

Streszczenie

Pomimo niezwykłych postępów we współczesnej medycynie, wiele chorób związanych ze starzeniem się (m.in. choroba Alzheimera i Parkinsona), ze względu na swój złożony charakter, pozostaje nieuleczalna. Powszechnie wiadomo, że wspomniane powyżej zespoły chorobowe (zaliczane do chorób neurodegeneracyjnych) są związane z samoorganizacją (agregacją) nieprawidłowo sfałdowanych białek – amyloidów – których obecność w postaci blaszek lub inkluzji wewnątrzkomórkowych stwierdzono w tkankach przebadanych *post mortem*. Jednakże amyloidy są strukturalnie skomplikowane, a ich rola w patologii chorób neurodegeneracyjnych wciąż stanowi przedmiot debat. Z uwagi na powyższe, opis właściwości strukturalnych włókien amyloidowych ma ogromne znaczenie. Rozwój nowych technik bio-obrazowania amyloidów może zapewnić wgląd w mechanizmy ich powstawania, funkcje biologiczne (w tym toksyczność), a w dalszej perspektywie, przyczynić się do postępu w rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia wyniki interdyscyplinarnych badań nad bio-obrazowaniem amyloidów, w oparciu o wybrane techniki (tj. mikroskopie: fluorescencyjną, dwu-fotonową, polaryzacyjną, sił atomowych i elektronową) i aspekty obrazowania (tj. multimodalność, obrazowanie bez znaczników i obrazowanie z funkcjonalnymi znacznikami). W ramach niniejszej pracy czuła na polaryzację mikroskopia dwu-fotonowa została wykorzystana do obrazowania ułożenia włókien amyloidowych przez analizę właściwej włóknom amyloidowym auto-fluorescencji i rozkładu kąтового związanych z nią momentów dipolowych emisji wzbudzonej dwoma fotonami. Praca ta pokazuje, na podstawie uporządkowanego modelu (sferolit), że auto-fluorescencja amyloidów wzbudzona dwoma fotonami jest silnie spolaryzowana, a jej dystrybucja kątowa rozmieszczona jest w zakresie 29° wokół długiej osi włókna amyloidowego. Oznacza to, że wzbudzona dwoma fotonami autofluorescencja pochodząca od włókien amyloidowych została pioniersko skorelowana z ich orientacją w płaszczyźnie próbki. Stanowi to obiecujące narzędzie do obrazowania agregatów białkowych (amyloidów), bez wstępnego barwienia jakimikolwiek znacznikami. Następnie, badania nad nieliniowymi właściwościami optycznymi amyloidów zostały rozszerzone. W efekcie, zobrazowano lokalne uporządkowanie w super-strukturach amyloidowych – sferolitach – ponownie, bez wykorzystania znaczników fluorescencyjnych. Dzięki wprowadzeniu skorelowanego obrazowania mikroskopii fluorescencyjnej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) odkryte zostało, że wspomniana wcześniej zależna od polaryzacji i dwu-fotonowo wzbudzana auto-fluorescencja włókien amyloidowych może zostać wykorzystana do ich detekcji i wyróżnienia zniekształceń strukturalnych, stanów pośrednich, jak i amorficznych agregatów. Połączenie obu technik pozwoliło na zobrazowanie heterogenicznej struktury wewnętrznej sferolitów amyloidowych. Odkrycie zaprezentowane w ramach tej pracy ma duże znaczenie w kontekście badań nad genezą struktur amyloidowych, ponieważ może zostać z powodzeniem wykorzystane na różnych etapach ich agregacji – bezinwazyjnie. Następnie, przedstawiono prace naukowe związane z syntezą, charakteryzacją i zastosowaniem ultra małych nano-klastrów złota stabilizowanych ligandem supramolekularnym (eterem koronowym). Materiał ten został zaprojektowany do funkcjonalnego i multimodalnego obrazowania agregatów białkowych – amyloidów. Prezentowany w ramach tej pracy nano-materiał charakteryzuje się dyskretną strukturą elektronową, fluorescencją w bliskiej podczerwieni (NIR), amfifilowością i wysoką gęstością

elektronową. Z uwagi na wspomniane właściwości, został on wykorzystany do barwienia i obrazowania sferolitów oraz włókien amyloidowych, odpowiednio, pod mikroskopem fluorescencyjnym i elektronowym. Co więcej, nanoklastry stabilizowane eterem koronowym wykazują wysokie powinowactwo do hydrofobowych powierzchni dostępnych w materiałach pochodzenia biologicznego. W przeciwieństwie do znaczników o charakterze hydrofilowym, wspomniane nanoklastry natychmiast wiążą się ze sferolitami amyloidowymi. W przypadku włókien, organizacja klastrów na ich powierzchni tworzy wzór odpowiadający przestrzennemu rozmieszczeniu domen z hydrofobowymi aminokwasami. W związku z powyższym, amfifilowe właściwości zaprezentowanych nanoklastrów są potencjalnie atrakcyjne dla funkcjonalnego obrazowania szeregu różnych struktur biologicznych.