



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wojciech Dzwolak  
[wdzwolak@chem.uw.edu.pl](mailto:wdzwolak@chem.uw.edu.pl)

Warszawa, 21 sierpnia 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Patryka Obstarczyka „*Amyloids bio-imaging: two-photon excited autofluorescence and multimodal gold nanoclusters*” powstałej pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Olesiak-Bańskiej na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej.

Nanowłókna amyloidowe – uporządkowane,  $\beta$ -karkowe agregaty białek lub peptydów wykazujące charakterystyczny wzór dyfrakcji rentgenowskiej (tzw. *cross- $\beta$* ) od kilku już dekad są obiektem intensywnych badań prowadzonych przez biofizyków i biologów strukturalnych. Tłem dla niesłabnącego zainteresowania tymi strukturami jest ich powiązanie z szeregiem chorób degeneracyjnych, w których nieprawidłowo zwinięte białka odkładają się w formie złogów amyloidowych w różnych tkankach. Wśród kilkudziesięciu chorób z tej grupy są m.in. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, cukrzyca typu II, ale również pewne choroby nowotworowe. Co istotne, najbardziej toksyczną formą białka nie musi być wcale samo włókno amyloidowe – rolę tę często spełnia pośredni stan strukturalny powstający przejściowo na ścieżce amyloidogennych przemian konformacyjnych. Z drugiej strony, niezwykła stabilność termodynamiczna i mechaniczna nanowłókien amyloidowych powstałych z *niepatogennych* białek jest często wykorzystywana przez żywe organizmy (jak to się dzieje w przypadku ludzkiego PMEL17, czy bakteryjnych fimbrii spiralnych). Abstrahując od biomedycznego aspektu tych badań, procesy amyloidogenezy różnych białek / peptydów mogą biec przez mechaniczycznie podobne etapy: pierwotne zarodkowanie agregatu, które może być poprzedzone separacją faz ciec-ciecz (efekt *LLPS*), elongację protofilamentów, i, wreszcie, ich lateralne splatanie się w dojrzałe włókna amyloidowe. Co ciekawe, makromolekularna samoorganizacja amyloidów może biec dalej prowadząc do

superstruktur o mikrometrycznych rozmiarach, takich jak sferolity, które w szczególności sposób przykuły uwagę mgr. inż. Patryka Obstarczyka prowadzącego swoje badania pod kierunkiem prof. Olesiak-Bańskiej.

Napisana w języku angielskim i licząca sobie 125 stron rozprawa „*Amyloids bio-imaging: two-photon excited autofluorescence and multimodal gold nanoclusters*” jest ustrukturyzowana wg. kilku głównych pytań i hipotez postawionych przez Autora, a w szczególności: [i] na ile parametry anizotropii wzbudzonej dwufotonowo auto-fluorescencji sferolitycznych superstruktur modelowego amyloidu mogą być skorelowane z geometrią ich przestrzennej organizacji, [ii] czy odpowiednio sfunkcjonalizowane luminescencyjne nanoklastry złota mogą być wykorzystane do multimodalnego obrazowania (fluorescencja + mikroskopia elektronowa) tego rodzaju obiektów. Dużym nakładem pracy i przy zastosowaniu całej gamy metod optycznych (przede wszystkim zaawansowanej spektroskopii fluorescencyjnej, ale także spektroskopii absorpcyjnej UV-VIS i w podczerwieni), oraz mikroskopowych (AFM, EM) uzyskano szereg bardzo ciekawych wyników badawczych przedstawionych w tej rozprawie. Jej Autorowi udało się m.in. wykazać silną anizotropię dwufotonowo wzbudzonej auto-fluorescencji sferolitu zbudowanego z amyloidowych włókien insulinowych. Jest to jeden z wielu wartościowych wyników badawczych zawartych w tej przejrzystej i zwięźle napisanej rozprawie. Co istotne, kluczowe rezultaty badań prowadzonych przez mgr. inż. Obstarczyka zostały przedstawione w trzech artykułach opublikowanych przez renomowane czasopisma (wśród nich w prestiżowym *The Journal of Physical Chemistry Letters*, ACS) towarzyszących rozprawie; we wszystkich trzech mgr. inż. Obstarczyk jest pierwszym autorem .

W tym miejscu chciałbym przejść do bardziej szczegółowych, merytorycznych kwestii (kolejność ich postawienia nie musi oddawać kalibru problemu):

1. Na stronie 15 rozprawy Autor pisze „...*Up to the present day, roughly 50 proteins or peptides are known to form amyloid fibrils ( e.g. amyloid- $\beta$  peptide, tau protein,  $\alpha$ -synuclein, insulin, and lysozyme..*” Liczba ta jest zdecydowanie niedoszacowana. Eksperymentalnie potwierdzona amyloidogenność dotyczy już zapewne tysięcy

sekwencji aminokwasowych białek i peptydów; ~50 może być bliższe liczbie jednostek chorobowych, w których amyloidy są rozpoznane jako czynnik patogenny.

2. Wspominany na str. 22 model strukturalny amyloidu insuliny zaczerpnięty z pracy Jimenez et al. z 2002 roku jest problematyczny. O ile zrekonstruowane w oparciu o dane cryo-EM boczne splatanie się protofilamentów w fibryle wyższego rzędu pozostaje bezsporne, o tyle „odgadnięta” i przedstawiona tam ultrastruktura pojedynczego protofilamentu insuliny (z naprzemiennym ustawieniem  $\beta$ -strandów łańcuchów A i B) nie przetrwała próby czasu (jest w konflikcie m.in. z późniejszym modelem zamka sterycznego wg. D. Eisenberga i współpracowników).
3. Emergentna auto-fluorescencja amyloidów w zakresie b. bliskiego nadfioletu pozostaje wciąż tajemniczym zjawiskiem. Przypuszczalnie dalekozasięgowe sprzężanie się momentów przejścia białkowych chromoforów (niekoniecznie aromatycznych) pozostających względem siebie w (kwazi)translacyjnej relacji jest warunkiem jego zaobserwowania (tak, jak to się dzieje w kryształach wykazujących tzw. *aggregation-induced emission*). W tym kontekście, zaobserwowanie auto-fluorescencji w nieustrukturyzowanych / fluktuujących stanach pośrednich byłoby zaskakujące (patrz dyskusja m.in. na stronie 87, 90).
4. Zastanawiam się na ile „korpulentność” funkcjonalizowanych nano-klastrów złota w porównaniu do płaskich (np. Congo Red) lub łatwo planaryzujących się (np. ThT) konwencjonalnych sond molekularnych wykazujących selektywne powinowactwo wobec amyloidu może wpływać na stabilność sferolitów (kwestia wypełniania / „rozpychania się” sondy w przestrzeniach między indywidualnymi fibrylami). Jaki jest szacunkowy  $R_{hyd}$ . (promień hydrodynamiczny) nanoklastrów złota modyfikowanych eterem koronowym stosowanych w pracy?
5. Zastanawiają mnie również bardzo duże różnice w widmach IR Aq-GNC i Ch-GNC (Ryc. 47). Nie wiem na ile efekty solwatacyjne mogą je tłumaczyć. Czy jest możliwe by koniugaty rozpuszczone w wodzie i chloroformie mogły mieć trochę

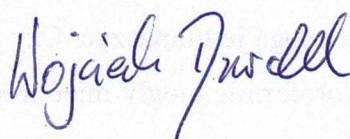
inny skład chemiczny (np. przez zróżnicowaną rozpuszczalność ubocznych produktów syntezy, etc.. w wodzie/fazie organicznej i selektywną elucję zanieczyszczenia).

6. Jakkolwiek rozprawę czyta się z przyjemnością, jej Autor nie ustrzegł się jednak pewnych błędów / pomyłek, których nie wychwyciła najwyraźniej końcowa redakcja. I tak na przykład: [i] w legendzie Ryc. 1: *diffraction* a nie *refraction*; *reflex*, a nie *pattern*; [ii] definicja wydajności kwantowej fluorescencji – str. 47 – wymaga korekty; [iii] wreszcie pewne zdania m.in. ze stron 2 i 66 uczulają nas na to, jak ograniczonym zaufaniem należy darzyć narzędzia typu *spell-check*.

Jednak wszystkie poruszone w moich komentarzach i pytaniach kwestie nie zmieniają wysokiej oceny pracy „*Amyloids bio-imaging: two-photon excited autofluorescence and multimodal gold nanoclusters*” wnoszącej cenny wkład w zrozumienie właściwości optycznych i strukturalnych agregatów amyloidowych i przyczyniającej się do rozwoju metod stosowanych na tym polu badań.

Podsumowując: stwierdzam, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki i wymogi stawiane pracom doktorskim, zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa (w szczególności określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i normami zwyczajowymi. Stwierdzam, iż dorobek naukowy Doktoranta i jego postawa akademicka w pełni uzasadniają nadanie mu stopnia naukowego doktora i wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Obstarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość uzyskanych wyników naukowych, doskonałe portfolio publikacyjne Doktoranta (w tym również publikacje nie związane bezpośrednio z rozprawą) oraz jego postawę akademicką wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



/ Wojciech Dzwolak