



Dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 4.07.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej

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

przedstawionej przez mgr inż. Manuelę Grelich-Muchę

Agregacja białek oraz powstawanie struktur amyloidowych stanowią poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Schorzenia neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera i Parkinsona, czy amyloidozy wtórne mają u swoich podstaw obecność uporządkowanych agregatów białkowych, których usuwanie pozostaje do dziś nierozwiązanym problemem klinicznym. Trudności nie dotyczą jednak jedynie terapii – równie istotnym wyzwaniem pozostaje skuteczna i wczesna diagnostyka tych patologii.

Amyloidy charakteryzują się szczególnymi właściwościami fizykochemicznymi, w tym unikalnymi cechami optycznymi. Po wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 340–380 nm emitują sygnał autofluorescencji w zakresie światła widzialnego. Pomimo licznych badań i zaproponowanych hipotez dotyczących mechanizmu autofluorescencji amyloidów, dokładna natura tego zjawiska nie została dotąd jednoznacznie wyjaśniona. Szczególnie mało poznane pozostają nieliniowe właściwości optyczne tych struktur, w tym autofluorescencja indukowana wzbudzeniem wielofotonowym. Pogłębienie wiedzy w tym obszarze może stworzyć nowe możliwości w zakresie nieinwazyjnego wykrywania amyloidów *in vivo*, co otwiera potencjalnie przełomowe perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne.

W ostatnich latach amyloidy zyskały zainteresowanie także jako obiecujące biomateriały. Dzięki swojej wysokiej stabilności, zdolności do samoorganizacji oraz możliwości funkcjonalizacji, stanowią one atrakcyjną platformę do tworzenia nanostruktur, powłok funkcjonalnych, czy rusztowań do hodowli komórek. Kluczowe znaczenie dla ich dalszego zastosowania w technologii ma jednak szczegółowe poznanie ich struktury molekularnej oraz związanych z nią właściwości fizykochemicznych, w tym optycznych.

Praca doktorska mgr inż. Manueli Grelich-Muchy odpowiada na te zapotrzebowania.

Jednym z kluczowych i oryginalnych aspektów rozprawy doktorskiej była weryfikacja hipotezy zakładającej wpływ morfologii oraz struktury drugorzędowej amyloidowych włókien na ich właściwości

autofluorescencyjne. Kandydatka przedstawiła wieloaspektowe podejście do problemu bazując na dwóch modelach badawczych: fragmencie (105-115) transtyretyny (TTR(105-115)) oraz lizozymie izolowanym z białka jaja kurzego (HEWL). Wykazała, że różnice w chiralności peptydu, a w przypadku białka - różnice w warunkach inkubacji (stężenie NaCl), wpływają na kształt oraz na autofluorescencję badanych włókien. Udowodniła ponadto, że w mieszaninach quasi-racemicznych TTR(105-115) tworząca się antyrównoległa β -kartka sprzyja formowaniu taśmowych, nieskręconych włókien, co przypisano wyeliminowaniu odpychania między grupami funkcyjnymi zlokalizowanymi na końcach peptydu. Odpychanie to sprzyjało tworzeniu skręconych helikalnie włókien z równolegle ułożonych pasm peptydów o stereochemii wyłącznie L lub D. Wskazanie na możliwość kontroli nad architekturą supramolekularną za pomocą modyfikacji chemicznych ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale i aplikacyjne – np. w projektowaniu biomateriałów.

Kolejną hipotezę, której weryfikacji podjęła się Doktorantka, był wpływ sposobu zmodyfikowania N- i C-końców peptydu o właściwościach amyloidogennych (TTR(105-115)) na kształt, rozmiar oraz strukturę drugorzędową formujących się agregatów. Wyniki AFM potwierdziły, że modyfikacje grup końcowych znacząco wpływają na zdolność peptydów do tworzenia uporządkowanych włókien oraz na ich morfologię. Obserwacje za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) zostały spójnie powiązane z widmami w podczerwieni (ATR-FTIR) oraz uzupełnione symulacjami dynamiki molekularnej (MD), które ujawniły kluczową rolę oddziaływań elektrostatycznych i przeszkód sterycznych w procesie tworzenia struktury β -kartki. Konsekwentne zestawianie danych spektroskopowych i AFM z symulacjami MD pozwoliło nie tylko wykazać istnienie postulowanych zależności, ale też zaproponować wyjaśnienie ich źródeł. Zastosowane metody i jakość przeprowadzonych analiz świadczą o dojrzałości badawczej Doktorantki oraz jej wysokich kompetencjach w zakresie fizykochemii biomolekuł.

Na szczególną uwagę zasługuje udowodnienie możliwości występowania autofluorescencji fibryli amyloidowych TTR(105-115) oraz HEWL w wyniku procesu dwufotonowego wzbudzenia. Zauważalna różnica w sile sygnału i wydajności kwantowej fluorescencji pomiędzy monomerami a włóknami pozwoliła na postawienie tezy, że struktura amyloidowa sprzyja efektywnemu procesowi dwufotonowego wzbudzenia. Doktorantka podjęła się też udowodnienia, że między autofluorescencją wzbudzaną jedno- (1P) i dwufotonowo (2P) występują różnice mechanistyczne. Porównanie spektralnych właściwości emisji, wartości przesunięcia energetycznego oraz różnic w czasach życia fluorescencji jasno wskazało, że emisja fotonów w obu przypadkach zachodzi z różnych stanów wzbudzonych. Dodatkowo, odmiennosc funkcji dopasowujących dla zaników fluorescencji po wzbudzeniu 1P (trójeksponencjalna) i 2P (dwueksponencjalna) potwierdziła, że ścieżki relaksacyjne różnią się w zależności od mechanizmu absorpcji. Tak szczegółowa

i przekonująca analiza spektroskopowa stanowi mocny punkt rozprawy i dowodzi wysokiej klasy przygotowania metodologicznego Doktorantki.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań/zagadnień do dyskusji, które poniżej przytaczam. Byłabym wdzięczna za odniesienie się do nich podczas obrony.

- W wynikach dotyczących rozmiarów włókien fibrylarnych podawane są odchylenia od obserwowanych wielkości. Czy wynikają one z różnic w rozmiarach włókien w tych samych próbkach, czy też z powtórzeń biologicznych eksperymentów?
- Czy obrazy AFM i TEM były rejestrowane w kilku powtórzeniach dla osobno przygotowanych próbek poddawanych fibrylizacji czy też są to wyniki pojedynczych eksperymentów?
- Czy na widmach MS peptydu TTR(105-115) obecne były tylko sygnały m/z przypisane klastrom $M2+H^+$ i $M3+2H^+$? Czy nie wystąpiły sygnały $[M2+2H^+]^{+2}$ i $[M3+3H^+]^{+3}$, które, przynajmniej teoretycznie, powinny mieć większą intensywność ze względu na wyższy poziom protonowania?
- Pasma absorpcyjne przy ok 1670 cm^{-1} uznane zostało przez Doktorantkę za odpowiadające α -helisie, β -zgięciom, bądź kombinacji tych struktur. W publikacji Zou et al. (J. Phys. Chem. B 2013, 117, 4003–4013) autorzy podają, że równoległa β -kartka w strukturach fibrylarnych ma składową przy $1660\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$. Czy takie wyjaśnienie pasowałoby do wyników otrzymanych przez Doktorantkę?
- Na rysunku 35a i b przedstawione są widma ATR-FTIR m.in. dla enancjomerów L i D peptydu TTR(105-115). Położenie maksimum absorpcji w czasie t_1 na panelu a nie jest takie samo jak na panelu b (1629 cm^{-1} vs. $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$). Skąd wzięła się ta różnica?
- Doktorantka podaje, że antyrównoległa β -kartka w mieszaninie quasi-racemicznej składa się z naprzemiennie ułożonych pasm o konfiguracji L i D. Czy, przynajmniej teoretycznie, możliwy jest dla takiej mieszaniny inny układ, np. L-L-D-D? Czy układy inne niż L-D-L-D zostały kiedykolwiek opisane w literaturze?
- Opisując analogi TTR(105-115) z modyfikowanym N-końcem Doktorantka podaje, że grupami blokującymi mogą być H- oraz grupy *N*-acetylo- α -aminowa i *N,N*-dimetylo- α -aminowa. Może to sugerować, że w peptydzie z H- na N-końcu nie ma grupy aminowej. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować bardziej jednoznaczny opis wprowadzonych modyfikacji?
- Schemat syntezy przedstawiony na rys. 39 sugeruje, że grupy metylowe wprowadzane były na grupę aminową znajdującą się na C-końcu peptydu. Czy ten schemat nie powinien być zmodyfikowany?
- W rozdziale 6 Doktorantka podała, że rozmiary włókien amyloidowych dla peptydu H-TTR-OH wynosiły $22 \times 8 \times 104\text{ nm}$, a ich mniejszą wysokość i większy dystans skrzyżowania helisy (większą długość

okresu helikalnego skrętu), w porównaniu z rozmiarami enancjomerów L i D peptydu z amidowanym C-końcem (22-23 x 11 x 96-98 nm), przypisała obecności grupy karboksylowej na C-końcu. Jednak podane w rozdziale 5 rozmiary włókien dla czystych enancjomerycznie, amidowanych peptydów, nie różniły się znacząco wysokością i dystansem skrzyżowania helisy od peptydu H-TTR-OH (18 x 7 x 104 nm). Czy nie należałoby podchodzić ostrożniej do interpretacji wyników, biorąc pod uwagę pewną zmienność rozmiarów włókien fibrylarnych?

- Na stronie 86 Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że fibryle tworzone przez enancjomer L peptydu TTR(105-115) były prawoskrętne, a enancjomer D – lewoskrętne. Czy zaskakujący jest sam kierunek skrętu, czy fakt, że jest on odmienny dla każdego z enancjomerów? Czy w literaturze zostały opisane badania strukturalne enancjomerów innych peptydów amyloidogennych?

- Czy wyniki przedstawione na rys. 49c są średnią z kilku powtórzeń biologicznych? Czy różnice w zawartości β -kartki w czasie t_1 i t_2 można traktować jako istotne statystycznie?

- Przy porównywaniu modeli warstw tworzonych przez peptyd TTR(105-115) w wersji amidowanej i peptyd z karboksylowym C-końcem (Rys. 51) Doktorantka wskazuje, że różnice w morfologii fibryli tworzonych przez każdy z tych peptydów mogą wynikać z braku oddziaływań między grupą karboksylową a karbonylową reszt seryny pochodzących z dwu sąsiadujących warstw. Podobne oddziaływanie, między protonem z C-końcowej grupy amidowej a grupą karbonylową reszt Ser, zaobserwowano natomiast w modelu otrzymanym dla peptydu z amidowanym C-końcem. Czy modelowanie prowadzone było z zachowaniem warunków pH, w których próbki badane były eksperymentalnie, to znaczy w pH 2? W tych warunkach karboksylowy C-koniec powinien być protonowany i potencjalnie mógłby również utworzyć wspomniane powyżej wiązanie wodorowe. Model zaprezentowany na rys. 51b wydaje się nie uwzględniać tego protonu. Czy był on brany pod uwagę w modelowaniu? Czy odległość między tym protonem a grupą karbonylową reszty Ser z sąsiedniej warstwy wyklucza powstanie takiego oddziaływania?

- Arnaudov i de Vries (Biophys. J. 2005, 88(1): 515-526) pokazali, że lizozym przy pH 2 w temperaturze 55°C jest połowicznie, a w 60°C całkowicie rozfałdowany. Czy w związku z tym pasmo na widmie ATR-FTIR przy ok. 1650 cm^{-1} (Rys. 56) można by przypisać strukturze nieuporządkowanej zamiast α -helisie? Jak można by sprawdzić, jaką strukturę ma białko w stosowanych przez Doktorantkę warunkach eksperymentalnych?

- Czy dla próbek HEWL o pH 1,5 można rozważać charge-transfer między grupą NH_3^+ a deprotonowaną grupą karboksylową kwasu glutaminowego (str. 108)?

Powyższe uwagi są wyrazem ciekawości naukowej i przyczynkiem do dyskusji. Nie umniejszają one mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej wykonanej przez mgr inż. Manuellę Grelich-Muchę. Praca ta wnosi istotny

wkład do istniejącego stanu wiedzy na temat powiązania struktury amyloidów z ich właściwościami autofluorescencyjnymi. Opisująca wyniki badań rozprawa oparta jest na trzech publikacjach, w których Doktorantka jest pierwszą autorką. Rozprawa ta została przygotowana z ogromną starannością, z bardzo klarownym podziałem treści. Opis wyników każdej z publikacji uzupełniony jest o uzasadnienie celowości podjętych badań oraz o wnioski wyciągnięte na ich podstawie. Wyniki zilustrowane są niezwykle starannie przygotowanymi rysunkami i tabelami. Wprowadzenie literaturowe przedstawia w sposób zwięzły, ale bardzo poglądowy, informacje na temat fluorescencji jedno- i dwufotonowej, struktury amyloidów oraz ich autofluorescencji. Korekta rozprawy została przeprowadzona bardzo starannie i jest w niej niewiele błędów edytorskich. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej można z pełnym przekonaniem stwierdzić, że mgr inż. Manuela Grelich-Mucha wykazała się dojrzałością naukową, samodzielnością badawczą oraz doskonałą znajomością zarówno zagadnień eksperymentalnych, jak i teoretycznych związanych z badaniami nad amyloidami. Jej umiejętność formułowania celów badawczych, ich realizacji oraz klarownego przedstawiania wyników świadczy o wysokich kwalifikacjach badaczki gotowej do dalszego prowadzenia pracy naukowej na poziomie międzynarodowym.

Na dodatkowe podkreślenie zasługuje całkowity dorobek Doktorantki. Oprócz trzech publikacji, które stanowiły podstawę rozprawy, mgr Grelich-Mucha jest współautorką 5 innych opublikowanych prac, a dwie są w trakcie przygotowywania. Wyniki swoich badań prezentowała również na polskich i międzynarodowych konferencjach, będąc łącznie współautorką 7 komunikatów ustnych i 6 posterowych. Doktorantka odbyła kilka staży i wizyt naukowych w zagranicznych ośrodkach (Université de Strasbourg, Francja oraz Technische Universität Chemnitz, Niemcy). Może się też poszczycić imponującą listą nagród i wyróżnień, a także aktywnością obejmującą organizację konferencji, czy aplikowanie o granty.

Podsumowując, stwierdzam, iż rozprawa spełnia warunki 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). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauk Chemicznych Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Manuely Grelich-Muchy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Składam również wniosek o wyróżnienie rozprawy.