

dr hab. Eryk Wolarz, prof. nadzw. PP  
Zakład Mikro- i Nanostruktur  
Instytut Badań Materiałowych  
i Inżynierii Kwantowej  
Wydział Fizyki Technicznej  
Politechnika Poznańska  
ul. Piotrowo 3, 60-965 Poznań  
e-mail: [eryk.wolarz@put.poznan.pl](mailto:eryk.wolarz@put.poznan.pl)

Poznań, 20.08.2018 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Brach  
pt. „Ciekłokrystaliczne DNA domieszkowane nanostrukturami”**

Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę maszynopisu książki i została napisana w Katedrze Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod opieką naukową prof. dr. hab. inż. Marka Samocia. Prace badawcze stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej prowadzone były w wymienionym powyżej ośrodku naukowym oraz w ośrodkach zewnętrznych. W szczególności materiał DNA, doktorantka przygotowała we współpracy dr. Krzysztofem Pawlikiem z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Fotochemiczna analiza zmian strukturalnych DNA była wykonywana w kooperacji z grupą badawczą prof. Malcolma Buckle'a z Laboratorium Biologii i Farmakologii Stosowanej z ENS Cachan we Francji. Doktorantka złożyła podziękowania członkom zespołu badawczego z macierzystego ośrodka badawczego, w szczególności dr hab. Katarzynie Matczyszyn za inspirację do badań, wsparcie i zaangażowanie w trakcie realizacji doktoratu, a także dr inż. Marcie Gordel-Wójcik, mgr inż. Magdalenie Waszkiewicz i mgr inż. Magdalenie Klekotko za zsyntezowanie nanocząstek wykorzystywanych w eksperymentach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy łącznie 166 stron. Część wstępna zawiera podziękowania dla osób, które przyczyniły się do jej powstania, szczegółowy spis treści oraz objaśnienia stosowanych skrótów. Wykaz stosowanych skrótów okazuje się bardzo przydatny w trakcie czytania zasadniczej części rozprawy. Drobne uwagi mogą dotyczyć objaśnienia skrótu „CPDs” („cyklobutyłowe dimery pirymidynowe”) oraz skrótów „UV” i „UV-Vis”. Czy możliwe byłoby użycie w tych przypadkach określeń „zakres ultrafioletu”, „zakres światła widzialnego i ultrafioletu”? W zakończeniu pracy znajdują się kolejno: lista podpisów pod rysunkami, wykaz tabel, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim (wymaganym ustawowo) oraz wykaz dorobku publikacyjnego doktorantki obejmujący sześć artykułów naukowych.

Część zasadnicza rozprawy składa się z dziewięciu rozdziałów. W pierwszym rozdziale doktorantka przedstawiła motywację i cel pracy. Zwróciła uwagę, że w ciągu ostatnich kilkunastu lat znacznie wzrosło zainteresowanie materiałami hybrydowymi, jakimi są ciekłe

kryształy domieszkowane nanocząstkami. Dotyczy to zarówno termotropowych jak i liotropowych ciekłych kryształów z wprowadzonymi do nich nanocząstkami plazmonicznymi, węglowymi, magnetycznymi lub półprzewodnikowymi. Układy te mogą znaleźć zastosowanie m.in. w konstrukcji urządzeń elektro-optycznych wykorzystujących zjawiska fotoniczne lub plazmoneczne. Mając na uwadze ten nurt badań, doktorantka skierowała swoje zainteresowanie w kierunku układów tworzonych przez ciekłokrystaliczne DNA domieszkowane złotymi lub złoto-srebrnymi nanocząstkami. Badania materiałów tego typu mają bardzo duże znaczenie poznawcze przede wszystkim w genetyce, a także mogą służyć opracowaniu nowych schematów leczenia w terapii genowej. W swojej pracy doktorantka określiła dwa główne cele. Pierwszym z nich było zbadanie wpływu uporządkowania cząsteczek DNA tworzących liotropowy ciekły kryształ na ich strukturę. Badania te mogłyby dostarczyć cennych wskazówek przy opracowywaniu metod kontroli transkrypcji genowej in vivo. Do tego celu doktorantka zaplanowała wykorzystanie techniki fotochemicznej analizy zmian strukturalnych. Drugim celem pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania nanocząstek złota jako znaczników w obrazowaniu DNA w różnych fazach ciekłokrystalicznych. W szczególności dotyczy to określenia preferowanych obszarów lokowania się nanocząstek złota o różnym kształcie i rozmiarze w niejednorodnej strukturze ciekłokrystalicznej próbki DNA oraz wpływu nanocząstek na stabilność tej struktury. Do tych badań zaplanowano wykorzystanie jednofotonowej mikroskopii polaryzacyjnej i dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej. **Cele badań zostały określone w sposób jasny i nie budzący zastrzeżeń.**

Drugi rozdział stanowi wprowadzenie do rozprawy. W rozdziale tym przedstawiony został aktualny stan wiedzy dotyczący struktury DNA oraz formowania przez DNA in vitro liotropowych faz ciekłokrystalicznych różnych typów (niebieskiej i precholesterolowej, cholesterolowej, kolumnowej). Ponadto przedstawiono w nim ogólną charakterystykę nanocząstek złota, ich klasyfikację, a także omówiono wybrane zjawiska związane z oddziaływaniem fal elektromagnetycznych z nanocząstkami, które miały podstawowe znaczenie w badaniach prowadzonych przez doktorantkę. Są to w szczególności: zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy (LSPR), zjawisko generacji drugiej harmonicznej (SHG) oraz zjawisko absorpcji dwufotonowej (2PA). Również wyczerpująco zaprezentowane zostały dotychczasowe osiągnięcia dotyczące zastosowania nanocząstek złota jako wielofunkcyjnych znaczników do obrazowania in vitro i in vivo w układach biologicznych oraz ich wykorzystania w badaniach medycznych. Zwrócono również uwagę na zagrożenia związane z zastosowaniem niesfunkcjonalizowanych nanocząstek złota w medycynie. Omówiono również niektóre wyniki badań ciekłych kryształów domieszkowanych nanocząstkami złota, w tym dotyczące organizacji nanocząstek złota w ciekłokrystalicznym DNA. **Rozdział wprowadzający jest zwięzły i**

**zawiera najistotniejsze informacje pozwalające czytelnikowi lepiej zrozumieć stosowaną w pracy technikę eksperymentalną oraz interpretację uzyskanych wyników.**

W trzecim rozdziale doktorantka przedstawiła techniki eksperymentalne stosowane przez nią w pracy. W szczególności są to: mikroskopia polaryzacyjna, fotochemiczna analiza zmian strukturalnych (PhAST) i dwufotonowa mikroskopia fluorescencyjna. PhAST jest jedną z wielu technik wykorzystywanych m.in. w badaniach genetycznych do analizy oddziaływań pomiędzy specyficznymi sekwencjami DNA i białkami. Technika ta została opracowana przez Malcolma Buckle'a i współpracowników, z którymi doktorantka współpracowała w ramach realizacji swojego doktoratu. Ze względu na kluczowe znaczenie tej techniki w badaniach została ona szczegółowo omówiona w rozprawie z uwzględnieniem reakcji fotodimeryzacji w łańcuchu DNA na skutek działania promieniowania UV, reakcji wydłużania startera i elektroforezy kapilarnej. W rozdziale można znaleźć istotne informacje dotyczące układu mikroskopu dwufotonowego znajdującego się w laboratorium Katedry Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych, który również był intensywnie wykorzystywany w badaniach. **Przedstawiony opis technik eksperymentalnych jest wyczerpujący i nie budzi zastrzeżeń.**

Rozdziały od czwartego do siódmego zawierają wyniki eksperymentów przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Rezultaty badań omawiane w rozdziale czwartym dotyczą fotochemicznej analizy zmian strukturalnych w ciekłych kryształach DNA i zostały opublikowane w wieloautorskiej pracy, w której doktorantka jest wymieniona jako pierwszy autor (K. Brach, A. Hatekayama, C. Nougès, J. Olesiak-Bańska, M. Buckle, K. Matczyszyn, Scientific Reports 8, 4528 (2018)). Kolejne trzy rozdziały (piąty, szósty i siódmy) zawierają wyniki badań właściwości fizycznych ciekłych kryształów DNA domieszkowanych nanocząstkami złoto-srebrnymi i złotymi. Materiał dotyczący DNA domieszkowanego nanoklasterami złoto-srebrnymi, przedstawiony w rozdziale piątym został opublikowany w dwóch pracach (K. Brach, M. Waszkiewicz, J. Olesiak-Banska, M. Samoć, K. Matczyszyn, Langmuir 33, 8993 (2017) oraz K. Brach, J. Olesiak-Bańska, M. Waszkiewicz, M. Samoć, K. Matczyszyn, J. Mol. Liq. 259, 82 (2018)), natomiast wyniki prac dotyczące układów DNA-nanopręty złota opublikowano w jednym artykule (K. Brach, K. Matczyszyn, J. Olesiak-Bańska, M. Gordel, M. Samoć, Phys. Chem. Chem. Phys. 18, 7278 (2016)). Doktorantka nie wspomniała, czy wyniki badań DNA domieszkowanego nanogwiazdkami złota, zaprezentowane w rozdziale siódmym, również zostały opublikowane w artykułach naukowych. **Należy stwierdzić, że publikacja wyników badań w renomowanych czasopismach naukowych, jak ma to miejsce w przypadku recenzowanej rozprawy, jest ważnym atutem w jej pozytywnej ocenie.**

Ponieważ badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej uzyskały już akceptację recenzentów będących wybitnymi ekspertami w odpowiednich dziedzinach, powoływanych przez wydawnictwa naukowe, pozwolę sobie jedynie na skrótowe omówienie rezultatów

eksperymentów i wskazanie drobnych nieścisłości, które wystąpiły w tych rozdziałach. W rozdziale czwartym omówione zostały prace badawcze dotyczące DNA otrzymanego z komórek bakterii *Escherichia coli* o znanej sekwencji nukleotydowej. W rozdziale szczegółowo opisano proces izolacji DNA z komórek oraz procesy linearyzacji i ponownego oczyszczania plazmidowego DNA. Omówiono spektroskopową analizę czystości plazmidowego DNA w zakresie UV-Vis. W pracy zamieszczono widma uzyskanego plazmidowego DNA w roztworze wodnym potwierdzające skuteczność stosowanych procedur oczyszczania. Pewne wątpliwości może budzić opis osi rzędnych na wykresach (Rys. 4.1 i 4.2). Czy mamy tu do czynienia z absorpcją czy absorbancją? Do badań z wykorzystaniem techniki PhAST przygotowano serię sześciu liotropowych ciekłych kryształów na bazie wodnego roztworu DNA o stężeniu 0,5 mg/mL oraz 10 mM buforu Tris z odpowiednim dodatkiem soli NaCl i MgCl<sub>2</sub>. W podobny sposób przygotowano porównawczą serię roztworów izotropowych, zmniejszając stężenie DNA w roztworze wodnym do 0,05 mg/mL. Przeprowadzono obserwacje mikroskopowe roztworów DNA na brzegach wysychających kropli osadzanych na stałym podłożu. Potwierdzono występowanie tekstury zygzakowatej. Doktorantka używa tutaj często określenia „faza zygzakowata”, co nie wydaje się właściwe. W celu wytworzenia zmian strukturalnych w DNA, próbki poddawano działaniu promieniowania UV, stosując impulsowy laser Nd:YAG. Następnie dla próbek tych przeprowadzono reakcję wydłużania startera (dostępnego komercyjnie). Do wyselekcjonowania produktów reakcji zastosowano rozdział elektroforetyczny. Szczegółowa analiza elektroforegramów otrzymanych zarówno dla DNA ciekłokrystalicznego jak również dla DNA w roztworze izotropowym, po ich naświetleniu, pozwoliła stwierdzić w obu przypadkach występowanie defektów w postaci dimerów pirymidynowych, tworzonych przez pary zasad w określonych pozycjach DNA. Dalsze badania pokazały, że wpływ na pozycje tych defektów w cząsteczkach DNA ma ich uporządkowanie w roztworze, a także wartość pH roztworu. Doktorantka przeprowadziła szczegółową dyskusję otrzymanych wyników eksperymentalnych. Stwierdziła, że typ uporządkowania molekuł DNA w roztworze ma istotny wpływ na strukturę przestrzenną tych cząsteczek. Ponadto zasugerowała, iż uporządkowanie ciekłokrystaliczne DNA *in vivo* może być istotnym czynnikiem wpływającym na epigenetyczną kontrolę ekspresji genów. **Wyniki zaprezentowane w rozdziale czwartym należy uznać za bardzo wartościowe, poszerzające wiedzę przede wszystkim z zakresu genetyki, biochemii, a także biofizyki.**

W rozdziale piątym opisano badania dotyczące ciekłych kryształów DNA domieszkowanych nanoklasterami złoto-srebrnymi. Nanoklastery są szczególnym rodzajem nanocząstek zbudowanych z kilkudziesięciu atomów (np. złota) i rozmiarach porównywalnych z długościami fal dla elektronów z poziomu Fermiego. W tego typu strukturach dominują efekty kwantowe. Obecność atomów srebra w badanych w pracy nanoklasterach wpływa na wzrost

wydajności kwantowej luminescencji nanoklasterów złota i jednocześnie powoduje wzmocnienie emisji. W rozdziale podano ogólne informacje dotyczące syntezy nanoklasterów złoto-srebrnych oraz przygotowania próbek ciekłokrystalicznego DNA domieszkowanego nanoklasterami. Badano dwa typy próbek – w postaci warstw na brzegu wysychających kropeł roztworu DNA i warstw tego roztworu zamkniętych w komórkach ciekłokrystalicznych. Wykorzystywane w badaniach DNA pochodziło z ikry łososia i uzyskano je ze źródła komercyjnego. W badaniach stosowano metodę transmisyjnej mikroskopii elektronowej, metody absorpcyjną i fluorescencyjną, metodę jednofotonowej mikroskopii polaryzacyjnej i metodę mikroskopii sil atomowych. Wstępne badania pozwoliły określić właściwości fizyczne wykorzystywanych w badaniach nanoklasterów. Uzyskano ich obraz TEM (znacznik skali na Rys. 5.1a jest niepoprawny), widma absorpcji wodnego roztworu nanoklasterów, widma jednofotonowo wzbudzonej emisji oraz widma dwufotonowo wzbudzonej emisji nanoklasterów w wodnym roztworze i w cienkiej warstwie. Zaobserwowano zjawisko generacji drugiej harmonicznej dla nanoklasterów. W dalszej części rozdziału opisano wyniki badań dotyczące ciekłokrystalicznego DNA domieszkowanego tymi nanoklasterami na brzegach wysychających kropeł i w komórkach ciekłokrystalicznych. Na brzegach kropeł obserwowano charakterystyczną teksturę zygzakowatą oraz występowanie domen fazy kolumnowej. Dzięki właściwościom emisyjnym wykorzystywanych nanoklasterów określono ich rozkład w badanych próbkach. Stwierdzono, że nanoklasterki rozmieszczone były wewnątrz całej warstwy, jednak ich koncentracja była większa w obszarach defektów fazy kolumnowej. Analogiczne badania przeprowadzone dla warstw ciekłokrystalicznego DNA z nanoklasterami złoto-srebrnymi w komórkach ciekłokrystalicznych potwierdziły występowanie faz cholesterolowej i kolumnowej. Stwierdzono, że w fazie cholesterolowej nanoklasterki były rozmieszczone równomiernie w objętości próbki, natomiast w fazie kolumnowej następowała agregacja nanoklasterów. W obu przypadkach zaobserwowano wypieranie nanoklasterów do obszarów występowania fazy izotropowej o niższym stopniu uporządkowania. Ważną obserwacją było to, że nanoklasterki złoto-srebrne nie wpływały istotnie na stabilność faz ciekłokrystalicznych. **Prace opisane w rozdziale piątym mają istotne znaczenie, ponieważ pozwoliły one ocenić możliwości stosowania nanoklasterów złoto-srebrnych jako znaczników do obrazowania DNA w fazach ciekłokrystalicznych.**

W rozdziale szóstym przedstawiono zagadnienia związane z ciekłymi kryształami DNA domieszkowanymi nanoprętami złota o średniej długości 35 nm i średnicy 10 nm, stabilizowanymi ligandami naładowanymi dodatnio (CTAB) lub ujemnie (PSS). Omówiono schemat syntezy nanoprętów złota oraz podano skład roztworów, w których rozpuszczano DNA. Tak jak poprzednio, w badaniach wykorzystywano DNA pochodzące z ikry łososia. W rozdziale przedstawiono obrazy TEM nanoprętów „dekorowanych” ligandami oraz ich widma UV-Vis z

widocznymi dwoma charakterystycznymi pasmami zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR). Skoncentrowano się na zbadaniu wpływu ładunku ligandów na właściwości fazowe roztworów DNA w komórkach ciekłokrystalicznych. Badania pozwoliły stwierdzić, że domieszkowanie roztworów DNA nanopętami złota przy stosowanych stężeniach nie powodowało zauważalnego zwiększenia liczby defektów w fazach ciekłokrystalicznych. **Istotnym wynikiem badań było stwierdzenie, że wprowadzenie do ciekłokrystalicznego DNA nanopęt z dodatnio naładowanymi ligandami powodowało niewielkie zwiększenie skoku helisy fazy cholesterolowej oraz znaczny wzrost stabilności tej fazy oraz fazy kolumnowej. W przypadku domieszkowania nanopętami z ujemnie naładowanymi ligandami następowało zmniejszenie skoku helisy fazy cholesterolowej i destabilizacja obserwowanych faz ciekłokrystalicznych.**

W ostatnim rozdziale rozprawy prezentującym wyniki badań (rozdział siódmy) omówiono ciekłe kryształy DNA domieszkowane nanogwiazdkami złota. Nanogwiazdki złota posiadają nieregularny kształt charakteryzujący się występowaniem licznych ostrych końcówek osadzonych na rdzeniu w postaci nanokulki złota. Po krótkim przedstawieniu syntezy nanogwiazdek oraz przygotowania komórek ciekłokrystalicznych zawierających roztwory DNA z nanogwiazdkami złota, omówiono podstawowe właściwości fizyczne wykorzystywanych nanogwiazdek (obrazy SEM, widma ekstynkcji). Następnie przedstawiono wyniki obrazowania ciekłych kryształów DNA domieszkowanych nanogwiazdkami złota z wykorzystaniem metod jednofotonowej mikroskopii polaryzacyjnej i mikroskopii dwufotonowej. W podsumowaniu tej części badań stwierdzono, że domieszkowanie ciekłych kryształów DNA nanogwiazdkami może prowadzić do zmiany skoku helisy fazy cholesterolowej oraz ma wpływ na stabilność faz ciekłokrystalicznych. W fazie ciekłokrystalicznej DNA nanogwiazdki mają tendencję do tworzenia agregatów, które są wypierane do obszarów mezofazy o mniejszym uporządkowaniu DNA. Ponadto nanogwiazdki złota zaburzają uporządkowanie cząsteczek DNA w fazie ciekłokrystalicznej. **Badania pokazały, że nanocząstki złota mogą znaleźć zastosowanie w powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana, w obrazowaniu dwufotonowym oraz mogą być przydatne w terapii fototermicznej.**

Rozdział ósmy zawiera ogólne podsumowanie badań przedstawionych w rozprawie. Ostatni, dziewiąty rozdział zawiera bardzo obszerny spis odnośników literaturowych składający się z 318 pozycji.

Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera bogaty materiał eksperymentalny dotyczący zagadnień związanych z wpływem uporządkowania DNA w fazie ciekłokrystalicznej na jego strukturę przestrzenną oraz możliwościami zastosowania nanocząstek złota jako znaczników w obrazowaniu DNA w różnych fazach ciekłokrystalicznych. Założone cele pracy zostały zrealizowane. Materiał badawczy przedstawiony w rozprawie został opublikowany

przez doktorantkę w czterech artykułach w renomowanych czasopismach naukowych. Rozprawa ma przemyślany układ i jest napisana poprawną polszczyzną. Występujące sporadycznie błędy (literówki) nie umniejszają jej wartości. Nieliczne uwagi merytoryczne zawarte w niniejszej recenzji również nie wpływają na pozytywną ocenę pracy.

**Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i niniejszym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Brach do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Polowinski', is located in the lower right quadrant of the page.