

Manuela Grelich-Mucha

Amyloids: correlating autofluorescence in one- and two-photon regimes with morphology and secondary structure

Streszczenie Pracy Doktorskiej

Amyloidy należą do agregatów peptydowych lub białkowych, charakteryzujących się obecnością struktury drugorzędowej typu β -kartki, stabilizowanej przez gęstą sieć wiązań wodorowych. Amyloidy występują głównie w formie podłużnych fibryli, a ich odkładanie się związane jest z patologicznym stanem, jakim jest np. choroba Alzheimera. Amyloidy posiadają bardzo ciekawe właściwości optyczne. W wyniku wzbudzenia w zakresie 340-380 nm, emitują sygnał autofluorescencji w zakresie światła widzialnego (440-530 nm). Pomimo wysuniętych kilku hipotez na temat mechanizmu odpowiedzialnego za autofluorescencję amyloidów, właściwe źródło nie zostało jeszcze poznane. Zjawisko autofluorescencji, do którego dochodzi w wyniku wzbudzenia wielofotonowego, zostało zbadane dotychczas w nieznacznym stopniu. Lepsze zrozumienie nieliniowych właściwości optycznych amyloidów daje potencjalną możliwość do ich wykrywania *in vivo*.

Niniejsza Praca Doktorska ma charakter interdyscyplinarny i obejmuje zagadnienia z pogranicza chemii oraz inżynierii materiałowej w badaniu struktur amyloidowych. Przeprowadzone badania obejmują (i) syntezę amyloidogennych peptydów metodą syntezy peptydów na podłożu stałym oraz optymalizację protokołów inkubacji, (ii) charakteryzację liniowych i nieliniowych właściwości optycznych, morfologii, struktury drugorzędowej oraz (iii) symulacje dynamiki molekularnej (MD).

W ramach Pracy Doktorskiej została zbadana autofluorescencja fibryli amyloidowych otrzymanych z fragmentu 105-115 transtyretyny, TTR(105-115). Zostały rozpatrzone *L*- i *D*-enancjomery oraz ich mieszanina racemiczna. Peptydy TTR(105-115) zostały sfunkcjonalizowane grupą α -aminową oraz amidową odpowiednio na N- i C-końcach. Obrazowanie morfologii wskazało na znaczne różnice między fibrylami enancjomerów oraz racematu. Co ciekawe, próbka racemiczna miała przesunięty ku krótszym długościom fal sygnał autofluorescencji względem obu enancjomerów. Ponadto, enancjomeryczne i racemiczne fibryle różniły się ułożeniem struktury typu β -kartki. Otrzymane wyniki pokazują, że różnice w morfologii oraz organizacji struktury β -kartkowej mogą wpływać na autofluorescencję fibryli.

W celu lepszego zrozumienia zależności między morfologią i strukturą drugorzędową, badania zostały poszerzone o różne grupy funkcyjne na N- i C-końcach fragmentów TTR(105-115). Otrzymane enancjomeryczne oraz quasi-racemiczne próbki różniły się pod względem morfologii. Ponadto, badane fibryle charakteryzowały się różnym ułożeniem struktury typu β -kartki. Symulacje MD wskazały, że do powstania fibryli

niezbędna jest odpowiednia liczba wiązań wodorowych. Otrzymane wyniki pokazują, że modyfikacje grup końcowych peptydów wpływają na strukturę drugorzędową powstających agregatów.

Przeprowadzone badania obejmują także jedno- (1P) i dwu-fotonowo (2P) wzbudzaną autofluorescencję amyloidów lizozymu białka jaja kurzego (HEWL) i szukania zależności między właściwościami optycznymi, morfologią, a ich strukturą drugorzędową. W wyniku inkubacji HEWL w funkcji siły jonowej powstały fibryle różniące się morfologią i zawartością struktury typu β -kartki. Pomimo tego, że proces wzbudzenia 2P charakteryzuje się niemal dwukrotnie niższą energią niż proces 1P, sygnały 1P i 2P wzbudzanej autofluorescencji charakteryzowały się innymi drogami relaksacji. Przesunięty ku dłuższym długościom fal sygnał 2P autofluorescencji (względem sygnału 1P) został dodatkowo potwierdzony przez różne czasy życia fluorescencji wzbudzanej w procesie 1P i 2P. Otrzymane wyniki udowodniły, że autofluorescencja może zostać wzbudzona w procesie 2P, co otwiera możliwość do wykrywania amyloidów *in vivo*.

Przedstawione wyniki badań pokazują, że interpretacja morfologii i struktury drugorzędowej amyloidów może pomóc w lepszym zrozumieniu zjawiska autofluorescencji oraz wskazują, że struktury te mogą być badane pod wieloma względami. Tym samym, zachęcają do kontynuacji badań w obszarze amyloidów.