



Dr hab. Elżbieta Jankowska

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

Gdańsk, 24.07.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Amyloids bio-imaging: two-photon autofluorescence and multimodal gold nanoclusters”
przedstawionej przez magistra Patryka Obstarczyka

Praca doktorska magistra Patryka Obstarczyka dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia białeczek o charakterze amyloidogennym. Tematyka ta od dłuższego czasu znajduje się w centrum zainteresowania naukowców, ponieważ agregacja białek i tworzenie przez nie złogów amyloidowych powiązane są z szeregiem chorób, w tym także chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy, które dotyczą wielu milionów ludzi na całym świecie i stanowią prawdziwe wyzwanie cywilizacyjne, szczególnie w starzejących się społeczeństwach państw rozwiniętych. Poszerzanie wiedzy na temat struktury agregatów oraz możliwości ich obrazowania, w tym również obrazowania w warunkach *in vivo*, jest niezbędne, aby możliwe było diagnozowanie chorób o podłożu amyloidowym.

Badania podjęte przez magistra Patryka Obstarczyka wpisują się w to zapotrzebowanie. Rozprawa doktorska prezentuje możliwości obrazowania amyloidów z wykorzystaniem ich autofluorescencji. Przeprowadzone przez Doktoranta badania dowiodły, iż czuła na polaryzację mikroskopia dwufotonowa umożliwia określenie ułożenia włókien amyloidowych, ponieważ jest ono skorelowane z rozkładem kątowym momentów dipolowych emisji autofluorescencji. Odkrycie to może stać się podstawą bio-obrazowania agregatów białkowych, gdyż pozwala pominąć ich barwienie za pomocą znaczników fluorescencyjnych. Z wykorzystaniem takiego obrazowania możliwa byłaby nie tylko detekcja amyloidów, ale również identyfikacja zaburzeń występujących w ich strukturze, co pozwalałoby na rozpoznawanie stanów pośrednich w procesie amyloidogenezy. Drugim zagadnieniem, który obejmuje rozprawa, jest możliwość multimodalnego obrazowania agregatów białkowych z zastosowaniem nanoklastrów złota stabilizowanych ligandem supramolekularnym. Nanoklastry te mogą służyć jako sondy do bio-obrazowania za pomocą światła, ponieważ emitują luminescencję w bliskiej podczerwieni, jak również, ze względu na wysoką gęstość elektronową złota, do obrazowania za pomocą mikroskopii elektronowej. Doktorant dowiódł, iż otrzymane przez niego nanoklastry wykazują wysokie powinowactwo do powierzchni hydrofobowych, dzięki czemu mogły posłużyć do detekcji sferolitów amyloidowych oraz domen hydrofobowych na powierzchni włókien



amyloidowych. Ponieważ liczne badania wykazały, że różne morfologie włókien amyloidu mogą być bardziej patogenne niż inne, szybka charakterystyka strukturalna amyloidów jest klinicznie istotna dla diagnozy, klasyfikacji i, w dalszej perspektywie, leczenia chorób amyloidowych.

Rozprawa doktorska magistra Patryka Obstarczyka nie ma układu typowego dla prac eksperymentalnych. Przyjmuje raczej formę pośrednią między typową rozprawą a tzw. spinką publikacyjną. Otrzymane wyniki zgrupowane zostały w trzech rozdziałach, z których każdy nawiązuje do pracy opublikowanej w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym (rozdział III: Obstarczyk i współ., *J. Phys. Chem. Lett.* 2021, 12, 1432–1437; rozdział IV: Obstarczyk i współ., *Biomater. Sci.*, 2022, 10, 1554–1561; rozdział V: Obstarczyk i współ., *ACS Omega* 2023, 8, 11503–11511). Każdy rozdział zawiera krótkie wprowadzenie, opis wykorzystanych materiałów i metod eksperymentalnych oraz omówienie wyników zakończone podsumowaniem. Przyjęta forma dobrze sprawdza się w prezentacji uzyskanych wyników badawczych. Opisy metodologiczne znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie omawianych eksperymentów, co ułatwia odnajdywanie potrzebnych informacji. Rozpoczynające każdy rozdział streszczenie i kończące go podsumowanie podkreślają najważniejsze osiągnięcia i ułatwiają zrozumienie celu prowadzonych badań.

Zastosowany nie-klasyczny układ rozprawy pociąga za sobą kilkukrotne pojawienie się wprowadzenia literaturowego – na wstępie rozprawy, a także na początku każdego z rozdziałów przedstawiających wyniki. Mimo to pewnych informacji zabrakło, a wydaje się, że powinny znaleźć swoje miejsce w pracy. Chodzi tu przede wszystkim o informacje związane z autofluorescencją amyloidów. Doktorant cytuje wprawdzie publikację autorstwa Jonathana Pansieri i współp. (*Nat. Photonics* 2019), ale zupełnie nie odwołuje się do jej treści, mimo iż dotyczy ona właśnie autofluorescencji amyloidów, badanej innymi technikami mikroskopowymi. Opisanie możliwości tych technik i skonstruowanie ich z dwufotonową mikroskopią fluorescencyjną dałoby lepszy kontekst dla badań przeprowadzonych przez Doktoranta. Prosiłabym więc o nakreślenie takiego tła podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Bibliografia pracy jest bardzo bogata (214 pozycji) i w znakomitej większości obejmuje odwołania do najnowszych publikacji, co pokazuje, iż Doktorant dobrze zna aktualną literaturę przedmiotu. Wysoko oceniam stronę redakcyjną rozprawy. Wyniki ilustrowane są starannie przygotowanym materiałem graficznym, uzupełnionym precyzyjnymi podpisami. Rzetelnie przeprowadzona została korekta. Pomyłki, nieścisłości czy niejasności są nieliczne, jednak obowiązek recenzencki obliguje do zwrócenia uwagi także na nie:

- Pomyłkowo przywoływane są w tekście rozprawy niektóre rysunki (Fig.32 zamiast 33 (str. 72), czy Fig.34 zamiast 35 (str. 74))

- Na rysunku 35 chyba zamienione zostały zdjęcia mikroskopowe dla prostopadle ułożonych polaryzacji wzbudzenia i emisji (górne zdjęcie przedstawia raczej horyzontalnie spolaryzowane wzbudzenie i wertykalną emisję, a dolne – wertykalne wzbudzenie i horyzontalną emisję). Tak przynajmniej sugerują wnioski wyciągnięte na podstawie tych zdjęć („strongest two-photon excited fluorescence matching the polarization of the incident light”), a także analogiczne zdjęcia znajdujące się w cytowanej pod rysunkiem pracy autorstwa Doktoranta (J. Phys. Chem. Lett., 2021)
- W rozdziale IV na określenie dwufotonowej autofluorescencji kilkakrotnie zastosowano niewyjaśniony wcześniej skrót TPAF, choć w większości przypadków tę samą technikę oznaczano skrótem 2PAF.
- Na str. 100 błędnie podano wzór chloroformu (CHCl_4 zamiast CHCl_3).

Uwagi dotyczące omawianych wyników badań pozwolę sobie pogrupować w taki sam sposób jak zrobił to Doktorant, w związku z czym odnosić się będę kolejno do poszczególnych rozdziałów.

Rozdział III: Osiągnięciem opisanym w tym rozdziale było wykazanie, że wzbudzana dwufotonowo autofluorescencja amyloidu jest wysoce spolaryzowana, a jej rozkład kątowy jest związany z długą osią fibryli w obrębie stożka o rozwarciu $\sim 60^\circ$ (2ψ). Swoimi badaniami Doktorant potwierdził, iż są to właściwości całkowicie zgodne z tymi, które wykazuje fluorescencja specyficznego dla amyloidów znacznika – tioflawiny T. Udowodnił tym samym, iż autofluorescencja amyloidów może być wykorzystywana do ich obrazowania bez wprowadzania do badanego układu dodatkowego elementu, który mógłby zaburzać proces agregacji białka, czy też powodować problemy związane z toksycznością bądź agregacją samego znacznika fluorescencyjnego.

Pewne wątpliwości w treści tego rozdziału może wzbudzić tok rozumowania zaprezentowany na podstawie badań fibryli za pomocą AFM. W przedstawionej dyskusji Doktorant przywołuje dane literaturowe na temat morfologii samych fibryli, a na ich podstawie wyciąga wnioski na temat morfologii fibryli w sferulitach, po wcześniejszym uczynieniu założenia, że ich morfologia jest podobna. Rozważania swe Doktorant kończy stwierdzeniem, że wykorzystana technika badawcza pokazała, iż sferulity mogą być zbudowane z fibryli o podobnej morfologii jak ta określona za pomocą AFM. Wydaje się, iż jest tu błąd logiczny. Nie jest jasne, w jaki sposób Doktorant dochodzi do wniosku zgodnego z przyjętym założeniem, poprzez dane na temat samych fibryli. Mam nadzieję, iż zostanie to wyklarowane podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Niejasne jest także, w jakim celu badania morfologii fibryli z wykorzystaniem AFM prowadzone były w roztworach o różnym stężeniu soli. Daje to wprowadzić informację, iż struktura fibryli się zmienia, aż do osiągnięcia nieskręconej morfologii dla 100 mM NaCl, ale informacja ta nie ma przełożenia na badania



sferulitów, ponieważ te uporządkowane formy otrzymywane były w roztworach bez dodatku soli. Czy są lub były planowane eksperymenty z wykorzystaniem dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej w warunkach o modyfikowanej zawartości soli?

Rozdział IV: W rozdziale tym Doktorant opisał badania, które doprowadziły do określenia lokalnego uporządkowania w superstrukturach amyloidowych - sferulitach. Dzięki zależnej od polaryzacji, wzbudzonej dwoma fotonami autofluorescencji amyloidu potwierdzone zostało istnienie orientacji fibrylarnej w koronie sferulitu, jak również wykazano obecność amorficznych agregatów, zniekształconych fibryli i/lub amyloidowych form pośrednich w rdzeniu sferulitu. Ujawniła się tu przewaga zastosowanej beznaznikowej techniki fluorescencyjnej nad klasycznym podejściem z wykorzystaniem tioflawiny T, która nie pozwala różnicować struktur amorficznych od zniekształconych struktur fibrylarnych, obecnych na różnych etapach tworzenia blaszek amyloidowych.

Choć zasadniczo eksperymenty zostały jasno opisane to pewną wątpliwość wzbudzają wartości kątów $\psi + \Delta\psi$, wyliczone dla rejonów określonych jako R_2 i R_3 . Jak wynika z rysunku 41, każdy z tych rejonów cechują inne wartości $\Delta\psi$, co przy przyjęciu stałego kąta ψ powinno dać różne wartości sumy $\psi + \Delta\psi$. Czy jakieś założenia pozwoliły sprowadzić te wartości do kątów odpowiednio 51.5° dla autofluorescencji i 53° dla fluorescencji ThT? Proszę o stosowne wyjaśnienia w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

Rozdział V: Osiągnięciem opisanym w tym rozdziale było scharakteryzowanie właściwości nanoklastrów złota połączonych z funkcjonalizowanymi grupą tiolową supramolekularnymi ligandami w postaci cząsteczek eteru 12-korona-4. Doktorant wykazał ich przydatność w multimodalnym obrazowaniu amyloidów. Zwrócił również uwagę na możliwość manipulowania właściwościami fizykochemicznymi tych klastrów i wpływania na ich właściwości luminescencyjne, co może być wykorzystane zarówno w badaniach nanomateriałów, jak i biocząsteczek. W jednym z eksperymentów, które posłużyły do zbadania właściwości spektroskopowych nanoklastrów, wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). W opisie widm wskazano pasmo 1089 cm^{-1} jako pasmo odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C-O, razem z pasmem 1125 cm^{-1} . Czy Doktorant mógłby się pokusić o dyskusję, z jakiego powodu w roztworze wodnym nanoklastrów wystąpiło to dodatkowe pasmo, którego nie było w roztworze organicznym? Ciekawi mnie również, na jakiej podstawie stwierdzono, iż amorficzny rdzeń sferulitów jest bogaty w strukturę α -helikalną (str. 102). Cytowana praca Krebsa i współp. (PNAS 2004) raczej nie pozwala na wyciągnięcie takiego wniosku.

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają mojej zdecydowanie pozytywnej oceny przedstawionej przez mgr Patryka Obstarczyka rozprawy doktorskiej. Uważam, iż rozprawa dotyczy ważnej i aktualnej tematyki, jest spójna merytorycznie i ciekawa, a przedstawione wyniki wnoszą nową wartość do bieżącego stanu wiedzy.



Na szczególną uwagę zasługuje ogólny dorobek Doktoranta, który w zakresie publikacyjnym obejmuje osiem prac naukowych, w tym trzy prace pierwszoautorские, bezpośrednio powiązane z tematyką rozprawy. Publikacje te uzupełnione zostały komunikatami konferencyjnymi, których było łącznie dziewięć. Mgr Patryk Obstarczyk odbył dwa dłuższe, zagraniczne staże naukowe (1-2 miesiące), które z pewnością przyczyniły się do jego rozwoju naukowego. Zdobył też finansowanie na swoje badania w postaci grantu Preludium. Jego starania i osiągnięcia docenione i podkreślone zostały pięcioma nagrodami, w tym prestiżowym stypendium START przyznany przez Fundację Nauki Polskiej.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie magistra Przemysława Obstarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG