Autoreferat

Joanna Grzyb

Wrocław, 2017

Spis treści

1. Dane osobowe i kontaktowe 2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe 2
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych 2
3. Sumaryczne wskaźniki dorobku naukowego habilitanta 3
3. Wykaz prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego ze wskazaniem udziału habilitanta 3
4. Omówienie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego 5
Wprowadzenie 5
Omówienie wyników wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego 8
Białka projektowane *de novo* do badania układów transportu elektronów 8
Transport elektronów w układach bionanohybrydowych 11
Perspektywy dalszych badań 16
Cytowana literatura 17
5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze 19
Projekty badawcze realizowane w roli kierownika 22
Doświadczenie naukowe zdobyte w kraju i za granicą 22
Nagrody i wyróżnienia: 22
Wykłady zaproszone: 23
Pozostałe wygłoszone wykłady, prezentacje konferencyjne i seminaria 23
Pozostałe publikacje, niewchodzące w zakres przedstawianego osiągnięcia naukowego, w czasopismach posiadających Impact Factor 23
Rozdziały w książkach 25
Doniesienia konferencyjne w formie posterowej 25
6. Osiągnięcia organizacyjne i dydaktyczne 27

1. Dane osobowe i kontaktowe

Imię i nazwisko: Joanna Grzyb

Adres do kontaktu:

Zakład Biofizyki
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
email: joanna.grzyb@uwr.edu.pl
tel: 505147798

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister – Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, kierunek biologia
Obrona: 11 czerwca 2002
Promotor: prof. dr hab. Stanisław Więckowski
Tytuł pracy magisterskiej: Charakterystyka wstępna miejsca wiązania chinonów w obrębie cząsteczki oksydoreduktazy ferredoksyna:$NADP^+$

Doktor – Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, specjalność biochemia
Obrona: 12 czerwca 2007
Promotor: prof. dr hab. Kazimierz Strzałka
Tytuł pracy doktorskiej: Wpływ kadmu na oksydoreduktazę ferredoksyna:NADP+ - molekularny mechanizm inhibicji

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.09 2006 - 30.06.2007, asystent, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

01.10.2009 – 30.06.2017, adiunkt, Środowiskowe Laboratorium Fizyki Biologicznej, Instytut Fizyki Polskiej Akademii, aleja Lotników 32/46, 02-668 Warszawa

01.07.2017 – adiunkt, Zakład Biofizyki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław

4. Sumaryczne wskaźniki dorobku naukowego habilitanta

Wskaźniki według bazy Web of Science Core Collection, październik 2017

(ResearcherID: B-4788-2010)

Indeks Hirsha – 10

Liczba publikacji z Impact Factor – 25, w tym 22 prace oryginalne i 3 przeglądowe

Suma Impact Factor – 73.713, suma punktów ministerialnych - 692

Całkowita liczba cytowań – 403, w tym bez autocytowań - 380

5. Wykaz prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego ze wskazaniem udziału habilitanta

Podkreśleniem oznaczono autora korespondencyjnego. Wskaźniki bibliometryczne według stanu na rok publikacji. Liczba cytowań według stanu na październik 2017, baza Web of Science.

*#1 **Grzyb J**, Xu F, Weiner L, Reijerse EJ, Lubitz W, Nanda V, Noy D, De novo design of a non-natural fold for an iron-sulfur protein: Alpha-helical coiled-coil with a four-iron four-sulfur cluster binding site in its central core, Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics (**2010**) 1797:406-413.*

IF=4.864, punkty MNiSW=40, cytowania (bez autocytowań) =33 (31)

Udział habilitanta (35%): Opracowanie procedury ekspresji i oczyszczania białka CCIS, przeprowadzenie procedur mutacji Cys->Ser, opracowanie procedury rekonstytucji, przeprowadzenie charakterystyki holobiałka (spektrometria UV-Vis, sączenie molekularne, dichroizm kołowy), przygotowanie próbek do EPR i udział w pomiarach oraz opracowaniu wyników, przygotowanie próbek do ultrawirowania analitycznego, przygotowanie rysunków, udział w przygotowaniu manuskryptu.

*#2 **Grzyb J**, Xu F, Nanda V, Łuczkowska R, Reijerse E, Lubitz W, Noy D, Empirical and computational design of iron-sulfur cluster proteins, Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics (**2012**) 1817:1256-1262.*

IF=4.864, punkty MNiSW =40, cytowania (bez autocytowań) =16 (15)

Udział habilitanta (40%): Zaprojektowanie białka RCM oraz części badań go dotyczących. Opracowanie procedury ekspresji i oczyszczania białka RCM oraz CCIS2, przeprowadzenie mutacji długiej pętli RCM, opracowanie procedury rekonstytucji obu białek, przeprowadzenie częściowej charakterystyki holobiałka (spektrometria UV-Vis, sączenie molekularne), przygotowanie próbek do EPR oraz udział w pomiarach i interpretacji wyników. Opieka nad magistrantką wykonującą pracę magisterską dotyczącą charakterystyki RCM (w tym, obliczenie stałych wiązania hemu przez RCM i

muteiny). Pozyskanie znaczącej części finansowania (stypendium EMBO, grant Homing PLUS). Przygotowanie manuskryptu jako autor korespondencyjny.

*#3 **Grzyb J,** De Novo Designed Proteins - Perspective Materials for Nanotechnology, Acta Physica Polonica A (**2012**) 122:279-283.*

IF=0.525, punkty MNiSW =15, cytowania (bez autocytowań) =2 (2)

Udział habilitanta (100%): Praca przeglądowa, jednoautorska. W pracy zamieszczone zostały również przykładowe dane z charakterystyki spektralnej białek, wykonane przez habilitanta.

*#4 Szczepaniak K, Worch R, **Grzyb J,** Ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase in junction with CdSe/ZnS quantum dots: characteristics of an enzymatically active nanohybrid, Journal of Physics: Condensed Matter (**2013**) 25:194102.*

IF=2.209, punkty MNiSW =35 cytowania (bez autocytowań) =7 (6)

Udział habilitanta (50%): Zaprojektowanie badań, opieka nad magistrantem wykonującym pracę magisterską dotyczącą optymalizacji wiązania enzymu do koloidalnych kropek kwantowych, przeprowadzenie pomiarów parametrów kinetyki enzymatycznej. Pozyskanie finansowania (grant Homing PLUS, grant Opus). Przygotowanie manuskryptu jako autor korespondencyjny.

*#5 **Grzyb J,** Kalwarczyk E, Worch R, Photoreduction of natural redox proteins by CdTe quantum dots is size-tunable and conjugation-independent, RSC Advances (**2015**) 5:61973-61982.*

IF=3.289, punkty MNiSW =35, cytowania (bez autocytowań) =2 (0)

Udział habilitanta (60%): Zaprojektowanie badań, przygotowanie próbek do wszystkich oznaczeń, wykonanie badań kinetyki fotoredukcji oraz sączenia molekularnego, udział w pomiarze potencjału zeta, opracowanie zbiorcze wyników. Pozyskanie finansowania (grant Lider). Przygotowanie manuskryptu jako autor korespondencyjny.

*#6 Darżynkiewicz ZM, Pędziwiatr M, **Grzyb J,** Quantum dots use both LUMO and surface trap electrons in photoreduction, Journal of Luminescence (**2017**) 183:401–409.*

IF=2.74, punkty MNiSW =35, cytowania (bez autocytowań) =0 (0)

Udział habilitanta (50%): Opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie części pomiarów TRES oraz wygaszania fluorescencji, opracowanie danych uzyskanych z przeprowadzonych pomiarów. Pozyskanie finansowania (grant Lider). Udział w przygotowaniu manuskryptu jako autor korespondencyjny.

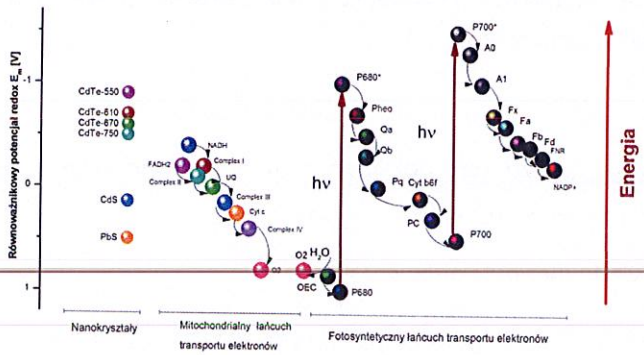
Suma IF=18.491, suma punktów MNiSW =195, łączne cytowania (bez autocytowań) = 60 (54)

6. Omówienie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

***Tytuł osiągnięcia:* Sztuczne układy do badania transportu elektronów – projektowanie i charakteryzacja.**

Wprowadzenie

Transfer elektronów między kolejnymi cząsteczkami to zjawisko, który leży u podstaw wielu procesów życiowych. W najprostszej możliwej wersji transfer elektronów rozpatrujemy między dwoma cząsteczkami: donorem, oddającym elektron, oraz akceptorem, przyjmującym elektron. Automatycznie więc reakcja zachodzi ze zmianą stopnia utlenienia – donor jest utleniany, natomiast akceptor redukowany. Dwa najważniejsze naturalne procesy zachodzące z transportem elektronów to oddychanie mitochondrialne i fotosynteza. W obu przypadkach transport elektronów odbywa się przez szereg przekaźników hydrofobowych i hydrofilowych, a efektem jest wytworzenie gradientu elektrochemicznego (inaczej: siły protonomotorycznej) w poprzek błony, co następnie napędza syntezę ATP. W obu rozważanych przypadkach występują reakcje jednoelektronowe oraz dwuelektronowe, oraz punkty (bramki), w których dochodzi do zmiany z jedno- na dwuelektronowy przekaźnik (i odwrotnie). Takim punktem jest między innymi fotosyntetyczna reakcja redukcji $NADP^+$ do NADPH, w której donorem elektronowym jest jednoelektronowo zredukowana ferredoksyna (Fd). Reakcję tę katalizuje oksydoreduktaza ferredoksyna:NADP+ (FNR) a bramkowanie elektronów jest możliwe dzięki kofaktorowi flawoadeninowemu (FAD), który może ulegać stopniowej, dwuelektronowej redukcji [1]. Wprowadzenie czynników zewnętrznych, które również mogą być donorami lub akceptorami elektronów, powoduje, że naturalne procesy mogą ulec zaburzeniu. Takie zjawisko może być niepożądane, jako skutek uboczny zanieczyszczenia środowiska. Jednakże, w ten sam – kontrolowany – sposób możemy wpływać na przebieg metabolizmu komórki.



Rys.1 Schemat przedstawiający transport elektronów w błonach mitochondrialnych i fotosyntetycznych, wraz z porównaniem ich równoważnikowego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (E_m). Schemat nie uwzględnia cyklu Q oraz możliwych wersji cyklicznego transportu elektronów UQ – ubichinon, Cyt c – cytochrom c, OEC – kompleks rozkładający wodę, Pheo – feofityna, Q_a i Q_b – chinony Q_a i Q_b w obrębie fotosystemu II, PQ – plastochinon, Cyt b_6f – kompleks cytochromu b_6f; A_0, A_1, F_x, F_a, F_b – kolejne centra redoks w obrębie fotosystemu I; PC - plastocyjanina, Fd - ferredoksyna, FNR – oksydoreduktaza ferredoksyna:$NADP^+$. Na schemacie zaznaczono również wartości E_m dla wybranych nanokryształów. Przygotowane w oparciu o [2-5].

W szlakach (łańcuchach) transportu elektronów bierze udział więcej niż dwie cząsteczki. Rys.1 pokazuje schematycznie układ kolejnych elementów w szlaku transportu elektronów w chloroplastach i mitochondriach, wraz z zaznaczeniem równoważnikowego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (E_m) oraz energii kolejnych przekaźników. Dokładne omówienie tych procesów znajdzie Czytelnik w podręcznikach i pracach przeglądowych, na przykład [2, 3].

Pojedyncze pary red-oks również funkcjonują w żywych komórkach. Zaliczyć tu można reakcję katalizowaną przez oksydazę glukozy [6] (utlenienie glukozy do glukonolaktonu, przy jednoczesnej redukcji tlenu do nadtlenku wodoru) czy też reakcje redukcji protochlorofilidu do chlorofilidu, zachodzącą dzięki obecności światłozależnej oksydoreduktazy protochlorofilid:NADPH lub światłoniezależnej oksydoreduktazy protochlorofilid:ferredoksyna [7]. W każdym jednakże przypadku należy pamiętać, że donory i akceptory tych reakcji muszą być zregenerowane w innych reakcjach, a więc w praktyce, mamy do czynienia z siecią powiązań oksydacyjno-redukcyjnych. Zrozumienie więc, a następnie racjonalne wykorzystanie, tak skomplikowanego układu wymaga stosowania w badaniach określonych układów uproszczonych.

Przedstawione dzieło dotyczy dwóch typów układów, umożliwiających badania transportu elektronów. Pierwszy typ to białka projektowane *de novo* (zwane również sztucznymi białkami). Drugi natomiast to układy bionanohybrydowe – zawierające białka naturalne (izolowane z materiału roślinnego lub pozyskane z ekspresji bakteryjnej) oraz elementy abiotyczne – w moim przypadku były to koloidalne kropki kwantowe.

Białka projektowane de novo są omówione szeroko w wielu już opracowaniach [8-10]. Częściowo, pisałam o tym temacie także w pracy przeglądowej, która stanowi część prezentowanego dzieła [praca #3]. Generalnie, przez białka projektowane *de novo* rozumiemy takie, których sekwencja aminokwasowa została opracowana całkowicie przez badacza w ten sposób, aby zapewnić stabilizację struktury i spełnianie określonej funkcji. Jednocześnie, użycie sekwencji niehomologicznych z naturalnymi ma na celu doprowadzenie do wyłączenia niechcianych w danej sytuacji własności cząsteczki białka, chociażby glikozylacji zmieniającej ładunek, reakcji ubocznych czy też podatności na degradację. Pierwsze białka tego typu jako „makiety białkowe" wykorzystywały w badaniach grupy W. deGrado i L. Duttona [11]. Ze względów technicznych – synteza peptydu odbywała się wtedy jedynie metodami chemicznymi - pierwsze makiety były złożone z czterech identycznych helis, o długości kilkudziesięciu aminokwasów każda. Organizacja w homotetramer odbywała się spontanicznie w roztworze. Obecnie możemy uzyskać znacznie bardziej skomplikowane sekwencje dzięki ekspresji heterologicznej nawet bardzo długich genów [12, 13]. Makiety białkowe wykorzystywane są nadal do badania białek wiążących hem oraz inne porfiryny [12, 14-16], a także centra metaliczne (w tym, żelazo-siarkowe) [17-19]. Projektowanie *de novo* służy również do uzyskania nowych, funkcjonalnych motywów – w szczególności interesujące są enzymy katalizujące reakcje do tej pory możliwe jedynie dzięki katalizie *stricte* chemicznej [13, 20, 21]. Za pomocą makiet białkowych z generacji HP (nazwa to akronim od Hydrophylic Protein, wprowadzony przez L. Duttona) [15] bada się na przykład multimeryczne układy chlorofili [16], stanowiące w naturze podstawę funkcjonowania zarówno specjalnej pary chlorofili w fotosystemach, jak i fotosyntetycznych kompleksów zbierających światło (LHC). Inne białko projektowane *de novo*, SCPZnI3, posłużyło do pokazania zmian w stałej dielektrycznej, towarzyszących fotoindukowanemu transferowi elektronów [22].

Strategie projektowania są przynajmniej dwojakie – ślepo opieramy się na algorytmie komputerowym, który ma za zadanie zoptymalizować sekwencję do zadanej struktury, lub też – w oparciu o intuicję biochemiczną - narzucamy sekwencję. W praktyce obecnie najefektywniejsze jest połączenie obu podejść – narzucenie pewnych więzów znacząco usprawnia nawet najefektywniejszemu serwerowi pracę obliczeniową. Być może w przyszłości, w miarę doskonalenia zestawów danych wejściowych algorytmów, poprawiona zostanie ich efektywność, i będą funkcjonować bez znaczącego wkładu intuicyjnego.

Układy bionanohybrydowe według najprostszej z definicji składają się z przynajmniej jednego elementu biologicznego (tutaj: białka) oraz elementu abiotycznego – tutaj będą to koloidalne kropki kwantowe, choć możliwe są tez hybrydy z innymi typami nanostruktur [23, 24]. Koloidalne kropki kwantowe (nazywane dalej QD, od ang. *Quantum Dot*) należą do szerszej grupy materiałów, określanych mianem nanostruktur. Bardzo dobre wprowadzenie do fizyki nanostruktur znajdzie Czytelnik w przetłumaczonym na język polski podręczniku [25]. Generalnie, chodzi o szereg substancji, wytworzonych przede wszystkim przez człowieka w ramach zamierzonych procedur laboratoryjnych, które to substancje maja rozmiary nanometrowe. Przynajmniej jeden z wymiarów nanostruktury nie przekracza 100 nm. Struktury te to przede wszystkim metale (srebro, złoto, miedź), tlenki metali (ZnO) i sole metali (np. tellurek kadmu), ale znane są także nanomateriały zbudowane z niemetali (różnorakie formy węglowe, krzem i tlenki krzemu). Nanostruktury mogą być wbudowane w większe objętościowo elementy makroskopowe (np. epitaksjalne kropki kwantowe). Koloidalne QD natomiast tworzą stabilne zawiesiny czy to w wodzie i buforach wodnych czy w rozpuszczalnikach organicznych. Zawiesiny takie makroskopowo mają własności roztworów. Wspomniane nanokryształy są w przybliżeniu sferyczne, zbudowane z materiałów półprzewodnikowych, np. tellurku kadmu, selenku kadmu czy selenku cynku. Nazwa ?"kropka kwantowa"? nawiązuje do kwazizerowego wymiaru nanokryształów, związanego z przestrzennym ograniczeniem (zamrożeniem ruchu ich elektronów, poprzez odpowiednio dobraną barierę przestrzenna (dla koloidalnych QD to po prostu zewnętrzna powierzchnia. Fizyka materiału półprzewodnikowego, z którego zbudowana jest QD, powoduje, że jest on (w porównaniu z fluoroforami organicznymi) odporny na fotoblaknięcie. Z tych samych powodów QD osiągać mogą wysokie wydajności kwantowe fluorescencji, w zakresie 30-80% w zależności od materiału i sposobu syntezy [26, 27]. Układy nanohybrydowe w najprostszej wersji służą jedynie jako sposób wyznakowania fluorescencyjnego elementu biologicznego (np. przeciwciała); ciekawsze, i naukowo bardziej przyszłościowe, jest badanie współdziałania obu elementów. W szczególności jest to przekaz energii, zarówno na sposób promienisty jak i bezpromienisty, z przekazem elektronów włącznie. QD mogą bowiem wykazywać własności oksydacyjno-redukcyjne. Ich E_m zależne będzie od materiału, z jakiego są wykonane, ale również od ich rozmiaru. Efekt powiązania E_m z rozmiarem wynika również z szerokości przerwy energetycznej, podobnie jak położenie maksimum emisji fluorescencji tych nanostruktur. Przykładowo, używane przeze mnie kropki kwantowe z tellurku kadmu, o średnicach od 2.5 do 7 nm, mają E_m w zakresie -1 V do -0.5 V (pomiar wykonany przeze mnie, opisany w pracy #5), czyli mogą być zarówno donorami jak i akceptorami dla elementów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. W przypadku mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów większość QD z CdTe spełniałaby rolę donora. Zastosowanie innych niż CdTe materiałów pozwala na uzyskanie wyższych potencjałów redoks [4, 5], a więc część QD może być akceptorami także w mitochondrialnym transporcie elektronów. Transport elektronów z QD i innych nanocząstek został opisany dla drobnocząsteczkowych akceptorów [28-32] oraz nielicznych białek [33]. Mechanizmy rządzące tymi zjawiskami są dopiero badane, w co wpisują

się również moje prace. Przekaz energii bez transferu elektronów, na przykład według mechanizmu Försterowskiego, jest szerzej badany dla kompleksów barwnikowych (głównie fotosyntetycznych) w połączeniu z nanostrukturami [23, 34, 35].

Omówienie wyników wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego

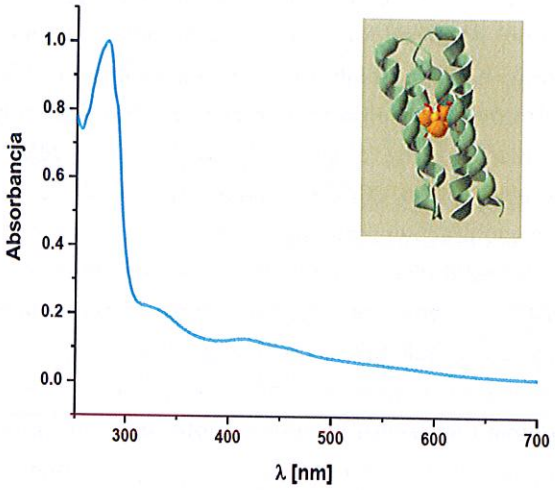
Białka projektowane *de novo* do badania układów transportu elektronów

Do grupy pierwszej układów do badania transportu elektronów należy grupa białek CCIS (Coiled-Coil Iron Sulphur protein) oraz białka generacji RCM (Redox-Chain Maquette). CCIS [praca #1] zostało zaprojektowane całkowicie *de novo* i nie ma naturalnie występujących homologów co do sposobu koordynacji centrum żelazo-siarkowego. Rozpoczęcie prac nad takim motywem białkowym przez mojego opiekuna stażu podoktoranckiego, dr. D. Noya z Instytutu Weizmanna (obecnie z Nigal-Galilee Institute) w Izraelu, wynikało z potrzeby uzyskania elementów do łączenia źródła elektronów z błon fotosyntetycznych (np: fotosystemu I) a elementów akceptorowych, natywnie z fotosystemem niezwiązanych, np. hydrogenazy. Takie połączenie, w którym CCIS spełniałoby funkcję kabla, przekierowuje równowagę reakcji katalizowanej przez akceptor silnie w stronę pożądanego produktu. Dzieje się tak dzięki stałemu dopływowi elektronów, spełniającemu w takiej reakcji rolę substratu. Element spełniający role kabla powinien móc zarówno przewodzić elektrony jak i być wydłużany w pewnym zakresie, na przykład poprzez zwielokrotnianie motywu. Przewodzenie elektronów możliwe jest dzięki obecności centrum Fe-S. Umiejscowienie tego centrum w hydrofobowym rdzeniu wiązki czterech helis chroni go przed kontaktem z otoczeniem wodnym, a więc minimalizuje straty w przewodnictwie. Czysto helikalne białko to również podstawa dalszego wydłużania struktury, poprzez powtarzanie elementów. Alfa-helisa to element struktury białka, który jest najbardziej stabilny, i jednocześnie może mieć znaczną długość. Zaprojektowanie sekwencji białkowej CCIS1, jak również kolejnych jego generacji (CCIS1a, CCIS2a, CCIS2b, CCIS2c i CCIS2d, [praca #2]) zostało wykonane przez dr V. Nandę i jego współpracowników, natomiast moim zadaniem było uzyskanie białka w ekspresji bakteryjnej, rekonstytucja z centrum żelazo-siarkowym oraz przeprowadzenie szerokiej charakterystyki biofizycznej. Centra żelazo-siarkowe rekonstytuowałam w warunkach beztlenowych, z podstawowych substratów: soli żelaza ($FeCl_3$ lub $Fe(NO_3)_3$) oraz źródła siarki (Na_2S). Klaster [4Fe4S] powstaje spontanicznie w temperaturze pokojowej, przy zapewnieniu odpowiednich ligandów tiolowych. Taka rolę spełnia ditiotreitol lub β-merkaptoetanol, a następnie ich funkcję przejmują grupy tiolowe łańcucha białkowego. Przechwycenie Fe-S przez białko jest możliwe dzięki pozytywnej zmianie entropii (uwolnione zostają cztery pojedyncze ligandy tiolowe oraz cząsteczki wody, tworzące sferę koordynacyjną). Udało się rzeczywiście uzyskać białka zgodne z projektem pod względem struktury drugorzędowej, oraz wprowadzić centra żelazo-siarkowe (Rys. 2). Były to, zgodnie z oczekiwaniami, centra typu [4Fe4S], co potwierdziłam techniką EPR – zarówno uzyskując charakterystyczne, rombiczne widmo o stałych g = 1.90, 1.97 and 2.04, jak i wykazując szybką relaksację sygnału (widmo zanika dla temperatury powyżej 70 K). Wydajność wprowadzenia centrum Fe-S była różna w zależności od białka i wymagała optymalizacji procedur. W szczególności, uzyskanie przeze mnie najwyższej wydajności rekonstytucji przy niskim stężeniu białka i wysokim stężeniu „wolnych centrów Fe-S", co było niezbędne dla białek generacji CCIS2, wskazuje, że szybkość

wiązania Fe-S przez peptyd (k_{on}) jest stosunkowo niska. Jednakże, po związaniu centrów kompleks pozostaje stabilny. Dzięki technice dichroizmu kołowego w UV potwierdziłam przyjęcie przez CCIS helikalnej struktury drugorzędowej, w szczególności w obecności Fe-S. Analiza rozmiaru cząsteczek, wykonana przeze mnie metodą sączenia molekularnego, pokazała, że otrzymałam dwie równorzędne konfiguracje – monomeryczną, oraz dimeryczną, powstałą przez wymianę domen pomiędzy monomerami (ang. domain swapping). Wymianę domen potwierdziliśmy równoległą analizą za pomocą ultrawirowania analitycznego. Częściowo wymianę domen udało mi się zahamować poprzez zastosowanie wysokiej siły jonowej. Powstający dimer wiązał dwa centra Fe-S, co wykazałam wprowadzając mutacje Cys-Ser w miejscu dwóch z czterech reszt cysteinowych. Powstanie kolejnych generacji CCIS wynikało więc z dwóch zauważonych problemów. Były to:

- mieszana koordynacja centrum żelazo-siarkowego przez białko i przez wolne ligandy tiolowe, obecne przy syntezie, co powodowało, że przynajmniej jedna z reszt cysteinowych białka pozostawała wolna, natomiast centrum FeS wykazywało zwiększoną wrażliwość na tlen i rozcieńczanie; zaproponowanym rozwiązaniem było wzmocnienie sfery koordynacyjnej FeS poprzez dodatkową strefę wiązań wodorowych.

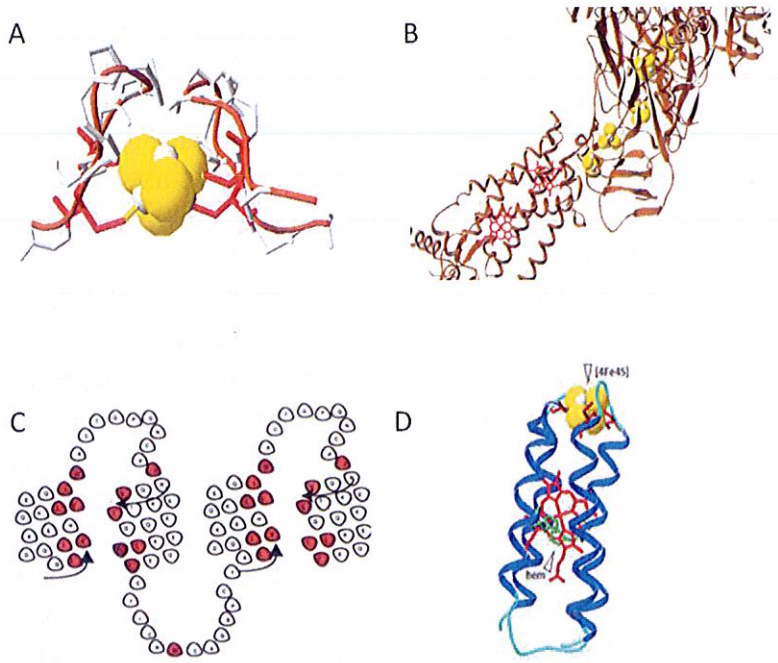
- powstawanie dimeru poprzez zmianę konformacji wzajemnej fragmentów białka. Ponieważ tak powstały dimer wiązał dwa centra Fe-S, więc pośrednio był też dowodem na możliwość propagacji struktury i uzyskania długiego kabla („zazębianie się ogniw"). Zaproponowanym rozwiązaniem było wprowadzenie kilku wariantów oddziaływań, głównie elektrostatycznych, mających stabilizować właściwe ułożenie helis.



Rys.2 Widmo absorbcji zrekonstruowanego holobiałka CCIS1 w formie utlenionej, z widocznymi charakterystycznymi maksimami świadczącymi o obecności centrum 4Fe4S. Wstawka: wizualizacja struktury CCIS.

Uzyskane białko CCIS2b rzeczywiście wykazywało poprawioną stabilność i monomeryczność, jednakże w żadnym przypadku nie udało się uzyskać zwiększonej odporności na tlen. Równoległa strategia, zastosowana przez badaczy z grupy prof. G. Ghirlandy, pozwoliła uzyskać sztuczne białko DSD-Fdm wiążące dwa centra [4Fe4S] w obrębie trójhelisowego homodimeru [19] i pokazać transfer elektronów pomiędzy nim a cytochromem c [36]. Szczegóły projektu - w tym użycie trzech helis w

miejsce czterech, a co za tym idzie – zmniejszenie hydrofobowego rdzenia – powodują, że białko to ma prawdopodobnie mniejszą stabilność niż CCIS.



Rys.3. Struktury wzorcowe oraz efekt końcowy projektowania RCM A) Miejsce Fx fotosystemu I, z symetrycznym ułożeniem pętli oraz reszt cysteinowych (zaznaczone na czerwono) B) reduktaza fumaranowa ze związanym hemem (czerwony) oraz centrami 4Fe4S (żółte) C) końcowa sekwencja RCM z zaznaczonymi na czerwono ugrupowaniami hydrofobowymi D) model RCM2 ze skróconą długą pętlą.

Drugie z białek, RCM, zostało zaprojektowane przeze mnie metodą intuicyjną (Rys. 3) [praca #2]. Rdzeń białka również tworzy wiązka czterech helis, z hydrofobowym wnętrzem. W centralnej części wiązki znajduje się miejsce dla kofaktora hemowego. Za to wiązanie odpowiadają dwie reszty histydynowe, umiejscowione odpowiednio na helisie 1 i helisie 3. W odpowiadających im miejscach na helisach 2 i 4 znajdują się reszty glicynowe. Tak małe ugrupowania aminokwasowe powodują, że pierścień porfirynowy ma odpowiednią przestrzeń pomiędzy helisami. W układzie aminokwasów na helisach uwzględniony został układ hydrofobowe-hydrofilowe, oraz dodatkowo – wprowadzone zostały ładunki przeciwne mające stabilizować helisę. Dodatkowym wymogiem było uzyskanie punktu izoelektrycznego białka w pobliżu pH 8, co miało być w przyszłości wykorzystane do uzyskania struktury krystalicznej ze związanym hemem. Miejsca wiążące centra żelazo-siarkowe zostały wprowadzone w pętle pomiędzy helisami. Tym razem wykorzystałam motywy zaczerpnięte z naturalnych białek. Centrum wiązane jest między symetrycznymi pętlami 1 i 3 pochodzi z miejsca wiązania Fx w fotosystemie I. Warto zauważyć, że jest to jeden z nielicznych symetrycznych motywów wiązania Fe-S. W projekcie uwzględniłam również, że aby mógł efektywnie zachodzić transport elektronów pomiędzy oboma kofaktorami, odległość pomiędzy krawędzią pierścienia porfirynowego a centrum Fe-S nie powinna być większa niż 6-8 Å. Dodatkowo, wprowadziłam resztę tryptofanową, której zadaniem jest stabilizowanie konformacji pierścienia porfirynowego. W pierwszej wersji RCM w pętli 2 również wprowadziłam także motyw wiązania Fe-S. Wykorzystałam tu, zgodnie z wcześniej sprawdzonymi wzorcami literaturowymi, zmodyfikowany motyw CxxCxxCx..xC (x - dowolna reszta

aminokwasowa, inna niż cysteina), umieszony na pojedynczej pętli, pomiędzy helisami 2 i 3. Jednakże, nie udało się opracować procedury pozwalającej na wprowadzenie centrum w obu dedykowanych miejscach. Dzięki uzyskanym muteinom pokazałam, że problem stanowi nie tylko obecność reszt cysteinowych w tej pętli (muteina Cys->Ser, RCM1), ale również jej długość. Dla muteiny o pętli skróconej do hydrofilowej sekwencji GGSGGSGG (RCM2) uzyskałam znacznie wyższą wydajność oczyszczania prawidłowo zwiniętego białka. Dla obu mutein pokazałam również wiązanie hemu, centrum Fe-S jak i obu tych kofaktorów jednocześnie. Wyznaczone zostały stałe dysocjacji (K_d) hemu dla wersji wyjściowej (10 μM) i mutein, odpowiednio 2.4±0.8 μM dla RCM1 i 0.36±0.2 μM dla RCM2. Zauważyłam, że efektywność wiązania hemu można podnieść (odpowiednio K_d spada do 0.14±0.03 μM dla RCM1 i 0.23±0.02 μM dla RCM2) po zablokowaniu grup tiolowych. Innymi słowy, pod nieobecność centrum Fe-S część cystein tworzyła mostki disiarczkowe, na tyle zmieniające odległość między helisami, że dopasowanie pierścienia porfirynowego było utrudnione. Badanie za pomocą sączenia molekularnego pozwoliło pokazać, że RCM2 z centrum FeS jest monomerem, natomiast w obecności hemu następuje wymiana domen i dimeryzacja. Przy jednoczesnym wprowadzeniu obu kofaktorów uzyskuje się mieszankę obu konformacji, przy czym monomer zawiera zarówno centrum Fe-S jak i hem. Co ciekawe, w widmie EPR obecny jest sygnał od centrum [4Fe4S] natomiast brak jest sygnału od hemu. Taki wynik pokazuje istnienie sprzężeń między oboma kofaktorami. RCM było w praktyce pierwszym białkiem, w którym dokładnie pokazaliśmy jednoczesne wiązanie obu kofaktorów. Wcześniej opisano makietę ferredoksyny [18], FdM, wbudowaną w pętlę między dwoma helisami wiążącymi również hem (było to białko dimeryczne, z generacji HP). Cytowana praca skupiała się głównie na analizie wiązania centrum Fe-S w obrębie peptydu FdM, natomiast wiązanie hemu zostało jedynie potwierdzone, bez dokładniejszej analizy. Badania RCM rozpoczęłam jeszcze na stażu podoktoranckim w Instytucie Weizmanna i kontynuowałam je dzięki finansowaniu w ramach programu Homing PLUS z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Muteina z krótką, hydrofilową pętlą, jak i wyznaczenie stałych wiązania hemu, było częścią pracy magisterskiej R. Łuczkowskiej (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego), wykonanej pod moim kierunkiem. RCM jest obecnie wykorzystywany w konstruowaniu układów biosensorycznych, jako część pracy pracy doktorskiej mgr M. Łazickiej (Uniwersytet Warszawski) realizowanej w ramach grantu Opus finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

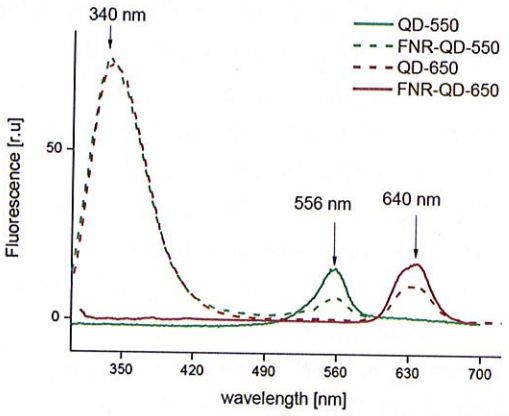
Podsumowując, przedstawione przeze mnie białka projektowane *de novo* posłużyły do zbadania znaczenia sfery koordynacyjnej centrum Fe-S dla stabilności tegoż centrum. Otrzymanie białka CCIS potwierdziło potencjał metod komputerowych w uzyskaniu nieznanych motywów struktur białkowych, eksponując jednakże słabości wynikające z niedostatku danych wejściowych. Jednocześnie, białko uzyskane metodą projektowania intuicyjnego okazało się zgodne z narzuconymi mu założeniami. Oba białka mogą być wprowadzane w badaniach w miejsce naturalnych ferredoksyn i białek hemowych.

Transport elektronów w układach bionanohybrydowych

Drugim typem testowanych przeze mnie układów do badania transportu elektronów są bionanohybrydy. Jak wspomniałam wcześniej, określenie to odnosi się do połączenia elementu biologicznego (najczęściej białka) z abiotyczną nanostrukturą. Pierwszym badanym przeze mnie

wariantem był kompleks kowalencyjny oksydoreduktaza ferredoksyna:$NADP^+$ (FNR) z kropkami kwantowymi CdSe/ZnS [praca #4]. W części (optymalizacja wiązania, wstępne testy aktywności enzymatycznej) cytowany artykuł przedstawia wyniki pracy magisterskiej K. Szczepaniaka (Politechnika Warszawska, 2012), wykonywanej pod moją opieką. Przygotowując połączenie QD-FNR testowaliśmy nanokryształy o średnicy rdzenia CdSe odpowiednio 3 nm (maksimum emisji dla 550 nm) oraz 7 nm (maksimum emisji 650 nm). W badaniach użyliśmy FNR z sinicy *Synechocystis* sp. PCC 6803, oczyszczonej z ekspresji heterologicznej w bakteriach *E.coli*. FNR jest enzymem chloroplastowym, katalizującym redukcję $NADP^+$ do NADPH dzięki elektronom dostarczanym przez zredukowaną ferredoksynę. Uzyskana nanohybryda (Rys.4) była pierwszym literaturowym pokazaniem połączenia enzymu fotosyntetycznego z QD. *In vitro* enzym ten może katalizować redukcję różnego typu związków drobnocząsteczkowych używając NADPH jako źródła siły redukcyjnej. O ile NADPH jest preferowanym substratem (można zastosować również NADH, ale powinowactwo FNR do niego jest kilkusetkrotnie niższe), o tyle dobrych akceptorów jest wiele. Najczęściej stosowany jest żelazicyjanek, który jest analogiem naturalnego akceptora, centrum żelazo-siarkowego ferredoksyny. Drugim zastosowanym akceptorem był dibromotymochinon (DBMIB) – prosty chinon, analog plastochinonu który może być substratem FNR w postulowanym przebiegu cyklicznego transportu elektronów wokół PSI. Mechanizm katalizy enzymatycznej najprościej opisać według schematu jest typu ping-pong – najpierw wiązane jest NADPH, kofaktor flawoadeninowy (FAD) enzymu przejmuje elektron, NADP+ jest uwalniane, a następnie wiązany i redukowany jest końcowy akceptor elektronu. W szerokim zakresie stężeń substratu możliwe jest stosowanie kinetyki Michaelisa-Menten, jednakże konieczne jest rozpatrywanie każdego substratu z osobna, przy stałym stężeniu drugiego substratu. Przy łączeniu QD z FNR wykorzystano łącznik zerowej długości – EDC, którego działanie polega na aktywacji grup karboksylowych (tu stanowiących pokrycie powierzchniowe QD) do reakcji z grupami aminowymi (tu: aminokwasy z powierzchni FNR). Powstanie połączenia potwierdziliśmy nie tylko pomiarami aktywności, ale także poprzez określenie rozmiaru kompleksu. Dla obu typów nanokryształu po przyłączeniu FNR promień zwiększał się o ok. 9 nm, co dosyć dobrze odpowiada dłuższej osi białka (ok. 5 nm FNR + ok. 6 nm dla białka wiążącego maltozę, MBP, pozostawionego jako „metka" z konstruktu genetycznego, a zwiększającego szansę na połączenie FNR-QD bez użycia istotnych dla aktywności aminokwasów). Szybkość reakcji katalizowanej przez QD-FNR była niezależna od oświetlenia, a więc można było założyć, że w tym typie bionanohybrydy QD jest potencjalnie jedynie biernym składnikiem kompleksu i może służyć jako znacznik fluorescencyjny do lokalizacji FNR. Jednakże zauważyłam, że parametry kinetyki enzymatycznej (stała Michaelisa K_m, stała szybkości reakcji k_{cat}) zmieniają się po przyłączeniu do QD (Tab. I). Co ciekawe, zmiana jest zależna nie tylko od rozmiaru QD ale i od typu reakcji katalizowanej przez NADPH (redukcja żelazicyjanku lub redukcja DBMIB). K_m dla DBMIB (przy stałym stężeniu NADPH) malało, ale jedynie dla QD-650. Zmniejszała się również stała katalityczna. Dla redukcji FeCy zarówno K_m jak i k_{cat} zmniejszają się dla koniugatów z oboma typami QD. K_m wyznaczona dla NADPH nie zmienia się, z dokładnością odchyleń standardowych, zarówno dla reakcji przy stałym stężeniu DBMIB jak i FeCy. Maleje jednak szybkość reakcji, mierzona stałą katalityczną Obserwowane zmiany najłatwiej wytłumaczyć poprzez inhibicjęakompetycyjną (ang. uncompetitive), wynikającą z wpływu inhibitora na strukturę enzymu w taki sposób, że utrudnione jest uwalnianie produktu. Możliwe jest także, iż zmiany wynikają z lokalnego zagęszczenia substratu poprzez oddziaływanie z powierzchnią QD. W pracy magisterskiej K. Kur (Politechnika Warszawska, 2016), również realizowanej pod moją opieką i będącej kontynuacją opisanych wyżej badań, próbowaliśmy pokazać że w odpowiednim systemie, transport elektronów jest możliwy bezpośrednio z QD na FNR. Zastosowanie QD z CdTe

oraz FNR pozbawionej domeny MBP pozwoliło uzyskać częściowy sukces – obserwowaliśmy redukcję NADP+ do NADPH, jednakże reakcja była mało wydajna. Równolegle, ukazała się praca [37] pokazująca podobną reakcję, mierzoną pośrednio, poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy alkoholowej utleniającej NADPH. Najprawdopodobniej i w tym układzie produkcja NADPH nie jest wysoce wydajna, a poprawiona zostaje poprzez ciągłe zużywanie substratu, co przesuwa równowagę reakcji. Wydaje się również, że do rzeczywistego wykorzystania podobnej reakcji konieczne jest zapewnienie źródła elektronów, które będzie zabezpieczać QD przed fotodegradacją. Takim układem może być np. system dehydrogenaza glukozy-glukoza. Badania te są przeze mnie kontynuowane. Moje badania wpisują się w szereg ostatnich prac, pokazujących kompleksy białek enzymatycznych z koloidalnymi kropkami kwantowymi (przegląd w [38]). W wielu przypadkach zauważono również zmiany w parametrach kinetyki enzymatycznej. Generalnie, moje wyniki wraz z innymi potwierdzają że związanie białek w obrębie „korony" nanocząstki modyfikuje ich własności. Różne rozmiary nanocząstek, jako matryca pod utworzenie korony białkowej, mogą pośrednio wpływać na przebieg reakcji. Jednym z możliwych powodów jest zmiana stopnia dysocjacji reszt powierzchniowych, poprzez zmianę odległości między nimi [39].



Rys. 4. Widma emisji fluorescencji roztworu QD oraz roztworu koniugatów QD-FNR. Wzbudzenie 280 nm. Zaznaczono charakterystyczne pasmo emisji tryptofanu (~340 nm) oraz pasma emisji QD (odpowiednio, 556 nm i 640 nm).

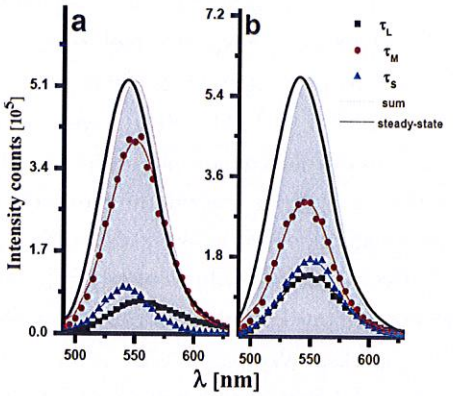
Tabela I. Parametry kinetyki enzymatycznej wyznaczone dla reakcji katalizowanej przez FNR lub FNR w połączeniu z QD.

	Redukcja DBMIB		**Redukcja FeCy**	
	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]
FNR	46.0 ± 5.9	25,9 ± 2,6	7.4 ± 0.4	26.0 ± 6,0
QD550-FNR	46.8 ± 2.8	15.3 ± 7.7	3.6 ± 0.8	11.2 ± 5.8
QD650-FNR	27.5 ± 6.1	4.6 ± 1.3	2.8 ± 0.8	4.4 ± 1.3

Faktyczny transfer elektronów pomiędzy nanocząstką a białkiem udało mi się pokazać dla układu z QD z CdTe [praca #5]. Nanokryształy te nie mają płaszcza, a więc szansa na przekazanie elektronu jest większa niż przy QD typu core/shell. Układ badawczy, składający się z zawiesiny QD oraz roztworu białek w odpowiednim odtlenowanym buforze, był oświetlany, co wymuszało transfer elektronu z wzbudzonej QD na kofaktor białka. Do badań wybrałam dwa białka, których redukcję można łatwo śledzić spektrofotometrycznie – ferredoksynę i cytochrom c. Ferredoksyna (Fd) jest białkiem roślinnym, posiadającym centrum żelazo-siarkowe [2Fe2S] (dalej w skrócie FeS). W naturze spełnia rolę przekaźnika elektronów między fotosystemem I a FNR, ale również uczestniczy w redukcji tioredoksyny i pośrednio, w regulacji homeostazy redoks w stromie chloroplastów. Istnieją również niefotosyntetyczne izoformy Fd, zaangażowane w reakcje biosyntez wymagających czynnika redukującego (np. redukcja azotanu). W badaniach użyliśmy preparatu Fd z liści szpinaku. Cytochrom c (Cyt c) jest białkiem mitochondrialnym, przenoszącym elektrony pomiędzy III a IV kompleksem łańcucha oddechowego. Użyliśmy komercyjnie dostępnego Cyt c, izolowanego z serca wołu. Kofaktorem Cyt c jest hem związany kowalencyjnie. E_m feredoksyny i cytochromu znacznie się różni. Fd ma niski potencjał (-415 mV [40]) a więc jest trudnoredukowalna, natomiast Cyt c (z potencjałem +215 mV [41]), jest redukowany stosunkowo łatwo. Zarówno Fd jak i Cyt c mogą być traktowane jako modele dla szeregu innych białek, wiążących te same kofaktory. Aby pokazać zależność efektywnego E_m QD od jej rozmiaru, użyliśmy czterech typów nanokryształów, o promieniu od 1.3 nm do 3.2 nm i maksimum emisji odpowiednio 550 nm, 610 nm, 670 nm i 750 nm. Wyniki eksperymentu pokazały, że efektywność redukcji ferredoksyny spada wraz ze wzrostem rozmiaru nanokryształu. W przypadku cytochromu c również występuje taka zależność, jednakże jest dodatkowo komplikowana przez równoległe procesy (prawdopodobnie reoksydacja i fotoerozja nanokryształów), i wypadkowo najszybciej redukujące są QD o rozmiarach pośrednich. Szybkość transportu elektronów (k_{ET}), obliczona na podstawie zmian w czasach zaniku fluorescencji QD pod nieobecność białek lub w ich obecności, maleje o rząd wielkości przy porównaniu QD-550 i QD-750. Przy czym, transfer elektronów z nanokryształu do Cyt c jest też kilka do kilkunastokrotnie szybszy niż z nanokryształów do Fd. Wykazaliśmy, poprzez pomiar rozmiaru kompleksów dwoma metodami (spektroskopia korelacji fluorescencji, sączenie molekularne) że Fd tworzy stabilny kompleks z QD i powoduje znaczący wzrost promienia hydrodynamicznego. Przeciwnie Cyt c – nie powoduje znaczącego wzrostu promienia hydrodynamicznego QD, tworzy więc jedynie niestabilny kompleks przejściowy. Proces fotoredukcji nie zależał więc od tworzenia stabilnego kompleksu. Wydajność fotoredukcji może natomiast zależeć od ładunku powierzchniowego nanocząstek. W celu zweryfikowania tej hipotezy, we współpracy z dr E. Kalwarczyk (IChF, Warszawa) wyznaczyłam potencjał zeta (ζ) QD, zarówno w obecności jak i pod nieobecność białek. Pod nieobecność bialek ζ jest ujemny i maleje wraz ze wzrostem rozmiaru nanokryształu. Dodatek białek powoduje ujednolicenie ζ: w obecności Fd w zakresie -30 do -40 mV, w obecności Cyt c natomiast przy ok. -20 mV. W warunkach eksperymentalnych ładunek powierzchniowy nie wpływał więc znacząco na wartość k_{ET}. Dla wartości k_{ET} bezpośrednie znaczenie ma więc przede wszystkim wartość energii orbitalu LUMO (krawędź pasma przewodnictwa) w porównaniu do wartości tych orbitali dla akceptorów. Wartość energii pasma przewodnictwa wyznaczyłam na podstawie przeprowadzonych przeze mnie pomiarów elektrochemicznych i znajomości na podstawie pomiarów spektrofotometrii UV-VIS, wartości przerwy energetycznej. Szybkość redukcji, obserwowanej makroskopowo, jest też zmniejszana poprzez tworzenie stabilnego kompleksu QD-Fd. Powierzchnia QD, ze względu na swoją geometrię, może jednocześnie związać od 5 do 15 cząsteczek Fd, w zależności od promienia nanokryształu. Aby więc doszło do redukcji większej liczby cząsteczek, musi nastąpić wymiana Fd zredukowanej na

utlenioną, co powoduje wydłużenie czasu między kolejnymi aktami przeniesienia elektronu. W przypadku Cyt c nie ma stabilnego kompleksu – prawdopodobnie powstaje jedynie kompleks przejściowy i zredukowany Cyt c natychmiast jest odsuwany od powierzchni QD. Omówiona praca była pierwszym pokazaniem fotoredukcji centrum Fe-S przez koloidalny kropki kwantowe. Fotoredukcja cytochromu c przez QD z CdTe była wcześniej pokazana, jednakże dla jednego rozmiaru nanokryształu i w uproszczonych warunkach eksperymentalnych (brak kontroli pH, obecność wolnych stabilizatorów w roztworze) [33]. Zastosowany przeze mnie układ potwierdza więc wcześniej uzyskane wyniki i pozwala rozszerzyć ich potencjalne zastosowanie.

Fotoredukcja naturalnych białek przez kropki kwantowe może zostać wykorzystana zarówno do napędzania światłem reakcji enzymatycznym, jak również do selektywnego sterowania stanem równowagi oksydacyjno-redukcyjnej komórki. Takie zastosowanie wymaga jednak lepszego poznania procesu od strony fizyki QD. Najlepszym narzędziem badania procesów związanych z QD jest analiza zmian ich fluorescencji. Przeprowadziliśmy więc szczegółową analizę czasoworozdzielczych widm emisji fluorescencji (TRES, przykald na Rys. 5) dla dwóch wybranych wariantów QD, w obecności lub pod nieobecność białek akceptorowych [praca #6]. Pojedynczy zanik fluorescencji QD, dla wybranej długości fali emisji, jest wieloeksponencjalny. W przypadku badanych przez nas QD z CdTe opis zaniku wymaga dopasowania trzech składowych. Postawiliśmy hipotezę, zgodną z sugestiami literaturowymi [42, 43], że jedna ze składowych (średni czas życia fluorescencji, τ_M) odpowiada emisji z krawędzi pasma przewodnictwa (przy uproszczeniu odnoszącym się do opisu cząsteczek, z orbitalu LUMO).



Rys.5. Przykładowe widma TRES, uzyskane dla roztworu kontrolnego CdTe-550 (a) oraz tych samych nanokryształów w obecności Cytochromu c (b). Widma zrekonstruowane na podstawie całkowitej intensywności strumienia fotonów przypisanych do danego czasu zaniku. Szara powierzchnia – suma zrekonstruowanych widm. Linia pogrubiona – widmo emisji steady-state, znormalizowane względem sumy widm TRES. Dane te zostały wykorzystane w pracy #6.

Pozostałe dwie składowe (najkrótsza, τ_S, i najdłuższa, τ_L) odpowiadają emisji ze stanów pułapkowych – zarówno z defektów powierzchniowych (τ_S) jak i z defektów wewnętrznych (τ_L). Analiza zaników fluorescencji pokazuje, że udział poszczególnych czasów życia fluorescencji zmienia się w zależności od długości fali emisji. Zrekonstruowane widma dla każdej z trzech składowych różnią się położeniem maksimum. Wygaszanie fluorescencji QD przez jodek potasu oraz dodatkowo porównanie widm TRES dla QD550 i QD650 pozwoliło potwierdzić hipotezę. W szczególności, powierzchnia (znormalizowana) pod krzywą τ_L, jak również względna proporcja pól τ_L do τ_S, dla QD650 jest znacząco większa niż dla QD550. Podobnie zmienia się proporcja między powierzchnią a objętością dla wspomnianych typów QD. W obecności białek skracają się długości wszystkich składowych (choć zmiana jest bardziej znacząca w obecności Cyt c), zmienia się położenie niektórych maksimów (na przykład, w obecności Cyt c, maksimum widma τ_S dla QD550 przesuwa się z 540 nm do 550 nm) oraz zmienia się względna proporcja pomiędzy intensywnością w maksimum (na przykład, dla QD550 w obecności Cyt c, proporcja τ_M do τ_S maleje prawie dwukrotnie). W szczególności, najsilniej zmieniała się intensywność

średniej składowej, a następnie najkrótszej. Pokazanie, że elektrony pasma przewodnictwa są zaangażowane w fotoredukcję ma istotne znaczenie dla zastosowań QD jako fotoreduktorów, ponieważ zapewnia że pasywacja powierzchni nie zahamuje procesu. Pasywacja taka może być celowa, ale może być również niekontrolowana, przez utworzenie "korony białkowej" z dostępnych w układzie cząsteczek. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy ciekawy mechanizm mieszany przy wygaszaniu fluorescencji QD przez jodek potasu: wygaszanie zachodziło zarówno poprzez składową dynamiczną jak i statyczną, przy czym w obecności cytochromu c zwiększał się wkład od składowej dynamicznej. Wyliczona na podstawie danych stała wiązania wskazuje na istnienie kilku (2 do 4) miejsc wiązania KI na powierzchni QD. Parametr ten nie musi jednak oznaczać fizycznie związania jonu jodkowego do powierzchni nanokryształu, a może być rozumiany jako trwała zmiana na powierzchni. W szczególności mogą powstawać defekty w sieci krystalicznej. Wzmocnienie tego efektu przez Cyt c wynika z dodatkowej redukcji hemu przez jodek lub też jest efektem kondensacji jonów na powierzchni dodatnio naładowanego białka.

Podsumowując, dzięki przeprowadzeniu powyższej serii badań z użyciem trzech białek modelowych, udało mi się udowodnić, że koloidalne nanokryształy mogą wpływać pośrednio lub też być aktywnymi uczestnikami reakcji redoks zachodzących w komórkach żywych organizmów. Co więcej, opisałam mechanizm aktywnego udziału QD od strony ich fizyki; wykazałam, że zależna od QD fotoredukcja angażuje elektrony z orbitalu LUMO, nie tylko z defektów powierzchniowych, a więc będzie zachodzić nawet przy pasywacji powierzchni. Zaprezentowane przeze mnie odkrycia przyczynią się do opracowania systemów pozwalających na sterowanie równowagą redoks za pomocą dobranych impulsów świetlnych.

Perspektywy dalszych badań

W następnym etapie badań zamierzam sprawdzić, czy możliwe jest zewnętrzne sterowanie (ukierunkowanie) transportem energii pomiędzy nanomateriałami a cząsteczkami biologicznymi, zaangażowanymi w naturalne procesy transferu elektronów. Moje badania pokazały zarówno zmiany w aktywności enzymu, jak i w wydajności przeniesienia elektronów w zależności od rozmiaru nanocząstek zaangażowanych w proces. Stąd też bezpośrednio wynika możliwość selektywnego wpływania, np. na stan redoks macierzy komórkowej, za pomocą oświetlania odpowiednio dobranego zestawu nanokryształów. Możliwe jest także przyspieszenie złożonych reakcji enzymatycznych, dzięki zaadsorbowaniu na powierzchni jednego nanokryształu cząsteczek enzymów uczestniczących w szlaku reakcji. Coraz więcej wiadomo więc o unikalnym środowisku jakie tworzy się w „koronie" nanocząstki, czyli na pograniczu nanocząstka – otoczenie. Jednakże ciągle są to wyrywkowe badania i opisy fenomenologiczne, brak jest ujęcia całościowego, pozwalającego na podjęcie próby celowego sterowania procesem. Brakuje również badań opisujących połączenia wieloelementowe z udziałem nanocząstek. Zamierzam więc zbadać układy bardziej skomplikowane niż dwie oddziałujące cząsteczki, w szczególności łącząc cząsteczki biologiczne z nanomateriałami w wieloelementowe łańcuchy i sieci. Liczę, że uzyskane dane pozwolą mi następnie sformułować zasady umożliwiające zewnętrzne sterowanie (np. impulsem świetlnym) naturalnymi procesami komórkowymi.

Cytowana literatura

[1] N. Carrillo, E.A. Ceccarelli, Open questions in ferredoxin-NADP+ reductase catalytic mechanism, European Journal of Biochemistry, 270 (2003) 1900-1915.

[2] R.E. Blankenship, Molecular mechanisms of photosynthesis, John Wiley & Sons, Place Published, 2013.

[3] R. Douce, Mitochondria in higher plants: structure, function, and biogenesis, Elsevier, Place Published, 2012.

[4] R. Rossetti, S. Nakahara, L.E. Brus, Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution, The Journal of Chemical Physics, 79 (1983) 1086-1088.

[5] A. Cuharuc, L. Kulyuk, R. Lascova, A. Mitioglu, A. Dikusar, Electrochemical characterization of PbS quantum dots capped with oleic acid and PbS thin films—a comparative study, Surface Engineering and Applied Electrochemistry, 48 (2012) 193-211.

[6] C.M. Wong, K.H. Wong, X.D. Chen, Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications, Applied microbiology and biotechnology, 78 (2008) 927-938.

[7] M. Gabruk, J. Grzyb, J. Kruk, B. Mysliwa-Kurdziel, Light-dependent and light-independent protochlorophyllide oxidoreductases share similar sequence motifs -in silico studies, Photosynthetica, 50 (2012) 529-540.

[8] P.-S. Huang, S.E. Boyken, D. Baker, The coming of age of de novo protein design, Nature, 537 (2016) 320-327.

[9] Z. Li, Y. Yang, J. Zhan, L. Dai, Y. Zhou, Energy functions in de novo protein design: current challenges and future prospects, Annual review of biophysics, 42 (2013).

[10] V. Nanda, R.L. Koder, Designing artificial enzymes by intuition and computation, Nature chemistry, 2 (2010) 15-24.

[11] D.E. Robertson, R.S. Farid, C.C. Moser, J.L. Urbauer, S.E. Mulholland, R. Pidikiti, J.D. Lear, A.J. Wand, W.F. DeGrado, P.L. Dutton, Design and synthesis of multi-haem proteins, (1994).

[12] I. Cohen-Ofri, M. van Gastel, J. Grzyb, A. Brandis, I. Pinkas, W. Lubitz, D. Noy, Zinc-Bacteriochlorophyllide Dimers in de Novo Designed Four-Helix Bundle Proteins. A Model System for Natural Light Energy Harvesting and Dissipation, Journal of the American Chemical Society, 133 (2011) 9526-9535.

[13] S. Bjelic, L.G. Nivón, N. Çelebi-Ölçüm, G. Kiss, C.F. Rosewall, H.M. Lovick, E.L. Ingalls, J.L. Gallaher, J. Seetharaman, S. Lew, Computational design of enone-binding proteins with catalytic activity for the Morita–Baylis–Hillman reaction, ACS chemical biology, 8 (2013) 749-757.

[14] R.L. Koder, K.G. Valentine, J. Cerda, D. Noy, K.M. Smith, A.J. Wand, P.L. Dutton, Nativelike structure in designed four α-helix bundles driven by buried polar interactions, Journal of the American Chemical Society, 128 (2006) 14450-14451.

[15] C. Negron, C. Fufezan, R.L. Koder, Geometric constraints for porphyrin binding in helical protein binding sites, Proteins, 74 (2009) 400-416.

[16] M. Wahadoszamen, I. Margalit, A.M. Ara, R. van Grondelle, D. Noy, The role of charge-transfer states in energy transfer and dissipation within natural and artificial bacteriochlorophyll proteins, Nature communications, 5 (2014).

[17] D.E. Benson, M.S. Wisz, H.W. Hellinga, Rational design of nascent metalloenzymes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (2000) 6292-6297.

[18] B.R. Gibney, S.E. Mulholland, F. Rabanal, P.L. Dutton, Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93 (1996) 15041-15046.

[19] A. Roy, I. Sarrou, M.D. Vaughn, A.V. Astashkin, G. Ghirlanda, De novo design of an artificial bis[4Fe-4S] binding protein, Biochemistry, 52 (2013) 7586-7594.

[20] D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A.M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J.L. Gallaher, E.A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, Kemp elimination catalysts by computational enzyme design, Nature, 453 (2008) 190-195.
[21] L. Yuan, I. Kurek, J. English, R. Keenan, Laboratory-directed protein evolution, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69 (2005) 373-392.
[22] N.F. Polizzi, M.J. Eibling, J.M. Perez-Aguilar, J. Rawson, C.J. Lanci, H.C. Fry, D.N. Beratan, J.G. Saven, M.J. Therien, Photoinduced Electron Transfer Elicits a Change in the Static Dielectric Constant of a de Novo Designed Protein, Journal of the American Chemical Society, 138 (2016) 2130-2133.
[23] S. Mackowski, Hybrid nanostructures for efficient light harvesting, Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal, 22 (2010) 193102.
[24] S. Mackowski, S. Wörmke, A.J. Maier, T.H. Brotosudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A.O. Govorov, H. Scheer, C. Bräuchle, Metal-enhanced fluorescence of chlorophylls in single light-harvesting complexes, Nano letters, 8 (2008) 558-564.
[25] R.W. Kelsall, I.W. Hamley, M. Geoghegan, K.J. Kurzydłowski, J. Ferenc, Nanotechnologie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Place Published, 2009.
[26] S.C. Ortiz, E.M. Ospino, R. Cabanzo, Spectroscopy characterization and quantum yield determination of quantum dots, Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing, 2016, pp. 012097.
[27] M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger, Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties, Anal Chem, 81 (2009) 6285-6294.
[28] D.F. Watson, Linker-Assisted Assembly and Interfacial Electron-Transfer Reactivity of Quantum Dot-Substrate Architectures, J Phys Chem Lett, 1 (2010) 2299-2309.
[29] W. Ma, L.-X. Qin, F.-T. Liu, Z. Gu, J. Wang, Z.G. Pan, T.D. James, Y.-T. Long, Ubiquinone-quantum dot bioconjugates for in vitro and intracellular complex I sensing, Scientific reports, 3 (2013) 1537.
[30] J. Chen, K. Wu, B. Rudshteyn, Y. Jia, W. Ding, Z.-X. Xie, V.S. Batista, T. Lian, Ultrafast Photoinduced Interfacial Proton Coupled Electron Transfer from CdSe Quantum Dots to 4, 4′-Bipyridine, Journal of the American Chemical Society, 138 (2016) 884-892.
[31] R.M. Young, S.C. Jensen, K. Edme, Y. Wu, M.D. Krzyaniak, N.A. Vermeulen, E.J. Dale, J.F. Stoddart, E.A. Weiss, M.R. Wasielewski, Ultrafast Two-Electron Transfer in a CdS Quantum Dot–Extended-Viologen Cyclophane Complex, Journal of the American Chemical Society, 138 (2016) 6163-6170.
[32] R.D. Harris, S. Bettis Homan, M. Kodaimati, C. He, A.B. Nepomnyashchii, N.K. Swenson, S. Lian, R. Calzada, E.A. Weiss, Electronic Processes within Quantum Dot-Molecule Complexes, Chem Rev, 116 (2016) 12865-12919.
[33] C. Gerhards, C. Schulz-Drost, V. Sgobba, D.M. Guldi, Conjugating Luminescent CdTe Quantum Dots with Biomolecules, The Journal of Physical Chemistry B, 112 (2008) 14482-14491.
[34] E.P. Lukashev, P.P. Knox, V.V. Gorokhov, N.P. Grishanova, N.K. Seifullina, M. Krikunova, H. Lokstein, V.Z. Paschenko, Purple-bacterial photosynthetic reaction centers and quantum-dot hybrid-assemblies in lecithin liposomes and thin films, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 164 (2016) 73-82.
[35] I. Nabiev, A. Rakovich, A. Sukhanova, E. Lukashev, V. Zagidullin, V. Pachenko, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, A.B. Rubin, A.O. Govorov, Fluorescent Quantum Dots as Artificial Antennas for Enhanced Light Harvesting and Energy Transfer to Photosynthetic Reaction Centers, Angew Chem Int Edit, 49 (2010) 7217-7221.
[36] A. Roy, D.J. Sommer, R.A. Schmitz, C.L. Brown, D. Gust, A. Astashkin, G. Ghirlanda, A de novo designed 2 [4Fe-4S] ferredoxin mimic mediates electron transfer, Journal of the American Chemical Society, 136 (2014) 17343-17349.
[37] K.A. Brown, M.B. Wilker, M. Boehm, H. Hamby, G. Dukovic, P.W. King, Photocatalytic Regeneration of Nicotinamide Cofactors by Quantum Dot-Enzyme Biohybrid Complexes, ACS Catalysis, (2016).
[38] B.J. Johnson, W. Russ Algar, A.P. Malanoski, M.G. Ancona, I.L. Medintz, Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: Approaches and challenges, Nano Today, 9 (2014) 102-131.

[39] D. Wang, R.J. Nap, I.n. Lagzi, B. Kowalczyk, S. Han, B.A. Grzybowski, I. Szleifer, How and Why Nanoparticle's Curvature Regulates the Apparent p K a of the Coating Ligands, Journal of the American Chemical Society, 133 (2011) 2192-2197.
[40] R. Cammack, K.K. Rao, C.P. Bargeron, K.G. Hutson, P.W. Andrew, L.J. Rogers, Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins, The Biochemical journal, 168 (1977) 205-209.
[41] T. Rajh, O.I. Micic, A.J. Nozik, Synthesis and Characterization of Surface-Modified Colloidal Cdte Quantum Dots, Journal of Physical Chemistry, 97 (1993) 11999-12003.
[42] M. Califano, Origins of Photoluminescence Decay Kinetics in CdTe Colloidal Quantum Dots, ACS nano, 9 (2015) 2960-2967.
[43] B.C. Fitzmorris, J.K. Cooper, J. Edberg, S. Gul, J.H. Guo, J.Z. Zhang, Synthesis and Structural, Optical, and Dynamic Properties of Core/Shell/Shell CdSe/ZnSe/ZnS Quantum Dots, J Phys Chem C, 116 (2012) 25065-25073.

7. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

Badania oksydoreduktazy ferredoksyna:NADP$^+$

Główny wątek moich obecnych badań, dotyczący transportu elektronów, wynika z tematyki którą zajmowałam się podczas studiów magisterskich i doktorskich. Pod kierunkiem prof. dra hab. Stanisława Więckowskiego, promotora mojej pracy magisterskiej, badałam własności enzymu fotosyntetycznego, oksydoreduktazy ferredoksyna:NADP$^+$ (FNR). W szczególności, szukałam sposobów scharakteryzowania miejsca wiążącego chinony w obrębie cząsteczki tego białka. Stosując szereg inhibitorów wykazałam, że grupy aminowe i tiolowe nie są bezpośrednio zaangażowane w redukcję substratów chinonowych. Jednakże, po związaniu substratu, zmienia się konformacja białka na tyle, że dochodzi do zwiększonej ekspozycji grup aminowych. Praca doktorska, realizowana pod kierunkiem prof. dra hab. Kazimierza Strzałki i we współpracy z wieloma osobami spośród kierowanego przez niego zespołu (głównie: dr Moniką Bojko, dr Beatą Myśliwą-Kurdziel, drem Przemysławem Malcem oraz drem Andrzejem Waloszkiem) dotyczyła również FNR, tym razem w kontekście mechanizmów inhibicji tego białka przez kadm. Badania te wpisywały się w szerszy wątek, związany z opisem wpływu metali ciężkich na rośliny i poszukiwaniem mechanizmów oporności. Udało mi się zarówno wyznaczyć stałe inhibicji FNR przez kadm, jak i określić, jakie zmiany fizykochemiczne w cząsteczce białka towarzyszą wiązaniu jonów kadmu. Wykazałam ponadto, że obecność cynku działa protekcyjnie również na poziomie molekularnym, co opisywano w skali makro (dla roślin rosnących na podłożach zanieczyszczonych). Wyniki te zostały opublikowane w trzech pracach (pozycje #17, #9 i #8 z listy *Pozostałych publikacji, nie wchodzących w zakres przedstawianego osiągnięcia*). Niejako przy okazji, bo dzięki poszukiwaniu innego niż szpinak źródła enzymu, opracowaliśmy procedurę izolacji i oczyszczania dwóch izoform FNR z pszenicy (praca #11). Przy okazji realizowania badań do tej pracy rozpoczęłam współpracę z prof. drem hab. Maciejem Garstką i jego grupą. Współpracę tę kontynuujemy także teraz, choć dotyczy obecnie wykorzystania elementów aparatu fotosyntetycznego w konstrukcji biosensorów.

Badania oddziaływania FNR z błonami modelowymi

Ten wątek badań rozpoczęłam jeszcze w trakcie studiów doktoranckich, we współpracy z grupą prof. Wiesława I. Gruszeckiego z UMCS w Lublinie. Udało mi się wtedy wykazać, że FNR oddziałuje, w warunkach *in vitro*, z lipidami wchodzącymi w skład błon tylakoidów –

monogalaktozylodiacyloglicerolem i diagalaktozylodiacyloglicerolem (DGDG). Zauważyłam wtedy, że istnieją różnice w tym oddziaływaniu w zależności od pH, jak również udało mi się określić średni kąt przyłączenia białka FNR do dwuwarstwy z DGDG. Wyniki zostały opublikowane (praca #12) a wątek ten kontynuowałam w ramach grantu Iuventus PLUS, pozyskanego w roku 2011. Podczas realizacji grantu badałam przede wszystkim oddziaływania FNR z innymi lipidami, co pozwoliło określić specyfikę wiązania względem określonego typu głów hydrofilowych lipidów. Interesowało mnie także, czy szybkość przyłączania zależy od upakowania błony, co sprawdziłam stosując różne początkowe warunki ciśnienia powierzchniowego. Dodatkowo, zbadałam zmiany w przyłączaniu do błony w obecności naturalnych substratów FNR – NADP (zarówno w formie utlenionej jak i zredukowanej) oraz ferredoksyny. Praca na podstawie uzyskanych danych została ostatnio opublikowana (praca #1).

Inne badania powiązane z aparatem fotosyntetycznym: badania cyklu ksantofilowego, mechanizmów związanych z odpowiedzią roślin na stres, zmian w strukturze elementów chloroplastów, badania elektrochemiczne.

W trakcie studiów doktoranckich brałam także udział w badaniach cyklu ksantofilowego – jednego z mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację roślin do zmiennego natężenia światła oraz fotoprotekcję w czasie intensywnego oświetlenia. Badania te dotyczyły zarówno reakcji *in vitro* (w tym szczególnej specyfiki środowiska lipidowego i znaczenia odwróconych struktur heksagonalnych), koniecznego do przebiegu reakcji deepoksydacji jak i *in vivo*. Badania te prowadzone były przez grupę prof. Kazimierza Strzałki we współpracy z grupą prof. C. Wilhelma i R. Gossa i zaoowocowała dwoma publikacjami (prace #13, 14).

We współpracy ze wspomnianym już zespołem prof. dra hab. Macieja Garstki prowadzę badania zmierzające do wykorzystania naturalnych i sztucznych elementów aparatu fotosyntetycznego w konstruowaniu bioczujników. Ja, wraz z podopieczną doktorantką, skupiam się przede wszystkim na połączeniu elektrod węglowych (w tym, sitodrukowanych) z fikobilisomami oraz z białkami projektowanymi *de novo* (w tym, z RCM oraz generacją HP49). Praca autorstwa M. Łazickiej i współpracowników jest obecnie przygotowywana do wysłania.

Obecnie uczestniczę również w badaniach odpowiedzi roślin na napromieniowanie UV. Projekt ten kierowany jest przez dr A. Katarzynę Banaś z Zakładu Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego. Moja rola to przede wszystkim analiza poziomu barwników w próbkach roślinnych (chlorofile, karotenoidy a ostatnio także ogół barwników polifenolowych) i interpretacja tych zmian. Dotychczas współpraca ta zaowocowała jedną publikacją (praca #3) i jest kontynuowana.

Moje zainteresowania dotyczą również badań elementów związanych z fotosyntezą za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM). Metoda ta umożliwia analizę rozmiaru oraz takich własności struktur jak elastyczność czy siła adhezji między strukturą a próbnikiem. We współpracy z dr hab. Beatą Myśliwą-Kurdziel badałam w ten sposób izolowane ciała prolamellarne (PLB) oraz zmianę w ich strukturze w trakcie oświetlania. PLB, obecne w chloroplastach roślin etiolowanych, pod wpływem oświetlania przekształcają się w protylakoidy i tylakoidy dojrzałych chloroplastach. Podobne przekształcenia (zwiększenie objętości a następnie formowanie podłużnych wypustek) udało nam się zaobserwować także w izolowanym preparacie (praca #5). Tę samą metodę AFM stosuję także w badaniu plastoglobuli – struktur białkowo-lipidowych, obecnych w chloroplastach na różnych etapach ich rozwoju, w różnym jednakże składzie i ilości w zależności od warunków

środowiska (na przykład, stresu chłodu). Projekt ten jest kierowany przez dr Katarzynę Gieczewską z Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego.

Osobny wątek badań to testy stabilności oraz toksyczności kropek kwantowych na aparat fotosyntetyczny na różnych poziomach organizacji (izolowane fotosystemy, izolowane tylakoidy i chloroplasty, całe komórki jednokomórkowego glonu *Chlamydomonas reinhardtii*). Wyniki te póki, co weszły w skład pracy magisterskiej Moniki Szajwaj (SGGW, 2012), przygotowywanej pod moim kierunkiem. Tematyka ta była również częścią pracy magisterskiej Katarzyny Sołtysiak (Politechnika Warszawska) obronionej w bieżącym roku.

Białka projektowane *de novo* w badaniach fotosyntezy

Oprócz badania białek *de novo*, wiążących centra żelazo-siarkowe, podczas stażu podoktorskiego w grupie dra Drora Noya, zajmowałam się także innymi białkami wiążącymi profiryny, w szczególności hem i chlorofil. Głównym celem projektu było uzyskanie modelu dimeru i multimeru chlorofilu, jaki występuje odpowiednio w fotosystemach I i II jako specjalna para chlorofilowa, oraz w antenach fotosyntetycznych (LHC). W badaniach tych używaliśmy hydrofilowej pochodnej chlorofilu, chlorofilidu cynkowego. Cześć wyników została opublikowana (praca #10), jednakże większość – w tym charakterystyka generacji białek HP7 uzyskanych na pojedynczym peptydzie (roboczo zwanych HP49) nadal czeka na publikację. Dzięki zastosowaniu ekspresji w systemie bakteryjnym i odejściu od pierwotnego białka homodimerycznego, mogłam wprowadzić pojedyncze mutacje w wybranych miejscach wiążących porfiryny. Uzyskałam szereg wariantów pozwalających lepiej poznać mechanizm tworzenia wspomnianych dimerów chlorofilowych.

Inne badania nanobiohybryd

Zdając sobie sprawę z potencjału projektowania białek, postanowiłam wykorzystać takie białka w tworzeniu stabilnego pokrycia nanokryształów. Zastosowanie pokrycia tego typu otwiera ogromne możliwości - na przykład przy użyciu białek dwudomenowych, jedna z domen może stanowić pokrycie nanokryształu, natomiast druga białko enzymatyczne (lub inne, w zależności od żądanej funkcji nanohybrydy). Grupie pracującej pod moim kierunkiem (projekt Lider z NCBiR) udało się opracować sposób pokrycia nanokryształów za pomocą znanych już białek Membrane Scaffold Protein (MSP), które oryginalnie dedykowane są do tworzenia *in vitro* nanodysków (struktur białkowo-lipidowych, będących modelem tratw lipidowych i płaskiej dwuwarstwy lipidowej). Część wyników badań weszła w skład pracy magisterskiej Anny Drzymały (obecnie Dąbrowskiej i została opublikowane (praca #2). Dzięki współpracy z drem hab. Dominikiem Grontem powstały także dwa projekty nowych białek dedykowanych już do pokrycia nanokryształów. Udało się nam połączyć te białka z nanokryształami a dane dotyczące metodyki łączenia i charakterystyki powstałych hybryd są przygotowywane do druku.

W ramach projektu Lider zajmowałam się również optymalizacją systemu łączenia cząsteczek w nanobiohybrydzie. Wbrew pozorom, nie jest to problem trywialny, ponieważ mamy tu do czynienia z

nanokryształem mogącym przyłączyć więcej niż jedną cząsteczkę nawet dużego białka do swojej powierzchni. Dlatego też przetestowaliśmy szereg warunków reakcji w celu otrzymania kontrolowanej stechiometrii, a w szczególności stechiometrii 1:1. Badania te weszły w skład pracy magisterskiej Andrzeja Dąbrowskiego oraz są podstawą dwóch zgłoszeń patentowych. Osobną strategią tworzenia nanohybryd jest wykorzystanie heterodimeryzujących helis. Dotychczas grupie pracującej pod moim kierunkiem udało się wyselekcjonować takie sekwencje i pokazać ich użyteczność z wykorzystaniem fluorescencyjnych białek, GFP i mCherry. Obecnie pracujemy nad adaptacją tego systemu do połączenia dwóch nanokryształów różnego typu.

Projekty badawcze realizowane w roli kierownika

1. Opus, NCN, 2010-2013, Funkcjonalizowanie kropek kwantowych w modułowych sensorach reakcji biologicznych, N N202 130039,
2. Homing PLUS, FNP, 2010-2012, Redox-active proteins for nanotechnological applications, HomingPLUS/1-6/2010
3. Iuventus PLUS, MNiSW, 2012-2014, Mechanizm oddziaływania oksydoreduktazy ferredoksyna:NADP+ z błonami modelowymi i naturalnymi w obecności metali ciężkich i innych czynników stresowych, Iuventus PLUS Nr IP2011016671
4. Lider, NCBIR, Optymalizacja układu białkowo-półprzewodnikowego pod katem zastosowań sensorycznych, na lata 2014-2016 (przedłużony do 2017), Lider/012/445/L-4/12/NCBR/2013
5. Sonata Bis, NCN, Mechanizmy transferu energii w bionanohybrydowych łańcuchach i sieciach, 2017-2022, UMO-2016/22/E/NZ/00673

Doświadczenie naukowe zdobyte w kraju i za granicą

20.09 -20.10.2011 Instytut Weizmanna, Izrael – wyjazd badawczy
01.07 – 30.10.2010 staż w Max-Planck Institute for Bioinorganic Chemistry, Muelheim am der Ruhr, Niemcy – wyjazd badawczy
01.07.2007 – 31.08.2009 Studia podoktorskie w Instytucie Weizmanna, Rehovot, Izrael
10 -17.07.2006 Szkoła letnia "Naturalne oksydanty", Uniwersytet Kiloński, Kilonia, Niemcy
15 – 21.09.2005, Zakład Biofizyki, Uniwersytet im. Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin – wyjazd badawczy
17.09- 16.10.2005, Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Lipski, Lipsk, Niemcy – wyjazd badawczy
06 – 31.07.2004, Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Lipski, Lipsk, Niemcy – wyjazd badawczy

Nagrody i wyróżnienia:

2012 stypendium konferencyjne kongresu EBEC, Freiburg, Niemcy
2010 EMBO Short-Term Scholarship
2007 Praca Doktorska wyróżniona przez Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
2006 Stypendium konferencyjne kongresu "Photosynthesis and stress. Biophysical and Biochemical Methods in Photosynthesis. Central-European Conference" Brno, Czechy
2005 Nagroda Zespołowa Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego

Wykłady zaproszone:

1. J. Grzyb, Enzymatically active nanohybrids, I Ogólnopolskie Sympozjum Interdyscyplinarne Inter-Mix 21-24 marca 2013, Pułtusk, Polska

2. J. Grzyb, De novo designed iron-sulfur cluster proteins: redox characteristics, III National Conference of Nano and Micromechanics, 4-6 lipca 2012, Warszawa

3. J. Grzyb, Tworzenie i charakterystyka aktywnych enzymatycznie nanostruktur hybrydowych, Sympozjum Biourządzenia – Biocząstki, 18 maja 2012, Warszawa

4. J. Grzyb, De novo designed proteins in photosynthetic research, Current Trends in Biochemistry, Biophysics and Cell Biology, 4-8 lutego 2012, Zakopane

5. J. Grzyb, De novo designed proteins - modules for photosynthetic systems, Photosynthesis Research for Sustainability, 24-30 lipca 2011, Baku, Azerbejdżan

Pozostałe wygłoszone wykłady, prezentacje konferencyjne i seminaria

1. **J. Grzyb**, Quantum dots with proteins - how to get them and why to use such nanohybrids. Seminarium w Centrum Nowych Technologii UW, 19 sierpnia 2015, Warszawa
2. **J. Grzyb**, R. Worch, Photoreduction of Ferredoxin and Cytochrome C by Cdte Quantum Dots, 16th International Congress on Photobiology - September 8th - 12th, 2014, Cordoba, Argentina
3. **J. Grzyb** „Między biologią a fizyką - o kropkach kwantowych, białkach z kofaktorami redox oraz ich nanohybrydach" – wygłoszone dla koła naukowego studentów Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, 07 marca 2014, Kraków
4. **J. Grzyb**, "Nanostruktury hybrydowe o aktywności enzymatycznej" Seminarium Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, 24 stycznia 2013
5. **J. Grzyb**, "Nanostruktury hybrydowe o aktywności enzymatycznej" Seminarium Instytutu Biologii Eksperymentalnej Roślin, Wydział Biologii UW, 22 lutego 2013 – wystąpienie ustne
6. **J. Grzyb**, K. Szczepaniak, A. Baranowska-Korczyc, R. Worch, Tworzenie i charakterystyka aktywnych enzymatycznie nanostruktur hybrydowych – oksydoreduktazę ferredoksyna:NADP+ w połączeniu z kropkami kwantowymi CdSe/ZnS, XIX Lubelskie Warsztaty Biofizyczne, Kazimierz nad Wisłą, 4-5 czerwca, 2012
7. **J. Grzyb**, Projektowane *de novo* białka wiążące centra żelazo-siarkowe i porfiryny, Seminarium Instytutu Biologii Eksperymentalnej Roślin, Wydział Biologii UW, 20 kwietnia 2012

Pozostałe publikacje, niewchodzące w zakres przedstawianego osiągnięcia naukowego, w czasopismach posiadających Impact Factor

(podkreśleniem oznaczono autora korespondencyjnego)

Prace oryginalne

1. **Grzyb J**, Gieczewska K, Łabuz J, Sztatelman O. Detailed characterization of Synechocystis PCC 6803 ferredoxin: NADP+ oxidoreductase interaction with model membranes, BBA-Biomembranes, (2017), DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.10.012
2. Dąbrowska A, Nyk M, Worch R, **Grzyb J,** Hydrophilic colloidal quantum dots with long peptide chain coats, Colloids Surf. B: Biointerfaces, 145, 662–67 (2016) .

3. Sztatelman O, **Grzyb J,** Gabryś H, Banaś AK, The effect of UV-B on Arabidopsis leaves depends on light conditions after treatment, BMC Plant Biology 15:281, (2015).
4. Wolska E, Kaszewski J, Kiełbik P, **Grzyb J,** Godlewski MM, Godlewski M, Rare earth activated ZnO nanoparticles as biomarkers, Optical Materials 36: 1655-1659 (2014).
5. **Grzyb J,** Solymosi K, Strzałka K, Mysliwa-Kurdziel B, Visualization and characterization of prolamellar bodies with atomic force microscopy, Journal of Plant Physiology 170:1217-1227 (2013).
6. Yatsunenko S, Kaszewski J, **Grzyb J**, Pelech I, Godlewski MM, Mijowska E, Narkiewicz U, Godlewski M. Impact of yttria stabilization on Tb3+ intra-shell luminescence efficiency in zirconium dioxide nanopowders, J. Phys. Condenced Matt. 25: 194106 (2013).
7. Gabruk M, **Grzyb J,** Kruk J, Mysliwa-Kurdziel B Light-dependent and light-independent protochlorophyllide oxidoreductases share similar sequence motifs — in silico studies. Photosynthetica 50: 529-540 (2012).
8. **Grzyb J,** Gagoś M, Myśliwa-Kurdziel B, Monika Bojko, Gruszecki WI, Waloszek A, Strzałka K. Cadmium inhibitory action leads to changes in the structure of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase. J. Biol. Phys. 38:415-428 (2012).
9. **Grzyb J,** Bojko M, Waloszek A, Strzałka K Ferredoxin:NADP+ oxidoreductase as a target of Cd2+ inhibitory action – Biochemical studies. Phytochemistry 72: 14-20 (2011).
10. Cohen-Ofri I, van Gastel M, **Grzyb J**, Brandis A, Pinkas I, Lubitz W, Noy D ZincBacteriochlorophyllide Dimers in de Novo Designed Four-Helix Bundle Proteins. A Model System for Natural Light Energy Harvesting and Dissipation. J. Am. Chem. Soc., 133: 9526–9535 (2011).
11. **Grzyb J**, Malec P, Rumak I, Garstka M, Strzalka K Two isoforms of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase from wheat leaves - purification and initial biochemical characterization. Photosynthesis Research. 96:99-112 (2008)
12. **Grzyb J**, Gagos M, Gruszecki W, Strzalka K Interaction of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase with model membranes. BBA - Biomembranes 1778: 133-142 (2008) .
13. Goss R, Latowski D, **Grzyb J**, Vieler A, Lohr M, Wilhelm C, Strzalka K. Lipid dependence of diadinoxanthin solubilization and de-epoxidation in artificial membrane systems resembling the lipid composition of the natural thylakoid membrane. BBA-Biomembranes 1768: 67-75.(2008)
14. Goss R, Lohr M, Latowski D, **Grzyb J**, Vieler A, Wilhelm C, Strzalka K. The role of the hexagonal structure forming lipids in diadinoxanthin and violaxanthin solubilization and deepoxidation. Biochemistry 44:4028-4036 (2005).
15. Suwalsky M, Martínez F, Cardenas H, **Grzyb J**, Strzałka K. Iron affects the structure of cell membrane molecular models. Chem. Phys. Lipids 134:69-77 (2005).
16. **Grzyb J**, Waloszek A, Latowski D, Więckowski S. Effect of cadmium on ferredoxin:NADP+ oxidoreductase activity, J. Inorg. Biochem. 98: 1338-1346 (2004).
17. **Grzyb J**, Bojko M, Więckowski S. Effects of Amino and Thiol Group Reagents on the Ferredoxin:NADP+ Oxidoreductase Catalysed Reduction of Dibromothymoquinone. Photosynthetica 41: 627-630 (2003).

Prace przeglądowe

18. **Grzyb J**, Latowski D, Strzałka K, Lipocalins - the family portrait. J. Plant Physiol. 163:895-915. (2006).

19. Latowski D, **Grzyb J**, Strzałka K.The xanthophyll cycle - molecular mechanism and significance. APP, 26:197-212. (2004).

Rozdziały w książkach

M. Łazicka, **J. Grzyb,** Białkowe warstwy monomolekularne utworzone na węglu szklistym przy użyciu metody Langmuir-Blogdett – analiza za pomocą mikroskopii sił atomowych i spektroskopii w podczerwienii.w: „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze Tom I". Red. J. Nyćkowiak i J. Leśny. (2015) ISBN: 978-83-942083-1-8.

Doniesienia konferencyjne w formie posterowej

(wybrane, za lata 2012-2017, podkreśleniem oznaczono osobę prezentującą).

1. **J. Grzyb**, D. Gront, K. Kopec, M. Pędziwiatr, S. Sztatelman. A protein basket for a quantum dot. 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress and 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) 16-20 Lipca 2017, Edinburgh, UK – abstract w Eur Biophys J (2017) 46 (Suppl 1) 186
2. J. Wójtowicz, **J. Grzyb**, K. Gieczewska. Biophysical properties of plastoglobules isolated from Arabidopsis mutants. 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress and 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) 16-20 Lipca 2017, Edinburgh, UK – abstract w Eur Biophys J (2017) 46 (Suppl 1) 297
3. K. Sołtysiak, K. Gieczewska, M. Łazicka, **J. Grzyb**. Colloidal quantum dots as a tool to track reversible binding of thylakoid proteins. 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress and 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) 16-20 Lipca 2017, Edinburgh, UK – abstract w Eur Biophys J (2017) 46 (Suppl 1) 336
4. O. Sztatelman, K. Kopeć, M. Pędziwiatr, **J. Grzyb**. The nanoconstruction site AT work – heterodimerizing helices as a tool to get nanocrystals together. 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress and 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) 16-20 Lipca 2017, Edinburgh, UK – abstract w Eur Biophys J (2017) 46 (Suppl 1) 337
5. M. Łazicka, J. **Grzyb**. Fotoprąd czyli wymuszony transport elektronów w elektrodowych układach hybrydowych, III ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu – BioOpen, 11-12 maja 2017, Łódź – abstrakt w książce abstraktów
6. M. Łazicka, J. Grzyb. The biophysical characteristic of four [4Fe4S] cluster types coordinated by protein maquettes" 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress and 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) 16-20 Lipca 2017, Edinburgh, UK – abstract w Eur Biophys J (2017) 46 (Suppl 1) 276
7. **J. Grzyb**, Białka w połączeniu z kropkami kwantowymi. Neutralność czy współdziałanie? Sympozjum analityczne, 16 maja 2016 - 18 maja 2016, Ślesin k/Konina
8. M. Łazicka, **J. Grzyb**, Bioelectrochemical Analysis of de novo designed proteins having different motifs bidning iron-sulfur cluster and iron-porphyrins, XVI Konferencja Polskiego towarzystwa Biofizycznego, Ryn, 28 czerwca – 01 lipca, 2016 1/2 , abstrakt opublikowany w Current Topics of Biophysics, 39 supl A (2016) 18
9. M. Łazicka, **J. Grzyb**, Anodic and cathodic photocurrent generated by photosystem I deposited on carbon electrodes. The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, Holandia, 7-12.08.2016- abstrakt w książce abstraktów

10. K. Gieczewska, J. Wójtowicz, **J. Grzyb**, Biophysical aspects of chloroplasts' membranes properties. The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, Holandia, 7-12.08.2016- abstrakt w książce abstraktów
11. J. Wójtowicz, **J. Grzyb,** A. Mostowska, K. Gieczewska, Photosynthetic performance and visualization of plastoglobules isolated from plants with different chilling tolerance. The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, Holandia, 7-12.08.2016, abstrakt w książce abstraktów
12. **J. Grzyb**, A. Dąbrowski, K. Kur, E. Kalwarczyk, M. Pędziwiatr, R. Worch, Photoreduction of proteins by quantum dots – influence of nanocrystal size and surface coating. 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015) July 18 to 22, 2015, Dresden, Germany, abstrakt w Eur Biophys J (2015) 44 (Suppl 1):S88
13. A. Dąbrowski, O. Sztatelman, A. Drzymała, **J. Grzyb**, Dimerization interface and peptide specific to semiconductor surfaces for nanodevices assembly. 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015) July 18 to 22, 2015, Dresden, Germany, abstrakt w Eur Biophys J (2015) 44 (Suppl 1):S134
14. A. Drzymała, A. Dąbrowski, **J. Grzyb**, Membrane Scaffold Proteins as coating for colloidal quantum dots 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015) July 18 to 22, 2015, Dresden, Germany, abstract w Eur Biophys J (2015) 44 (Suppl 1):135
15. M. Łazicka, M. Pędziwiatr, **J. Grzyb**, Redox-chain maquette and phycobilisomes on gold and carbon – comparison of bioelectrochemical systems. European Biophysics Congress (EBSA 2015) July 18 to 22, 2015, Dresden, Germany
16. A. Dąbrowski, O. Sztatelman, A. Drzymała, J. Grzyb, Nanobiodevices assembly by dimerization interface based on coiled-coil motif and peptide specific to semiconductor surfaces. Biomolecules and Nanostructures, 13-17 maja 2015, Jaroszowice k/Krakowa, abstract w Eur Biophys J (2015) 44 (Suppl 1):S86
17. A. Drzymała, A. Dąbrowski, **J. Grzyb**, Nanohybrids of colloidal quantum dots and Membrane Scaffold Proteins, Biomolecules and Nanostructures, 13-17 maja 2015, Jaroszowice k/Krakowa
18. **J. Grzyb,** R. Łuczkowska, K. Gieczewska. Why Chloroplastic ferredoxin: NADP+ oxidoreductase binds to lipids. Proceedings of International scientific conference and school for young scientists "Plant Physiology as theoretical basis for innovative agriculture and phytobiotechnologies", Tom. II, str. 544-546, Kaliningrad (2014)
19. **J. Grzyb**, R. Łuczkowska, D. Noy, A redox-chain maquette - a new protein to study electron transfer. Konferencja podsumowująca realizację projektu NanoFun, 28 marca 2014, Warszawa
20. **J. Grzyb,** A. Baranowska-Korczyc, K. Szczepaniak, R. Worch. Protein-quantum dots conjugates, Konferencja podsumowująca realizację projektu NanoFun, 28 marca 2014, Warszawa
21. A. Drzymała, A. Dąbrowski, **J. Grzyb**, Stabilizacja kropek kwantowych CdSe i CdSe/ZnS w roztworach wodnych z zastosowaniem białek amfipatycznych, Konferencja podsumowująca realizację projektu NanoFun, 28 marca 2014, Warszawa
22. O. Sztatelman, **J. Grzyb**, A. K. Banaś, PO196-The Effect of UV-B on Arabidopsis Leaves Depends on Light Conditions After Treatment, 16th International Congress on Photobiology - September 8th - 12th, 2014, Cordoba, Argentina
23. M. Szajwaj, **J. Grzyb**, The studies of quantum dots impact on photosynthetic systems, Current Trends in Biochemistry, Biophysics and Cell Biology, 4-8 lutego 2012, Zakopane
24. K. Szczepaniak, **J. Grzyb**, Conjugation of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase to quantum dots, Current Trends in Biochemistry, Biophysics and Cell Biology, 4-8 lutego 2012, Zakopane

8. Osiągnięcia organizacyjne i dydaktyczne

Prace magisterskie

Podczas pracy w Instytucie Fizyki PAN (lata 2009-2017) byłam opiekunem i promotorem 6 prac magisterskich. Trzy z nich zostały wykonane przez studentów otrzymujących dodatkowo stypendium z projektu HOMING PLUS:

1) Renata Łuczkowska, „RCM - redox chain maquette, oczyszczanie, rekonstrukcja i charakterystyka", kierunek Biotechnologia, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 2011
2) Monika Szajwaj, „Opracowanie testu toksyczności nanokryształów na systemy fotosyntetyczne", kierunek Biotechnologia, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 2012
3) Krzysztof Szczepaniak, „Otrzymywanie koniugatów kropek kwantowych z wybranymi białkami aktywnymi w reakcjach redoks", kierunek Biotechnologia, Politechnika Warszawska, 2012

Pozostałe prace dotyczyły tematyki realizowanej w projektach Opus oraz Lider.

1) Anna Drzymała (obecnie Dąbrowska), „Nanohybrydy koloidalnych kropek kwantowych i białek enzymatycznych - tworzenie i przykłady zastosowania", kierunek Zastosowania fizyki w biologii i medycynie, Uniwersytet Warszawski, 2014
2) Andrzej Dąbrowski, „Struktury nanohybrydowe o określonej stechiometrii – optymalizacja metody otrzymywania oraz przykłady zastosowania", kierunek Zastosowania fizyki w biologii i medycynie, Uniwersytet Warszawski, 2014
3) Katarzyna Kur, „Badanie wpływu kropek kwantowych na przebieg fotoredukcji wybranych białek z kofaktorami redoks", kierunek Inżynieria Chemiczna i Procesowa, Politechnika Warszawska, 2016
4) Katarzyna Sołtysiak, „Zastosowanie Koloidalnych kropek kwantowych w badaniach błon fotosyntetycznych", kierunek Fizyka Techniczna, Politechnika Warszawska, 2017

Do obrony gotowa jest także praca Marzeny Rodak z kierunku Inżynieria Nanostruktur na Uniwersytecie Warszawskim (studentka ma przerwę związaną z urodzeniem dziecka). Praca zatytułowana jest „Łączenie koloidalnych kropek kwantowych z wybranymi białkami i oligonukleotydami - otrzymywanie i charakterystyka".

Praca doktorska

Jestem opiekunem naukowym p. mgr Magdaleny Łazickiej, której promotorem jest prof. dr hab. Maciej Garstka, z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Wraz z otwarciem przewodu (przewidywany na koniec 2017 roku) obejmę funkcję promotora pomocniczego.

Zajęcia dydaktyczne

1. Fundacja na Rzecz Dzieci

Prowadziłam pięciokrotnie tygodniowe warsztaty laboratoryjne z biofizyki dla stypendystów Fundacji na Rzecz Dzieci (styczeń 2013, styczeń 2014, styczeń 2015, styczeń 2016 i styczeń 2017), będące częścią programu realizowane przez Instytut Fizyki PAN. W każdym z warsztatów brało udział dwoje uczestników, wyłonionych na podstawie wcześniejszych kwalifikacji.

Byłam także opiekunką dwóch staży wakacyjnych stypendysty Fundacji na Rzecz Dzieci, Szymona Szostaka. Staże były wspierane przez Fundację na Rzecz Dzieci (dwa tygodnie, lipiec 2016) oraz Fundację Explory (dwa tygodnie, wrzesień 2016).

2. Staże wakacyjne dla studentów II roku (biofizyka i fizyka UW, chemia UW)
    a. 2012 - 1 osoba, 4 tygodnie, lipiec
    b. 2013 - 3 osoby, 4 tygodnie każda, praktyki zawodowe, lipiec –wrzesień
    c. 2015 - 1 osoba, 3 tygodnie, wrzesień
    d. 2016 - 2 osoby, 3 tygodnie każda, lipiec-wrzesień

3. Wykłady
    a. 3 wykłady (2 h każdy) w ramach kursu „Podstawy biofizyki" – semestr letni 2015, Instytut Fizyki PAN
    b. Wykład (2 h) w ramach wykładu monograficznego „Fotosynteza - teraźniejszość, przeszłość i przyszłość" na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Kurs odbywał się w roku 2013, 2014 i 2016.
4. Piknik naukowy i Festiwal Nauki w Warszawie
    a. W roku 2016 brałam udział w opracowaniu koncepcji pokazu „Medycyna w kolorze żółtym", który następnie współprezentowałam podczas XXV Pikniku Naukowego w Warszawie.
    b. Pokaz „Medycyna w kolorze żółtym" został następnie wykorzystany na Festiwalu Nauki (wrzesień 2016, Warszawa). Pokaz ten także współprowadziłam.
    c. W roku 2017 brałam udział w opracowaniu koncepcji oraz współprowadziłam pokaz „Biofizyka pieczenia chleba" na XXVI Pikniku Naukowym w Warszawie.

Joanna Gnyb.