. K.; Gruber, J. M.; Chanaewa, A.; van Grondelle, R.; von Hauff, E.; Millo, D.; Jones, M. R.; Frese, R. N. Plasmon-Enhanced Photocurrent of Photosynthetic Pigment Proteins on Nanoporous Silver. *Advanced Functional Materials* **2016**, *26* (2), 285–292. <https://doi.org/10.1002/adfm.201504020>.
  - (15) Sun, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Herricks, T.; Xia, Y. Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO<sub>3</sub> with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly(Vinyl Pyrrolidone). *Chemistry of Materials* **2002**, *14* (11), 4736–4745.
  - (16) Kondo, M.; Iida, K.; Dewa, T.; Tanaka, H.; Ogawa, T.; Nagashima, S.; Nagashima, K. V. P.; Shimada, K.; Hashimoto, H.; Gardiner, A. T.; et al. Photocurrent and Electronic Activities of Oriented-His-Tagged Photosynthetic Light-Harvesting/Reaction Center Core Complexes Assembled onto a Gold Electrode. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (2), 432–438. <https://doi.org/10.1021/bm201457s>.
  - (17) Ataka, K.; Giess, F.; Knoll, W.; Naumann, R.; Haber-Pohlmeier, S.; Richter, B.; Heberle, J. Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of His-Tagged Cytochrome c Oxidase to a Gold Electrode: In Situ Monitoring by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (49), 16199–16206. <https://doi.org/10.1021/ja045951h>.
  - (18) Badura, A.; Esper, B.; Ataka, K.; Grunwald, C.; Wöll, C.; Kuhlmann, J.; Heberle, J.; Rögner, M. Light-Driven Water Splitting for (Bio-)Hydrogen Production: Photosystem 2 as the Central Part of a Bioelectrochemical Device. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, *82* (5), 1385–1390. <https://doi.org/10.1562/2006-07-14-RC-969>.
  - (19) Haxo, F. T.; Kycia, J. H.; Somers, G. F.; Bennett, A.; Siegelman, H. W. Peridinin-Chlorophyll a Proteins of the Dinoflagellate *Amphidinium Carterae* (Plymouth 450) 1. *Plant Physiol.* **1976**, *57* (2), 297–303.
  - (20) Hofmann, E.; Wrench, P. M.; Sharples, F. P.; Hiller, R. G.; Welte, W.; Diederichs, K. Structural Basis of Light Harvesting by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from *Amphidinium Carterae*. *Science* **1996**, *272* (5269), 1788–1791. <https://doi.org/10.1126/science.272.5269.1788>.
  - (21) Olejnik, M.; Krajnik, B.; Kowalska, D.; Twardowska, M.; Czechowski, N.; Hofmann, E.; Mackowski, S. Imaging of Fluorescence Enhancement in Photosynthetic Complexes Coupled to Silver Nanowires. *Applied Physics Letters* **2013**, *102* (8), 083703–083703–083705. <https://doi.org/doi:10.1063/1.4794171>.
  - (22) Czechowski, N.; Nyga, P.; Schmidt, M.; Brotosudarmo, T.; Scheer, H.; Piatkowski, D.; Mackowski, S. Absorption Enhancement in Peridinin–Chlorophyll–Protein Light-Harvesting

- Complexes Coupled to Semicontinuous Silver Film. *Plasmonics* **2012**, 7 (1), 115–121. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9283-7>.
- (23) Olejnik, M. Biokoniugacja nanostruktur metalicznych z kompleksami fotosyntetycznymi, Rozprawa doktorska, Toruń, 2013.
- (24) Haniewicz, P.; Abram, M.; Nosek, L.; Kirkpatrick, J.; El-Mohsnawy, E.; Olmos, J. D. J.; Kouřil, R.; Kargul, J. M. Molecular Mechanisms of Photoadaptation of Photosystem I Supercomplex from an Evolutionary Cyanobacterial/Algal Intermediate. *Plant Physiology* **2018**, 176 (2), 1433–1451. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01022>.
- (25) Kargul, J.; Janna Olmos, J. D.; Krupnik, T. Structure and Function of Photosystem I and Its Application in Biomimetic Solar-to-Fuel Systems. *J. Plant Physiol.* **2012**, 169 (16), 1639–1653. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.018>.
- (26) Kowalska, D.; Steer, R. P. Quenching of MgTPP and ZnTPP Fluorescence by Molecular Oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, 195 (2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.10.011>.
- (27) Tripathy, U.; Kowalska, D.; Liu, X.; Velate, S.; Steer, R. P. Photophysics of Soret-Excited Tetrapyrroles in Solution. I. Metalloporphyrins: MgTPP, ZnTPP, and CdTPP. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112 (26), 5824–5833. <https://doi.org/10.1021/jp801395h>.
- (28) Kowalska, D.; Liu, X.; Tripathy, U.; Mahammed, A.; Gross, Z.; Hirayama, S.; Steer, R. P. Ground- and Excited-State Dynamics of Aluminum and Gallium Corroles. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (6), 2670–2676. <https://doi.org/10.1021/ic900056n>.
- (29) Kowalska, D.; Haro-González, P.; Martín, I. R.; Cáceres, J. M. Analysis of the Optical Properties of Er<sup>3+</sup>-Doped Strontium Barium Niobate Nanocrystals Using Time-Resolved Laser Spectroscopy. *Appl. Phys. A* **2010**, 99 (4), 771–776. <https://doi.org/10.1007/s00339-010-5716-y>.
- (30) Haro-González, P.; Martín, I. R.; Martín, L. L.; Kowalska, D.; Cáceres, J. M. Crystallization Effect on Tm<sup>3+</sup>–Yb<sup>3+</sup> Codoped SBN Glass Ceramics. *Optical Materials* **2010**, 32 (10), 1385–1388. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2010.03.014>.
- (31) Olejnik, M.; Krajnik, B.; Kowalska, D.; Lin, G.; Mackowski, S. Spectroscopic Studies of Plasmon Coupling between Photosynthetic Complexes and Metallic Quantum Dots. *J. Phys.: Condens. Matter* **2013**, 25 (19), 194103. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/19/194103>.
- (32) Szalkowski, M.; Ashraf, K. U.; Lokstein, H.; Mackowski, S.; Cogdell, R. J.; Kowalska, D. Silver Island Film Substrates for Ultrasensitive Fluorescence Detection of (Bio)Molecules. *Photosyn. Res.* **2016**, 127 (1), 103–108. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0178-x>.
- (33) Maćkowski, S.; Czechowski, N.; Ashraf, K. U.; Szalkowski, M.; Lokstein, H.; Cogdell, R. J.; Kowalska, D. Origin of Bimodal Fluorescence Enhancement Factors of Chlorobaculum Tepidum Reaction Centers on Silver Island Films. *FEBS Lett* **2016**, 590 (16), 2558–2565. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12292>.
- (34) Czechowski, N.; Lokstein, H.; Kowalska, D.; Ashraf, K.; Cogdell, R. J.; Mackowski, S. Large Plasmonic Fluorescence Enhancement of Cyanobacterial Photosystem I Coupled to Silver Island Films. *Applied Physics Letters* **2014**, 105 (4), 043701. <https://doi.org/10.1063/1.4891856>.
- (35) Prymaczek, A.; Cwierzona, M.; Grzelak, J.; Kowalska, D.; Nyk, M.; Mackowski, S.; Piatkowski, D. Remote Activation and Detection of Up-Converted Luminescence via Surface Plasmon Polaritons Propagating in a Silver Nanowire. *Nanoscale* **2018**, 10 (26), 12841–12847. <https://doi.org/10.1039/C8NR04517H>.
- (36) Nazir, R.; Balčiūnas, E.; Buczyńska, D.; Bourquard, F.; Kowalska, D.; Gray, D.; Maćkowski, S.; Farsari, M.; Gryko, D. T. Donor–Acceptor Type Thioxanthenes: Synthesis, Optical Properties, and Two-Photon Induced Polymerization. *Macromolecules* **2015**, 48 (8), 2466–2472. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00336>.
- (37) Klemens, T.; Świtlicka-Olszewska, A.; Machura, B.; Grucela, M.; Janeczek, H.; Schab-Balcerzak, E.; Szlapa, A.; Kula, S.; Krompiec, S.; Smolarek, K.; et al. Synthesis, Photophysical Properties and Application in Organic Light Emitting Devices of Rhenium(I) Carbonyls Incorporating

Functionalized 2,2':6',2''-Terpyridines. *RSC Adv.* **2016**, 6 (61), 56335–56352.

<https://doi.org/10.1039/C6RA08981J>.

- (38) Kiliszek, M.; Harputlu, E.; Szalkowski, M.; Kowalska, D.; Unlu, C. G.; Haniewicz, P.; Abram, M.; Wiwatowski, K.; Niedziółka-Jönsson, J.; Maćkowski, S.; et al. Orientation of Photosystem I on Graphene through Cytochrome C553 Leads to Improvement in Photocurrent Generation. *Journal of Materials Chemistry A* **2018**, 6 (38), 18615–18626.  
<https://doi.org/10.1039/C8TA02420K>.

Dorota Kowalska