



dr hab. inż. Katarzyna Matras-Postolek, prof. PK

25.07.2025r., Kraków

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków

k.matras@pk.edu.pl, tel. +48 126282704

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Manueli GRELICH-MUCHY

pt. „*Amyloids: correlating autofluorescence in one- and two-photon regimes with morphology and secondary structure*”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Manueli Grelich-Muchy została przygotowana na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej pod opieką dwóch promotorów: dr hab. inż. Joanny Olesiak-Bańskiej, prof. PWr, oraz prof. Vladimira Torbeeva z Uniwersytetu w Strasburgu (Francja). Rozprawa doktorska obejmuje niezwykle interesujące badania interdyscyplinarne z obszaru chemii, inżynierii materiałowej, biologii strukturalnej oraz spektroskopii. **Głównym celem pracy jest synteza i zbadanie struktur białkowych amyloidów z wykorzystaniem zaawansowanych metod spektroskopowych.**

Amyloidy to białkowe struktury o charakterystycznej, uporządkowanej konformacji β -harmonijki, odznaczające się dużą odpornością na proteolizę. Powstają w wyniku nieprawidłowego fałdowania polipeptydów, co może być indukowane zmianami pH, temperatury, stresem mechanicznym lub oksydacją. Agregacja białek prowadzi do tworzenia nierozpuszczalnych włókien amyloidowych, które w organizmie człowieka mogą odkładać się w tkankach, przyczyniając się do rozwoju amyloidoz i chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Wczesne wykrywanie struktur amyloidowych ma kluczowe znaczenie w kontekście rozwoju wspomnianych chorób. Amyloidy wykazują interesujące właściwości optyczne, po wzbudzeniu w zakresie 340–380 nm emitują sygnał autofluorescencji w świetle widzialnym w zakresie od 440–530 nm. Choć istnieje kilka hipotez dotyczących mechanizmu tej emisji, jej źródło pozostaje nie do końca poznane. Zjawisko autofluorescencji przy wzbudzeniu wielofotonowym jest słabo zbadane, a lepsze poznanie nieliniowych właściwości optycznych amyloidów może umożliwić ich wykrywanie metodą *in*

vivo. Z tego punktu widzenia podjętą w rozprawie doktorskiej tematykę badawczą uważam za niezwykle istotną i aktualną.

Recenzowana rozprawa doktorska ma układ klasycznej dysertacji, została napisana w języku angielskim i liczy 146 stron. Zasadnicze części rozprawy obejmują: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp - w którym przedstawiono hipotezy badawcze, część literaturową (37 stron), badania własne z omówieniem wyników (59 stron), podsumowanie i dyskusję (5 stron) oraz spis literatury (15 stron, łącznie 240 pozycji). Rozprawę uzupełniają: spis treści, wykaz skrótów, wykaz dorobku naukowego Kandydatki oraz sekcja *Publishing Statements*, zawierająca informacje o wkładzie Autorki w przygotowanie poszczególnych tabel i rysunków zamieszczonych w pracy.

Część literaturowa pracy doktorskiej składa się z trzech głównych podrozdziałów będącym wprowadzeniem do tematyki badawczej. Podrozdział 1 zawiera podstawy teoretyczne dotyczące procesów optycznych jedno- i wielofotonowych, a także definiuje kluczowe parametry fluorescencji: czas życia oraz wydajność kwantową. Kolejne części poświęcone są procesom dwufotonowym (2PA, 2PEF), stanowiącym istotny element badań. Autorka wyjaśnia, że w warunkach wysokiego strumienia fotonów, uzyskiwanego za pomocą laserów impulsowych o czasie trwania impulsów w zakresie piko- i femtosekund, możliwa jest jednoczesna absorpcja dwóch fotonów, której suma energii odpowiada przerwie energetycznej między stanem podstawowym a wzbudzonym. Wreszcie, w części poświęconej metodom wyznaczania przekroju czynnego absorpcji dwufotonowej (σ_2), Doktorantka omawia zarówno metody bezpośrednie (np. technika Z-scan), jak i pośrednie, oparte na zjawisku fluorescencji. W podrozdziale 2 zostały z kolei omówione podstawy teoretyczne dotyczące peptydów i białek, w tym syntezę peptydów w roztworze oraz w ciele stałym, hierarchiczną budowę białek, a także procesy prawidłowego i nieprawidłowego ich fałdowania się, które mają kluczowy wpływ na ich właściwości. Podrozdział ten jest niezwykle ciekawy z punktu widzenia znaczenia i zastosowania struktur białkowych. W końcu podrozdział 3 stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat amyloidów. W części tej, Autorka w przystępny i treściwy sposób przedstawia najważniejsze informacje dotyczące ich struktury (włókna, sferulity), funkcji oraz zjawiska polimorfizmu, a także stosowanych metody ich charakteryzacji (XRD, TEM, AFM, SEM, ATR-FTIR). Kolejna część została poświęcona wyjaśnieniu ich właściwości

autofluorescencji, z uwzględnieniem głównych hipotez tłumaczących mechanizm tego zjawiska. Doktoranta szczególną uwagę poświęca tu roli krótkich wiązań wodorowych oraz oddziaływań z udziałem grup karbonylowych (CO), które mogą odpowiadać za występowanie niearomatycznej autofluorescencji. Autorka omawia również najważniejsze metody obrazowania amyloidów z wykorzystaniem klasycznych barwników, takich jak tioflawina T i czerwień Kongo, a także przedstawia możliwości ich detekcji *in vivo* przy użyciu fluorescencyjnych sond działających w zakresie bliskiej podczerwieni.

Podsumowując część teoretyczną, którą Kandydatka określiła jako *Wprowadzenie*, oceniam ją bardzo pozytywnie. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a poszczególne rozdziały tworzą spójną całość, ułatwiając czytelnikowi zrozumienie zarówno teoretycznych podstaw, jak i wyników badań. Całość świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki, która w sposób systematyczny i klarowny przedstawia podstawy fizyczne i metodyczne niezbędne do dalszych badań eksperymentalnych. Na uwagę zasługuje estetyka tej części pracy, rysunki są czytelne i starannie opracowane, a tekst napisany jest jasnym i poprawnym językiem. Kandydatka w części literaturowej cytuje aż 173 pozycje literaturowe, w tym publikacje z czasopism o wysokim współczynniku wpływu, co dowodzi, że podjęta tematyka badawcza jest zarówno istotna, jak i aktualna.

Zauważam jednak, że w tej części zabrakło głębszego wyjaśnienia oraz wyraźnego rozróżnienia dwóch pojęć, fluorescencji i autofluorescencji, z których to drugie jest kluczowym przedmiotem badań eksperymentalnych. Ponadto w części teoretycznej nie zostało dokładnie omówione zjawisko epimeryzacji (Rysunek 4). Mam również pytanie dotyczące opisanej na stronie 28 strategii konwergencji (Rysunek 5) – w jaki sposób w praktyce przeprowadza się izolację i sprzęganie w roztworze poszczególnych fragmentów budulcowych białek? Szczegółowe wyjaśnienie tych kwestii pomogłoby lepiej zrozumieć przedstawioną metodologię syntezy peptydów. Pomimo tych drobnych uwag, w mojej opinii Wprowadzenie w sposób przejrzysty i jednoznaczny przedstawia aktualny stan wiedzy na temat amyloidów oraz stanowi solidną podstawę do sformułowania hipotez badawczych, które Autorka jasno sprecyzowała w postaci głównych postulatów, przedstawionych w pracy na stronie 15.



Analizując część doświadczalną, warto zaznaczyć, że badania przedstawione w pracy cechują się dużą spójnością i konsekwencją – zarówno w zakresie planowania i przeprowadzenia eksperymentów, jak i w starannym doborze metod analitycznych służących do charakterystyki uzyskanych struktur białkowych. Taki sposób realizacji badań świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz Jej bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań na wysokim poziomie, także w środowisku międzynarodowym. Część eksperymentów, w tym dotyczących syntezy struktur białkowych, została zrealizowana przez Kandydatkę w trakcie kilku staży na Uniwersytecie w Strasburgu we Francji.

W pracy doktorskiej w celu otrzymania wybranych peptydów zastosowano syntezę w fazie stałej (SPPS) z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego (reaktor Liberty Blue, CEM), przy użyciu komercyjnie dostępnych reagentów. W kolejnym etapie otrzymane związki zostały oczyszczone i analizowane przy użyciu wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej (HPLC) w trybie analitycznym i preparatywnym oraz spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS). Potwierdzenie struktury oraz badania morfologii opracowanych związków wykonano przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz spektroskopii ATR-FTIR. Badania optyczne przeprowadzono metodami absorpcyjnej i fluorescencyjnej spektroskopii. Dodatkowo, w celu oceny stabilności i właściwości molekularnych badanych układów, zastosowano symulacje dynamiki molekularnej (MD) w środowisku GROMACS z wykorzystaniem odpowiednich modeli β -kartkowych.

Jednym z ważniejszych osiągnięć Doktorantki, były wyniki zaprezentowane w podrozdziale 5 części doświadczalnej, dotyczące autofluorescencji enancjomerycznie czystych fibryli amyloidowych L- i D- oraz ich mieszaniny racemicznej. Pani Manuela była odpowiedzialna zarówno za otrzymanie i oczyszczenie odpowiednich związków, jak i ich charakterystykę. Badanym peptydem był fragment transtyretyny 105–115 (TTR(105–115)) funkcjonalizowany na końcu N-grupą α -aminową, a na końcu C-grupą amidową. W eksperymencie porównano właściwości optyczne i strukturalne otrzymanych próbek czystych enancjomerów oraz ich mieszaninę racemiczną w stosunku molowym 1:1. Wykazano wyraźne różnice morfologiczne w obu przypadkach, włókna enancjomeryczne tworzyły helikalne struktury, natomiast mieszanina racemiczna przyjmowała formę taśmowatą. Widma ATR-FTIR ujawniły obecność struktur β -kartki: równoległej w próbkach enancjomerycznych oraz

antyrownoległej w próbce racemicznej. Symulacje dynamiki molekularnej potwierdziły dużą stabilność strukturalną włókien racemicznych, z uporządkowaną siecią wiązań wodorowych i dobrze upakowanym rdzeniem hydrofobowym. Doktorantka zaobserwowała, że wszystkie badane próbki wykazują autofluorescencję, przy czym włókna racemiczne mają przesunięcie maksimum autofluorescencji ku krótszym długościom fal, co powiązała z odmienną organizacją struktury drugorzędowej i występowaniem gęstej sieci wiązań wodorowych. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała główny wniosek, iż przesunięcie widma autofluorescencji pomiędzy próbkami enancjomerycznymi a racemiczną determinowane jest różnicami w morfologii oraz organizacji struktur β -harmonijki w analizowanych układach. W ten sam sposób potwierdziła jedną z kluczowych hipotez sformułowanych w niniejszej pracy doktorskiej.

W kolejnej części pracy doktorskiej Kandydatka kontynuowała badania nad fragmentem peptydu TTR(105–115), rozszerzając je o analizę jego zmodyfikowanych wariantów, w których oba końce zakończono różnymi grupami funkcyjnymi, na końcu N zastosowano grupy α -amino, N-acetylo- α -amino lub N,N-dimetylo- α -amino, natomiast na końcu C grupę amidową lub karboksylową. Od strony eksperymentalnej zastosowane metody badawcze były zbliżone do wcześniejszych etapów, natomiast sama analiza objęła nowe układy peptydowe o podobnej strukturze białkowej. Szczegółowy opis tych badań przedstawiono w podrozdziale 6. Badania prowadzono zarówno na próbkach enancjomerycznych, jak i quasi-racemicznych. Wyniki wykazały, że grupy końcowe odgrywają istotną rolę w kształtowaniu morfologii i struktury drugorzędowej powstałych struktur. Wykazano, że tworzenie włókien amyloidowych zależy od obecności wiązań wodorowych stabilizujących strukturę β -harmonijki. Co istotne, wszystkie quasi-racemiczne próbki wykazują przyspieszoną kinetykę formowania włókien w porównaniu do próbek enancjomerycznie czystych. W rozdziale tym Doktorantka pokazuje, że modyfikacje końców peptydów mogą być użytecznym narzędziem w projektowaniu ich nadcząsteczkowych agregatów o przewidywalnej morfologii. Przykładowo, obecność grupy hydroksylowej (-OH) na końcu C prowadzi do wydłużenia odległości skreću (cross-over distance) w skrećonych włóknach amyloidowych. Z kolei, grupa końcowa C-terminalna odgrywa drugorzędną rolę w kształtowaniu morfologii włókien amyloidowych, lecz ma istotny wpływ na kinetykę ich formowania.

Podrozdział 7 obejmuje badania autofluorescencji wyizolowanego lizozymu z białka jaja kurzego (HEWL) wzbudzanego jedno- i dwufotonowo. Doktorantka wykazała, że HEWL może być wzbudzany procesem dwufotonowym, a ścieżki relaksacji emisji różnią się między procesami jedno- i dwufotonowymi. Wykazano również, że włókna amyloidowe wykazują silniejszy sygnał autofluorescencji niż monomery, a wzrost stężenia soli NaCl wpływa na ich morfologię, strukturę β -harmonijkową oraz intensywność sygnału. Autofluorescencja dwufotonowa jest przesunięta ku czerwieni względem jednofotonowej, co wynika z odmiennych mechanizmów relaksacji. Badania potwierdzają zależność między właściwościami optycznymi a strukturą i morfologią agregatów. Ponadto, jak pokazała Doktorantka, możliwość wzbudzania amyloidów w reżimie nieliniowym daje nadzieję na nieinwazyjną detekcję ich złogów za pomocą metod *in vivo*.

W podrozdziale 8 Kandydatka przedstawiła podsumowanie wyników badań, perspektywy dalszych prac oraz najważniejsze wyzwania badawcze. Pani mgr inż. Manuela Grelich-Mucha wykazała słuszność większości postawionych przez siebie tez poprzez kompleksowe badania eksperymentalne i teoretyczne zrealizowane w ramach pracy doktorskiej. Udowodniła, że morfologia oraz struktura drugorzędowa struktur białkowych w istotny sposób wpływają na właściwości autofluorescencyjne włókien amyloidowych. Jednoznacznie pokazała, że morfologia i struktura drugorzędowa agregatów nadcząsteczkowych mogą być kontrolowane poprzez odpowiednią modyfikację grup końcowych budujących ich jednostek peptydowych. Potwierdziła ponadto, że autofluorescencja amyloidów może być indukowana procesem wielofotonowym, a mechanizm emisji fluorescencji wzbudzonej jedno- i wielofotonowo różni się w zależności od zastosowanego trybu wzbudzenia. **Tym samym, w mojej opinii, Doktorantka w pełni zrealizowała ambitny cel pracy doktorskiej, wnosząc istotny wkład w rozwój wiedzy na temat amyloidów białkowych – ich syntezy oraz charakterystyki przy użyciu zaawansowanych metod spektroskopowych.** O wysokiej wartości naukowej prowadzonych przez Doktorantkę badań świadczy również ranga czasopism naukowych, w których zostały opublikowane wyniki badań. Opisane w pracy badania i wyniki zostały opublikowane na łamach 3 prestiżowych czasopism tj. *The Journal of Physical Chemistry B*, *Biomaterials Science*, *The Journal of Physical Chemistry Letters*.

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęło mi się jednak kilka pytań i komentarzy, które staną się punktem wyjścia do dyskusji naukowej:

1. Dlaczego do syntezy fragmentów wybranych peptydów TTR(105–115) oraz ich modyfikacji wybrano syntezę mikrofalową? Czy próbowano w trakcie badań eksperymentalnych w tym celu wykorzystać również ogrzewanie konwencjonalne. Jakie zalety ma synteza mikrofalowa nad reakcjami prowadzonymi w standardowych warunkach ?
2. Jakie były średnie wydajności procesu syntezy wspomnianych peptydów oraz ich modyfikowanych form?
3. Jakiej czystości odczynniki zostały zastosowane w przypadku fragmentu peptydu TTR (105–115) ? Niestety, informacje te nie zostały podane w pracy, a ze względu na wyjątkowo wymagający charakter syntezy, czystość reagentów może mieć kluczowe znaczenie dla otrzymania zamierzonych struktur o odpowiednich właściwościach konformacyjnych.
4. Jak jest stabilność opracowanych, uporządkowanych struktur białkowych będących przedmiotem badań?

Część doświadczalna pracy doktorskiej została starannie przygotowana, dobrze zaplanowana i stanowi spójną całość zarówno pod względem graficznym, jak i merytorycznym. Niemniej jednak, Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów oraz niedociągnięć. Przykładowo, niektóre rysunki mogłyby być lepszej jakości (np. rys. 34 a, b i c), a w opisie procesu syntezy mikrofalowej brakuje pełnych danych dotyczących parametrów eksperymentalnych, takich jak moc reaktora, dokładny czas reakcji czy czystość użytych odczynników. Ponadto, w niektórych miejscach (np. str. 103) w przedstawionych wzorach brakuje jednostek przy podanych wartościach. Jednak pragnę podkreślić, że wspomniane uwagi i nieścisłości nie wpływają znacząco na wartość naukową rozprawy doktorskiej, która oceniam bardzo wysoko. Również pragnę zwrócić uwagę na imponujący dorobek naukowy Doktorantki, która jest autorem i współautorem w sumie 8 publikacji wydanych w prestiżowych periodykach naukowych. Wszystkie Jej prace były cytowane w sumie 69 razy, IH 8. Doktorantka była wykonawcą w 5 projektów badawczych, w tym projektu First Team finansowanych przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej. Ponadto odbyła 6 staży zagranicznych, głównie na Uniwersytecie w Strasburgu. Jest również laureatką licznych nagród i wyróżnień.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Manuela Grelich-Mucha stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego spełniając tym samym wszystkie kryteria zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Manuela Grelich-Mucha do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy, rzetelność prowadzonych badań, a także znakomity jak na tak wczesny etap kariery dorobek naukowy, wnioskuję o wyróżnienie ocenianej pracy.

Katarzyna Motus-Pastalka