

AUTOREFERAT

Opracowanie i praktyczne wykorzystanie sond fluorescencyjnych do skuteczniejszego wykrywania i wizualizacji substancji bionieorganicznych w systemach biologicznych

Dr Jacek Ł. Kolanowski

Zakład Sond Molekularnych i Pro-leków

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

ul. Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

Poznań, 14.01.2023

1. Imię i Nazwisko	4
2. Dyplomy, stopnie naukowe nadane w określonych dziedzinach nauki lub sztuki, w tym nazwa instytucji, która nadała stopień, rok nadania stopnia, tytuł rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4
4. Opis osiągnięć, określony w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy.	5
4.A Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.B Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	5
4.C Omówienie celu naukowego ww. zbioru prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.	8
4.C.1 Opracowanie nowych kryteriów i podejść do projektowania i walidacji sond fluorescencyjnych do wykrywania analitów bionieorganicznych w modelach biologicznych	9
4.C.2 Wykorzystanie zależności struktura-reaktywność-odpowieź fluorescencyjna do opracowania specyficznych sond dla analitów bionieorganicznych	15
4.C.3 Projektowanie i stosowanie niezawodnych sond do wiarygodnej detekcji bionieorganicznych analitów w kontekście biologicznym	19
4.C.4 Wprowadzenie i postępy w projektowaniu sond dwuanalitowych do zastosowań biologicznych	30
4.C.5 Bibliografia	32
4.D Podsumowanie najważniejszych osiągnięć kandydata w przedstawionych publikacjach	36
4.E Omówienie możliwych zastosowań osiągniętych wyników.....	37
5. Prezentacja znaczącej działalności naukowej lub artystycznej prowadzonej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub kulturalnej, w szczególności w instytucjach zagranicznych	38
5.A Opis działalności naukowej nieuwzględnionej w osiągnięciu naukowym 4.C	38
5.A.1 Badania prowadzone w School of Chemistry, University of Sydney, Australia (2014-2017)	38
5.A.2 Badania prowadzone w Zakładzie Sond Molekularnych i Proleków, ICHB PAN (2018-2022)	39
5.A.3 Badania prowadzone w Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych, ICHB PAN (2021-2022)	41
5.A.4 Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora	42
5.B Współpraca z krajowymi i zagranicznymi instytucjami lub organizacjami.....	44
5.B.1 Współpraca międzynarodowa	44
5.B.2 Współpraca krajowa	47
6. Prezentacja osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych oraz osiągnięć w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki.....	48
6.A Osiągnięcia dydaktyczne.....	48
6.A.1 Opieka naukowa nad studentami, doktorami w trakcie specjalizacji lub doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub pomocniczego z wykazem studiów doktoranckich	48
6.A.2 Działalność dydaktyczna	49
6.B Działalność organizacyjna dla społeczności naukowej	50
6.B.1 Aktywność w ramach organizacji i towarzystw naukowych.....	50
6.B.2 Aktywność w komitetach i komisjach	51
6.B.3 Społeczna aktywność ekspercka i recenzencka	52
6.B.4 Wystąpienia ustne na zaproszenie z zakresu doradztwa naukowego i polityki naukowej	53
6.C Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki	53
7. Inne informacje	55
7.A Projekty finansowane ze środków zewnętrznych jako kierownik zespołu (od 2018 roku)	55

7.B	<i>Działania i osiągnięcia związane z infrastrukturą badawczą</i>	55
7.C	<i>Podsumowanie wystąpień seminaryjnych i konferencyjnych po uzyskaniu stopnia doktora</i>	56
7.D	<i>Udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych po uzyskaniu stopnia doktora</i>	57
7.E	<i>Nagrody i stypendia zdobyte po uzyskaniu stopnia doktora</i>	57
8.	Pełna Lista Publikacji Naukowych.....	58

1. IMIĘ I NAZWISKO

Jacek Łukasz Kolanowski

2. DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE NADANE W OKREŚLONYCH DZIEDZINACH NAUKI LUB SZTUKI, W TYM NAZWA INSTYTUCJI, KTÓRA NADAŁA STOPIEŃ, ROK NADANIA STOPNIA, TYTUŁ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Doktor nauk chemicznych (wyróżnienie *Très Honorable*) École Normale Supérieure de Lyon, Francja

Rok przyznania: **2013**

Promotor: Prof. Jens Hasserodt, tytuł pracy dyplomowej: "Kompleksy bispidyna-żelazo(II) jako nowa platforma do projektowania sond magnetogenicznych" (tłum. własne, oryginalny tytuł: Bispidine-iron(II) complexes as a novel platform for the design of magnetogenic probes").

Magister chemii (wyróżnienie *Maxima Cum Laude*) Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań
Rok przyznania: **2009**

Promotor: Prof. Henryk Koroniak, tytuł pracy dyplomowej: "Nowa metoda syntetyczna otrzymywania ortoalkilofluorowanych arylofosfonianów i ich reaktywność".

Licencjat z biotechnologii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Rok przyznania: **2007**

Promotor: Prof. Przemysław Wojtaszek, tytuł pracy dyplomowej: "Potencjalne zastosowanie terapeutyczne resweratrolu w procesach uruchamianych przez Sirtuiny".

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Kierownik Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych

Instytut Chemii Bionieorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICHB PAN), Poznań, Polska
Umowa o pracę, **10.2018 - obecnie**

Kierownik Zakładu Sond Molekularnych i Pro-leków

Instytut Chemii Bionieorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICHB PAN), Poznań, Polska,
Umowa o pracę, **09.2017 - obecnie**

Pracownik naukowo-badawczy w stopniu podoktorskim (typu post-doc)

School of Chemistry, University of Sydney, Australia
Umowa o pracę, **05.2015 - 05.2017**

Stażysta podoktorski francuskiej fundacji *Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer*

School of Chemistry, University of Sydney, Australia
Stypendium, **04.2014 - 05.2015**

Pracownik naukowy / doktorant

École Normale Supérieure de Lyon, Francja

Umowa o pracę, **01.2020 - 10.2013**

Pracownik naukowy / stażysta

Jacobs University Bremen, Niemcy

Stypendium, **10.2009 - 12.2009**

Praktykant (program LLP Erasmus)

Univeristaet Bremen, Niemcy

Stypendium, **10.2007 - 02.2008**

4. OPIS OSIĄGNIĘĆ, OKREŚLONY W ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY.

4.A Tytuł osiągnięcia naukowego

Opracowanie i praktyczne wykorzystanie sond fluorescencyjnych do skuteczniejszego wykrywania i wizualizacji substancji bionieorganicznych w systemach biologicznych

4.B Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

P1 - P6: Publikacje eksperymentalne	IF*	Cyt.**
<p>P1. KG Leslie, <u>JL Kolanowski</u>, N Trinh, S Carrara, MD Anscorb, K Yang, CF Hogan, KA Jolliffe*, EJ New*, Nicotinamide-Appended Fluorophores as Fluorescent Redox Sensors, 2020, <i>Australian Journal of Chemistry</i> 73, 10, 895-902.</p> <p><i>Mój wkład obejmuje:</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Optymalizację i zwiększenie skali syntezy sondy NCR1, zaprojektowanie drogi syntezy oraz po raz pierwszy zsyntetyzowanie i skuteczne oczyszczenie sondy NCR2• Zaprojektowanie, wykonanie i interpretacja wyników eksperymentów charakterystyki spektroskopowej tych dwóch sond oraz ich wydajności i odpowiedzi na różne anality.	1,073	2
<p>P2. <u>JL Kolanowski</u>, LJ Dawson, L Mitchell, Z Lim, ME Graziotto, WK Filipek, TW Hambley, EJ New*, A fluorescent probe for investigating metabolic stability of active transplatin analogues. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> 2018, 255 (3), 2721-2724</p> <p><i>Mój wkład obejmuje:</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Koncepcję, projektowanie, wykonanie i interpretację kluczowych eksperymentów i tez manuskryptu, w tym w szczególności charakterystykę spektroskopową, walidację wydajności i odpowiedzi sond oraz ich selektywności.	5,667	10

	<ul style="list-style-type: none">• Zaprojektowanie, przeprowadzenie i interpretacja unikalnych eksperymentów w celu lepszego zbadania wiarygodności odpowiedzi sondy na potencjalne zakłócenia biologiczne.• Zdefiniowanie głównych obserwacji i sformułowanie głównych tez manuskryptu, przygotowanie prezentacji danych spektroskopowych, współredakcja manuskryptu.• Współudział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, co było kluczowe dla pomyslniej publikacji.		
P3.	IJ Carney, <u>JL Kolanowski</u> , Z Lim, B Chekroun, TW Hambley, EJ New*, A ratiometric iron probe enables investigation of iron distribution within tumour spheroids. <i>Metallomics</i> , 2018 , 10(4), 553-556 <i>Mój wkład obejmuje:</i> <ul style="list-style-type: none">• Optymalizację syntezy sondy• Kompilację i zestawienie danych eksperymentalnych.• Wkład w planowanie manuskryptu i wspólne formułowanie głównych tez manuskryptu (w szczególności dotyczących zwiększonej wiarygodności działania sondy).• Współredagowanie manuskryptu i przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.	4,069	7
P4.	C Shen, <u>JL Kolanowski</u> , CM-N Tran, A Kaur, MC Akerfeldt, MS Rahme, TW Hambley, EJ New*, A ratiometric fluorescent sensor for the mitochondrial copper pool. <i>Metallomics</i> 2016 , 8, 915-919 <i>Mój wkład obejmuje:</i> <ul style="list-style-type: none">• Codzienny nadzór merytoryczny doktorantki (pierwszy autor manuskryptu) w zakresie projektowania i wykonywania syntez.• Przeprowadzanie regularnej interpretacji wyników prac syntetycznych doktorantki i podejmowanie decyzji o kolejnych etapach syntezy i charakterystyki spektroskopowej wszystkich sond.• Zaplanowanie eksperymentów, opracowanie protokołu pomiarowego i analizy danych, Interpretacja danych obrazowych, współautorstwo manuskryptu i współprzygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.	3,54	22
P5.	M Hu, KE Schulze, R Ghildyal, DC Henstridge, <u>JL Kolanowski</u> , EJ New, Y Hong, AC Hsu, PM Hansbro, PAB Wark, MA Bogoyevitch, DA Jans*, Respiratory Syncytial Virus co-opts host mitochondrial function to favour infectious virus production. <i>eLife</i> , 2019 , 8, e42448 <i>Mój wkład obejmuje:</i> <ul style="list-style-type: none">• Doradztwo w zakresie wyboru właściwych narzędzi do wiarygodnego badania ROS w mitochondriach• Wybór oraz wsparcie w implementacji protokołu pomiarowego i analizy danych w celu zapewnienia wiarygodności pomiarów stresu oksydacyjnego w mitochondriach.	7,551	20

- P6.** KL Chong, BA Chalmers, JK Cullen, A Kaur, JL Kolanowski, BJ Morrow, 6,02 10
K Fairfull-Smith, MJ Lavin, NL Barnett, EJ New, MP Murphy, SE Bottle*,
Pro-fluorescent mitochondria-targeted real-time responsive redox
probes synthesised from carboxy isoindoline nitroxides: Sensitive
probes of mitochondrial redox status in cells. *Free Radical Biology &
Medicine* **2018**, 128, 97-110.
Mój wkład obejmuje:
- Projektowanie i wspólne wykonywanie, przetwarzanie (z liderem grupy) oraz liderowanie analizie i interpretacji eksperymentów obrazowania konfokalnego a także czasu życia fluorescencji (Fluorescence Lifetime Imaging) w sposób zapewniający wiarygodność wyników.

P7 - P9: oryginalne publikacje teoretyczne (przeglądowe)

- P7.** JL Kolanowski, A Kaur, EJ New*, Selective and reversible approaches 7,093 14
towards imaging redox signaling using small molecule probes.
Antioxidants & Redox Signalling **2016**, kwiecień, 713-730.
Mój wkład obejmuje:
- Wymyślenie głównej koncepcji i sformułowanie głównych tez pracy, a także nowatorski sposób reprezentacji i organizacji danych, pozwalający na analizę tematu pod niezbadanym dotąd kątem.
 - Zebranie, analiza i interpretacja większości źródeł literaturowych, przygotowanie większości rycin oraz współredakcja manuskryptu.
- P8.** A Kaur, JL Kolanowski, EJ New*, Reversible fluorescent probes of 11,709 93
biological redox state. *Angewandte Chemie International Edition in
English* **2016**, 55, 1602-1613.
Mój wkład obejmuje:
- Analizę i interpretację większości źródeł wykorzystanych w tym manuskrypcie oraz sformułowanie kilku głównych tez tej pracy m.in. dotyczących zasad projektowania tych narzędzi i korelacji struktury z mechanizmami odpowiedzi fluorescencyjnej.
 - Projektowanie i przygotowanie wszystkich rycin oraz współtworzenie i współredagowanie manuskryptu.
- P9.** JL Kolanowski, F Liu, EJ New*, Fluorescent probes for the 40,182 215
simultaneous detection of multiple analytes in biology. *Chemical
Society Reviews* **2018**, 47, 195-208.
Mój wkład obejmuje:
- Analizę i interpretację części źródeł wykorzystanych w tym manuskrypcie oraz sformułowanie kilku tez tego przeglądu
 - Współtworzenie wybranych rycin, współredagowanie (wraz z autorem korespondencyjnym) manuskryptu

* z roku poprzedzającego publikację

**bez autocytowań (Web of Science, 20.12.2022)

4.C Omówienie celu naukowego ww. zbioru prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Celem naukowym moich badań była poprawa, w trzech głównych wymiarach, wiarygodności detekcji szczególnie istotnych biologicznie i trudnych do wykrywania tzw. analitów (tj. mierzonych / badanych substancji, ang. *analytes*) bionieorganicznych, w szczególności jonów metali przejściowych i reaktywnych form tlenu/azotu, z wykorzystaniem narzędzi fluorescencyjnych:

- **Projektowanie narzędzi:** Wprowadzenie nowych strategii molekularnych i zaleceń dotyczących tworzenia bardziej niezawodnych sond fluorescencyjnych (zwanymi też próbnikami, ang. *probes*) na fundamencie lepszego zrozumienia relacji struktura-efektywność działania, oraz sformułowanie wskazań i sposobów ich walidacji.
- **Rozwój sond fluorescencyjnych:** Opracowanie sond fluorescencyjnych (dalej: sond) o unikalnie wysokim poziomie specyficzności i wiarygodności detekcji analitów bionieorganicznych w oparciu o różne strategie (zależność struktura-selektywność, pomiar stosunku dwóch wielkości – tzw. ratiometryczność[†] oraz pomiar czasu życia fluorescencji jako parametrów bardziej wiarygodnie wskazujących na reakcję sondy z analitem).
- **Metodologia i zastosowanie sond fluorescencyjnych:** Opracowanie, na podstawie eksperymentów i literatury, metodologii i optymalnej sekwencji działań, aby umożliwić naukowcom wykorzystującym sondy fluorescencyjne niezawodne pozyskiwanie i ekstrakcję danych o trudno mierzalnych analitach bionieorganicznych w modelach biologicznych.

Tło i kontekst

Sondy fluorescencyjne są jednym z najpopularniejszych rodzajów narzędzi wykorzystywanych do zrozumienia procesów fizjologicznych i patologicznych. Badanie takich procesów wymaga niezwykle wiarygodnych sond, które ich nie zakłócają i pozwalają na obserwację analitów z wysoką rozdzielczością przestrzenną i czasową. Działanie sond fluorescencyjnych polega na wykrywaniu i wizualizacji substancji (bio)chemicznych (analitów), najlepiej w czasie rzeczywistym w żywych komórkach poprzez selektywną reakcję lub niekowalencyjne oddziaływanie z analitem, które skutkuje wykrywalną zmianą właściwości fluorescencyjnych (np. intensywności emisji).

W ostatnich dziesięcioleciach zainteresowanie sondami fluorescencyjnymi gwałtownie wzrosło, ale ponad 90% opublikowanych sond nigdy nie zostało ponownie zastosowanych w układach biologicznych poza eksperymentami typu proof-of-concept.¹ Wynika to przede wszystkim z niewystarczającej charakterystyki i ograniczonej niezawodności wykrywania analitów za pomocą tych narzędzi w środowisku biologicznym.

Celami biochemicznymi, na których skupiłem się w tej pracy były reaktywne formy tlenu i/lub azotu (RONS) oraz jony metali przejściowych - dwie kategorie substancji bionieorganicznych o znaczeniu diagnostycznym i terapeutycznym. Obie te kategorie odgrywają krytyczne, aczkolwiek nie do końca

[†] Ratiometryczność (z ang. *ratiometric*) czyli pomiar stosunku dwóch wielkości; ze względu na szerokie stosowanie tego zwrotu w międzynarodowej literaturze dziedzinowej a jednocześnie braku jednego słowa polskiego, które byłoby odpowiednikiem tego terminu i oddawało jego znaczenie w sposób precyzyjny, w tej pracy zaadoptowałem ten termin z języka angielskiego; także m.in.: (i) odpowiedź ratiometryczna (ang. *ratiometric response*) czyli odpowiedź prowadząca do zmiany stosunku dwóch sygnałów (np. intensywności emisji fluorescencji w dwóch różnych długościach fali) oraz (ii) sonda ratiometryczna (ang. *ratiometric probe*) czyli taka, która wykazuje odpowiedź ratiometryczną na obecności analitów

poznane role biologiczne np. w procesach nowotworzenia, neurodegeneracji i.in.. Ten stan rzeczy jest konsekwencją kilku wyzwań związanych ze wspomnianymi analitami i narzędziami do ich wykrywania:

- Różne formy RONS zmieniają się dynamicznie między sobą, czasami nawet w skali nanosekundowej, co utrudnia projektowanie specyficznych i selektywnych sond do ich wizualizacji. Podobnie, kompleksy jonów metali przejściowych łatwo wymieniają swoje ligandy, zmieniają strukturę i stopień utlenienia.
- Sygnały generowane przez sondy na skutek interakcji z analitem są często niejednoznaczne.
- Rola lub funkcja RONS i jonów metali zależy od ich lokalnego środowiska biochemicznego, zmieniającego się nie tylko przestrzennie w skali sub-komórkowej, ale również w czasie.

Znaczna część mojej pracy naukowej była poświęcona rozwiązywaniu tych problemów z wielu perspektyw, od etapu projektowania i walidacji sond do analizy danych w celu uzyskania bardziej wiarygodnych wyników i opracowywania nowych generacji sond. **W związku z tym moim wkładem w postęp w tym obszarze było rozszerzenie i poprawa niezawodności, projektowania i stosowania narzędzi (sond) fluorescencyjnych do obrazowania molekularnego.** To osiągnięcie naukowe zostało opisane jako seria działań w ramach następujących 4 tematów :

1. Dostarczenie oryginalnych odkryć i ustaleń teoretycznych dotyczących projektowania i kryteriów oceny sond w celu wsparcia i poprawy wiarygodności generowania, walidacji i stosowania narzędzi fluorescencyjnych do badania analitów bionieorganicznych (na podstawie **publikacji P7 i P8**)
2. Zrozumienie i wykorzystanie zależności struktura-odpowiedź dla sond, grup detekcyjnych i analitów w kontekście opracowania narzędzi do wykrywania analitów bionieorganicznych (**publikacje P1 i P2**)
3. Wykorzystanie opracowanych przeze mnie strategii do odkrycia, aktywnego rozwoju i zastosowania sond dla RONS i labilnych form jonów metali z bardziej wiarygodną odpowiedzią niezależną od stężenia sondy (**publikacje P3-P6**)
4. Kluczowy wkład w stworzenie nowego obszaru badawczego wokół rozwoju i wykorzystania sond dwuanalitowych (**publikacja P9**).

4.C.1 Opracowanie nowych kryteriów i podejść do projektowania i walidacji sond fluorescencyjnych do wykrywania analitów bionieorganicznych w modelach biologicznych

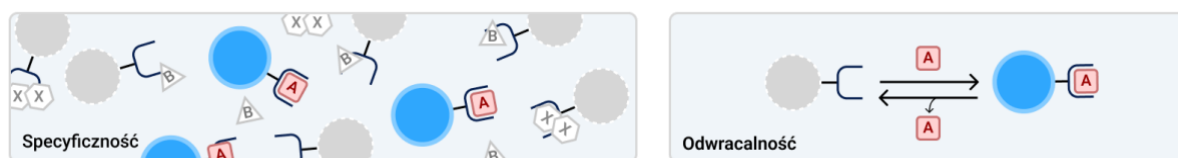
Sondy fluorescencyjne składają się zazwyczaj z fluoroforu (cząsteczki generującej wykrywalny sygnał) i fragmentu wrażliwego na analit, który może być częścią samego fluoroforu, dołączonym bezpośrednio lub poprzez łącznik (tzw. linker) (Ryc. 1). Niektóre sondy posiadają także dodatkowe elementy (np. drugi fluorofor, wygaszacz – ang. *quencher* oraz grupę kierującą sondę do konkretnego miejsca w modelu komórkowym – ang. *targeting group*). Największą zaletą sond fluorescencyjnych w porównaniu ze znacznikami (emitującymi zawsze ten sam sygnał) jest to, że ich właściwości fluorescencyjne ulegają zmianie w odpowiedzi na interakcję z analitem, generując bardziej jednoznaczny sygnał, który jest łatwiejszy do interpretacji.



Ryc. 1 Budowa modułowa sondy fluorescencyjnej

Związki bionieorganiczne występujące w organizmach mogą być nieuchwytne i trudne do wykrycia, zwłaszcza ze względu na zależność ich aktywności od stężenia i specjacji (tzn. formy w jakiej występują). Dlatego też badanie ich aktywności na poziomie komórkowym wymaga sond, które charakteryzują się:

1. **Wysoką specyficznnością (swoistością)** (Ryc. 2, lewy panel) zapewniającą uwzględnienie różnorodności form analitów, z których każda pełni inne role biologiczne
2. **Odwracalnością interakcji** (Ryc. 2, prawy panel), aby sprostać wyzwaniu, jakim jest szybkie przechodzenie analitów bionieorganicznych między tymi formami



Ryc. 2 Schemat specyficznosci sond fluorescencyjnych w wiązaniu analitów (lewy panel) oraz odwracalność interakcji analit-sonda (prawy panel)

Publikacja P7 zawiera dyskusję na temat trudności w opracowaniu sond i narzędzi fluorescencyjnych pozwalających na jednoczesne sprostanie tym wyzwaniom (specyficznosc i zmienność w czasie, odwracalna odpowiedź) na przykładzie sond do detekcji RONS. Co ważne, wypracowane wnioski można przenieść na sondy dla dowolnych celów molekularnych. Artykuł wskazuje również na alternatywny sposób przewidywania specyficznosci sond fluorescencyjnych poprzez analizę powiązań pomiędzy reaktywnością chemiczną (mechanizmami reakcji) grupy reagującej na analit (tzw. grupy responsywnej) a charakterem chemicznym samego analitu jako substratu tych reakcji. Praca ta kreśli również powiązania pomiędzy wspomnianym charakterem chemicznym grupy responsywnej przed i po interakcji z analitem, jej położeniem w strukturze sondy, a także związkiem położenia z mechanizmem fluorescencji grupy sygnałowej (fluoroforu). **Publikacja P8**, z kolei, skupia się na tym, jak osiągnąć odwracalność, identyfikuje luki w protokołach walidacyjnych i przedstawia rozwiązania zwiększające wiarygodność tych procesów (podrozdział 4.C.1.3). Z uwagi na fakt, że oba artykuły oparte są na głębokiej analizie dostępnych danych, prowadzącej do oryginalnych wniosków i ustaleń, odzwierciedlają one wyniki nowatorskich i oryginalnych choć teoretycznych badań, które stanowią istotny wkład w poszerzanie wiedzy i rozwój obszaru badawczego.

4.C.1.1 Stworzenie kompleksowej listy uniwersalnych kryteriów projektowania, wyboru i walidacji sond fluorescencyjnych dla analitów chemicznych w komórkach

W celu zaprojektowania i opracowania bardziej optymalnych sond nadających się do zastosowania w biologii, zdefiniowałem ulepszoną, kompleksową listę kryteriów projektowania sond fluorescencyjnych, która obejmuje następujące cechy:

1. **Właściwości fluorescencyjne**, w szczególności **(i)** wybór optymalnych długości fal wzbudzenia / emisji, **(ii)** maksymalna jasność, definiowana jako iloczyn **(iia)** współczynnika ekstynkcji - ϵ , opisującego efektywność absorpcji światła (energii) oraz **(iib)** wydajności kwantowej (Φ lub QY) opisującej wydajność emisji energii w postaci światła przez sondę (tzn. jaka frakcja energii zaabsorbowanej została wyemitowana do środowiska w postaci światła)
2. **Tryby oddziaływania z analitem** (kowalencyjny lub niekowalencyjny, odwracalny lub nieodwracalny), co wymaga odpowiedniej grupy responsywnej i powinno być zaprojektowane w oparciu o właściwości analitu i informacje o tym analizie, które chcemy uzyskać podczas eksperymentów
3. **Odpowiedź fluorescencyjna po interakcji z analitami**, różniąca się rodzajem i wielkością zmiany właściwości fluorescencyjnych: **(i)** odpowiedź oparta o wzrost (tzw. turn-on) lub spadek (tzw. turn off) intensywności sygnału oraz **(ii)** tzw. odpowiedź ratiometryczna czyli zmiana stosunku intensywności sygnału przy dwóch lub więcej długościach fali,
4. **Specyficzność oddziaływania z** interesującą nas formą analitu wobec innych jego form, podobnych analitów, a także stabilność (obojętność) wobec innych chemicznych i fizycznych elementów środowiska (np. białek, pH, ale także polarności czy lepkości),
5. **Czułość**, która jest konsekwencją **(i)** siły/prawdopodobieństwa interakcji pomiędzy analitem a sondą, **(ii)** wynikającego z interakcji rodzaju i wielkości zmiany właściwości fluorescencyjnych oraz **(iii)** szumu (np. sygnału tła i interakcji niespecyficznych),
6. **Zachowanie się sondy w środowisku komórkowym**, w tym lokalizacja i lokalne stężenie sondy w czasie, co jest konsekwencją wnikania, retencji i stabilności/metabolizmu, oraz sekrecji,
7. **Wpływ sondy na środowisko komórkowe**, który dla celów wizualizacji i monitorowania powinien być wyeliminowany, zminimalizowany lub możliwy do precyzyjnego określenia. Obejmuje on **(i)** toksyczność sondy, **(ii)** toksyczność sygnału (np. wywołaną światłem), mogące powodować zarówno ostre, jak i długotrwałe skutki letalne (tj. śmierć komórek), a także bardziej subtelne zmiany w procesach komórkowych, metabolizmie i stanie ogólnym.

4.C.1.2 Powiązanie struktury z reaktywnością i odpowiedzią sond fluorescencyjnych na RONS w celu poprawy selektywności

Zrozumienie zależności pomiędzy strukturą reagujących substancji a specyficznością reakcji jest, wydawać by się mogło, oczywistym kluczem do poprawy wiarygodności sond fluorescencyjnych. Większość istniejących prac przeglądowych klasyfikuje sondy fluorescencyjne dla RONS według typu użytych fluoroforów lub analitu, który mają wykrywać, co nie zapewniło jeszcze jasnego zrozumienia, jak osiągnąć specyficzność detekcji. Nasza praca (**publikacja P7**) przeformułowała to pytanie analizując RONS przez pryzmat możliwych reakcji chemicznych, którym mogą one ulegać oraz struktur potencjalnych motywów responsywnych, które są podatne na te reakcje. Na tej podstawie w unikalny sposób wskazaliśmy także najbardziej prawdopodobne niespecyficzne interakcje istniejących sond i zaproponowaliśmy strategię, która pomoże naukowcom w przyszłości zidentyfikować i unikać potencjalnych niespecyficznych odpowiedzi.

Po dogłębnej analizie wyników uzyskanych z badań z wykorzystaniem znanych sond potwierdziłem, że **najlepszym predyktorem specyficzności sondy jest zgodność mechanizmu reakcji analitu i reaktywności chemicznej grupy responsywnej sondy**. W szczególności, zdefiniowałem cztery typy transformacji (reakcji) chemicznych, którym najczęściej podlegają sondy fluorescencyjne do wykrywania RONS. Grupy te różnią się od siebie, natomiast sondy wewnątrz danej grupy wykazują

podobne zalety i podlegają podobnym ograniczeniom w zakresie ich specyficzności. Zidentyfikowałem także luki w wiedzy i zaproponowałem ulepszenia walidacji eksperymentalnej tych grup sond:

1. Utlenianie rodnikowe - bardzo czuła reakcja, która jednak jest relatywnie niespecyficzna, szczególnie w obecności innych rodników (np. H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OtBu}$, ONOO^-) i prowadzi do wielu reakcji ubocznych, jak również może sama generować nowe rodniki. Przykłady sond obejmują dichlorofluoresceinę (DCFH) i dihydroetydynę (DHE) oraz sondy oparte na rodnikach nitroksylowych.²⁻⁵
2. Oksydacyjne przemiany nukleofilowe - oparte na dostrojeniu grupy elektrofilowej na fluoroforze, są podatne na interferencję z innymi nukleofilowymi RONS (H_2O_2 , ONOO^- i $\text{O}_2^{\cdot-}$) oraz innymi nukleofilami (np. glutation, lizyny itp.). Przykładem są sondy oparte na boronianach.⁶⁻⁹
3. Elektrofilowe utlenianie nierodnikowe - oparte na RONS pełniącym rolę elektrofila (np. $\cdot\text{OCl}$ ze skłonnością do reakcji z wolnymi elektronami siarki, NO z elektronami azotu i nadtlenoazotyn z pierścieniami aromatycznymi). Cechują się wysoką specyficznością w stosunku do wybranego RONS a nie innych RONS, ale mogą generować rodniki i często są niedostatecznie przebadane w kontekście potencjalnych reakcji z innymi elektrofilami i rodnikami.¹⁰⁻¹⁴
4. Interakcje oparte na jonach metali – ta strategia (wykorzystania kompleksów jonów metali) otwiera możliwości wykorzystania szerszego zakresu cech do rozróżniania analitów (reaktywność, geometria, ładunek i potencjał redoks - podobnie jak w przypadku sond redoks opartych na białkach); jak dotąd istnieją tylko nieliczne przykłady takich narzędzi^{15,16}.

Większość sond opartych na selektywności względem jednego RONS jest nieodwracalnie modyfikowana przez analit. Nieliczne przykłady sond do detekcji RONS łączących specyficzność jak i odwracalność jest w dużej mierze inspirowana miejscami aktywnymi enzymów redoks. Wykorzystują one selen jako centrum reaktywne, które dzięki zastosowaniu odpowiednich podstawników może ulegać specyficznemu utlenianiu tylko przez wybrany RONS, np. ONOO^- , H_2O_2 lub $\cdot\text{OCl}$ i jest redukowane przez glutation lub inne tiole, umożliwiając badanie odwracalnych zmian redoks przez odwracalną odpowiedź fluorescencyjną. Brak jest jednak protokołów walidacyjnych do określania specyficzności tych sond *in cellulo*. W związku z tym, że tworzenie pojedynczych sond, które są zarazem odwracalne i specyficzne pozostaje dużym wyzwaniem, alternatywą może być jednoczesne użycie jednej specyficznej i jednej odwracalnej sondy o komplementarnych właściwościach fluorescencyjnych (np. nienakładających się długościach fal emisji). Alternatywnie, zaproponowaliśmy po raz pierwszy powiązanie dwóch sond (odwracalnych i specyficznych) ze sobą, aby zapewnić wspólną lokalizację i tę samą stabilność metaboliczną - koncepcja, którą dalej rozwinęliśmy i opisaliśmy w **publikacji P9**, omówionej w ostatnim podrozdziale opisu osiągnięcia (rozdział 4.C.4).

Podsumowując, w tej pracy (**publikacja P7**) wykazałem, jak ważne jest zrozumienie chemicznych determinantów reaktywności grupy responsywnej i analitów w celu zapewnienia specyficzności. Umożliwia to określenie klas związków, które mogłyby być najbardziej prawdopodobnymi interferentami w modelach biologicznych, a tym samym pozwala na bardziej wiarygodną walidację sond.

4.C.1.3 Określenie wymagań dotyczących projektowania i walidacji odwracalnych sond fluorescencyjnych dla analitów bionieorganicznych

Jak wspomniano powyżej, w celu bardziej niezawodnego monitorowania zmian w poziomach i lokalizacji analitów bionieorganicznych w czasie, preferowane są sondy fluorescencyjne, które reagują odwracalnie na obecność lub brak analitu. Można to osiągnąć poprzez skorelowanie zmian fluorescencji z niekowalencyjnym oddziaływaniem analitu z sondą lub z reakcją, która zrywa/tworzy wiązania kowalencyjne (Ryc. 3) przy założeniu, że nie prowadzi ona do fragmentacji sond (wówczas odwyfundowanie fragmentów od siebie w praktyce uniemożliwia reakcję odwrotną).

W przypadku sond, które wykrywają jony metali przejściowych, zwykle mamy do czynienia z niekowalencyjnym oddziaływaniem analitu z sondą. Wynika to przede wszystkim z unikatowego charakteru jonów metali, a w szczególności z dużej, ale zróżnicowanej gęstości ładunku jonów metali oraz ich wewnętrznie zróżnicowanej preferencji dla określonych geometrii wiązania i typów ligandów. Pozwoliło to na wykorzystanie wysoce specyficznych, wielokleszczowych ligandów jako motywów wiążących, które działają nawet w wysoce kompetycyjnych środowiskach wodnych.^{17,18,19-21}

W przypadku RONS, ze względu na ich wysoką reaktywność i mniejszą różnicę ładunków, sondy zazwyczaj działają poprzez odwracalną reakcję chemiczną, której efektem jest zmiana fluorescencji. Taka interakcja prowadzi jednak do zużycia cząsteczki analitu (RONS) i wymaga obecności innego analitu lub układu wewnętrznego o przeciwnej aktywności (np. substancji redukujących), aby zregenerować sondę do poprzedniego stanu, zanim będzie ona mogła ponownie wykryć analit. Stwarza to wyzwania w projektowaniu odwracalnych sond fluorescencyjnych dla RONS i pomimo zapotrzebowania na te narzędzia, brak było dedykowanych opracowań teoretycznych i przeglądowych wspomagających zrozumienie zależności pomiędzy strukturą a odwracalnością.

Aspekty istotne przy projektowaniu odwracalnych sond na RONS: nasza strategia projektowania takich sond opiera się na dopasowaniu charakteru chemicznego i reaktywności grupy responsywnej (która musi być odwracalnie modyfikowana przez analit) do mechanizmu generującego zmiany fluorescencji. To z kolei wymaga głębokiego zrozumienia, jak struktura grupy responsywnej determinuje oddziaływanie z analitem i jak wpływa na fluorescencję fluoroforu/grupy sygnałowej. W tym celu przeanalizowaliśmy opublikowane odwracalne sondy fluorescencyjne dla RONS z dwóch perspektyw:

1. Mechanizmów przez które odwracalne oddziaływanie analit-grupa responsywna wpływa na zmianę sygnału fluorescencyjnego (**publikacja P7**). Wskazaliśmy tu trzy typy interakcji:
 - a) Analit reaguje bezpośrednio z chromoforem prowadząc do jego zniszczenia/utworzenia (np. reakcja z fluoresceiną, rodaminą, flawiną lub nikotynamidem)²²⁻²⁶ - Ryc. 3A
 - b) Indukowana analitem modulacja zdolności przenoszenia energii/elektronów (np. w mechanizmie PeT / ICT) przez grupę responsywną sond wpływającą na fluorescencję (np. z rodnikiem nitroksylowym lub cząsteczkami chinonopodobnymi)^{27,28} - Ryc. 3B
 - c) Indukowane przez analit zmiany odległości pomiędzy fluoroforem a wygaszaczem / wzmacniaczem (np. poprzez tworzenie / niszczenie mostków disulfidowych)²⁹ - Ryc. 3C
2. Struktury chemicznej i charakteru grup reaktywnych odpowiedzialnych za odwracalną reakcję z analitem (**publikacja P8**) (rodniki nitroksylowe, chinony, dichalcogenidy i chalcogenoksydy, nikotynamidy i flawiny)



Ryc. 3 Schematyczne przedstawienie mechanizmów pozwalających na przełożenie odwracalnej interakcji analit-sonda na wykrywalny sygnał

Aspekty istotne w walidacji sond: Choć wszystkie wspomniane wyżej motywy responsywne i mechanizmy mogłyby być wykorzystane do projektowania odwracalnych sond fluorescencyjnych dla RONS, porównanie ich potencjału jest utrudnione przez rozbieżności w opublikowanych protokołach walidacji tych sond. W wielu badaniach brakowało oceny odwracalności, czułości biologicznej lub biokompatybilności na wielu poziomach, co utrudniało ich wiarygodne wykorzystanie w biologii. Z tego powodu w opisywanej pracy (**publikacja P8**) przedstawiliśmy wytyczne dotyczące kompleksowej walidacji działania sond odwracalnych, w celu potwierdzenia ich niezawodności w eksperymentach biologicznych. W szczególności, w porównaniu z innymi rodzajami sond, walidacja ich odwracalności wymaga wzięcia pod uwagę dodatkowych elementów takich jak:

- a) czas reakcji - wystarczająco krótki, aby monitorować szybkie zmiany stężenia w czasie rzeczywistym;
- b) odwracalność i stabilność po wielu cyklach (niskie zmęczenie systemu);
- c) możliwość dostosowania siły wiązania i czułości sond na analit do zakresu fizjologicznie i/lub patologicznie istotnych stężeń analitów, (np. poprzez pomiar tych zakresów alternatywnymi technikami);
- d) opracowanie uniwersalnych protokołów i analiz z wykorzystaniem sond poza mikroskopią (np. zbadanie kompatybilności sondy z cytometrią przepływową lub miniaturyzacją do formatu płytek wielodołkowych a nawet automatyzacją).

4.C.1.4 Podsumowanie (publikacje P7 i P8)

Wyżej opisana praca pokazuje mój znaczący wkład w teorię i koncepcje projektowania i walidacji sond fluorescencyjnych dla analitów bionieorganicznych w komórkach, umożliwiając opracowanie bardziej niezawodnych narzędzi. W **publikacji H7** poprawiłem zrozumienie zależności pomiędzy strukturą, reaktywnością i odpowiedzią fluorescencyjną, ustanawiając ścisłe kryteria projektowania **wysoce specyficznych** sond dla RONS. Następnie w **publikacji H8** opracowałem i opisałem szereg uwarunkowań niezbędnych do projektowania **odwracalnych sond** oraz protokołów walidacji tych narzędzi w celu maksymalizacji ich niezawodności. Należy zauważyć, że chociaż manuskrypty przedstawione w tej sekcji mają cechy prac przeglądowych, moja praca miała charakter oryginalny a nie odtwórczy i obejmowała prace teoretyczne tj. metaanalizy prowadzące do nowych wniosków, które znacząco wpływają na sposób, w jaki sondy fluorescencyjne są wykorzystywane w badaniach biologicznych poprawiając ich wiarygodność.

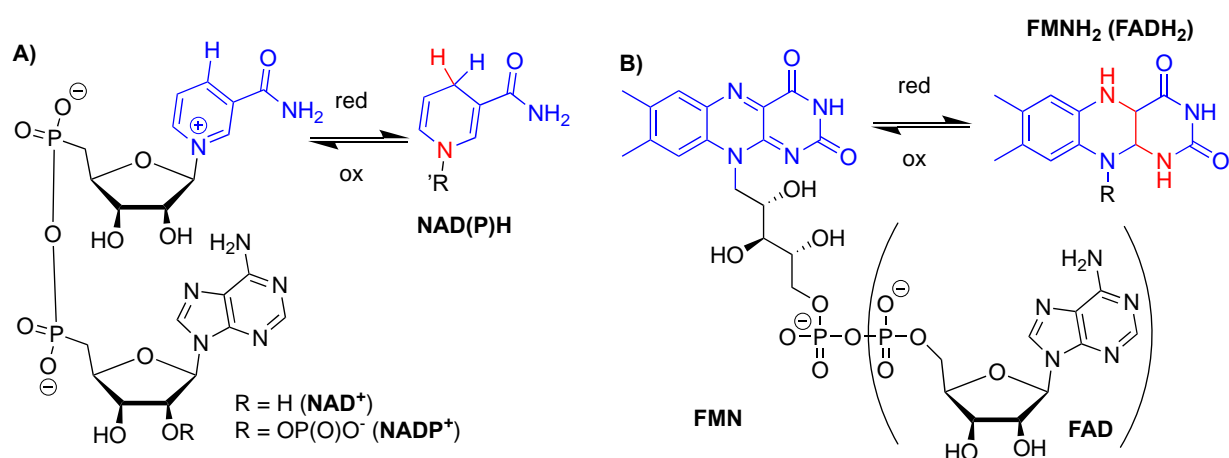
4.C.2 Wykorzystanie zależności struktura-reaktywność-odpowieź fluorescencyjna do opracowania specyficznych sond dla analitów bionieorganicznych

W tej części opiszę moje wysiłki zmierzające do zastosowania teoretycznych ustaleń i wniosków opisanych w punkcie 4.A.2 do zbadania, jak można manipulować strukturą chemiczną i reaktywnością grupy sygnałowej i grupy responsywnej w celu opracowania wysoce specyficznych sond do detekcji RONS i jonów metali.

4.C.2.1 Sondy na redoks oparte na nikotynamidach

Publikacja P1 bada związek między strukturą a reaktywnością, na przykładzie nikotynamidu – grupy responsywnej, dołączonej do fluoroforu na bazie kumaryny pełniącego rolę grupy sygnałowej. Mój wkład w tę pracę otworzył drogę do zaprojektowania i rozwoju redoks-aktywnej sondy opartej na nikotynamidzie.

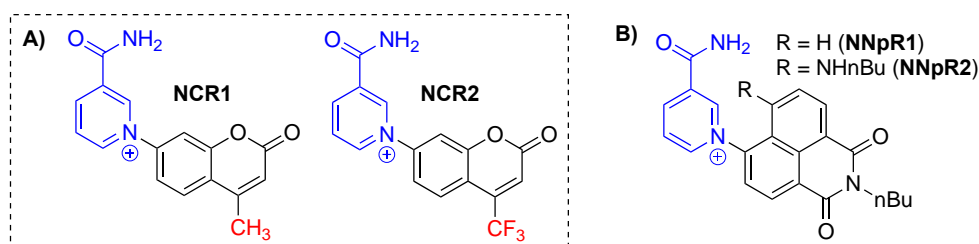
Flawina (np. kofaktor FAD) i nikotynamid (część dinukleotydu (fosforanu) nikotynamidu adeninowego - NAD(P)⁺ i jego zredukowanej formy - NAD(P)H - Ryc. 4) to dwa koenzymy pośredniczące w przemianach redoks w żywych komórkach. Są one również fluorescencyjne w jednej z form redoks, co pozwala na wykorzystanie zmian ich fluorescencji jako wskaźnika wewnątrzkomórkowego stanu redoks.³⁰⁻³³ Podczas gdy jedna część zespołu badawczego, w którym pracowałem przy realizacji tego zadania tworzyła fluorescencyjne sondy redoks oparte o flawinę, moja praca koncentrowała się na zrozumieniu związku pomiędzy strukturą i reaktywnością redoks-aktywnej grupy nikotynamidu (**publikacja P1**) w celu dostarczenia wiedzy do rozwoju sond reagujących na zmiany redoks w biologii.



Ryc. 4 (A) Struktury dwóch wewnątrzkomórkowych i odwracalnych par redoks zawierających motyw nikotynamidowy (NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH) (B) Struktury dwóch wewnątrzkomórkowych i odwracalnych par redoks zawierających motyw flawinowy (FMN/FMNH₂ and FAD/FADH₂). Niebieski – motywy redoks-aktywne, czerwony – zredukowane fragmenty tych motywów.

Aby umożliwić rozróżnienie endogennej fluorescencji NAD(P)⁺ i fluorescencji sond opartych na nikotynamidzie, motyw nikotynamidu jako element reagujący na redoks, został włączony w strukturę fluoroforu kumarynowego, który działałby jako fluorescencyjny reporter. W tym celu zoptymalizowałem reakcję sprzężenia grupy 7-aminowej kumaryny z *m*-amidopirydyną (powstanie grupy nikotynamidowej) i oczyszczenia związku NCR1 (Ryc. 5), który jest oparty na kumarynie 120. Zsyntetyzowałem również i oczyściłem po raz pierwszy sondę NCR2 oparta na kumarynie 151 w celu zbadania wpływu podstawników na reaktywność redoks i właściwości fluorescencyjne sond

nikotynamidowo-kumarynowych. Maksima wzbudzenia NCR1 i NCR2 były przesunięte w kierunku niebieskim w porównaniu z macierzystymi kumarynami, przy czym maksimum wzbudzenia w przypadku NCR2 znajdowało się przy dłuższej fali (374 nm), co umożliwiło wzbudzenie bez użycia promieniowania UV, a tym samym czyniło tę sondę bardziej biokompatybilną w porównaniu z NCR1. Ponieważ oba związki zostały wyizolowane w postaci utlenionej, w której nikotynamid nie powinien wykazywać fluorescencji, ich emisja w tych warunkach może być przypisana do reszty kumarynowej. Badanie elektrochemiczne wykazało, że NCR2 ulega pojedynczemu etapowi utleniania o większej amplitudzie i przy innym potencjale niż NCR1, który wykazywał dwuetapowy proces utleniania. Co ważne, ekspozycja na czynnik redukujący (ditiotionian(III) sodu) w przypadku obu sond prowadziła do spadku intensywności fluorescencji, który nie mógł być odwrócony po dodaniu nadtlenu wodoru. Brak odwracalności redukcji można tłumaczyć obecnością wielu procesów redukcyjnych widocznych w cyklicznym voltamperogramie obu sond.



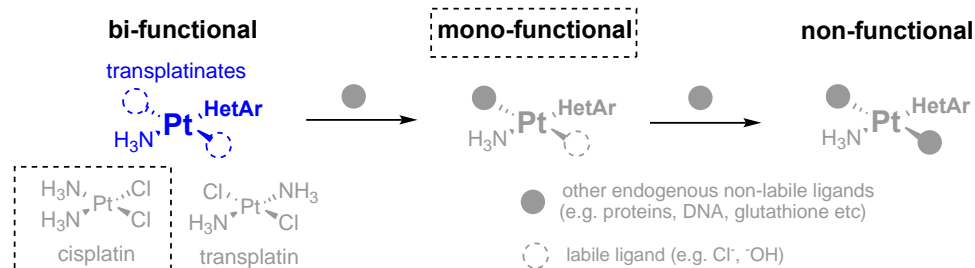
Ryc. 5 (A) Pierwsza generacja koniugatów nikotynamidu i kumaryny (NCR1 i NCR2) przygotowanych i scharakteryzowanych przeze mnie w tej pracy oraz (B) druga generacja koniugatów nikotynamidu z naftalimidem (NNpR1 i NNpR2) zaprojektowane i opracowane na podstawie wniosków wyciągniętych z mojej analizy zachowania sond pierwszej generacji. Na niebiesko – redoks-aktywny podstawnik nikotynamidowy, na czerwono – podstawniki decydujące o właściwościach fluorescencyjnych i potencjale redoks sond pierwszej generacji.

Różnice w zachowaniu redoks i właściwościach fluorescencyjnych NCR1 i NCR2 pokazują możliwość dostrojenia właściwości koniugatów nikotynamid-kumaryna poprzez zmianę charakteru donorowo-akceptorowego podstawników w pozycji 4 reszty kumarynowej. Zrozumienie zależności pomiędzy charakterem i względnym położeniem podstawnika na rusztowaniu fluorescencyjnym w odniesieniu do położenia motywu nikotynamidowego (reagującego z analitem) pozwoliło na zaprojektowanie bardziej biokompatybilnej sondy opartej na cząsteczce naftalimidu przez skonjugowanie jej w odpowiednim miejscu z nikotynamidem. Nowa sonda (NNpR1) została następnie z powodzeniem przygotowana i wykorzystana do wykrywania hipoksji w linii komórkowej nowotworu płuc, A549. Dodatkowo, dominacja fluorescencji charakterystycznej dla kumaryny czy naftalimidu nad fluorescencją nikotynamidu w tych sondach pozwala na bardziej wiarygodne odróżnienie sond opartych o nikotynamid od jego endogennej fluorescencji wewnątrzkomórkowej.³⁵

4.C.2.2 Opracowanie sondy fluorescencyjnej do wykrywania jednej z form kompleksów metali na bazie kompleksów platyny o potencjale terapeutycznym

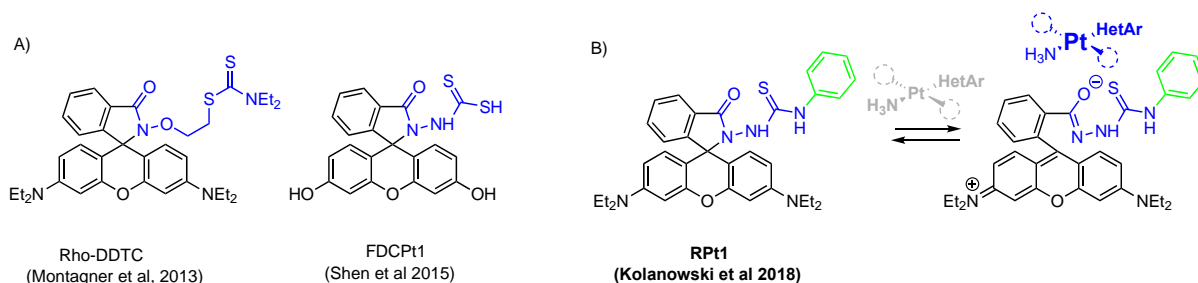
Terapeutyczne kompleksy oparte na platynie (Pt), takie jak cisplatyna i transplatyna, są przykładem ważnych, ale trudnych do monitorowania kompleksów metali o znaczeniu biologicznym. Ze względu na szeroko obserwowany wpływ geometrii i charakteru chemicznego ligandów na zmieniającą się dynamicznie bioaktywność kompleksów Pt, monitorowanie form tych związków, w których występują one w systemach biologicznych (Ryc. 6) jest kluczowe dla zrozumienia ich losu biologicznego, mechanizmu działania i ewentualnych reakcji ubocznych jakim podlegają, co z kolei

otworzy drogę do przewidywania ich potencjału terapeutycznego i projektowania, lepszych, bardziej efektywnych i pozbawionych efektów ubocznych leków przeciwnowotworowych a nawet leków na inne schorzenia.



Ryc. 6 Schematyczne przedstawienie kompleksów na bazie platyny(II) i ich form metabolicznych (monofunkcyjnych i niefunkcyjnych). Na niebiesko - rodzaj i forma kompleksów platyny wykrywalnych przez sondę opracowaną w ramach mojego osiągnięcia habilitacyjnego. W prostokątach przerywaną linią - formy kompleksów platyny wykrywalne przez sondy opracowane i opublikowane w innym miejscu. HetAr - podstawniki heteroarylowe, Pt - jon Pt(II).

W niniejszej pracy (**publikacja P2**) postawiliśmy sobie za cel opracowanie wysoce niezawodnych sond fluorescencyjnych wrażliwych na Pt poprzez osiągnięcie niezwykle wysokiej specyficzności. Projektowanie specyficznych sond dla różnych form kompleksów platyny pozostaje dużym wyzwaniem; w rzeczywistości przed opublikowaniem naszej pracy były znane tylko dwa takie sondy (Ryc. 7A - Rho-DDTC³⁶ dla cisplatin i pochodnych, FDCPt1³⁷ dla kompleksów platyny(II) z pojedynczym labilnym ligandem), a od tego czasu opracowano jedynie dwa nowe warianty sond Rho-DDTC ale także dla cisplatin autorstwa tej samej grupy badawczej.^{38,39}



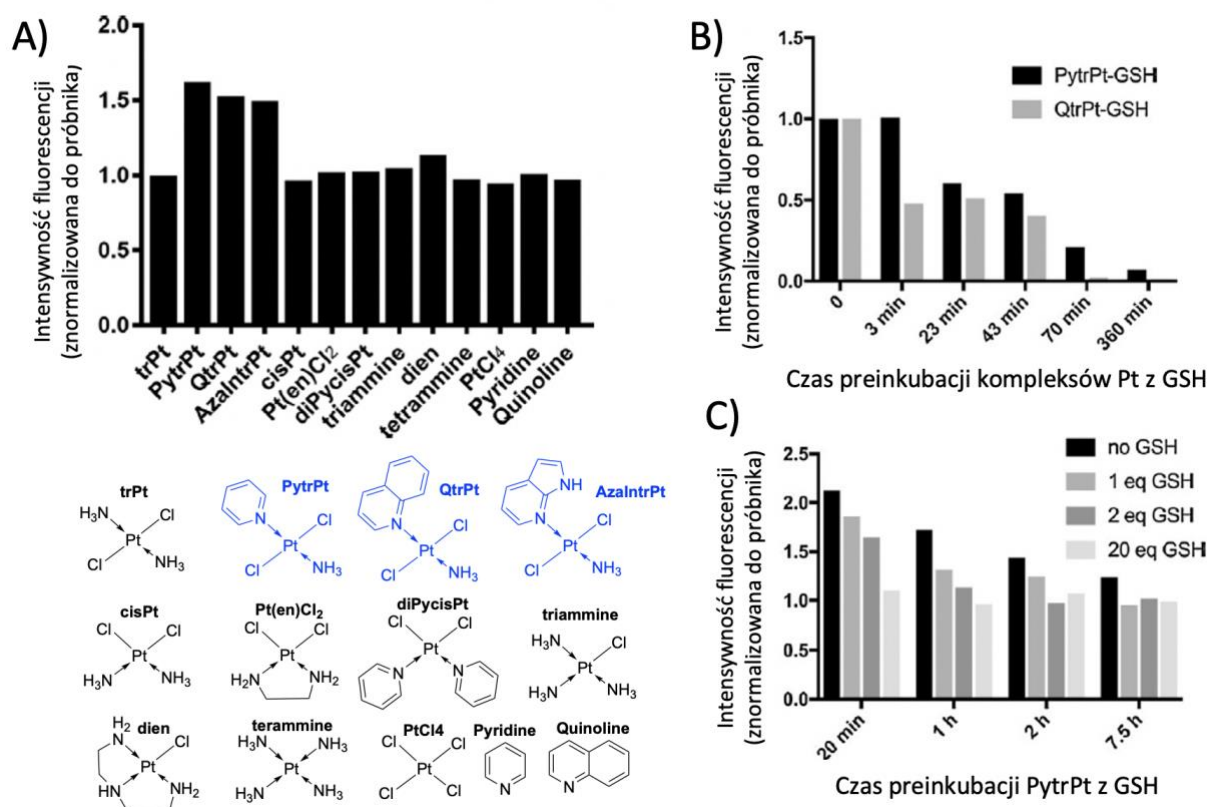
Ryc. 7 Struktury specyficznych sond fluorescencyjnych dla kompleksów metali platyny (II) A) wcześniej opublikowana wrażliwa na cisplatinę Rho-DDTC³⁶ i FDCPt1³⁷ wrażliwy na monofunkcyjne kompleksy platyny(II) B) sonda opracowana przeze mnie i współpracowników (**publikacja P2**) wraz z mechanizmem odpowiedzi sondy na analit – kompleks platyny. Motywy responsywne specyficzne dla kompleksów platyny na niebiesko. Na zielono specyficzny motyw odpowiedzialny za selektywność wobec heteroarylowych analogów transplatin.

W rozdziale 4.C.1.1 opisałem, jak ważne jest zrozumienie, jak poszczególne elementy strukturalne reagentów wpływają na ich podatność na określony typ oddziaływań i jak to się wiąże ze specyficznością. Jak wynika z analizy struktur opublikowanych sond, motywy wiązania kompleksów Pt(II) charakteryzują się dużą liczbą tzw. "miękkich" ligandów (w szczególności atomów siarki) i naprężoną geometrią. Biorąc pod uwagę te informacje i charakterystykę oddziaływań niekowalencyjnych sond z Pt(II), wprowadziliśmy hydrofobowy podstawnik arylowy do motywu responsywnego FDCPt1 i skoniugowaliśmy go z rodaminą pełniącą rolę grupy sygnałowej w celu uzyskania lepszych parametrów fluorescencyjnych, co doprowadziło do opracowania RPt1 (Ryc. 7B).

Badania przesiewowe odpowiedzi fluorescencyjnej RPt1 na obecność szeregu kompleksów Pt(II) wykazały specyficzną odpowiedź (wzrost fluorescencji) wyłącznie na analogi transplatyny zawierające cząsteczki heteroaromatyczne (PytrPt, QtrPt i AzaIntrPt - Ryc. 8 A i B). Jest to konsekwencją przesunięcia równowagi w kierunku otwartej, fluorescencyjnej formy sondy po związaniu z kompleksem platyny (prawa struktura, Ryc. 7B). Odpowiedź występuje w fizjologicznym pH w roztworze wodnym, co sugeruje, że interakcja między sondą a analitem jest wystarczająco silna, aby przetrwać także w środowisku wewnątrzkomórkowym. Co ciekawe, pomimo dużego podobieństwa motywu responsywnego w sondzie RPt1 do motywu FDCPt1 (Ryc. 7A na niebiesko), nie zaobserwowaliśmy żadnej odpowiedzi ze strony monofunkcyjnych kompleksów platyny. Ta specyficzność, jak wspomniałem wyżej, może wynikać z obecności podstawnika fenyloвого w pobliżu atomu siarki, blokującego niespecyficzne wiązanie poprzez zwiększenie zawady sterycznej i jednocześnie stabilizujące oddziaływanie typu pi-pi pomiędzy grupą fenylową i heteroaromatycznym ligandem kompleksu Pt. Dodatkowe testy szerokiego zakresu analitów wykazały, że sonda jest wrażliwa na jony rtęci i srebra, ale ponieważ metale te nie występują endogennie w środowisku biologicznym, nie powinno to przeszkadzać w jej praktycznym wykorzystaniu.

4.C.2.3 Opracowanie testu fluorescencyjnego opartego na RPt1 do oceny stabilności metabolicznej terapeutyków aryloво-transplatynowych

Mając do dyspozycji RPt1, opracowałem szybki i wiarygodny test *in vitro* do oceny stabilności metabolicznej kompleksów transplatyny zawierających podstawnik aryloво. W tym celu preinkubowałem kompleksy pirydyna-transplatyna i chinolina-transplatyna z glutationem (GSH) w fizjologicznym pH w stosunku 1:1 (50 μ M), a następnie dodałem RPt1. Spadek intensywności fluorescencji w porównaniu do czasu zero (bez preinkubacji kompleksu Pt z GSH) wskazuje na niższy poziom dwufunkcyjnej formy kompleksu transplatyny, co koreluje z sekwestracją kompleksu Pt przez glutation. Ponadto kompleks chinolina-transplatyna wykazywał mniejszą oporność na glutation w porównaniu z kompleksem pirydyna-transplatyna. Co więcej, efekt ten zależy nie tylko od czasu preinkubacji, ale także od stężenia glutationu, przy czym glutation w stężeniu 2 mM niemal całkowicie sekwestruje kompleks PytrPt przy stężeniu 50 μ M w ciągu 1 h.



Ryc. 8 Podsumowanie odpowiedzi fluorescencyjnej RPt1 (50 μ M) na obecność kompleksów platyny (znormalizowana zintegrowana intensywność fluorescencji emisji przy 582-586 nm dla λ_{exc} = 540 nm (A), 555 nm – (B i C) w buforze HEPES (20 mM, pH 7.4, 1% DMF), A) znormalizowana intensywność fluorescencji w obecności 1 ekwiwalentu o kompleksów platyny i ich struktury (na niebiesko – struktury kompleksów indukujących odpowiedź sondy RPt1). B) fluorescencja RPt1 po ekspozycji na trans-Pt-pirydynę (PytrPt, czarny) i trans-Pt-Quinolinę (QtrPt, szary) przed (0 min) i po preinkubacji kompleksów Pt z 1 ekwiwalentem glutationu, C) fluorescencja RPt1 po ekspozycji na trans-Pt-pirydynę preinkubowaną z 0, 1, 2 i 20 ekwiwalentem glutationu (odpowiednio od czarnego do jasnoszarego) przez wskazany czas. Zaadoptowane z publikacji P2.

4.C.2.4 Podsumowanie (publikacje P1 i P2)

Powyższa sekcja opisuje mój wkład w projektowanie i walidację sond fluorescencyjnych, a także badanie zależności struktura-reaktywność-specyficzność grup responsywnych w celu opracowania bardziej specyficznych sond. W **publikacji P1** pokazałem jak zrozumienie zależności struktura-reaktywność-odpowiedź fluorescencyjna, na przykładzie konjugatów nikotynamidu i kumaryny może wspierać projektowanie bardziej niezawodnych sond dla stanu redoks. Następnie, w **publikacji P2** opracowałem wysoce specyficzną sondę RPt1 i test fluorescencyjny oparty na RPt1, kompatybilny ze zminiaturyzowanym formatem mikropłytek, który może być zastosowany do szybkiej i wiarygodnej oceny wewnątrzkomórkowej stabilności kompleksów typu transplatyna z podstawnikami heteroarylowymi o potencjale terapeutycznym lub biologicznym.

4.C.3 Projektowanie i stosowanie niezawodnych sond do wiarygodnej detekcji bionieorganicznych analitów w kontekście biologicznym

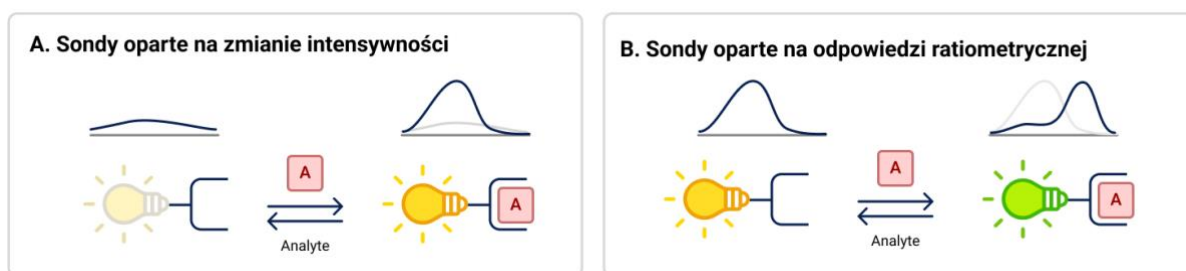
Ta część opisuje moją pracę nad rozwojem i zastosowaniem narzędzi fluorescencyjnych do wykrywania istotnych analitów bionieorganicznych w modelach komórkowych ze zwiększoną wiarygodnością. Moje wysiłki skupiły się zarówno na opracowaniu wysoce specyficznych sond

fluorescencyjnych, jak i na optymalizacji procesów zbierania i analizy danych w celu maksymalizacji wiarygodności odpowiedzi w badaniach biologicznych.

4.C.3.1 Rozwój tzw. ratiometrycznych sond fluorescencyjnych do wykrywania labilnych form jonów metali przejściowych

4.C.3.1.1 Odpowiedź ratiometryczna zwiększa niezawodność wykrywania

Jak wspomniano w podrozdziale 4.C.1, anality mogą wywoływać różne tryby odpowiedzi sond. Wynikająca z tego zmiana może być wzrostem lub spadkiem intensywności emisji (dla sond opartych na intensywności) lub zmianą koloru emisji (tzw. odpowiedź ratiometryczna) (Ryc. 9). Chociaż większość opublikowanych sond jest oparta na zmianie intensywności, to ich wadą jest zależność intensywności fluorescencji nie tylko od stężenia analitu, ale także od stężenia, lokalizacji i metabolizmu samych sond. Sondy ratiometryczne pozwalają na pomiar obecności analitu na podstawie zmian w stosunku intensywności fluorescencji przy dwóch różnych długościach fali. Stosunek ten jest niezależny od stężenia i lokalizacji sondy. Sondy ratiometryczne są zatem znacznie bardziej niezawodne i preferowane w przypadku badań w złożonych modelach biologicznych, ale ich opracowanie stanowi większe wyzwanie.



Ryc. 9 Schemat sond A. opartych o intensywność (turn on - włącz lub turn off - wyłącz) i B. ratiometrycznych

Sondy ratiometryczne mogą być skonstruowane na wiele sposobów, w tym z wykorzystaniem reportera fluorescencyjnego, który inherentnie reaguje zmianą długości fali emisji (tzn. zmiana koloru emisji) lub poprzez połączenie dwóch fluoroforów - jednego reportera opartego na intensywności z drugim, który emituje stabilny sygnał niezależnie od środowiska/analitu. W mojej pracy wykorzystywałem przede wszystkim tę drugą strategię, aby zaprojektować i opracować niezawodne sondy do wykrywania wybranych labilnych form jonów metali przejściowych w biologii.

Należy zauważyć, że choć jony metali istnieją w dwóch głównych pulach w komórkach (związane z białkami i labilne), uważamy, że to pula labilna (dynamicznie wiązana i dysocjująca) jest krytyczna dla procesów sygnałowych, utrzymania homeostazy metali i dostarczania jonów metali do metaloenzymów. Istnieją metody pomiaru całkowitej puli metali (labilne + związane), np. ICP-MS, jednak zazwyczaj wymagają one zniszczenia próbki. Dlatego też fluorescencyjne sondy ratiometryczne omawiane w tym rozdziale są ukierunkowane na detekcję labilnych form metali, które mają kluczowe znaczenie w poznawaniu procesów patologicznych.

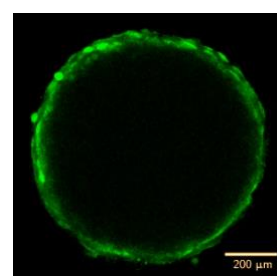
Poniżej przedstawiam przykłady moich wysiłków zmierzających do wykorzystania koncepcji ratiometryczności w celu poprawy detekcji labilnych jonów dwóch najczęściej występujących biologicznie redoks-aktywnych jonów metali przejściowych: żelaza i miedzi. W szczególności opracowaliśmy i wykorzystywaliśmy sondy odwracalne, aby umożliwić badanie labilnych form

żelaza (LIP, ang. *labile iron pools*) i labilnych form miedzi (LCP, ang. *labile copper pools*) z rozdzielczością przestrzenną i czasową. Żelazo i miedź pełnią bardzo różnorodne funkcje w komórkach i są prawdopodobnie jednymi z najtrudniejszych do wykrycia analitów co wzmacnia istotność moich badań i wyników opisywanych w ramach tego osiągnięcia.

4.C.3.1.2 Opracowanie ratiometrycznego wariantu sondy Calcein-AM dla labilnych form jonów żelaza(II) w złożonych modelach biologicznych (**publikacja P3**)

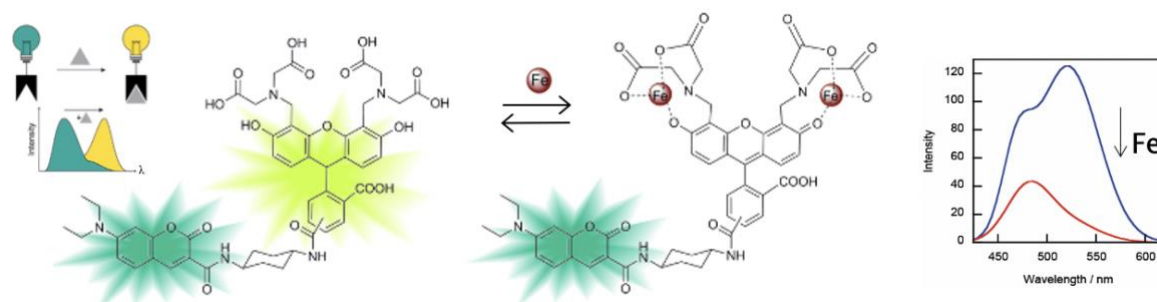
Pula labilnych form jonów żelaza (LIP) w postaci żelaza(II) jest ściśle kontrolowana, ponieważ może uczestniczyć w reakcjach Fentona generując reaktywne formy tlenu. LIP jest zatem swoistym parametrem diagnostycznym homeostazy żelaza i może wskazywać lub powodować różnorodne patologie, w tym neurodegenerację,⁴⁰ zapalenia,⁴¹ choroby sercowo-naczyniowe⁴² i nowotwory.^{43,44} Dostępność żelaza jest również związana ze wzrostem i rozprzestrzenianiem się mikroorganizmów, dlatego jego sekwestracja jest podejściem terapeutycznym w leczeniu infekcji.^{45,46}

Calcein-AM był pierwszą szeroko stosowaną sondą fluorescencyjną do detekcji LIP, działającą przez wygaszanie intensywności fluorescencji fluoresceiny w obecności odwracalnie wiązanych jonów Fe(II) (typu *turn-off*). Jednym z kluczowych problemów w stosowaniu Calcein-AM jest fakt, że brak fluorescencji może oznaczać zarówno wysokie stężenie analitu wygaszającego fluorescencję jak i niskie stężenie lub nawet rozkład sondy. Jest to widoczne np. na Ryc. 10 przedstawiającej zdjęcie sferoidu nowotworowego wybarwionego Calcein-AM, na którym nie można określić, czy brak sygnału fluorescencji w centrum sferoidu jest spowodowany brakiem wnikania sondy czy dużą ilością Fe(II).



Ryc. 10 Obraz przekroju poprzecznego sferoidu komórek DLD-1 eksponowanych na Calcein-AM. Zaadoptowano z publikacji P3.

Aby rozwiązać ten problem, opracowaliśmy bardziej wiarygodną, ratiometryczną sondę na Fe(II) opartą na strukturze Calcein-AM (**publikacja P3**). Do fluoresceinowego rdzenia Calcein-AM dołączyliśmy niewrażliwą na metal aminokumarynę, tworząc FICFe1', sondę, która reaguje na obecność Fe(II) zmianami intensywności przy dwóch długościach fali. Dekonwolucja widm fluorescencji FICFe1' w obecności Fe(II) potwierdza brak zmiany emisji fluorescencji kumaryny z jednoczesnym zmniejszeniem intensywności fluorescencji fluoresceiny (Ryc. 11). To oznacza, że obliczony stosunek dwóch pików emisyjnych może być użyty do wiarygodnej identyfikacji i badania Fe(II).

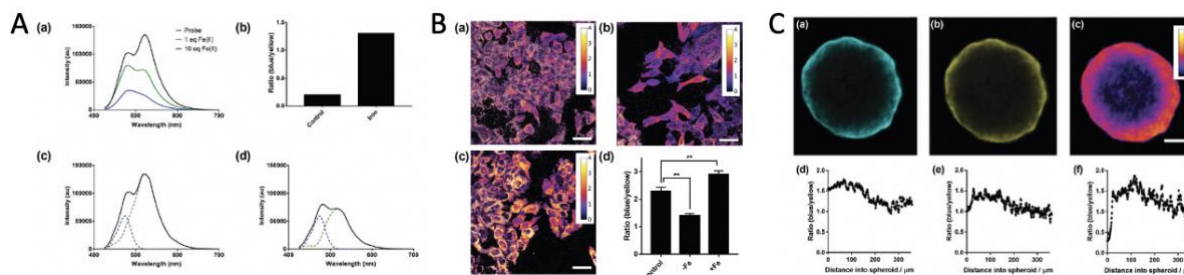


Ryc. 11 Struktura i schemat ratiometrycznej odpowiedzi fluorescencyjnej sondy FICFe1' opartej na Calcein-AM oraz zmiana emisji fluorescencji sondy w obecności żelaza (panel po prawej).

Do zastosowań komórkowych przygotowaliśmy wariant sondy FICFe1', zawierający grupy estru acetoksymetylowego FICFe1, który jest analogiczny do Calcein-AM. Ekspozycja linii komórkowej

gruczolakoraka jelita grubego DLD-1 na FICFe1 i następnie ekspozycja komórek na jony Fe(II) prowadziły do wzrostu stosunku fluorescencji niebieskiej (425-480 nm, emisja kumaryny) do zielonej (520 - 600 nm, emisja kalceiny wygaszana przez Fe(II)) w eksperymencie mikroskopowym, zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami w buforze. Ekspozycja komórek na chelator żelaza prowadzi z kolei do zmniejszenia stosunku niebieskiej do zielonej fluorescencji w porównaniu do komórek eksponowanych tylko na sondę FICFe1, przy czym wszystkie różnice są statystycznie istotne. To wyraźnie pokazuje wiarygodność użycia sondy FICFe1 do badania puli labilnych form jonów Fe(II) w modelach komórkowych.

Wykazaliśmy również, że FICFe1 lepiej nadaje się do badania sferoidów guzów litych, umożliwiając ocenę terapii chelatorami żelaza. Aby porównać działanie FICFe1 z Calcein-AM, sferoidy DLD-1 były potraktowane FICFe1 (Ryc. 12). Stwierdziliśmy, że intensywność fluorescencji w każdym kanale zmniejszyła się w kierunku centrum sferoidu, ale stosunek światła niebieskiego do żółtego może być wiarygodnie mierzony w głębi przekroju sferoidu nawet przy zmniejszonej intensywności. Dzięki temu wykazaliśmy, że stężenie sondy maleje w kierunku centrum sferoidu, ale stężenie labilnego żelaza(II) jest najwyższe w odległości około 50 - 100 μm od powierzchni sferoidu - informacja, której nie można było uzyskać stosując sondę Calcein-AM.



Ryc. 12 A. (a) Widma emisyjne FICFe1' z 1 i 10 ekwiwalentami Fe(II) ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$). (b) Stosunek emisji 490 nm do 530 nm przy braku i obecności Fe(II) ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$). (c) Dekonwolucja widma emisji FICFe1' bez Fe(II). (d) Dekonwolucja widma emisji FICFe1' z 1 ekwiwalentem Fe(ii). B. FICFe1 może informować o egzogennych zmianach w poziomie żelaza. Konfokalne obrazy typu ratio – stosunkowi intensywności w dwóch długościach fali (425-480 nm/520-600 nm, $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) komórek DLD-1 poddanych działaniu FICFe1 (10 μM , 2 h), po czym 30 min. traktowanych (a) kontrolą (rozpuszczalnikiem), (b) hydrazonem izonikotynoilowym salicylaldehydu (SIH; 10 μM) lub (c) siarczanem amonowo-żelazowym(II) (FAS; 100 μM). Paski skali przedstawiają 20 μm . (d) Zmiany stosunku niebieskiego do żółtego w różnych warunkach. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe z 5 powtórzeń, $**p < 0,01$. C. Środki chelatujące żelazo zmieniają poziom żelaza tylko na brzegu sferoidu. Obrazy mikroskopii konfokalnej (C): (a) kanał niebieski (425-480 nm), (b) kanał żółty (520-600 nm) i (c) obrazy stosunku fluorescencji w kanałach niebieskim do żółtego sferoidu DLD-1 (106 komórek) inkubowanych z FICFe1 (10 μM , 24 h). Pasek skali reprezentuje 200 μm . Wykresy intensywności stosunku intensywności fluorescencji sferoidów poddanych następnie przez 2 h działaniu (d) kontroli (rozpuszczalnik), (e) deferipronu (100 μM) i (f) deferasiroksu (100 μM).. Zaadaptowane z **publikacji P3**.

Mając takie narzędzie w rękę, opracowaliśmy następnie test do badania efektywności chelatorów żelaza o potencjalnych zastosowaniach klinicznych. Test wykazał, zgodnie z oczekiwaniami, że związki te są skuteczne w usuwaniu żelaza z zewnętrznych warstw komórek, ale nie są w stanie skutecznie tego zrobić w przypadku głębszych warstw. Głębsze warstwy odpowiadają obszarom guzów litych, które wykazują hipoksję i są odpowiedzialne zarówno za oporność na leki, jak i powrót nowotworu i przerzuty wtórne po chemioterapii. Ten test fluorescencyjny może być teraz wykorzystywany do oceny efektywności nowych chelatorów żelaza jako potencjalnych terapeutyków.

Podsumowanie (publikacja P3)

Publikacja P3 opisuje rozwój nowego sondy fluorescencyjnego FICFe1 na labilne formy jonów Fe(II) o znacznie lepszej niezawodności i penetracji komórkowej niż istniejące narzędzia. Udało mi się wykorzystać zalety detekcji typu ratiometrycznego do zbadania efektu hipoksji w stałych modelach guzów 3D z wykorzystaniem tego sondy. Zaprojektowałem też i opracowałem testy do badania efektu chelatorów żelaza za pomocą FICFe1.

4.C.3.1.3 Opracowanie ratiometrycznego sondy do wykrywania zmian w puli labilnych form jonów Cu(I) w mitochondriach (**publikacja P4**)

Podobnie jak żelazo, miedź jest metalem redoks-aktywnym, występującym w formie Cu(II), gdy jest związana z enzymami i jako Cu(I) w puli labilnych form jonów metali. Miedź, oprócz roli w miejscach aktywnych enzymatycznie, jest zaangażowana w sygnalizację i wpływa na migrację komórek, inwazję tkanek i przerzuty. Zaburzenia homeostazy miedzi były wielokrotnie sugerowane jako mechanizm działania leków przeciwnowotworowych, przede wszystkim cisplatyny. Większość opisanych sond fluorescencyjnych na labilne formy jonów miedzi(I) (LCP) działa przez wygaszanie fluorescencji (tzw. *turn off*) i brak jest dostępnych sond ratiometrycznych do badania LCP w organellach subkomórkowych.

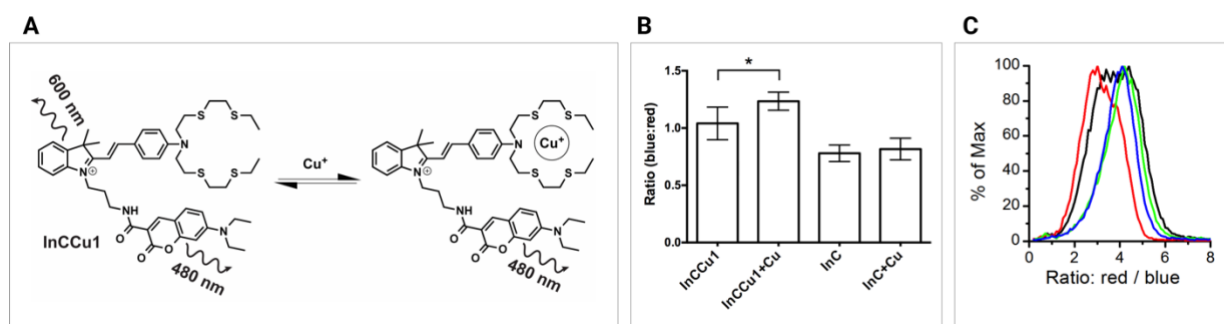
W tej pracy opracowaliśmy wysoce selektywną, odwracalną i ratiometryczną sondę dla Cu(I) o nazwie InCCu1 (Ryc. 13 A), który może wiarygodnie wykryć zmiany w puli labilnych jonów Cu(I) w mitochondriach. Motyw tioeterowy zastosowany w tej sondzie ma powinowactwo do jonów Cu(I) odpowiadające endogennym chelatorom, umożliwiając jej konkurowanie o Cu(I) w komórkach, ale pozwalając na odwracalność tego procesu. InCCu1 został oparty o fluorofor typu hemicyjaniny, który wykazuje biokompatybilne właściwości fluorescencyjne (pomarańczowa emisja, znaczące przesunięcia Stokesa i wysoka wydajność kwantowa). Podobnie jak w przypadku sondy FICFe1, InCCu1 zawiera również aminokumarynę przyłączoną do fluoroforu typu hemicyjaniny poprzez linker alkilowy, aby wprowadzić niereaktywne, niezależne pasmo fluorescencji i zapewnić odpowiedź typu ratiometrycznego.

Wzbudzenie InCCu1 tylko jedną długością lasera skutkuje widmem emisyjnym z dwoma wyraźnymi maksimumami fluorescencyjnymi przy około 480 nm i 600 nm. Dodanie Cu(I) w roztworze wodnym buforowanym w pH 7,4 prowadziło do zmniejszenia emisji fluorescencji przy 600 nm (fluorescencji hemicyjaniny) wskazując na wiązanie Cu(I), bez wpływu na emisję przy 480 nm. Umożliwia to pomiar stosunku niebieskiej do pomarańczowej fluorescencji, który jest skorelowany ze stężeniem Cu(I) (Ryc. 13). Wykazałem również, że na odpowiedź indukowaną przez Cu(I) nie ma wpływu jednoczesna obecność innych jonów metali, a fluorescencja jest niezależna od pH, co potwierdza specyficzność sondy.

Wykazaliśmy również, że InCCu1 może być wiarygodnie wykorzystany do monitorowania zmian w puli labilnych form jonów miedzi(I) w mitochondriach. Potwierdziliśmy kolokalizację sondy z MitoTracker Deep Red (barwnik mitochondrialny) w linii komórkowej gruczolakoraka jelita grubego DLD-1. Ta lokalizacja mitochondrialna jest prawdopodobnie wynikiem lipofilowej, kationowej natury fluoroforu hemicyjaninowego, która sprzyja gromadzeniu się tego związku przy ujemnym potencjale błonowym mitochondriów. Następnie, w eksperymencie mikroskopii fluorescencyjnej wykazaliśmy, że fluorescencyjny sygnał ratiometryczny z InCCu1 w żywych komórkach zmienia się po ekspozycji na Cu(I). Dla porównania, stosunek fluorescencji kontrolnej

sondy *InC*, która nie posiada motywu wiążącego miedź, nie był zmieniony przez traktowanie miedzią.

Jednym z moich głównych osiągnięć była obszerna optymalizacja i późniejsze zastosowanie uniwersalnego, wiarygodnego i szczegółowego protokołu eksperymentalnego do przygotowania próbek, pozyskiwania danych i ich analizy. Szczególnie skupiłem się na opracowaniu strategii minimalizowania i eliminacji potencjalnych artefaktów. Było to krytyczne osiągnięcie, aby uniknąć błędnego interpretowania artefaktów jako rzeczywistej odpowiedzi biologicznej, umożliwiając porównywanie danych ilościowych w różnych próbkach. Ten oryginalny protokół pozwolił mi wiarygodnie skorelować nawet niewielką odpowiedź fluorescencyjną *InCCu1* wywołaną ekspozycją na rosnące stężenie miedzi, aby wykazać istotność statystyczną tej zmiany. Protokół ten jest kompatybilny z większością sond fluorescencyjnych na anality bionieorganiczne itp. i w ten sposób stanowi nowe, oryginalne i potężne narzędzie do zapewnienia wiarygodności eksperymentu. Zaletą tego nowego protokołu jest to, że adresuje on większość potencjalnych źródeł błędnej interpretacji, niewiarygodności danych i artefaktów na wielu etapach: od przygotowania próbki i wyboru sondy, poprzez konfigurację ustawień sprzętu mikroskopowego i zbieranie obrazów, wzbudzanie lasera, aż do końcowego procesu analizy danych. Aby opracowane metodologie i techniki mogły być łatwo zastosowane przez szerokie grono potencjalnych użytkowników (badaczy), którzy mogą nie być wyspecjalizowani w dziedzinie sond fluorescencyjnych, opublikowałem je w formie obszernego protokołu w książce z serii *Neuromethods*.⁴⁷



Ryc. 13 A) Struktura odwracalnego sondy *InCCu1* i schemat jego odpowiedzi fluorescencyjnej w równowadze z Cu(I) . B) skwantyfikowana odpowiedź fluorescencyjna sondy *InCCu1* na ekspozycję komórek na miedź. Komórki były traktowane siarczanem miedzi przez noc ($100 \mu\text{M}$) lub niczym, a następnie *InCCu1* lub *InC* ($0,1 \mu\text{M}$, 15 min) przed obrazowaniem w mikroskopie konfokalnym. Średni stosunek fluorescencji obliczono ze stosunku intensywności kanału niebieskiego ($\lambda_{em} = 425\text{-}525 \text{ nm}$) do kanału czerwonego ($\lambda_{em} = 570\text{-}670 \text{ nm}$). Słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej dla pięciu pomiarów. C) histogram z eksperymentu cytometrii przepływowej na populacjach komórek zawierających *InCCu1* w różnych warunkach. Histogramy pokazują stosunek emisji czerwonej 585(15) do emisji niebieskiej 450(50), wzbudzenie przy 405 nm dla komórek DLD1 traktowanych *InCCu1* ($0,2 \mu\text{M}$, 15 min) po ekspozycji na *InCCu1* dla komórek wystawionych na działanie: kontroli czyli buforu fosforanowego PBS (ang. phosphate buffer saline) - kolor czarny, oraz siarczanu miedzi ($100 \mu\text{M}$, 2 h) - kolor czerwony, lub cisplatyny ($10 \mu\text{M}$, 16 h) a następnie PBS (2 h) - kolor zielony, lub cisplatyny ($10 \mu\text{M}$, 16 h), a następnie siarczanu miedzi ($100 \mu\text{M}$, 2 h) - kolor niebieski. Zaadoptowano z publikacji P4.

Aby zademonstrować praktyczną przydatność *InCCu1* wykorzystaliśmy tę sondę do zbadania wpływu cisplatyny na labilne zasoby miedzi w mitochondriach. Jak wspomniano w punkcie 4.C.3., cisplatyna i jej analogi są szeroko stosowanymi chemioterapeutykami w leczeniu nowotworów. Początkowo uważano, że działają one poprzez indukcję uszkodzeń DNA w szybko dzielących się komórkach nowotworowych, ale wykazano, że w niektórych przypadkach zaledwie 1% cisplatyny w komórkach gromadzi się w jądrze, a reszta jest zaangażowana w inne, w dużej mierze nieznanne

oddziaływania. Obserwacja ta może przyczynić się do zrozumienia niskiej selektywności chemioterapeutyków opartych na cisplatynie i przyczyn efektów ubocznych jej stosowania w praktyce klinicznej. Środowisko naukowe intensywnie pracuje nad zrozumieniem prawdziwego losu kompleksów opartych na platynie w komórkach i identyfikacji innych mechanizmów działania, co mogłoby pozwolić na opracowanie bardziej selektywnej, bezpiecznej i wydajnej generacji terapii przeciwnowotworowych.

W naszej pracy podjęliśmy się sprawdzenia hipotezy, że cisplatyna zakłóca transport i homeostazę jonów miedzi. Wcześniej wykazano, że cisplatyna oddziałuje z kilkoma białkami transportującymi miedź, ale jest to słabo poznane ze względu na brak odpowiednich narzędzi do monitorowania puli labilnych form jonów miedzi (LCP) w różnych obszarach komórki. Dzięki wykorzystaniu InCCu1 odkryliśmy, że mitochondrialna pula labilnych form jonów miedzi(I) w komórkach poddanych działaniu cisplatyny nie podlega zmianom przy ekspozycji komórek na miedź, podczas gdy w komórkach bez traktowania cisplatyną ekspozycja na miedź prowadzi do wzrostu LCP. Ponownie udało nam się uchwycić subtelne zaburzenia w stosunkach intensywności fluorescencji z istotnością statystyczną dzięki zastosowaniu unikatowego protokołu, który rozwinąłem i opisałem powyżej. Fakt, że cisplatyna upośledza import miedzi do mitochondriów, został dodatkowo potwierdzony za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem tej samej sondy, co zwiększa wiarygodność tego wniosku i pokazuje kompatybilność InCCu1 z różnymi technikami eksperymentalnymi. Jak wspomniano w podrozdziale 4.C.1, opracowanie protokołów stosowania sond poza mikroskopią jest ważne dla umożliwienia ich szerszego zastosowania w biologii.

Podsumowanie (publikacja P4)

Wykrywanie puli labilnych form jonów metali stanowi wyzwanie ze względu na dynamiczną kinetykę grup wiążących te jony i występujących natywnie w komórce. Dzięki naszej konstrukcji sondy, która zawiera konkurencyjny motyw wiążący miedź wraz z ratiometrycznym fluorescencyjnym reporterem, i opracowaniu protokołów oraz metod zbierania i analizy danych, byłem w stanie wykazać statystyczną istotność zmian w poziomach mitochondrialnej Cu(I) w komórkach poddanych działaniu leku i zastosować to do badania wpływu platynowych środków terapeutycznych na mitochondrialny wychwyty Cu(I).

4.C.3.2 Identyfikacja i zastosowanie wiarygodnych sond dla RONS

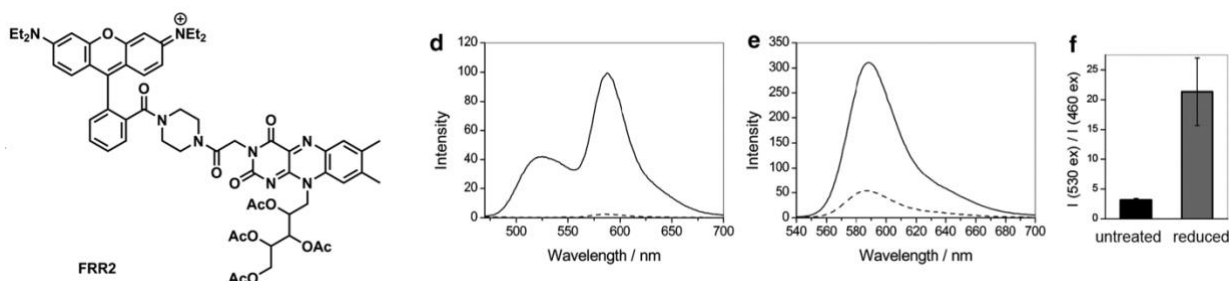
4.C.3.2.1 Rozszyfrowanie roli mitochondrialnego generowania RONS podczas infekcji RSV za pomocą narzędzi ratiometrycznych (publikacja P5)

Osiągnięcia w podrozdziale 4.C.3. i podrozdziale 4.C.1. łącznie opisują nowe, uniwersalne i wiarygodne protokoły, strategie projektowe i kryteria usprawniające rozwój i zastosowanie sond fluorescencyjnych do wykrywania reaktywnych form tlenu i azotu w żywych komórkach. W tym rozdziale zastosowałem tę wiedzę do wyboru odpowiednich narzędzi i zaprojektowania oraz analizy eksperymentu badania wpływu infekcji wirusowej RSV w komórkach ludzkich na generowanie stresu oksydacyjnego w mitochondriach komórek gospodarza przy użyciu unikalnie wiarygodnej sondy fluorescencyjnej wrażliwej na RONS dopasowanej do konkretnego problemu biologicznego.

Głównym celem tej pracy, przeprowadzonej we współpracy z prof. Davidem A Jansem z Monash University (Melbourne, Australia), było rzucenie światła na patogenezę syncytialnego wirusa oddechowego (RSV, ang. *respiratory syncytial virus*), która pozostawała w dużej mierze nieznana,

pomimo relatywnie wysokiej śmiertelności spowodowanej infekcjami RSV, większej niż w przypadku grypy. W ramach tej pracy nasi współpracownicy wykazali, że RSV indukuje redystrybucję mitochondriów w zakażonych komórkach poprzez mechanizm zależny od dyneiny/mikrotubuli oraz pokazali, że w zastosowanych modelach chorobowych RSV stopniowo zmniejsza maksymalną i związaną z ATP aktywność oddechową mitochondriów gospodarza, przy czym efekt ten wzrasta wraz z czasem trwania infekcji. Ponieważ potencjał błonowy mitochondriów jest zaburzony (obniżony) po zakażeniu RSV, dalsze badania nad generowaniem RONS w mitochondriach były trudne, gdyż większość dostępnych sond nie mogła być wiarygodnie wykorzystana w tym kontekście.

W oparciu o moje doświadczenie praktyczne i wiedzę literaturową (podsumowaną częściowo w osobnej pracy przeglądowej opublikowanej w innym miejscu⁴⁸), byłem w stanie zidentyfikować, zaproponować i zaplanować wykorzystanie mitochondrialnej sondy flawinowo-rodaminowej (FRR2)⁴⁹ wrażliwej na zmiany stanu redoks jako odpowiedniego i wiarygodnego narzędzia do tego zastosowania. Zmniejszenie potencjału mitochondrialnego komórek gospodarza wpływa na efektywność wejścia większości sond do mitochondrium a co za tym idzie wpływa w trudny do skwantyfikowania sposób na jego lokalne stężenie. FRR2 jest sondą odwracalną i wzbudzeniowo-ratiometryczną, co oznacza, że stosunek zmian intensywności emisji w kanale czerwonym (maksimum ok. 580 nm) przy wzbudzeniu światłem niebieskim (488 nm) vs zielonym (515 nm) (Ryc. 14) koreluje ze wzrostem poziomu RONS i jest niezależny od stężenia sondy. Ta kluczowa zaleta jest dodatkowo poparta obszerną walidacją sondy wobec szerokiego zakresu analitów, która wykazała, że nie mają na niego wpływu zmiany środowiskowe ani anality inne niż RONS, a także że może ona być kilkukrotnie odwracalnie utleniona i zredukowana bez znacznego wpływu na jego efektywność i wiarygodność działania⁴⁹. Parametry te, jak opisano w podrozdziale 4.C.1, spełniają większość kryteriów wiarygodnej sondy do zastosowań biologicznych.

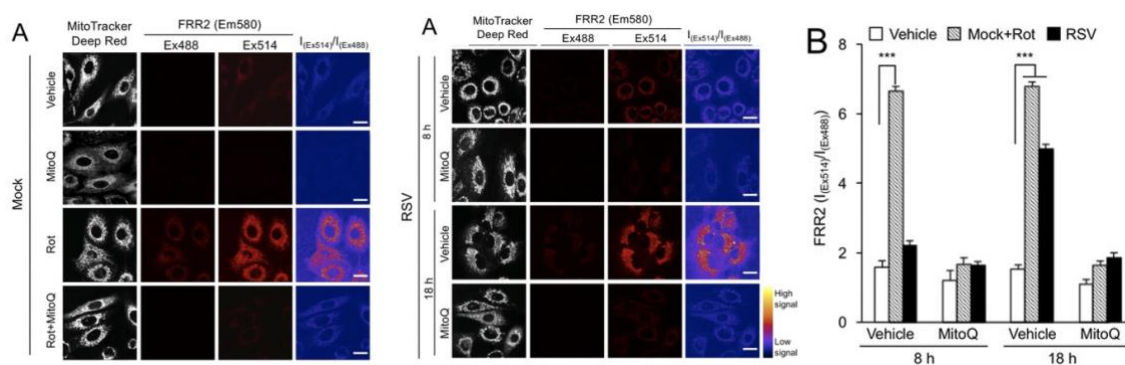


Ryc. 14 Po lewej: Struktura FRR2 (Flavin-rhodamine redox sensor 2). Po prawej: Odpowiedź fluorescencyjna **FRR2** na redukcję. Widma emisji fluorescencji **FRR2** (10 μM) w formie utlenionej (czarna linia) i zredukowanej (linia przerywana) po wzbudzeniu przy 460 nm (d) i 530 nm (e). Sonda została zredukowana przy użyciu 200 ekwiwalentów $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Stosunek emisji FRR2 (f) przy 580 nm po wzbudzeniu przy 530 versus 460 nm w formach utlenionych (czarna) i zredukowanych (szara). Wszystkie dane uzyskano w 100 mM buforze HEPES, pH 7,4. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 3). Zaadoptowano z Kaur et al 2016⁴⁹.

Po wybraniu sondy opracowałem protokół zbierania danych i analizy, wdrażając proces eksperymentalny zgodny z założeniami opisanymi w sekcji 4.C.1. W wyniku tych eksperymentów, możliwe było wygenerowanie obrazu stosunku intensywności fluorescencji przez indywidualne dzielenie pikseli zebranych obrazów przy dwóch długościach fali wzbudzającej. Segmentację ROI przeprowadzono na obrazie MitoTracker DeepRed stosując automatyczny algorytm segmentujący Otsu, a następnie usunięto regiony mniejsze niż 1000 pikseli (mniejsze niż spodziewany rozmiar

mitochondriów). Tak posegmentowane regiony zostały wyznaczone do ilościowej oceny proporcji sygnału fluorescencyjnego dla dwóch różnych długości fali wzbudzenia na obrazach.

Zastosowanie tej metodyki pozwoliło nam wykazać, że infekcja RSV zwiększa poziom ROS w mitochondriach komórki gospodarza już po 8 h i znacząco po 18 h oraz że odpowiedź ta jest podobna do odpowiedzi na ekspozycję komórek gospodarza na rotenon - induktor mitochondrialnego stresu oksydacyjnego (Ryc. 15). Co ciekawe, okazało się również, że dodanie MitoQ, który jest inhibitorem reorganizacji mikrotubul, zapobiega wzrostowi mitochondrialnego stresu oksydacyjnego indukowanego przez RSV (Ryc. 15B). Ta obserwacja, możliwa dzięki racjonalnemu doborowi odpowiedniej sondy fluorescencyjnej i wiarygodnemu protokołowi użycia tej sondy w modelu komórkowym, była krytyczna dla potwierdzenia głównej tezy manuskryptu, czyli faktu, że RSV wykorzystuje mitochondrialny stres oksydacyjny gospodarza do promocji infekcji. Wykazano również, że zabiegi blokujące generowanie ROS chronią przed infekcją RSV w modelowej linii komórkowej A549, jak również w komórkach nabłonka oskrzelowego pochodzących od pacjenta oraz *in vivo* w modelu mysim.



Ryc. 15 Komórki kontrolne A549 niezakażone (panel A po lewej) lub zakażone RSV (panel A po środku) przez 8 lub 18 h po iniekcji., traktowane zgodnie ze wskazaniami przez końcowe 2 h przed barwieniem mitochondrialnie specyficzną sondą RONS, FRR2 (czerwony kolor na obrazach; 2 μ M, 15 min przed obrazowaniem - emisja zebrana dla oddzielnych wzbudzeń przy 488 nm i 514 nm i stosunek emisji przy dwóch różnych wzbudzeniach obliczony - niebiesko-czerwone-żółte panele) i Mitotracker Deep Red (biały; 100 nM, 15 min): mitochondrialny inhibitor kompleksu I rotenon (Rot, 0.5 μ M), specyficzny dla mitochondriów zmiatacz ROS - mezytan mitochinonu (MitoQ, 1 μ M), NCZ (17 μ M) lub DMSO jako nośnik; w przypadku podwójnego dodania Rot/MitoQ (Rot + MitoQ), Rot dodano 4 h przed barwieniem. Wyniki przedstawiają średnią \pm SEM dla $n = 3$ niezależnych eksperymentów, gdzie w każdym eksperymencie analizowano 25-30 komórek na próbkę, *** $p < 0,001$. Zaadoptowano z **publikacji P5**.

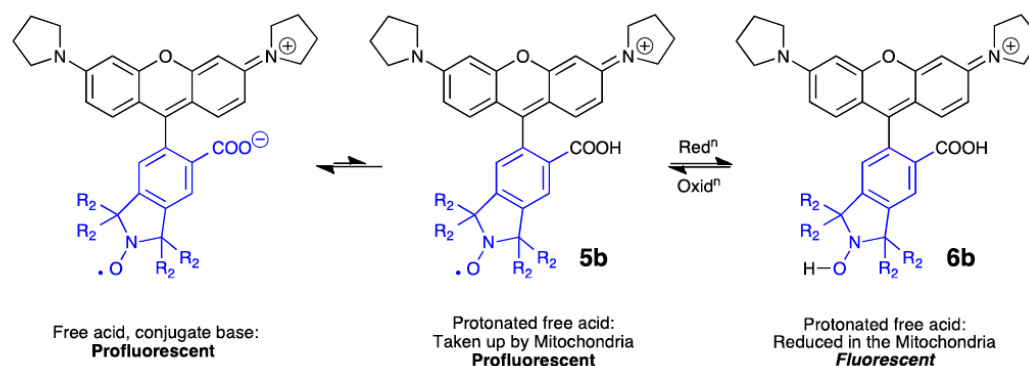
Podsumowanie (publikacja P5)

Opisane powyżej eksperymenty rzucają nowe światło na proces rozwoju infekcji RSV i otwierają drogę do nowych terapii przeciwko zakażeniu RSV. Wiarygodna obserwacja zmian w generacji mitochondrialnych ROS w tym modelu z zaburzonym potencjałem mitochondrialnym była bardzo trudna do osiągnięcia, ale odegrała kluczową rolę w sukcesie tej pracy. Zapewniłem to poprzez staranny wybór ratiometrycznego i dokładnie zwalidowanej sondy FRR2 spełniającej kryteria z rozdziału 4.C.1.1 oraz zastosowanie wiarygodnego ciągu eksperymentalnego i protokołu opisanego w rozdziale 4.C.1.3 zastosowania sond fluorescencyjnych w komórkach.

4.C.3.2.2 Poprawa wiarygodności wykrywania RONS za pomocą fluorescencyjnego obrazowania czasu życia fluorescencji przy użyciu sondy opartej na rodniku nitroksylowym (**publikacja P6**)

Czas życia fluorescencji to czas pomiędzy absorpcją kwantu energii a jego emisją. Jest to atrakcyjny parametr analityczny, ponieważ jest wrażliwy na środowisko emitera, ale jest niezależny od stężenia fluoroforu i nie zależy bezpośrednio od absorpcji/emisji. Czas życia fluorescencji jest coraz częściej wykorzystywany w mikroskopii obrazowania czasu życia fluorescencji (FLIM), która mierzy głównie fluorescencję endogenną, ponieważ liczba dedykowanych sond zwalidowanych i opracowanych dla tej techniki jest ograniczona.

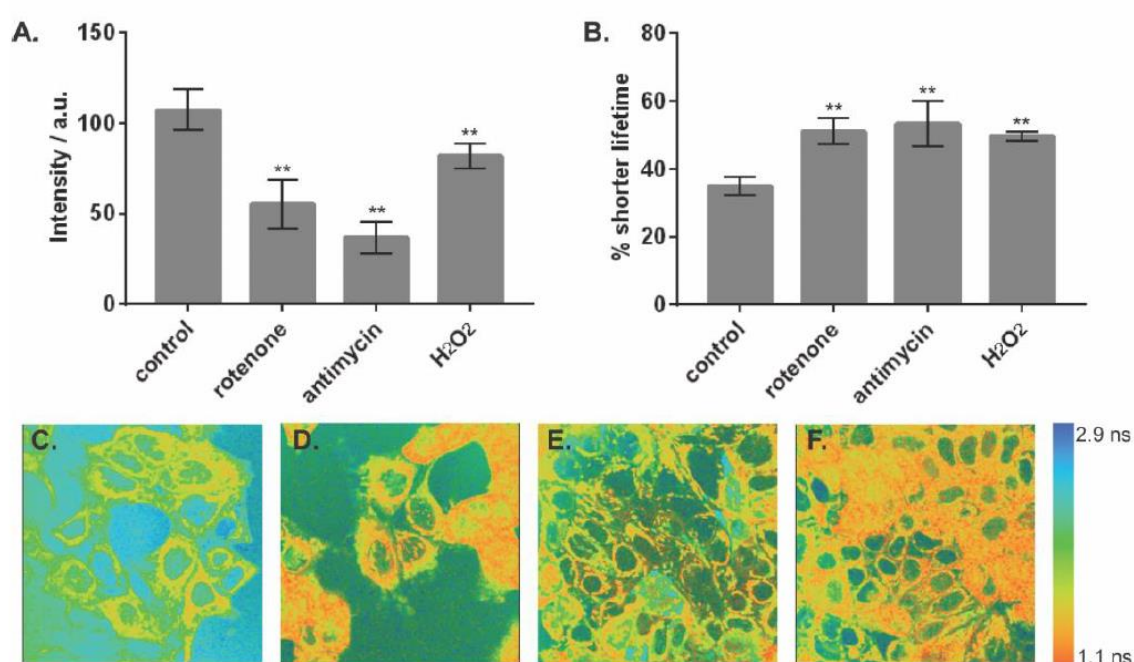
Jak omówiono w pkt 4.C.1, rodniki nitroksylowe są wrażliwymi na redoks grupami responsywnymi, wykorzystywanymi przy projektowaniu zarówno nieodwracalnych, jak i odwracalnych sond fluorescencyjnych na RONS. Ich reaktywność może być precyzyjnie dostrojona poprzez modyfikacje strukturalne tego niezwykle stabilnego rodnika organicznego i może służyć do opracowania sond czułych na specyficzne RONS. Jeden z przykładów został opracowany przez grupę prof. Steven'a Bottle'a z Queensland University of Technology poprzez racjonalne zaprojektowanie włączenia cząsteczki rodnika do struktury rodamininy (5b na Ryc. 16). Wykazano, że sonda lokalizuje się w mitochondriach, a jej zależna od intensywności odpowiedź fluorescencyjna na RONS została potwierdzona *in vitro*, jak również w unieśmiertnionych ludzkich fibroblastach hTERT poddanych działaniu rotenonu, który wywołuje zwiększony stres oksydacyjny w mitochondriach, co prowadziło do obniżenia intensywności fluorescencji. Jednak, jak w przypadku wszystkich sond opartych na intensywności, nie było jednoznaczne czy obserwowana zmiana była rzeczywiście spowodowana odpowiedzią redoks sondy, czy też zmianą jej stężenia.



Ryc. 16 Równowagi kwasowo-zasadowe i redukcjno-oksydacyjne sondy 5b obecnej w formie RCOOH (profluorescencyjnej, ciemnej). Zdeprotonowana i niefluorescencyjna forma sondy (lewa struktura) najbardziej prawdopodobna w cytoplazmie; protonowana forma sondy (środkowa struktura 5b) prawdopodobnie lokalizująca się w mitochondriach ze względu na obecność ładunku dodatniego w cząsteczce oraz zredukowana forma sondy, fluorescencyjna (prawa struktura, 6b) prawdopodobnie dominująca w mitochondriach. Zaadoptowano z **publikacji P6**.

Aby rozwiązać ten problem, zaproponowałem, zaprojektowałem i przeprowadziłem eksperymenty walidacyjne odpowiedzi sondy na zmiany redoks w komórkach przy użyciu FLIM. Oczekuje się, że czas życia fluorescencji emitera rodamininy wydłuży się w wyniku redukcji wygaszającego fluorescencję rodnika nitroksylowego do aminy hydroksylowej. Zmiana ta powinna być niezależna od stężenia sondy i korelować z obecnością lub brakiem rodnika działając jako wiarygodna reprezentacja stanu redoks środowiska. Eksperymenty mikroskopii konfokalnej na komórkach DLD-1 potraktowanych 5b spowodowały spadek fluorescencji po poddaniu ich działaniu H₂O₂, jak

również dwóch inhibitorów, rotenonu i antymycyny, zaburzających mitochondrialną równowagę redoks i prowadzących do stresu oksydacyjnego (Ryc. 17). Aby potwierdzić, że efekt ten jest rzeczywiście związany z wywołanym przez środowisko przesunięciem równowagi redoks sondy w kierunku rodnika nitroksylogo, a nie tylko lokalną zmianą stężenia sondy, przeprowadziłem eksperyment FLIM w tych samych warunkach. Dane dotyczące czasu życia fluorescencji dopasowane do rozkładu dwueksponencjalnego dały dwie składowe czasu życia 1,3 ns i 2,9 ns, odpowiadające odpowiednio pro-fluorescencyjnej formie rodnikowej 5b i fluorescencyjnej formie hydroksyloaminowej 6b (Ryc. 16). Komórki poddane działaniu warunków utleniających wykazywały obniżony średni czas życia fluorescencji, odpowiadający zwiększonemu występowaniu krótszej składowej czasu życia przypisanej rodnikowej, utlenionej formie 5b (Ryc. 17B-F). Potwierdza to wrażliwość sondy na środowisko redoks komórki i zapewnia bardziej wiarygodny sposób jej monitorowania w modelach biologicznych.



Ryc. 17 Mikroskopia obrazowania czasu życia fluorescencji umożliwia ratiometryczny pomiar proporcji pro-fluorescencyjnych rodników i form nierodnikowych. Komórki DLD-1 traktowane **5b** (100 nM, 15 min), a następnie kontrolą, rotenon (10 μ M, 15 min), antymycyna (10 μ M, 15 min) lub H₂O₂ (50 μ M, 15 min). Panel **A**. Intensywności fluorescencji z obrazów komórek w mikroskopie konfokalnym, wzbudzenie 488 nm, emisja 550-650 nm. Panel **B**. procent krótszego (1,3 ns) czasu życia z obrazowania czasu życia fluorescencji, wzbudzenie dwufotonowe 820 nm, emisja 550-650 nm. Panele **C-F**. Obrazy czasu życia fluorescencji pokazujące średnie czasy życia dla **C**: kontrola, **D**: rotenon, **E**: antymycyna i **F**: H₂O₂ n=3, dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. Zaadoptowano z publikacji P6.

Podsumowanie (publikacja P6)

Eksperymenty te potwierdziły, że 5b może być użyty jako wiarygodny sonda fluorescencyjny do monitorowania zmian stanu redoks mitochondriów poprzez monitorowanie zmian czasów życia fluorescencji sondy. Pokazałem również, jak stosując protokoły FLIM można wyeliminować niejednoznaczność w interpretacji odpowiedzi sond opartych na intensywności, co czyni to podejście możliwym do zastosowania w szerokim zakresie narzędzi responsywnych.

4.C.3.3 Podsumowanie (publikacje P3 – P6)

Opracowałem i zastosowałem protokoły do bardziej niezawodnej detekcji analitów w złożonych modelach komórkowych z wykorzystaniem sygnału niezależnego od stężenia sondy, eliminując jedną z największych wad większości narzędzi fluorescencyjnych.

Aby poprawić narzędzia fluorescencyjne do badań biologicznych analitów bionieorganicznych, opracowałem dwa sondy ratiometryczne dla labilnych form jonów metali (Fe(II), Cu(I)) o zwiększonej niezawodności wykrywania analitów w złożonych modelach biologicznych (sferoidy 3D guza i subtelne zmiany w mitochondriach). Narzędzia te mogłem zastosować do badania wielu zagadnień biologicznych związanych z fizjologią, progresją i leczeniem nowotworów.

Następnie, w kontekście wykrywania RONS, pracowałem nad wyborem odpowiednich narzędzi i uniwersalnych protokołów wykorzystania sond i analizy danych, aby wiarygodnie badać RONS w komórkach. W szczególności, kierując procesem racjonalnego wyboru sond i projektowania eksperymentów z ich użyciem, byłem w stanie wykorzystać te narzędzia do sprostania wyzwaniom związanym z pomiarem stresu oksydacyjnego w mitochondriach dotkniętych infekcją wirusową (ze względu na wynikającą z tego zmianę potencjału redoks i wpływ na akumulację sond). Ponadto zademonstrowałem skuteczność wykorzystania obrazowania czasu życia fluorescencji jako obiecującej metody wiarygodnego pomiaru stresu oksydacyjnego za pomocą narzędzi opartych na intensywności fluorescencji.

4.C.4 Wprowadzenie i postępy w projektowaniu sond dwuanalitowych do zastosowań biologicznych

Osiągnięcia opisane w pkt 4.C.1-4.C.3 koncentrują się na niezawodności i rozwoju sond wykrywających pojedyncze cele molekularne. Wiadomo jednak, że funkcje tych analitów (RONS i różnych form jonów metali) zmieniają się w zależności od ich biologicznego kontekstu i otoczenia. Na przykład H_2O_2 jest stosunkowo stabilną cząsteczką, która może istnieć w cytoplazmie przez długi czas, ale w obecności żelaza(II) lub miedzi(I) może ulec przemianie w reakcji Fentona w krótkotrwały i bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Na tę reakcję ma wpływ lepkość i pH, które jak się szacuje może zmieniać się w komórkach w zakresie od 4,5 do 9. Ponadto, podwyższone poziomy RONS, Cu(I) i żelaza(II) zostały powiązane z początkiem neurodegeneracji i raka, co z kolei czyni je potencjalnie obiecującymi celami molekularnymi programów terapeutycznych (opartych na antyoksydantach i chelatowaniu metali).^{44,50-55} Z tego względu możliwość jednoczesnego pomiaru wielu parametrów z rozdzielczością przestrzenną i czasową zapewniłaby naukowcom sposób na odkrycie biologicznego znaczenia ich interakcji ze sobą i środowiskiem. W tym celu postawiłem sobie za cel otwarcie nowego kierunku wykorzystania obrazowania biologicznego poprzez usystematyzowanie i przygotowanie podstaw teoretycznych do rozwoju badań nad i z wykorzystaniem sond wieloanalitowych.

W szeroko cytowanej (wyróżnienie *Highly Cited Paper* w serwisie *Web of Science*) pracy omówionej poniżej (**publikacja P9**) wprowadziłem pierwsze systematyczne podstawy do rozwoju, walidacji i wykorzystania dwuanalitowych sond fluorescencyjnych w modelach biologicznych. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych sond, które wykrywają obecność tylko pojedynczych analitów, sondy dwuanalitowe generują odrębny sygnał w przypadku jednoczesnej obecności dwóch analitów. Zdolność do wykrywania obu celów za pomocą jednej sondy dostarcza zdecydowanie więcej informacji o względnej relacji między analitami poprzez korelację obecności

sygnału z bliskością obu analitów i usunięciem problemów wywołanych zmiennymi lokalizacją, stężeniami i stabilnością metaboliczną dwóch różnych sond jednoanalitowych.

Koncepcja sondy wieloanalitowej wywodzi się z dziedziny molekularnych bramek logicznych. Znanych jest wiele związków działających na zasadzie bramek logicznych, ale tylko garstka odosobnionych przykładów została przetestowana i wykorzystana w biologii, wciąż jednak bez szerszego zastosowania w badaniach komórkowych. W tej pracy podsumowałem nieliczne udane przykłady tych sond i co najważniejsze, sformułowałem też dodatkowe, specyficzne dla sond wieloanalitowych wymagania, w tym opisałem optymalne typy odpowiedzi sondy na kilka analitów, konieczne do zapewnienia wiarygodności ich działania w biologii. Te wymagania muszą być spełnione w dodatku do wszystkich innych kryteriów idealnych sond fluorescencyjnych omówionych w rozdziale 4.C.1 (w tym biokompatybilność, stabilność i operatywność w warunkach wodnych - coś, z czym większość istniejących molekularnych bramek logicznych nie jest kompatybilna). Sformułowane przeze mnie kluczowe aspekty działania sond dwuanalitowych i ich znaczenie przedstawione są poniżej:

1. Rodzaj bramki logicznej, która zapewnia niezawodną specyficzność reakcji

Współwystępowanie obu analitów musi być odróżnialne od ich braku lub obecności jednego z nich, dlatego sondy te muszą spełniać kryteria bramki logicznej typu "AND" (sygnał generowany w obecności obu analitów różni się od wszystkich innych sytuacji - jest specyficzny, Ryc. 18A). Chociaż można również zastosować ujemną bramkę logiczną AND (NAND), nie jest ona optymalna, ponieważ opiera się na utracie sygnału w obecności analitu (typu turn off) czego nie można wiarygodnie odróżnić od braku sondy.

2. Od specyficzności do selektywności

W ramach odpowiedzi typu "AND" pojawiają się trzy różne sytuacje (Ryc. 18B). We wszystkich trzech, sygnał wynikający z jednoczesnego wiązania obu analitów jest zawsze odrębny od pozostałych (specyficzny). Jednak wariant (iii) pozwala nie tylko na specyficzne wykrywanie jednoczesnej obecności dwóch analitów, ale także na selektywne wykrywanie każdej z 4 kombinacji (brak, analit A, analit B lub oba anality) poprzez generowanie innego sygnału w każdym przypadku.

A	OR	AND	XOR	INH	NOR	NAND	XNOR
No analyte							
Analyte A							
Analyte B							
Analytes A + B							

B	i	ii	iii
No analyte			
Analyte A			
Analyte B			
Analytes A + B			

Ryc. 18 Tablice prawdy A) dla dwu wejściowych bramek logicznych, pokazujące kombinację wejść (analitów A i B), dla których występuje mierzalna odpowiedź na wyjściu. XOR = wyłączne OR, INH = hamowanie, NAND = ujemne AND, XNOR = wyłączne NOR; B) dla czujników, w których można odróżnić odpowiedź na analit A + B od obecności braku analitu, lub tylko analitu A lub tylko analitu B. Zaadoptowano z **publikacji P9**.

3. Dla niezawodności wymagana jest odpowiedź ratiometryczna

Podobnie jak w przypadku sond jednoanalitowych, jeżeli odpowiedź sondy dwuanalitowej opiera się wyłącznie na zmianie intensywności fluorescencji, występuje ten sam problem, w którym wysokie stężenie sondy jest nieodróżnialne od odpowiedzi pozytywnej. Z tego powodu, aby zapewnić prawdziwe i wiarygodne wykrywanie, odpowiedź ratiometryczna w obecności dwóch analitów jest jeszcze ważniejsza niż w przypadku sond jednoanalitowych.

4. Odwracalność i kolejność interakcji

Aby wykryć dwa anality, muszą wystąpić dwa zdarzenia rozpoznawcze (jedno dla analitu A i jedno dla analitu B). Każde z nich może mieć charakter odwracalny lub nieodwracalny, co prowadzi do trzech możliwych kombinacji: oba odwracalne, oba nieodwracalne i jedno odwracalne jedno nieodwracalne. Ponadto, każdy motyw rozpoznawczy (reaktywny) i każde zdarzenie rozpoznawcze może zachodzić niezależnie lub sekwencyjnie (np. reakcja z analitem A umożliwia reakcję z analitem B). Taka konstrukcja otwiera możliwość badania sekwencji pojawiania się analitów w biologii, co jest nieosiągalne dla dostępnych narzędzi.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe, możliwe jest wiele permutacji konstrukcji tych sond, z których każda nadaje się do różnych rodzajów badań biologicznych.

Podsumowanie (publikacja P9)

W **publikacji P9** sformułowałem krytyczne podstawy teoretyczne, które uporządkowały i napędziły rozwój badań i projektowanie sond fluorescencyjnych opartych na detekcji dwóch analitów. Dzięki możliwości uzyskania nowego wymiaru informacji dzięki sondom dwuanalitowym, mają one olbrzymi potencjał do pogłębienia i zmiany naszego rozumienia funkcji bionieorganicznych i innych analitów w biologii. Przeprowadziłem także koncepcyjną dyskusję i udowodniłem, dlaczego sondy dwuanalitowe muszą wykazywać specyficzną odpowiedź typu AND w obecności dwóch analitów jednocześnie oraz być kompatybilne (specyficzne, stabilne, przechodzące przez błony komórkowe i nietoksyczne) ze środowiskiem biologicznym. Po opublikowaniu naszej pracy, liczba doniesień o takich narzędziach gwałtownie wzrosła, a dziesiątki nowych sond dwuanalitowych z zademonstrowanym zastosowaniem w biologii zostały opublikowane od tego czasu. W ciągu ostatnich czterech lat praca ta konsekwentnie utrzymywała prestiżowe oznaczenie "Highly cited paper" w bazie Web of Science z ponad 200 cytowaniami, co jeszcze bardziej pokazuje znaczenie i wpływ tej pracy na środowisko naukowe w dziedzinie sond fluorescencyjnych.

4.C.5 Bibliografia

- (1) New, E. J. Harnessing the Potential of Small Molecule Intracellular Fluorescent Sensors. *ACS Sensors* **2016**, *1* (4), 328-333. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00148>.
- (2) Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J. A.; Dennerly, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts, L. J.; Ischiropoulos, H. Measuring Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Fluorescent Probes: Challenges and Limitations. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *52* (1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- (3) Wardman, P. Methods to Measure the Reactivity of Peroxynitrite-Derived Oxidants Toward Reduced Fluoresceins and Rhodamines. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2008; Vol. 441, pp 261-282. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01214-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01214-7).

- (4) Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. Hydroethidine- and MitoSOX-Derived Red Fluorescence Is Not a Reliable Indicator of Intracellular Superoxide Formation: Another Inconvenient Truth. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *48* (8), 983-1001. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028>.
- (5) Likhtenstein, G. I.; Ishii, K.; Nakatsuji, S. Dual Chromophore-Nitroxides: Novel Molecular Probes, Photochemical and Photophysical Models and Magnetic Materials: *Photochemistry and Photobiology*, 2007, 83. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, *83* (4), 871-881. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00141.x>.
- (6) Kuivila, H. G.; Armour, A. G. Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid¹⁻³. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (21), 5659-5662. <https://doi.org/10.1021/ja01578a020>.
- (7) Lippert, A. R.; Van de Bittner, G. C.; Chang, C. J. Boronate Oxidation as a Bioorthogonal Reaction Approach for Studying the Chemistry of Hydrogen Peroxide in Living Systems. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 793-804. <https://doi.org/10.1021/ar200126t>.
- (8) Liu, F.; Gao, Y.; Wang, J.; Sun, S. Reversible and Selective Luminescent Determination of ClO⁻/H₂S Redox Cycle in Vitro and in Vivo Based on a Ruthenium Trisbipyridyl Probe. *Analitka* **2014**, *139* (13), 3324-3329. <https://doi.org/10.1039/C4AN00331D>.
- (9) Zielonka, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Joseph, J.; Dranka, B. P.; Kalyanaraman, B. Boronate Probes as Diagnostic Tools for Real Time Monitoring of Peroxynitrite and Hydroperoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (9), 1793-1799. <https://doi.org/10.1021/tx300164j>.
- (10) Kenmoku, S.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. Development of a Highly Specific Rhodamine-Based Fluorescence Probe for Hypochlorous Acid and Its Application to Real-Time Imaging of Phagocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (23), 7313-7318. <https://doi.org/10.1021/ja068740g>.
- (11) Chen, X.; Wang, X.; Wang, S.; Shi, W.; Wang, K.; Ma, H. A Highly Selective and Sensitive Fluorescence Probe for the Hypochlorite Anion. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (15), 4719-4724. <https://doi.org/10.1002/chem.200701677>.
- (12) Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluorescein. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (13), 2446-2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>.
- (13) Ueno, T.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. Mechanism-Based Molecular Design of Highly Selective Fluorescence Probes for Nitritative Stress. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (33), 10640-10641. <https://doi.org/10.1021/ja061972v>.
- (14) Yang, Y.; Seidlits, S. K.; Adams, M. M.; Lynch, V. M.; Schmidt, C. E.; Anslyn, E. V.; Shear, J. B. A Highly Selective Low-Background Fluorescent Imaging Agent for Nitric Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (38), 13114-13116. <https://doi.org/10.1021/ja1040013>.
- (15) Franz, K. J.; Singh, N.; Lippard, S. J. Metal-Based NO Sensing by Selective Ligand Dissociation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (12), 2120-2122. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000616\)39:12<2120::POMOC-ANIE2120>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000616)39:12<2120::POMOC-ANIE2120>3.0.CO;2-M).
- (16) Lim, M. H.; Wong, B. A.; Pitcock, W. H.; Mokshagundam, D.; Baik, M.-H.; Lippard, S. J. Direct Nitric Oxide Detection in Aqueous Solution by Copper(II) Fluorescein Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (44), 14364-14373. <https://doi.org/10.1021/ja064955e>.
- (17) Hasserodt, J.; Kolanowski, J. L.; Touti, F. Magnetogenesis in Water Induced by a Chemical Analyte. *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, *53* (1), 60-73. <https://doi.org/10.1002/anie.201305662>.
- (18) Aron, A. T.; Ramos-Torres, K. M.; Cotruvo, J. A.; Chang, C. J. Recognition- and Reactivity-Based Fluorescent Probes for Studying Transition Metal Signaling in Living Systems. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48* (8), 2434-2442. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00221>.

- (19) Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (8), 4564-4601. <https://doi.org/10.1021/cr400546e>.
- (20) Dean, K. M.; Qin, Y.; Palmer, A. E. Visualizing Metal Ions in Cells: An Overview of Analytical Techniques, Approaches, and Probes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **2012**, *1823* (9), 1406-1415. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.001>.
- (21) Rakshit, A.; Khatua, K.; Shanbhag, V.; Comba, P.; Datta, A. Cu²⁺ Selective Chelators Relieve Copper-Induced Oxidative Stress *in Vivo*. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (41), 7916-7930. <https://doi.org/10.1039/C8SC04041A>.
- (22) Miller, E. W.; Tulyathan, O.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. Molecular Imaging of Hydrogen Peroxide Produced for Cell Signaling. *Nat Chem Biol* **2007**, *3* (5), 263-267. <https://doi.org/10.1038/nchembio871>.
- (23) Kaur, A.; Brigden, K. W. L.; Cashman, T. F.; Fraser, S. T.; New, E. J. Mitochondrially Targeted Redox Probe Reveals the Variations in Oxidative Capacity of the Haematopoietic Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (24), 6686-6689. <https://doi.org/10.1039/C5OB00928F>.
- (24) Kaur, A.; Haghghatbin, M. A.; Hogan, C. F.; New, E. J. A FRET-Based Ratiometric Redox Probe for Detecting Oxidative Stress by Confocal Microscopy, FLIM and Flow Cytometry. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51* (52), 10510-10513. <https://doi.org/10.1039/c5cc03394b>.
- (25) Takahashi, S.; Piao, W.; Matsumura, Y.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Kamachi, T.; Kohno, M.; Nagano, T.; Hanaoka, K. Reversible Off-on Fluorescence Probe for Hypoxia and Imaging of Hypoxia-Normoxia Cycles in Live Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (48), 19588-19591. <https://doi.org/10.1021/ja310049d>.
- (26) Yeow, J.; Kaur, A.; Anscumb, M. D.; New, E. J. A Novel Flavin Derivative Reveals the Impact of Glucose on Oxidative Stress in Adipocytes. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (60), 8181-8184. <https://doi.org/10.1039/C4CC03464C>.
- (27) Gouille, V.; Harriman, A.; Lehn, J.-M. An Electro-Photoswitch: Redox Switching of the Luminescence of a Bipyridine Metal Complex. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, No. 12, 1034. <https://doi.org/10.1039/c39930001034>.
- (28) Morrow, B. J.; Keddie, D. J.; Gueven, N.; Lavin, M. F.; Bottle, S. E. A Novel Profluorescent Nitroxide as a Sensitive Probe for the Cellular Redox Environment. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49* (1), 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.019>.
- (29) Lee, K.; Dzubeck, V.; Latshaw, L.; Schneider, J. P. De Novo Designed Peptidic Redox Potential Probe: Linking Sensitized Emission to Disulfide Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (42), 13616-13617. <https://doi.org/10.1021/ja047300r>.
- (30) Ostrander, J. H.; McMahon, C. M.; Lem, S.; Millon, S. R.; Brown, J. Q.; Seewaldt, V. L.; Ramanujam, N. Optical Redox Ratio Differentiates Breast Cancer Cell Lines Based on Estrogen Receptor Status. *Cancer Research* **2010**, *70* (11), 4759-4766. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2572>.
- (31) Blacker, T. S.; Duchen, M. R. Investigating Mitochondrial Redox State Using NADH and NADPH Autofluorescence. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *100*, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010>.
- (32) Wallrabe, H.; Svindrych, Z.; Alam, S. R.; Siller, K. H.; Wang, T.; Kashatus, D.; Hu, S.; Periasamy, A. Segmented Cell Analyses to Measure Redox States of Autofluorescent NAD(P)H, FAD & Trp in Cancer Cells by FLIM. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 79. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18634-x>.
- (33) Penjweini, R.; Roarke, B.; Alspaugh, G.; Gevorgyan, A.; Andreoni, A.; Pasut, A.; Sackett, D. L.; Knutson, J. R. Single Cell-Based Fluorescence Lifetime Imaging of Intracellular Oxygenation and Metabolism. *Redox Biology* **2020**, *34*, 101549. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101549>.
- (34) De Ruyck, J.; Famerée, M.; Wouters, J.; Perpète, E. A.; Preat, J.; Jacquemin, D. Towards the Understanding of the Absorption Spectra of NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a Common Indicator of Dehydrogenase

Enzymatic Activity. *Chemical Physics Letters* **2007**, *450* (1-3), 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.10.092>.

(35) Blacker, T. S.; Mann, Z. F.; Gale, J. E.; Ziegler, M.; Bain, A. J.; Szabadkai, G.; Duchen, M. R. Separating NADH and NADPH Fluorescence in Live Cells and Tissues Using FLIM. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 3936. <https://doi.org/10.1038/ncomms4936>.

(36) Montagner, D.; Yap, S. Q.; Ang, W. H. A Fluorescent Probe for Investigating the Activation of Anticancer Platinum(IV) Prodrugs Based on the Cisplatin Scaffold. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (45), 11785-11789. <https://doi.org/10.1002/anie.201305734>.

(37) Shen, C.; Harris, B. D. W.; Dawson, L. J.; Charles, K. A.; Hambley, T. W.; New, E. J. Fluorescent Sensing of Monofunctional Platinum Species. *Chemical Communications* **2015**, *51* (29), 1-3. <https://doi.org/10.1039/C4CC08077G>.

(38) Ong, J. X.; Lim, C. S. Q.; Le, H. V.; Ang, W. H. A Ratiometric Fluorescent Probe for Cisplatin: Investigating the Intracellular Reduction of Platinum(IV) Prodrug Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (1), 164-167. <https://doi.org/10.1002/anie.201810361>.

(39) Ong, J. X.; Le, H. V.; Lee, V. E. Y.; Ang, W. H. A Cisplatin-Selective Fluorescent Probe for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Platinum Accumulation in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (17), 9264-9269. <https://doi.org/10.1002/anie.202010951>.

(40) James, S. A.; Roberts, B. R.; Hare, D. J.; de Jonge, M. D.; Birchall, I. E.; Jenkins, N. L.; Cherny, R. A.; Bush, A. I.; McColl, G. Direct in Vivo Imaging of Ferrous Iron Dyshomeostasis in Ageing Caenorhabditis Elegans. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (5), 2952-2962. <https://doi.org/10.1039/C5SC00233H>.

(41) Wessling-Resnick, M. Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annu. Rev. Nutr.* **2010**, *30* (1), 105-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104804>.

(42) von Haehling, S.; Jankowska, E. A.; van Veldhuisen, D. J.; Ponikowski, P.; Anker, S. D. Iron Deficiency and Cardiovascular Disease. *Nat Rev Cardiol* **2015**, *12* (11), 659-669. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.109>.

(43) Manz, D. H.; Blanchette, N. L.; Paul, B. T.; Torti, F. M.; Torti, S. V. Iron and Cancer: Recent Insights: Iron and Cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2016**, *1368* (1), 149-161. <https://doi.org/10.1111/nyas.13008>.

(44) Torti, S. V.; Torti, F. M. Iron and Cancer: More Ore to Be Mined. *Nature Reviews Cancer* **2013**, *13* (5), 342-355. <https://doi.org/10.1038/nrc3495>.

(45) Coraça-Huber, D. C.; Dichtl, S.; Steixner, S.; Nogler, M.; Weiss, G. Iron Chelation Destabilizes Bacterial Biofilms and Potentiates the Antimicrobial Activity of Antibiotics against Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens and Disease* **2018**, *76* (5). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty052>.

(46) Thompson, M. G.; Corey, B. W.; Si, Y.; Craft, D. W.; Zurawski, D. V. Antibacterial Activities of Iron Chelators against Common Nosocomial Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56* (10), 5419-5421. <https://doi.org/10.1128/AAC.01197-12>.

(47) Kolanowski, J. L.; Shen, C.; New, E. J. Fluorescent Probes for the Analysis of Labile Metals in Brain Cells. In *Neuromethods*; 2017; Vol. 124, pp 51-70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6918-0_4.

(48) Yang, K.; Kolanowski, J. L.; New, E. J. Mitochondrially Targeted Fluorescent Redox Sensors. *Interface Focus* **2017**, *7* (2), 20160105. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0105>.

(49) Kaur, A.; Jankowska, K.; Pilgrim, C.; Fraser, S. T.; New, E. J. Studies of Hematopoietic Cell Differentiation with a Ratiometric and Reversible Sensor of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling* **2016**, *24* (13), 667-679. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6495>.

(50) Liu, J.; Wang, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/294303>.

- (51) Wang, J.; Yi, J. Cancer Cell Killing via ROS: To Increase or Decrease, That Is a Question. *Cancer Biology and Therapy* **2008**, 7 (12), 1875-1884. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7067>.
- (52) Wondrak, G. T. Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities. *Antioxidants & redox signaling* **2009**, 11 (12), 3013-3069. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2541>.
- (53) Bedford, M. R.; Ford, S. J.; Horniblow, R. D.; Iqbal, T. H.; Tselepis, C. Iron Chelation in the Treatment of Cancer: A New Role for Deferasirox? *Journal of Clinical Pharmacology* **2013**, 53 (9), 885-891. <https://doi.org/10.1002/jcph.113>.
- (54) Lane, D. J. R.; Mills, T. M.; Shafie, N. H.; Merlot, A. M.; Moussa, R. S.; Kalinowski, D. S.; Kovacevic, Z.; Richardson, D. R. Expanding Horizons in Iron Chelation and the Treatment of Cancer: Role of Iron in the Regulation of ER Stress and the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2014**, 1845 (2), 166-181. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.005>.
- (55) Zhang, C.; Zhang, F. Iron Homeostasis and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Protein & Cell* **2015**, 6 (2), 88-100. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0119-z>.

4.D Podsumowanie najważniejszych osiągnięć kandydata w przedstawionych publikacjach

Moja skumulowana wiedza i doświadczenie badawcze pozwoliły mi wnieść znaczący wkład w formie:

- Oryginalnych badań i ustaleń teoretycznych wspierających projektowanie i walidację sond fluorescencyjnych nowej generacji,
- Aktywnego rozwoju i zastosowania sond fluorescencyjnych w celu uzyskania odpowiedzi na trudne pytania biologiczne w modelach komórkowych, oraz
- Uporządkowania i nadania kierunku oraz dynamiki rozwoju nowemu obszarowi badań dotyczącego sond dwuanalitowych,

które łącznie wywarły znaczący wpływ na dziedzinę obrazowania molekularnego z wykorzystaniem narzędzi opartych na fluorescencji do badania analitów bionieorganicznych oraz poprawiły wiarygodność wyników otrzymywanych przez ich stosowanie. Kluczowe osiągnięcia obejmują:

- **Dostarczenie nowych kryteriów projektowania i metodologii w celu poprawy wiarygodności generowania, walidacji i wykorzystania sond fluorescencyjnych do badania bionieorganicznych analitów w komórkach.**
 - Określenie nowych oryginalnych zależności pomiędzy strukturą a selektywnością/odwracalnością odpowiedzi sond fluorescencyjnych na anality bionieorganiczne
 - Określenie kryteriów idealnej sondy fluorescencyjnej do zastosowań biologicznych oraz przedstawienie wymaganych protokołów walidacji w celu zapewnienia niezawodności wykrywania.
 - Usystematyzowanie i rozwinięcie koncepcji dwuanalitowych sond fluorescencyjnych do zastosowań biologicznych w żywych komórkach jako narzędzi zwiększających wiarygodność badania zależności między różnymi parametrami
- **Rozwój i walidacja niezawodnych i praktycznych narzędzi fluorescencyjnych (sond, testów i protokołów) do badania analitów bionieorganicznych**

- Opracowanie uniwersalnego protokołu dla zastosowania sond fluorescencyjnych do wykrywania analitów bionieorganicznych w komórkach
- Opracowanie specyficznej sondy do wykrywania trans-arylowych kompleksów platyny(II) o potencjale terapeutycznym i związanej z nią wiarygodnej metody oceny ich stabilności metabolicznej w warunkach in vitro
- Opracowanie ratiometrycznej wersji sondy Calcein-AM, FICFe1 do bardziej wiarygodnego wykrywania labilnych form jonów żelaza(II) oraz powiązanego z nią testu do badania skuteczności terapii chelatującej żelazo w guzach litych
- Opracowanie pierwszej ratiometrycznej sondy do monitorowania labilnych form jonów miedzi(I) w organellach (mitochondria)
- Wykorzystanie obrazowania czasu życia fluorescencji do bardziej wiarygodnej (niezależnej od stężenia sondy) detekcji RONS w komórkach z zastosowaniem sond opartych na intensywności.
- Zastosowanie sondy i protokołu do niezawodnego wykrywania RONS w mitochondriach niezależnie od potencjału błonowego
- **Głębsze poznanie procesów biologicznych związanych z analitami bionieorganicznymi poprzez zastosowanie tych narzędzi**
 - Wykazanie, że glutation może sekwestrować kompleksy transplatyny i że ich stabilność wobec glutationu może korelować z ich aktywnością komórkową
 - Odkrycie istnienia obszaru podwyższonego stężenia labilnych form jonów żelaza(II) w trójwymiarowych modelach guzów litych (sferoidach)
 - Wykazanie istotnej różnicy pomiędzy klinicznie zatwierdzonymi chelatorami w skuteczności chelatowania żelaza w modelach guzów litych (sferoidy)
 - Ujawnienie inhibicji przez cisplatynę wychwyty miedzi do mitochondriów
 - Wykazanie, że rodniki nitroksylowe mogą odwracalnie informować o statusie redoks komórek w mitochondriach
 - Udowodnienie, że oddechowy wirus syncytialny wykorzystuje zmiany w generowaniu RONS w mitochondriach do promowania infekcji
- **Usystematyzowanie i stworzenie podstaw rozwoju nowego obszaru badawczego obejmującego wykorzystanie sond dwuanalitowych w biologii**
 - Opisanie kluczowych założeń, wyzwania, kierunków rozwoju i możliwości jakie dają sondy dwuanalitowe w badaniu środowiska biologicznego i zwrócenie uwagi na tego typu narzędzia w kontekście biologicznych (ponad 200 cytowań w ciągu 4 lat, niezmiennie wyróżnienie „Highly cited paper” bazy danych Web of Science)
 - Zainspirowanie dziesiątek grup badawczych z całego świata pracą w tym obszarze, co doprowadziło do powstania kilkudziesięciu przykładów narzędzi tego typu (>5-krotny wzrost ilości biologicznie kompatybilnych sond dwuanalitowych od momentu opublikowania mojej pracy)

4.E Omówienie możliwych zastosowań osiągniętych wyników

Przedstawione powyżej wyniki świadczą o znaczącym wkładzie w projektowanie, rozwój i wykorzystanie bardziej wiarygodnych sond fluorescencyjnych w badaniu analitów bionieorganicznych w modelach biologicznych.

- Dla biologów chemicznych wyniki dostarczają nowych strategii i ścieżek do projektowania nowych sond fluorescencyjnych o niespotykanej dotąd niezawodności, a także protokołów i

sposobów ich walidacji i umożliwienia ich skutecznego zastosowania w odpowiedzi na pytania biologiczne.

- Opracowanie nowych protokołów może pomóc dużej liczbie badaczy biomedycznych w niezawodnym stosowaniu komercyjnych, jak również nowo opublikowanych sond, dzięki czemu ich wyniki będą bardziej wiarygodne i dokładne.
- Zrozumienie choroby - opracowane sondy, jak również ich przyszłe generacje mogą pomóc w fundamentalnym zrozumieniu procesów patofizjologicznych, które, jak się okazuje, są kontrolowane lub mediowane przez bionieorganiczne anality. Różnice w profilach bionieorganicznych różnych chorób (np. nowotworów, neurodegeneracji, zapalenia) i ich etapów mogą otworzyć drogę do rozwoju biomarkerów i terapii opartych na analitach bioinorganicznych.
- Opisane wyniki mogą być podstawą do opracowania lepszych terapii poprzez
 - rozwój testów fluorescencyjnych w celu szybkiej i niezawodnej identyfikacji bioaktywnych cząsteczek poprzez monitorowanie, czy wpływają one na bionieorganiczne anality w żywych komórkach
 - ocenę (i) stabilności związków przeciwnowotworowych opartych na platynie (ii) skuteczności kandydatów na leki (chelatory żelaza), jak również
 - rozszyfrowanie mechanizmów działania leków - tj. czy indukują one zaburzenie homeostazy miedzi(I), żelaza(II) lub RONS (np. w wysokoprzepustowym badaniach przesiewowych opartych o obrazowanie)
- Ukształtowanie nowego obszaru badań nad sondami dwuanalitowymi do zastosowań biologicznych, przyczyniając się do co najmniej 5-krotnego wzrostu ilości biologicznie kompatybilnych sond dwuanalitowych w ciągu ostatnich 4 lat oraz wpływając na programy badawcze wielu grup na całym świecie, które obecnie rozpoczęły nad nimi prace.

5. PREZENTACJA ZNACZĄCEJ DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ LUB ARTYSTYCZNEJ PROWADZONEJ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB KULTURALNEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI W INSTYTUCJACH ZAGRANICZNYCH

Licencjat i tytuł magistra zdobyłem na uczelni w Polsce ale pozostała część mojej kariery naukowej miała miejsce w instytucjach zagranicznych, aż do momentu mojego powrotu do Polski do Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN we wrześniu 2017 roku.

5.A Opis działalności naukowej nieuwzględnionej w osiągnięciu naukowym 4.C

5.A.1 Badania prowadzone w School of Chemistry, University of Sydney, Australia (2014-2017)

Poza osiągnięciami naukowymi opisanymi w punkcie 4C, będącymi głównym przedmiotem niniejszego wniosku, w trakcie stypendium podoktorskiego na Uniwersytecie w Sydney w grupie prof. Elizabeth New byłem zaangażowany w kilka innych projektów badawczych. Pierwsza grupa projektów dotyczy podobnych tematów jak te wymienione w punkcie 4C (opracowanie sond fluorescencyjnych dla bioanalitów). Jednym z przykładów jest mój wkład w charakterystykę *in vitro* i demonstracje działania (tzw. proof-of-concept) pierwszej sondy fluorescencyjnej na bazie

karboranu do barwienia komórkowych kropli lipidowych (**publikacja P17** - współautor). Przeprowadziłem również resyntezę i potwierdziłem odwracalność odpowiedzi na jony srebra(I) nowej sondy fluorescencyjnej opartej na kumarynie, która została wykorzystana do badania stabilności nanocząstek srebra w roztworach wodnych naśladujących rzeczywiste środowisko (**publikacja P15**). Aby jeszcze bardziej zwiększyć wpływ tej pracy na rozwój dyscypliny, zainicjowałem współpracę z grupą prof. Wojciecha Chrzanowskiego (University of Sydney). Moja wiedza w zakresie walidacji i charakterystyki sond fluorescencyjnych została również wykorzystana do zbadania właściwości fluorescencyjnych zestawu tetrazoli terpirydynowo-arylowych zsyntetyzowanych przez grupę prof. Max Massi (Curtin University, Australia). Moje prace doprowadziły do identyfikacji kilku z tych związków jako skutecznego zestawu sond do notorycznie trudnej dyskryminacji Zn(II) od Cd(II) (**publikacja P16**). Dzięki mojej wiedzy na temat projektowania, walidacji i wykorzystania sond fluorescencyjnych do badania stanu redoks (jak opisano w podrozdziale 4.C1.) mogłem wnieść znaczący wkład (jako współautor) do manuskryptu przeglądowego omawiającego strategię kierowania do mitochondriów sond fluorescencyjnych do wykrywania zmian redoks (**publikacja P18**). To również wpłynęło na moją pracę w zakresie wiarygodnej charakterystyki zmian w generowaniu reaktywnych form tlenu w mitochondriach ludzkiej komórki gospodarza po zakażeniu wirusem RSV, które zostały przedstawione w **publikacji P5** opisanym już w części dotyczącej osiągnięcia habilitacyjnego.

Druga grupa projektów dotyczyła opracowania kompleksów metali jako sond do wykrywania analitów biochemicznych do zastosowania w rezonansie magnetycznym. W tej pracy moją główną rolą było projektowanie narzędzi, jak również nadzorowanie dwóch doktorantów w ich wysiłkach eksperymentalnych, analizowanie wyników i pomoc w wyciąganiu wniosków w celu podjęcia decyzji o kolejnych krokach. W ramach tych wysiłków z powodzeniem opracowaliśmy pierwsze magnetogeniczne kompleksy kobaltu o potencjalnym zastosowaniu w detekcji środowiska redukującego w komórkach (**publikacja P21**) oraz pierwszy kobaltowy czujnik paraSHIFT dla anionów mogący operować w roztworach wodnych (**publikacja P19**). Wykorzystując wiedzę zdobytą w badaniach nad nikotynamidem jako cząsteczką reagującą na redoks, przyczyniłem się do zaprojektowania, a następnie analizy odpowiedzi na zmiany redoks środka kontrastowego MRI opartego na Gd(III) i posiadającego nikotynamid jako grupę redoks-aktywną (**publikacja P14**). Zastosowałem również moją wiedzę, zgromadzoną m.in. w ramach mojej pracy doktorskiej, aby wnieść wkład w pracę prof. Matthew Shores nad rozwojem kompleksów magnetogenicznych na bazie żelaza(II) (projektowanie związku, pomoc w interpretacji danych), co zaowocowało współautorstwem **publikacji P12**.

5.A.2 Badania prowadzone w Zakładzie Sond Molekularnych i Proleków, ICHB PAN (2018-2022)

Po odbyciu stażu podoktorskiego na University of Sydney, przenieśliem się do Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i sformułowałem nowy, niezależny program badawczy jako kierownik Zakładu Sond Molekularnych i Proleków. Stosując szeroką interdyscyplinarność kieruję zespołem w pracy nad kilkoma różnymi kierunkami badań.

Główny kierunek moich badań wywodzi się z opisanej w osiągnięciu (**publikacja P9**) pracy seminalnej dotyczącej projektowania i koncepcji wykorzystania sond dwuanalitowych w zastosowaniach biologicznych. Na te badania skutecznie pozyskałem finansowanie i z powodzeniem rozwijałem dwuanalitowe sondy fluorescencyjne (finansowanie w ramach programu HOMING), ale także bioluminescencyjne (program SONATA) do wykrywania par analitów bionieorganicznych i

enzymów, jak również opracowanie wiarygodnych testów analitycznych wykorzystujących te narzędzia w praktyce. W ramach tych prac opracowaliśmy m.in. nowatorską, zieloną metodę syntetyczną tworzenia wiązań amidowych jako wytrzymałych biokompatybilnych łączników (**publikacja P11**), którą możemy teraz zastosować do sprzęgania ze sobą różnych składników sond. Ponadto, z powodzeniem opracowaliśmy (manuskrypty w przygotowaniu):

- **dwuanalitowe sondy fluorescencyjne** for do bardziej wiarygodnej detekcji a) hipoksji (środowisko redukujące i pH) b) ferroptozy (żelazo(II) i stress oksydacyjny) oraz c) podatności komórek ludzkich (gospodarza) na infekcję SARS-CoV-2 (dwa ludzkie enzymy proteolityczne aktywujące wnikanie SARS-CoV-2 do komórek) – wyniki tych badań są obecnie przedmiotem czterech manuskryptów w przygotowaniu.
- **Dwuanalitowe narzędzia oparte na bioluminescencji** do wykrywania a) hipoksji b) żelaza(II) oraz c) potencjału redukcyjnego komórek (enzymów) – przedmiot trzech manuskryptów w przygotowaniu
- **wiarygodne testy multiparametryczne do zastosowań praktycznych**, w tym: a) wysokoprzepustowy zminiaturyzowany test do identyfikacji inhibitorów infekcji komórek ludzkich wirusami typu RNA b) multiparametryczny i wielowymiarowy test do wykrywania ferroptozy - oba testy stanowią przedmiot patentów w przygotowaniu.

Pod moim nadzorem i kierownictwem dwoje stypendystów podoktorskich dołączyło do mojego zespołu, aby pracować nad projektami z zakresu wieloparametrycznej detekcji i obrazowania, których są liderami. Jeden z grantów został uzyskany w ramach programu finansowania PACIFIC programu Horizon Europe COFUND (MSCA action), kierowanego przez dr Marię Dekaliuk, którego celem jest opracowanie testu opartego na wykorzystaniu i poprawie czułości zjawiska FRET do ilościowego oznaczania wielu białek w płynnych próbkach biologicznych. Nasze modelowe cele molekularne to trzy szeroko stosowane biomarkery białkowe: antygen specyficzny dla prostaty (PSA), fetoproteina (AFP) i antygen zarodkowy raka (CEA). Drugi projekt (program SONATINA) prowadzony przez dr Magdalenę Derbis ma na celu opracowanie zestawu narzędzi obrazowych do badania agregacji i rozpuszczania poliglutaminowanego białka FMR1 odpowiedzialnego m.in. za zespół drżenia i ataksji związany łamliwym chromosomem X, należący do tzw. chorób rzadkich. W ramach tego projektu skupiamy się zarówno na opracowaniu nowych sond do wizualizacji agregatów, jak i na wiarygodnych protokołach akwizycji i analizy obrazu, które pozwolą badać proces z niespotykaną dotąd rozdzielczością przestrzenną i czasową (m.in. z wykorzystaniem najnowszej technologii MINFLUX pozwalającej na obrazowanie fluorescencyjne z dokładnością nawet < 5 nm).

Inny kierunek badawczy, który zapoczątkowałem w moim Zakładzie, dotyczy opracowania związków chemicznych, które kowalencyjnie i selektywnie przyłączają się do białek *in situ*. Badamy rozwój takich narzędzi dla różnych zastosowań, w tym:

- a) obrazowania lokalnego mikrośrodowiska białek z niespotykaną dotąd rozdzielczością poprzez połączenie sond chemicznych (program OPUS) oraz najnowocześniejszej unikalnej infrastruktury obrazowania fluorescencyjnego Minflux z rozdzielczością do pojedynczego nanometra (pojedyncza cząsteczka - projekt Polska Mapa Drogowa Infrastruktury Badawczej NEBI)
- b) identyfikacja celów molekularnych i niepożądanych oddziaływań (tzw. off-targets) kandydatów na leki (projekt EU-OPENSREEN-DRIVE w ramach schematu finansowania

Horizon 2020 INFRADEV, we współpracy z ekspertem biomedycznym, prof. Alwin Krämer z Instytutu Helmholtz DKFZ, Heidelberg, Niemcy).

- c) Rozwój kowalencyjnych inhibitorów dla poprawy specyficzności i skuteczności inhibicji (np. projekt w ramach programu finansowania MINIATURA prowadzony przez adiunkta w moim Zakładzie, dr Michała Jakubczyka)

5.A.3 Badania prowadzone w Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych, ICHB PAN (2021-2022)

Oprócz kierowania swoją grupą badawczą (Zakładem), jestem również kierownikiem Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych (CHTSS) w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Mimo że projekt rozpoczął się jako przedsięwzięcie infrastrukturalne, które miało być zakończone w 2023 roku, udało mi się rozwinąć i otworzyć Centrum dla działalności badawczej w 2021 roku, czyli dwa lata przed planowanym terminem. Dwa główne cele CHTSS to (i) wspieranie badań środowiska naukowego w Polsce i za granicą z wykorzystaniem wiedzy i infrastruktury w zakresie wysokoprzepustowego odkrywania i walidacji cząsteczek bioaktywnych oraz (ii) prowadzenie badań nad udoskonaleniem testów i metodologii dla bardziej wiarygodnej i pogłębionej identyfikacji i charakterystyki cząsteczek bioaktywnych. Centrum funkcjonuje jako partnerski ośrodek założycielski paneuropejskiej infrastruktury badawczej EU-OPENSSCREEN ERIC obejmującej 33 zespoły z 10 krajów Europy, certyfikowanych pod kątem najwyższej wiarygodności naukowej i rzetelności. Koncepcja EU-OPENSSCREEN została również opisana w recenzowanej publikacji naukowej (**publikacja P13**)

W ciągu ostatnich dwóch lat w ramach działań Centrum brałem udział w ponad 20 projektach badawczych poprzez projektowanie eksperymentów, planowanie i interpretację danych w fazach rozwoju testów i/lub badań przesiewowych. Współpraca ta jest wymieniona w części 5.B. Poniżej opisuję wybrane trzy kierunki badań, które są rozwijane długoterminowo i prowadzone z mojej własnej inicjatywy w ramach wzmocnienia pozycji Centrum na arenie międzynarodowej.

Pierwszym obszarem moich badań w ramach CHTSS było stworzenie wysokoprzepustowych protokołów i metodologii badawczych do eksperymentalnej oceny potencjału związków niskocząsteczkowych do zakłócania w sposób niespecyficzny powszechnie stosowanych oznaczeń i technologii analitycznych (tzw. "bio-profilowanie"). W szczególności byłem głównym uczestnikiem projektu EU-OPENSSCREEN-ERIC, opracował koncepcję i zaprojektował szczegółowe protokoły eksperymentalne do wiarygodnej oceny tendencji związków niskocząsteczkowych do (a) generowania reaktywnych form tlenu, (b) hamowania lucyferaz używanych w testach opartych na bioluminescencji oraz (c) wiązania/interakcji z jonami metali, które są najczęstszymi źródłami artefaktów w kampaniach przesiewowych. Mój zespół wygrał także konkurs na przeprowadzenie badań nad generacją RONS (trzy testy identyfikujące różne mechanizmy generacji RONS) i inhibicją lucyferaz (trzy różne lucyferazy) 100 000 związków wybranych przez EU-OPENSSCREEN jako tzw. biblioteki niecelowanej związków chemicznych. Wyniki tych prac są stopniowo umieszczane w specjalnej, należącej do EU-OPENSSCREEN i w pełni ogólnodostępnej Europejskiej Bazie Biologii Chemicznej (ang. *European Chemical Biology Database*, <https://ecbd.eu>). Ponadto, na podstawie tej pracy, tworzymy obecnie algorytmy do przewidywania potencjalnej reaktywności innych związków na podstawie danych zebranych dla związków w bibliotece EU-OPENSSCREEN, aby uzupełnić istniejące parametry (takie jak deskryptory PAINS) i pomóc w niezawodnej identyfikacji prawdziwych i specyficznych cząsteczek bioaktywnych oraz wczesnej eliminacji tych, które mogą prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników.

Drugi obszar koncentruje się na rozwoju wieloparametrycznych, opartych na obrazowaniu fluorescencyjnym, wysokoprzepustowych testów do fenotypowej oceny aktywności i toksyczności czynników chemicznych. W szczególności, stosujemy tzw. metodę „cell-painting”,¹ która polega na barwieniu kilku elementów komórkowych (jądro, mitochondria, cytoszkielet, błony i aparat Golgiego) i porównywaniu zmian we wzorach barwienia wywołanych przez różne substancje z tymi wywołanymi przez substancje kontrolne o znanych mechanizmach działania. Pozwala to nie tylko na wiarygodną identyfikację bioaktywnych cząsteczek, ale również daje wgląd w ich mechanizm terapeutyczny. W zależności od modeli biologicznych (np. linie komórkowe / typy komórek) stosowanych do badania efektów działania małych cząsteczek, test cell painting może również dać wgląd w niespecyficzną i/lub toksyczną aktywność związków. Z tego względu jest to jeden z najpotężniejszych i najbardziej niezawodnych sposobów identyfikacji prawdziwych i specyficznych substancji bioaktywnych i wczesnej eliminacji tych, które w późniejszych etapach (np. w badaniach klinicznych) mogą okazać się niebezpieczne, unikając marnowania zasobów, które w przeciwnym razie byłyby inwestowane w dalszy rozwój i testy kliniczne nieodpowiednich substancji. Nasze badania w tym obszarze koncentrują się na alternatywnych protokołach barwienia (w tym alternatywnych barwników oraz barwieniu innych cech komórkowych) jak również nowych algorytmach analizy obrazu w celu poprawy czułości i zakresu detekcji różnych mechanizmów działania. Ponadto, wraz z partnerami pracujemy nad adaptacją i zastosowaniem metody cell-painting do potwierdzania bezpieczeństwa związków zidentyfikowanych w badaniach przesiewowych (projekt kierowany przez prof. Annę Kurzyńską-Kokorniak w ramach programu Szybka Ścieżka finansowanego przez NCBI) oraz rozszerzeniem jej na badania bezpieczeństwa nanomateriałów (finansowanie w ramach programu Horizon Europe dla projektu i-CARE).

Trzecim kierunkiem badawczym, który eksplorowałem w ramach CHTSS jest rozwój i zastosowanie narzędzi do identyfikacji związków wiążących trójwymiarowe elementy struktury RNA. Podczas gdy zdecydowana większość terapii skupia się na białkach jako najczęstszych celach molekularnych, inhibicja wielu z nich pozostaje nieosiągalna. Ponadto uważa się, że coraz większa liczba celów RNA ma znaczenie dla rozwoju choroby, progresji i oporności na leczenie. To poszerzyło poszukiwania małych cząsteczek o te, które mogłyby wiązać i modulować stabilność i/lub aktywność cząsteczek RNA. Ostatnio zaadaptowaliśmy i zoptymalizowaliśmy wcześniej opublikowany test oparty o wypieranie barwnika ze struktur RNA (ang. indicator-displacement assay)² do wykrywania substancji wiążących pętle RNA i z powodzeniem wykorzystaliśmy go w identyfikacji bioaktywnych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii grypy i infekcji SARS-CoV-2. Obecnie pracujemy w ścisłej współpracy z kilkoma partnerami akademickimi i przemysłowymi (np. jako partnerzy w projektach ERC Starting Grant i OPUS) prowadząc badania mające na celu rozszerzenie zakresu testów do wykrywania wiązania do różnych typów struktur 3D RNA i identyfikacji szerszego zakresu związków niskocząsteczkowych wiążących RNA.

5.A.4 Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora

École Normale Supérieure de Lyon, Francja (doktorat)

Głównym tematem mojej pracy doktorskiej było opracowanie kompleksów metali na bazie żelaza(II), które mogłyby przełączać się pomiędzy różnymi stanami magnetycznymi pod wpływem bodźców zewnętrznych, co mogłoby znaleźć zastosowanie w detekcji bioanalitów. W większości kompleksów żelazo(II) posiada niesparowane elektrony d, co czyni te związki paramagnetycznymi. Z kolei gadolin jest zawsze paramagnetyczny (7 niesparowanych elektronów) i dlatego jest stosowany jako powszechny środek kontrastowy w obrazowaniu rezonansem magnetycznym

(MRI), jednej z najpotężniejszych technik obrazowania medycznego. W przypadku responsywnych środków kontrastowych, te oparte na gadolinie zawsze będą miały szczytkowy sygnał tła nawet przed interakcją z analitem ze względu na ich stały paramagnetyzm. Stwarza to znaczne ryzyko pomylenia wzrostu kontrastu spowodowanego interakcją z celem molekularnym (przejście ze stanu wyłączonego do włączonego – tzw. turn-on) ze wzrostem spowodowanym nagromadzeniem wyłączonej, ale nie w pełni wyciszonej formy sond opartych na gadolinie. Żelazo(II) natomiast może być przełączone ze stanu prawdziwie diamagnetycznego do paramagnetycznego poprzez zmianę jego sfery koordynacyjnej.

W ramach mojej pracy byłem głównym autorem publikacji przeglądowej, w której po raz pierwszy zdefiniowałem kryteria dla pozbawionych tła sond magnetogenicznych (od diamagnetycznych do paramagnetycznych) oraz omówiłem krok po kroku projektowanie takich narzędzi, jednocześnie krytycznie oceniając obecne próby ich opracowania (**publikacja P22**). Przygotowałem również i scharakteryzowałem szereg binarnych diamagnetycznych, paramagnetycznych i typu spin-cross-over kompleksów żelaza(II) opartych na ligandach bispidynowych (3,7-diazabicyklo[3,3,1]nonan (**publikacja P23**). Obejmowały one a) dopiero drugi przykład binarnej diamagnetyczno-paramagnetycznej pary kompleksów żelaza(II) nadających się do opracowania sond magnetogenicznych oraz b) zademonstrowały pierwsze zachowanie spin-cross-over w kompleksach bispidynowych. Moja ekspertyza pozyskana w ramach tej pracy została doceniona m.in. przez moje zaangażowanie w doradzanie czołowemu ekspertowi w tej dziedzinie (Prof. Peter Comba - autor ponad 50 manuskryptów na temat kompleksów bispidyna-metal) w zakresie projektowania i protokołu eksperymentalnego do przygotowania tego nowego typu ligandów bispidynowych i ich kompleksów. Świadczy to dodatkowo o oryginalności i wysokiego poziomu mojego osiągnięcia.

Jacobs University Bremen, Niemcy

Moje pierwsze projekty eksperymentalne były realizowane w latach 2007-2009 w grupie prof. Gerda-Volkera Roeschenthalera początkowo na Uniwersytecie w Bremie, a następnie na Uniwersytecie Jacobsa w Bremie (w sumie 12 miesięcy), gdzie skupiałem się na syntezie i dokładnej charakterystyce spektroskopowej fluorowanych fosfonianów. W porównaniu do fosforanów i fosfopoliestrów, które szeroko występują w przyrodzie, fosfoniany posiadają bardziej stabilne wiązanie P-C, które zastępuje jedno z połączeń P-O-C, dzięki czemu fosfoniany są często mniej podatne na hydrolizę, zachowując jednocześnie steryczny i fizyczny charakter fosforanów. Wprowadzenie fluoru do związków organicznych, często w miejsce wodoru, pozwala na radykalną zmianę właściwości chemicznych (ze względu na elektronegatywność fluoru i odwróconą polaryzację wiązania C-F w stosunku do C-H) przy niewielkich zmianach wymagań sterycznych (fluor ma najbardziej zbliżony promień atomowy do wodoru spośród wszystkich pierwiastków z wyjątkiem gazów szlachetnych). Prowadzi to do coraz szerszego wykorzystania związków fluorowanych, od bioaktywnych (np. farmaceutyki, biocydy), poprzez surfaktanty i ciecze jonowe do antykorozyjnych, farb i innych. W swojej pracy zsyntetyzowałem ponad 20 fluorowanych arylofosfonianów (**publikacja P24**) oraz w ramach współpracy przemysłowej, opracowywałem nowe metody wprowadzania fluoru do związków organicznych.

5.B Współpraca z krajowymi i zagranicznymi instytucjami lub organizacjami

5.B.1 Współpraca międzynarodowa

5.B.1.1 Bieżąca współpraca

University of Sydney, Australia

- **Prof. Elizabeth J New (od 2014)**
 - Kontynuacja współpracy po przejściu do ICHB PAN, która obejmowała ukończenie wielu projektów badawczych, które zaowocowały kilkoma publikacjami (w tym publikacje z listy tych opisanych w ramach osiągnięcia), wymianę studentów i partnerstwo w jednym z moich projektów badawczych (Homing) - zakończonym w 2022 roku, a także opracowywanie wykorzystania macierzy fluorescencyjnych do wykrywania jonów metali w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem technologii mikrofluidyki w nośniach papierowych (w toku)
- **Prof. Wojciech Chrzanowski (od 2015 r.)**
 - Współpraca zainicjowana podczas pracy w grupie prof. EJ New, kiedy to zorganizowałem z własnej inicjatywy pierwsze spotkanie obu zespołów, które doprowadziło do długotrwałej współpracy obu grup w zakresie 5 różnych tematów
 - **Rezultat - publikacja:** Z Lim, DG Smith, JL Kolanowski, RL Mattison, JC Knowles, S-Y Baek, W Chrzanowski, EJ New, A reversible fluorescent probe for monitoring Ag(I) ions. *Journal of the Royal Society Interface* **2018**, 15, 20180346.
 - W ramach mojej pracy już w ICHB PAN stworzyłem również wspólną agendę badawczą dotyczącą rozwoju narzędzi chemicznych do badania interakcji nanocząstek z komórkami i ich wpływu na środowisko komórkowe.
 - **Rezultat:** wspólny projekt iCARE w ramach Horizon Europe (3 mln EUR, HORIZON-CL4-2022-DIGITAL-EMERGING-01-35, rozpoczęcie w styczniu 2023, konsorcjum 7 partnerów akademickich i 5 przemysłowych).
- **Prof. Stuart Fraser (od 2015 r.)**
 - Współpracowałem z prof. Fraser'em nad projektem wykorzystującym różne fluorofory (w szczególności Nile Blue i nowa sonda kumarynowo-karboranowa) do badania zmian w rozmieszczeniu dotychczas nieuchwytnych wewnątrzkomórkowych lipidów w mysich embrionalnych komórkach macierzystych.
 - **Rezultat - publikacje:**
 - BB Boumelhem, C Pilgrim, VE Zwicker, JL Kolanowski, JH Yeo, KA Jolliffe, EJ New, ML Day, SJ Assinder, ST Fraser*, Intracellular flow cytometric lipid analysis - a multiparametric system to assess distinct lipid classes in live cells. *Journal of Cell Science* **2022**; 135 (5): jcs258322 -> przeprowadziłem kluczowe eksperymenty pokazujące przydatność Nile Blue w wykrywaniu innej puli lipidów niż szeroko stosowany barwik Nile Red, przyczyniłem się do teoretycznego wyjaśnienia zmian fluorescencji Nile Blue w obecności różnych lipidów, brałem udział w redakcji manuskryptu
 - A Wu⁺, JL Kolanowski⁺, BB Boumelhem, R Lee, A Kaur, ST Fraser, EJ New, LM Rendina, A New Carborane-Containing Fluorophore as a Stain of Cellular

Lipid Droplets. *Chemistry - An Asian Journal* **2017**, 12, 1704-1708. -> Moja rola jako lidera bioanalitycznej części pracy obejmowała spektroskopową charakterystykę sond karboranowo-kumarynowych, walidację ich działania in vitro i in cellulo, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu.

Ecole Normale Superieure Lyon, Francja - Prof. Jens Hasserodt (od 2013)

- Kontynuowałem współpracę po zakończeniu mojego doktoratu
- Temat: magnetogeniczna sonda typu spin-switching do detekcji anionów w wodzie
- Moja rola obejmowała pomysł, wykonanie doświadczeń analitycznych i opracowanie manuskryptu (w przygotowaniu).

University of Birmingham, Wielka Brytania (wcześniej University of Heidelberg, Niemcy) - prof. Dirk-Peter Herten (od 2016 r.)

- Zainicjowałem współpracę, która koncentruje się na rozwoju sond chemicznych i protokołów do obrazowania super-rozdzielczego (wymiana materiałów eksperymentalnych i pomysłów badawczych).

DKFZ Helmholtz Insitute, Heidelberg, Niemcy – prof. Alwin Krämer (od 2021 r)

- Współpraca zainicjowana w ramach projektu EU-OPENSSCREEN-DRIVE nad stworzeniem sond molekularnych do identyfikacji celów komórkowych substancji bioaktywnych – analogów gryseofulwiny (badania chemoproteomiczne) identyfikacja celów molekularnych i niepożądanych oddziaływań (tzw. *off-targets*)

5.B.1.2 Bieżąca współpraca w ramach Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych

EU-OPENSSCREEN-ERIC, Berlin, Niemcy - dr Wolfgang Fecke (od 2018)

- Współpraca w ramach Konsorcjum Europejskiej Infrastruktury Badawczej (ERIC), w którym jestem przedstawicielem placówki partnerskiej ICHB PAN
- **Tematy:**
 - wiarygodne protokoły i metodologie dla wysokoprzepustowych badań przesiewowych
 - bioprofilowanie bibliotek związków chemicznych w celu identyfikacji potencjalnych artefaktów w kampaniach przesiewowych
- **Rezultat - publikacja:** P Brennecke, D Rasina, O Aubi, K Herzog, J Landskron, B Cautain, F Vincente, J Quintana, J Mestres, B Stechmann, B Ellinger, J Brea, IL Kolanowski, R Pilarski, M Orzaez, A Pineda-Lucena, L Laraia, F Nami, P Zielenkiewicz, K Paruch, E Hansen, JP von Kries, M Neuenschwander, E Specker, P Bartunek, S Simova, Z Lesnikowski, S Krauss, L Lehtio, U Bilitewski, M Bronstrup, K Tasken, A Jirgenson, H Lickert, MH Clausen, JH Andersen, MJ Vincent, O Genilloud, A Martinez, M Nazare, W Fecke, P Gribbon, EU-OPENSSCREEN: A Novel Collaborative Approach to Facilitate Chemical Biology. *SLAS Discovery* **2019**, 24(3), 298-413.

University of Cambridge, Wielka Brytania - Prof. Folma Buss (od 2021)

- **Temat:** identyfikacja specyficznych kandydatów na inhibitory wobec mikrobiologicznych białek miozyny

- Mój wkład obejmuje projektowanie, analizę danych i nadzór nad adaptacją testów, badaniami przesiewowymi i walidacją trafień.

Ludwig-Maximilians-Universitaet Monachium, Niemcy - Prof. Claudia Veigel (od 2022)

- **Temat:** identyfikacja specyficznych inhibitorów ludzkiej miozyny jako narzędzi do badania procesów komórkowych regulowanych przez miozynę
- Mój wkład obejmuje projektowanie, analizę danych i nadzór nad adaptacją testów, badaniami przesiewowymi i walidacją trafień.

5.B.1.3 Wcześniejsza współpraca

Colorado State University, USA – Prof. Matthew Shores (Collaborator 2015-2019)

- **Temat:** Kontrola stanu spinu w roztworze za pomocą bodźców (bio)chemicznych
- Zainicjowałem współpracę z prof. Shores i zaproponowałem mu oryginalny pomysł szczególnej konstrukcji kompleksów żelaza(II) wykazujących czułość na zmiany w środowisku, służyłem radą w zakresie syntezy, projektowania eksperymentów i analizy danych.
- **Rezultaty**
 - **Plakat konferencyjny** prezentowany w ramach współpracy na *249th ACS National Meeting & Exposition*, marzec 2015, Denver (CO), USA
 - **Publikacja:** TJ Ozumerzifon, RF Higgins, JP Joyce, JL Kolanowski, AK Rappe, MP Shores, Evidence for Reagent-induced Spin-State Switching in Tripodal Fe(II) Iminopyridine Complexes. *Inorganic Chemistry*, **2019**, 2(12), 7785.

University of Melbourne, Australia - Prof. Marie Bogoyevitch (Collaborator 2015 - 2019)

- **Temat:** Badanie zaburzeń równowagi redoks w mitochondriach komórek zakażonych wirusem z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych
- Zainicjowałem i koordynowałem współpracę proponując rozwiązania problemu badania tworzenia ROS w mitochondriach z zaburzonym potencjałem błonowym, doradzałem w zakresie protokołu zastosowania wiarygodnych sond fluorescencyjnych, w tym projektowania eksperymentów, rozwiązywania problemów i interpretacji danych
- **Publikacja wynikowa:** M Hu, KE Schulze, R Ghildyal, DC Henstridge, JL Kolanowski, EJ New, Y Hong, AC Hsu, PM Hansbro, PAB Wark, MA Bogoyevitch, DA Jans*. Respiratory Syncytial Virus co-opts host mitochondrial function to favour infectious virus production. *eLife* **2019**, 8, e42448.

Queensland University of Technology, Australia - Prof. Steven Bottle (Collaborator 2015 - 2018)

- **Temat:** Sondy oparte na rodnikach nitroksylowych do monitorowania w czasie rzeczywistym stanu redoks w mitochondriach
- Mój wkład w tę współpracę polegał na wykonaniu, analizie i interpretacji wyników eksperymentów czasu życia fluorescencji (FLIM) w komórkach z wykorzystaniem sond dostarczonych przez prof. Bottle.
- **Rezultat - publikacja:** KL Chong, BA Chalmers, JK Cullen, A Kaur, JL Kolanowski, BJ Morrow, K Fairfull-Smith, MJ Lavin, NL Barnett, EJ New, MP Murphy, SE Bottle, Pro-fluorescent mitochondria-targeted real-time responsive redox probes synthesised from carboxy

isoindoline nitroxides: Sensitive probes of mitochondrial redox status in cells. *Free Rad. Biol. & Med.* **2018**, 128, 97-110.

Curtin University, Australia - Prof. Max Massi (Collaborator 2015 - 2017)

- **Temat:** aryłowe tetrazole funkcjonalizowane terpirydyną do wykrywania jonów metali
- Mój wkład obejmował pracę nad zsyntezowanymi związkami w celu scharakteryzowania właściwości wiązania i odpowiedzi fluorescencyjnej tych ligandów na jony metali oraz stworzenie testów opartych na macierzach fluorescencyjnych do rozróżniania Zn i Cd.
- **Rezultat - publikacja:** PJ Wright, JL Kolanowski, WK Filipek, EG Moore, S Stagni, EJ New, M Massi, Versatility of terpyridine functionalised aryl tetrazoles: photophysical properties, ratiometric sensing of zinc cations and sensitisation of lanthanide luminescence. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, 44, 5260-5270.

Universitat de Barcelona, Hiszpania - Prof. Patrick Gamez (Collaborator 2016 - 2018)

- doradztwo w zakresie protokołu stosowania naszych sond redoks w badaniach nad generacją ROS przez kompleksy metali in vitro, projektowanie eksperymentów i rozwiązywanie problemów

McGill University, Kanada - Prof. Gerd Multhaup (Collaborator 2016-2017)

- doradztwo w sprawie protokołu zastosowania naszej odwracalnej sondy do detekcji labilnych form miedzi(I) w mitochondriach w celu pomiaru zmian w transporcie Cu(I) w różnych warunkach fizjologicznych i patologicznych.

State University of Notre Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazylia - Prof. Adolfo Horn (Collaborator 2016-2017)

- doradztwo w zakresie syntezy i fluorescencyjnym znakowaniu kompleksów metali przejściowych o właściwościach cytotoksycznych.

5.B.2 Współpraca krajowa

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

- **Dr hab. Lucyna Mrówczyńska i Prof. Marek Sikorski (współpracownicy od 2016 r.)**
 - **Temat:** Wykrywanie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu w erytrocytach ludzkich ekspozowanych na flawiny za pomocą sond fluorescencyjnych
 - Zainicjowałem tę współpracę i brałem regularny udział w jej utrzymywaniu, doradzałem w zakresie protokołów dla aplikacji sond, w tym projektowania eksperymentów, rozwiązywania problemów, analizy danych i ilościowej interpretacji obrazów mikroskopowych.
 - **Rezultaty:**
 - **Poster konferencyjny:** prezentowany przez współpracowników na *Oxygenalia 2016*, listopad 2016, Poznań, Polska
 - **Manuskrypt (w trakcie korekty):** M Isińska-Rak, A Golczak, M Gierszewski, Z Anwar, V Cherkas, D Kwiatek, E Sikorska, I Khmielnski, G Brudziński, L Mrówczyńska*, JL Kolanowski*, M Sikorski*, 5-Deazaalloxazine as photosensitizer of singlet oxygen and potential redox-sensitive fluorescent probe.
- **Dr hab. Kinga Kamieniarz-Gdula (od 2022)**

- Moja rola to identyfikacja bioaktywnych cząsteczek wpływających na efektywność alternatywnego splicingu (projektowanie, nadzór i interpretacja danych generowanych przez mój zespół w procesie skriningu wysokoprzepustowego)
- **Rezultaty:** jestem formalnym partnerem w projekcie ERC Starting Grant z programu Horizon Europe kierowanym przez dr hab. Kamieniarz-Gdulę

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu – Prof. Natalia Rozwadowska

- **Temat:** Maskowane substraty bioluminogenne do selektywnego obrazowania parametrów biochemicznych raka
- Jestem liderem w grantie badawczym o tym tytule (SONATA), w którym prof. Rozwadowska jest partnerem konsorcyjnym -> jej rolą jest opracowanie komórkowych i zwierzęcych modeli raka płuca w celu zademonstrowania zastosowania rozwijanych przez nas nowych bioluminogennych substratów do detekcji parametrów biochemicznych

Politechnika Poznańska - dr Dariusz Brzeziński

- Rozwój wspomaganych przez SI algorytmów i podejść do analizy dużych ilości danych numerycznych i obrazowych

6. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ DYDAKTYCZNYCH I ORGANIZACYJNYCH ORAZ OSIĄGNIĘĆ W ZAKRESIE POPULARYZACJI NAUKI LUB SZTUKI.

6.A Osiągnięcia dydaktyczne

6.A.1 Opieka naukowa nad studentami, doktorami w trakcie specjalizacji lub doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub pomocniczego z wykazem studiów doktoranckich

Doktoranci:

- Doktoranci realizujący projekty badawcze pod moją opieką – Środowiskowe Studium Doktoranckie ICHB PAN
 - Francesca Canyelles I Font (2018 - obecnie)
 - Masroor Khan (2019 - obecnie)
 - Anna Wychowaniec (2019 - obecnie)
- Inni doktoranci, nad którymi sprawowałem opiekę:
 - Konrad Pakuła (2019 – obrona odbyła się 19.12.2022 - pozytywnie) - jako promotor pomocniczy, promotor główny: prof. Michał Jasiński
 - Myint Toe (2022 - obecnie) - jako członek PhD Thesis Advisory Committee, główny promotor: dr. Remigiusz Serwa (CeNT, Warszawa)
 - Dr Michael Harris (2016 - 2017, stopień uzyskany w 2019) - jako bezpośredni opiekun w laboratorium (w roli post-dok), promotor: prof. Tatjana N. Parac-Vogt
 - Dr Edward O'Neill (2014 - 2017, stopień uzyskany w 2017) - jako bezpośredni opiekun w laboratorium (w roli post-dok), promotor: prof. Elizabeth J. New
 - Dr Clara Shen (2014 - 2017, stopień uzyskany w 2017) - jako bezpośredni opiekun w laboratorium (w roli post-dok), promotor: prof. Elizabeth J. New

Studenci:

- magistranci pod moją opieką naukową (pracujących na moich projektach badawczych - ze względu na formalne procedury Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu nie mogłem pełnić roli promotora, mimo że praca została wykonana w całości w mojej grupie badawczej)
 - Anna Wychowaniec (magisterium w 2019 roku, promotor z ramienia uczelni: prof. Marek Sikorski)
 - Karolina Konsewicz (magisterium w 2020 roku, promotor z ramienia uczelni: Prof. Marek Sikorski)
 - Katarzyna Wodecka (magisterium 2020, promotor z ramienia uczelni: prof. Marek Sikorski)
 - Wiktoria Nitka (magisterium 2020, promotor z ramienia uczelni: prof. Donata Pluskota-Karwatka)
 - Adrian Rufli (MSc in 2020, promotor z ramienia uczelni: prof. Tomasz Pospieszny)
- pozostali studenci, którzy realizowali swoje staże badawcze w mojej grupie:
 - Joanna Gosieniecka - licealistka (2019) a następnie studentka University College London (2022)
 - Xhorxhina Shauli (2019) – staż letni, studentka programu SERP Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- studenci, nad którymi sprawowałem bezpośredni nadzór w laboratorium jako doktorant w ENS Lyon (2010 – 2013)
 - Robert Steinhoff z Technische Universität München, Niemcy
 - Hanno Kossen z University's College London, Wielka Brytania

6.A.2 Działalność dydaktyczna

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN – Poznań, Polska

- Molecular Probes for Biological Applications (15 h kurs dla doktorantów, dwa lata: 2020, 2022)

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza - Poznań, Polska

- Modern Chemical Biology (Wydział Chemii, 15 h kurs dla doktorantów, 2019)
- Advances in Molecular Medicine (Wydział Biologii, 15 h kurs dla magistrantów, trzy lata: 2020, 2021, 2022)

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu / Politechniki Poznańska, Polska

- Chemia Bioorganiczna (7 h wykładów, 2 x 8 h seminariów, dla studentów studiów licencjackich, 2020, 2021)

University of Sydney, Australia

- Chemia Ogólna dla 1 roku (CHEM1101) (20 h wykładów, 100 h laboratoriów nadzór, dwa lata: 2015, 2016)

6.B Działalność organizacyjna dla społeczności naukowej

6.B.1 Aktywność w ramach organizacji i towarzystw naukowych

- **Akademia Młodych Uczonych PAN (członek 2019 – obecnie, wiceprzewodniczący 2019-2021, przewodniczący 2022-obecnie)**
 - Organizacja ta zrzesza 35 wybitnych młodych polskich naukowców ze wszystkich dziedzin, którzy w dniu wyboru nie mają więcej niż 38 lat i legitymują się stopniem doktora, wybieranych przez członków Polskiej Akademii Nauk
 - Kilka miesięcy po wyborze na członka AMU PAN zostałem wybrany jednym z 3 zastępców Przewodniczącego AMU PAN koordynującym w szczególności współpracę międzynarodową i aktywność w obszarze doradztwa naukowego, a od początku 2022 jestem Przewodniczącym (koordynuje prace wszystkich grup roboczych, prowadzę spotkania i dyskusje, wspieram wybór tematów i działań itp.).
 - Działalność w AMU ma charakter społeczny i wolontaryjny i obejmuje aktywność w obszarze popularyzacji nauki (m.in. cykliczne wydarzenia promujące naukę wśród uczniów, kobiet, i ogółu społeczeństwa), polityki naukowej, szczególnie w kontekście sytuacji młodych naukowców (od 2019 byłem zaangażowany w przygotowanie kilkunastu eksperckich opinii i oświadczeń komentujących m.in. rozwiązania legislacyjne w obszarze polityki naukowej państwa) oraz doradztwa naukowego (m.in. udział w YASAS i SAPEA – szczegóły poniżej)
- **Struktura doradztwa naukowego akademii młodych uczonych (ang. Young Academies Science Advice Structure – YASAS: współzałożyciel i Prezes 2020-2022, Członek Zarządu 2022 - obecnie)**
 - Jako współzałożyciel i Prezes sieci YASAS, brałem udział w zbudowaniu konsorcjum i opracowaniu wspólnego statutu organizacji. Pracowałem nad budowaniem zaufania i relacji zarówno wewnątrz YASAS, jak i na zewnątrz z organizacjami o komplementarnych celach. Doprowadziłem do tego, że YASAS dołączył do oficjalnego mechanizmu doradztwa naukowego dla Komisji Europejskiej w ramach projektu SAPEA (ang. Scientific Advice for Policy by European Academies)
 - obecnie pełnię funkcję Członka Zarządu wspierając zapewnienie ciągłości instytucjonalnej relacji między YASAS a innymi partnerami,
- **SAPEA (ang. Scientific Advice for Policy by European Academies - obserwator w zarządzie 2021-2022, członek zarządu 2022, zastępca członka zarządu 2022 - obecnie)**
 - Inicjatywa sieci europejskich akademii nauk będąca kluczowym naukowym elementem oficjalnego mechanizmu doradztwa naukowego dla Komisji Europejskiej (SAM, ang. Scientific Advice Mechanism – <https://sapea.info>)
 - Wniosłem wkład w rozwój oficjalnego mechanizmu doradztwa naukowego dla Komisji Europejskiej w szczególności w obszarze optymalizacji jakości, transparentności i inkluzywności procesów doboru ekspertów jak i zaangażowania i roli młodych naukowców

- Brałem udział w przygotowaniu (w szczególności jako lider jednego z pakietów roboczych) wniosku o dofinansowanie kontynuacji projektu SAPEA, który został pozytywnie rozpatrzony a jego realizacja rozpoczęła się w maju 2022 roku (budżet 3 mln EUR, 5 partnerów, w tym kierowany wówczas przeze mnie YASAS)
- Obecnie jestem przedstawicielem YASAS do grupy roboczej projektu (pakiet pracy nr 4 – optymalizacja metodologii i procedur operacyjnych pracy SAPEA w ramach doradztwa naukowego dla Komisji Europejskiej) a także zastępcą członka Rady Nadzorczej SAPEA z ramienia YASAS
- **EU-OPENSREEN European Research Infrastructure Consortium (przedstawiciel ICHB PAN, 2018 – obecnie)**
 - Certyfikowane konsorcjum europejskiej infrastruktury badawczej (członek ESFRI) zrzeszające 33 partnerów z 10 krajów europejskich w obszarze biologii chemicznej i chemii medycznej
 - jestem jednym z członków Komitetu Wykonawczego projektu EU-OPENSREEN-DRIVE finansowanego ze środków Horyzont 2020 i realizowanego przez całe konsorcjum
 - Jestem przedstawicielem ICHB PAN w polskim konsorcjum POL-OPENSREEN z Polskiej Mapy Drogowej Infrastruktury Badawczej (7 partnerów, z których 3 jest też członkami EU-OPENSREEN-ERIC)
- **Wcześniejsze członkostwo w innych stowarzyszeniach**
 - Sydney Catalyst Network (2016-2017) - członek
 - Early-Mid Career Researchers of the Australian Academy of Science - członek forum (2015-2016)
 - Australian Society of Molecular Imaging (ASMI) - regularny uczestnik spotkań (2014-2015)
 - Towarzystwo Chemiczne University of Sydney (2014 - 2017)
 - Society of Biological Inorganic Chemistry (2014-2016) - członek

6.B.2 Aktywność w komitetach i komisjach

- **Członek Komitetów Naukowych PAN (2019 – obecnie)**
 - Komitet Chemii
 - Komitet Biologii Molekularnej Komórki
- **Członek Komisji Doradczych Dyrektora ICHB PAN (2019 – obecnie)**
 - Komisja ds. wprowadzenia języka angielskiego jako drugiego języka (zapropnowałem i brałem udział w przygotowaniu wniosku grantowego na wprowadzenie udogodnień w ICHB PAN dla osób anglojęzycznych, na które pozyskaliśmy dofinansowanie 500 000 zł)
 - Komisja ds. komercjalizacji i współpracy z biznesem (Ocenianie ryzyka i możliwości związanych z komercjalizacją różnych wyników badań, przygotowywanie rekomendacji dotyczących inwestycji w ochronę IP).

- **Członek komitetu redakcyjnego czasopisma naukowego *Analysis & Sensing* (Wiley & Sons, 2021 – obecnie)**
 - Czasopismo jest inicjatywą Chemistry Europe - zrzeszenia towarzystw chemicznych krajów Europejskich
- **Komitety organizacyjne konferencji naukowych:**
 - **Polish Scientific Networks: Climate Change – Science & Society**, Uniwersytet Wrocławski, Polska (28-30.09.2022) - członek komitetu organizacyjnego;
 - **Young Science Beyond Borders 2021**, online (16-17.12.2021) – przewodniczący komitetu organizacyjnego, prowadzący sesji i prelegent;
 - **9th International Conference on Biotechnology and Bioengineering 2019**, ICHB PAN, Poznań, Polska (25-28.09.2019) – współorganizator, przewodniczący sesji i prelegent.

6.B.3 Społeczna aktywność ekspercka i recenzencka

- **Zewnętrzny konsultant polskiego stanowiska w zakresie programów pracy funduszy europejskich w ramach programu Horyzont Europa (2021 – obecnie)**, kilkanaście interwencji w następujących obszarach:
 - Europejska Przestrzeń Badawcza (m.in. mechanizmy ewaluacji doskonałości naukowej, dywersyfikacja karier naukowych i współpraca międzysektorowa oraz rozwój infrastruktury badawczych)
 - Programy pracy dla programów z II filaru Horyzontu Europa w obszarze Zdrowie
- **Konsultant Wielkopolskiego Regionalnego Programu Operacyjnego na lata 2021 – 2027**
 - Większość wprowadzonych przeze mnie poprawek została zaakceptowana (lata 2020-2021) a program przyjęty przez Komisję Europejską w grudniu 2022 jako jeden z pierwszych regionalnych programów operacyjnych w Polsce
- **Recenzje artykułów naukowych** - dane z Web of Science (wyszukiwanie: „Kolanowski Jacek AND Kolanowski JL”) – 78 recenzji
 - Chemical Communications: 49 (wyróżniony wśród 5 najlepszych recenzentów Chemical Communications w 2018 oraz wśród 1% recenzentów z dziedziny Chemii w 2018 wg Web of Science) – IF2021: 6,065, 5-letni IF: 5,976
 - International Journal of Molecular Sciences: 5 - F2021: 6,208, 5-letni IF: 6,682
 - Sensors: 5 - F2021: 3,847, 5-letni IF: 4,05
 - Molecules: 3 - F2021: 4,927, 5-letni IF: 5,11
 - Chemical Society Reviews: 2 - F2021: 60,615, 5-letni IF: 56,283
 - Biosensors: 2 - F2021: 5,743, 5-letni IF: 5,972
 - ChemBioChem: 2 - F2021: 3,468, 5-letni IF: 3,167
 - Chemistry and Biodiversity: 2 - F2021: 2,745, 5-letni IF: 2,581
 - Chemosensors: 2 - F2021: 4,229, 5-letni IF: 4,211
 - Organic and Biomolecular Chemistry: 2 - F2021: 3,89, 5-letni IF: 3,464
 - Interface Focus: 1 - F2021: 4,661, 5-letni IF: 5,338

- Journal of Materials Chemistry B: 1 - F2021: 7,571, 5-letni IF: 6,788
- Materials: 1 - F2021: 3,748, 5-letni IF: 4,042
- Nature Communications: 1 - F2021: 17,694, 5-letni IF: 17,764

6.B.4 Wystąpienia ustne na zaproszenie z zakresu doradztwa naukowego i polityki naukowej

- 01-03.11.2022 - InterAcademy Partnership Triennale Conference, Biosphere 2, Arizona, USA: panelista w sesji "Science Advice by Young Academies"
- 19-20.09.2022 – Coroczna konferencja Euro-CASE, Bruksela, Belgia: prelegent podczas sesji warsztatowej na temat Angażowania Młodych Pracowników i Ekspertów na temat "YASAS: The Young Academies Science Advice Structure"
- 27-28.04.2022 – konferencja Science Advice under Pressure, European Commission Science Advice Mechanism (SAM), Bruksela, Belgia: współprowadzący i moderator warsztatów "Society, Policy and Research under Pressure"
- 13-16.07.2022 – European Science Open Forum 2022, Leiden i hybrydowo: panelista w sesji pt. "Innovations at the Science Policy Interface: Closing the Gap for Early Career Researchers' Policy Engagement" -
- 15.06.2022 – konferencja I warsztaty Scholars at Risk - Ukraine, International Science Council & ALLEA & Science4Ukraine: panelista
- 10-11.05.2022 – połączone spotkanie Europejskich Akademii Młodych Uczonych (ang. European National Young Academies – ENYA) i ALLEA (ang. The European Federation of Academies of Sciences and Humanities), Bruksela, Belgia:
 - wystąpienie na sesji plenarnej ENYA pt. YASAS: The Young Academies Science Advice Structure
 - współorganizacja merytoryczna I prowadzenie łączonej sesji ENYA-ALLEA pt. „Trust in science”
- 26-27.05.2022 – Forum Akademii Grupy Wszechradzkiej (V4 Academies Forum), Budapeszt, Węgry – prelegent w sesji dot. aktywności młodych naukowców w Akademiach pt. „YASAS: The Young Academies Science Advice Structure"
- 01.07.2020 – European Science Open Forum Life, online: panelista w sesji "Brain drain, brain gain, brain circulation" na temat mobilności młodych naukowców
- 14.10.2019 - XVI Międzynarodowa Konferencja "Młodzież w Nauce - 2019", Mińsk, Białoruś: prelegent w sesji dot. działalności Akademii Młodych Uczonych

6.C Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

Poniżej podsumowano moją działalność w zakresie popularyzacji i upowszechniania koncepcji naukowych wśród społeczeństwa, uczelni wyższych oraz uczniów szkół podstawowych.

Wystąpienia i wydarzenia popularnonaukowe dla studentów

- Seminarium na XIII Ogólnopolskim Sympozjum Naukowego Koła Chemików Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Jeziory, Polska (16.03.2019): "Chemiczne narzędzia do wizualizacji analizów biochemicznych i ich interakcji w żywych komórkach"

- Seminaria w cyklu Do Science (oddolna inicjatywa spotkań z naukowcami w celu dyskusji ścieżek kariery naukowej – organizowana przez studentów i młodych naukowców)
 - 08.10.2018, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu - inauguracyjne seminarium poznańskiego oddziału inicjatywy Do Science
 - 06.04.2018, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa – seminarium na zaproszenie
- Wykład popularnonaukowy z cyklu ARS Chemiae dla studentów, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska (11.04.2018): „Sondy molekularne do badania analitów biochemicznych i ich interakcji w biologii”
- Wystąpienie na XVI International Scientific Conference "Youth in Science - 2019", Narodowa Akademia Nauk Białorusi, Mińsk, Białoruś (14.10.2019): “Polish Young Academy”
- Uniwersyteckie dni otwarte - sesja "*Chemonstrations*" w School of Chemistry, The University of Sydney, Australia. 02.2016 – jako główny organizator sesji dla studentów pierwszego roku kierunków ścisłych, obejmujące serię pokazów prowadzonych przez doktorantów

Seminaria i wykłady popularnonaukowe dla dorosłych

- Wykład i dyskusja na temat biomarkerów i medycyny zpersonalizowanej dla uczestników festiwalu muzycznego. 03.08.2018 - Akademia Sztuk Przepięknych - PolAndRock Festival, Kostrzyn, Polska
- Konferencja popularnonaukowa PAN z *Wieniawskiego zaprasza*. ICHB PAN, Poznań, Polska (13.12.2017) - organizator i prelegent: „Z Chemią przez Świat”
- Wykład otwarty w ramach cyklu *Inspiring Science*, Ultimo Library, Sydney, Australia (05.2016): "Seeing the invisible: MRI”

Wykłady popularnonaukowe i warsztaty dla uczniów

- Wykład i pokazy z okazji zbiórki charytatywnej, Zespół Szkół nr 15, Poznań, Polska (28.02.2018) – uczniowie w grupie wiekowej 7-11 lat.
- Wykład i pokazy pt. „Z Chemią przez Świat: zobaczyć niewidzialne”, Szkoła nr 3, Luboń, Polska (10.01.2018) – uczniowie w grupie wiekowej 12-14 lat.
- Wykład i pokazy z okazji Narodowego Tygodnia Nauki, Parramatta West Public School, Sydney, Australia (08.2016) – trzy spotkania dla różnych grup wiekowych 6-12 lat (ponad 300 uczniów)

Aktywność medialna:

- **Współautor artykułu pt. „Głos Młodych” w miesięczniku Forum Akademickie (FA 7-8/2022)** na temat Akademii Młodych Uczonych PAN: <https://miesiecznik.forumakademickie.pl/czasopisma/fa-7-8-2022/glos-mlodych%E2%80%A9/>
- **Wywiad w programie Eureka, w ramach cyklu Ludzie Nauki, Jedyńka Polskie Radio, 28.12.2020** – sondy fluorescencyjne do poszukiwania leków na COVID-19 (mój projekt badawczy finansowany w ramach programu Homing Fundacji na rzecz Nauki Polskiej), <https://jedyńka.polskieradio.pl/artukul/2648789>
- **Artykuł prasowy na portalu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (fnp.org.pl) dot. mojego projektu badawczego Homing na temat inteligentnych sond do poszukiwań leków na COVID-19, 16.12.2020** – artykuł został wykorzystany przez wiele portali do przygotowania materiałów prasowych na temat projektu, m.in.:

- portal Nauka w Polsce Polskiej Agencji Prasowej (17.12.2020: (<https://scienceinpoland.pap.pl/aktualnosci/news%2C85399%2Cinteligentne-sondy-do-poszukiwan-lekow-na-covid-19.html>))
- portal bankier.pl (16.12.2020)
<https://www.bankier.pl/wiadomosc/Naukowcy-z-Poznania-opracowuja-inteligentne-sondy-do-poszukiwan-lekow-na-Covid-19-8021440.html>
- portal pulsmedycyny.pl, 15.12.2020 <https://pulsmedycyny.pl/polscy-naukowcy-opracowuja-inteligentne-sondy-do-poszukiwan-lekow-na-covid-19-1103297>
- portal epoznan.pl, 15.12.2020, https://epoznan.pl/news-news-112888-poznanscy_naukowcy_opracowuja_inteligentne_sondy_do_poszukiwan_lekow_na_covid_19
- **Gość podcastu *Faceci w Kitlach, odcinek nr 7 pt. „Jak stworzyć lek?” (11.2020).***
- **Wypowiedzi w prasie międzynarodowej**
 - Artykuł pt. “Centralised hiring a barrier to research assessment reform”, autor: Ben Upton, Times Higher Education (21.12.2022)
 - Artykuł pt. “War in Ukraine poses stark choices for scientists”, autor: Richard A. Stone, Science, 03.03.2022 (vol. 375, issue 6584, pp. 942-943) ,

7. INNE INFORMACJE

7.A Projekty finansowane ze środków zewnętrznych jako kierownik zespołu (od 2018 roku)

- Kierownik projektu
 - 4 projekty naukowe finansowane przez polskie instytucje (mój budżet: >3,4 mln PLN)
- Kierownik / koordynator zadania:
 - 3 projekty naukowe finansowane z Komisji Europejskiej (mój budżet: 850 000 EUR)
 - 2 krajowe projekty infrastruktury badawczej (mój budżet: 30 mln PLN) – więcej w punkcie 7.B
- Współwykonawca: 5 projektów naukowych finansowanych przez polskie instytucje
- Współpraca w ramach środków własnych partnerów:
 - akademickich (z Wielkiej Brytanii i trzy z Niemiec) – mój budżet: 650 000 PLN
 - biznesowych (z Holandii, Niemiec i trzy z Polski) – mój budżet: 1.5 mln PLN

Więcej szczegółów na temat projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych można znaleźć w załączniku 5A - Wykaz osiągnięć (Punkty II.9 i III.5).

7.B Działania i osiągnięcia związane z infrastrukturą badawczą

Znaczącym osiągnięciem w mojej karierze jest utworzenie i kierowanie pierwszym w Polsce akademickiego **Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych** (ang. Centre for High Throughput Screening Studies). Obecnie, obok infrastruktury i ekspertyzy w obszarze wysokoprzepustowych badań przesiewowych, rozszerzyliśmy je także na obrazowanie ultrawysokorozdzielcze oraz chemię medyczną. Dzięki rozwojowi wyjątkowej ekspertyzy i

infrastruktury nakierowanej także na zaspokajanie najbardziej zaawansowanych potrzeb naukowo-badawczych i skutecznemu marketingowi naszych usług, udało się przekroczyć docelowe wskaźniki efektywności projektu (m.in. osiągnięcie samowystarczalności finansowej przy średnim przychodzie na klienta ok. 200 000 PLN i ok 2 mln PLN przychodu w pierwszym roku działania) ponad rok wcześniej niż zakładano.

- 1. W ramach finansowania infrastruktury badawczej pozyskałem i koordynowałem budżet 30 mln PLN.** W tym jako kierownik zadania w ramach projektu NEBI z Polskiej Mapy Infrastruktury Badawczej, pozyskałem finansowanie i zakupiłem jeden z tylko kilku na świecie mikroskopów fluorescencyjnych w technologii Miniflux z rozdzielczością < 5 nm (unikat w badaniach biomedycznych w ostatnich 20 latach w Polsce, najbardziej ekskluzywny ze sprzętów badawczych zakupionych przez Polskę w ostatnich latach - jako pierwsi na świecie zabezpieczyliśmy środki na jego zakup)
- 2. W Centrum w ciągu 2 lat udało mi się pozyskać ponad 20 projektów badawczych** do realizacji na naszej infrastrukturze (łączy budżet zadań prowadzonych przez nas w tych projektach to **ponad 5 mln zł**)
- 3. Brałem także udział w przygotowaniu 11 kolejnych projektów obejmujących zadania eksperymentalne na kwotę ok. 2.6 mln zł,** które koordynować będzie Centrum Wysokoprzepustowych Badań Przesiewowych a które są obecnie w trakcie oceny przez instytucje finansujące.

7.C Podsumowanie wystąpień seminaryjnych i konferencyjnych po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem aktywny udział w 18 naukowych konferencjach krajowych i międzynarodowych w Polsce, Australii, Czechach, Nowej Zelandii, USA i na Węgrzech, w tym 15-krotnie w formie prelekcji, z czego:

- 5-krotnie w formie wykładu na zaproszenie
- 6-krotnie w formie wystąpienia ustnego oraz
- 4-krotnie w formie krótkiego wystąpienia ustnego typu flash

W ramach tych konferencji jako młody naukowiec uzyskałem następujące wyróżnienia

- Najlepsza krótka prezentacja (2016, GRC - Metals in Medicine, Andover, USA),
- Najlepsza prezentacja wśród młodych naukowców (2015 ASMI Conference, Melbourne, Australia)
- Zaproszenie na konferencję jako jeden ze 100 najbardziej obiecujących młodych naukowców w Australii - Theo Murphy Australian Frontiers in Science - Materials for the 21st Century, from Design to Application, Melbourne Australia (09.12.2015)
- Trzy granty wyjazdowe na konferencje (2016: GRC Metals in Medicine, Andover, USA; EuroBIC-13, Budapeszt, Węgry; AsBIC-2016, Auckland, Nowa Zelandia)

Wygłosiłem także 16 wykładów seminaryjnych na zaproszenie w Polsce, Australii, Francji, Hiszpanii, Kazachstanie, Nepalu i w Niemczech.

Więcej informacji na temat moich wystąpień seminaryjnych oraz konferencyjnych znajduje się w Załączniku 5A – Wykaz osiągnięć (punkt II.7)

7.D Udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych po uzyskaniu stopnia doktora

1. Szkolenie i certyfikacja w metodzie zarządzania PRINCE2 (online, 2021)
2. Warsztaty AAAS Communicating Science Workshop (online, 2019)
3. S4D4Cs 2nd Networking Meeting "Towards a European Science Diplomacy Roadmap" (Berlin, Niemcy, 2019)
4. Jak skutecznie ubiegać się o granty ERC (ICHB PAN, Polska, 2018)
5. Warsztaty Nailing Grants dotyczące efektywnego pisania naukowego (Charles Perkins Centre, University of Sydney, Australia, 2016)
6. Warsztaty Science Pathways 2016: Future Leaders EMCR Forum Meeting (University of New South Wales, Australia, 2016)
7. Warsztaty analizy obrazu (Charles Perkins Centre, University of Sydney, Australia, 2016)
8. Warsztaty DeltaVision Elite & Szkolenie seminaryjne z Mikroskopii Wysokorozdzielczej (Westmead, Australia, 2015)
9. Semestralny kurs Preparing for a Career in Research & Innovation (University of Sydney, Australia, 2014)
10. Kurs Principles and Practice of University Teaching and Learning (University of Sydney, Australia, 2014)

7.E Nagrody i stypendia zdobyte po uzyskaniu stopnia doktora

1. **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców**, (2020 - 2024)
2. **Stypendium dla młodego wykładowcy** (ang. Postdoctoral Teaching Fellowship), **Faculty of Science, University of Sydney, Australia**, 32 000 AUD (przyznane w 2015 i 2016 roku).
3. **Roczne podoktorskie stypendium wyjazdowe** (ang. Outgoing Postdoctoral Research Fellowship) z *Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer* (Francja) na The University of Sydney, Australia (2014-2015)
4. **Trzyletnie stypendium doktoranckie z Ligue Nationale Contre le Cancer** (Francja) na ENS Lyon, Francja (2010-2012).

(podpis wnioskodawcy)

8. PEŁNA LISTA PUBLIKACJI NAUKOWYCH

Ref	Autorzy	Szczegóły	Rok	Cyt.*	IF***	DOI
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia						
P1	KG Leslie, JL Kolanowski, N Trinh, S Carrara, MD Anscorn, K Yang, CF Hogan, KA Jolliffe, EJ New	"Nicotinamide-Appended Fluorophores as Fluorescent Redox Sensors." Australian Journal of Chemistry, 73, 895-902	2019	2	1,073	10.1071/CH19398
P2	JL Kolanowski, LJ Dawson, L Mitchell, Z Lim, ME Graziotto, WK Filipek, TW Hambley, EJ New	"A fluorescent probe for investigating metabolic stability of active transplatin analogues" Sensors and Actuators B: Chemical, 255(3), 2721-2724	2018	10	5,667	10.1016/j.snb.2017.09.084
P3	IJ Carney, JL Kolanowski, Z Lim, B Chekroun, TW Hambley, EJ New	"A ratiometric iron probe enables investigation of iron distribution within tumour spheroids." Metallomics, 10(4), 553-556	2018	7	4,069	10.1039/c7mt00297a
P4	C Shen, JL Kolanowski, CM-N Tran, A Kaur, MC Akerfeldt, MS Rahme, TW Hambley, EJ New	"A ratiometric fluorescent sensor for the mitochondrial copper pool." Metallomics, 8(9), 915-919	2016	22	3,54	10.1039/c6mt00083e
P5	M Hu, KE Schulze, R Ghildyal, DC Henstridge, JL Kolanowski, EJ New, Y Hong, AC Hsu, PM Hansbro, PAB Wark, MA Bogoyevitch, DA Jans	"Respiratory Syncytial Virus co-opts host mitochondrial function to favour infectious virus production." eLife, 8:e42448	2019	20	7,551	10.7554/elife.42448.001
P6	KL Chong, BA Chalmers, JK Cullen, A Kaur, JL Kolanowski, BJ Morrow, K Fairfull-Smith, MJ Lavin, NL Barnett, EJ New, MP Murphy, SE Bottle	"Pro-fluorescent mitochondria-targeted real-time responsive redox probes synthesised from carboxy isoindoline nitroxides: Sensitive probes of mitochondrial redox status in cells." Free Radical Biology & Medicine, 128, 97-110	2018	10	6,02	10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.008
P7	JL Kolanowski, A Kaur, EJ New	"Selective and reversible approaches towards imaging redox signaling using small molecule probes." Antioxidants & Redox Signaling, 24(13), 713-730	2016	14	7,093	10.1089/ars.2015.6588
P8	A Kaur, JL Kolanowski, EJ New	"Reversible fluorescent probes of biological redox state." Angewandte Chemie International	2016	93	11,709	10.1002/anie.201506353

		Edition in English, 55(5), 1602-1613				
P9	JL Kolanowski, F Liu, EJ New	"Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology" Chemical Society Reviews, 47(1), 195-208	2018	215	40,182	10.1039/c7cs00528h
Inne publikacje nie wchodzące w skład osiągnięcia						
P10	BB Boumelhem, C Pilgrim, VE Zwicker, JL Kolanowski, JH Yeo, KA Jolliffe, EJ New, ML Day, SJ Assinder, ST Fraser	"Intracellular flow cytometric lipid analysis – a multiparametric system to assess distinct lipid classes in live cells." Journal of Cell Science, 135(5), jsc258322	2022	4	5,235	10.1242/jcs.258322
P11	A Zarecki, JL Kolanowski, WT Markiewicz	"Microwave-Assisted Catalytic Method for a Green Synthesis of Amides Directly from Amines and Carboxylic Acids." Molecules, 26(8), 1761	2020	12	3,267	10.3390/molecules25081761
P12	TJ Ozumerzifon, RF Higgins, JP Joyce, JL Kolanowski, AK Rappe, MP Shores	"Evidence for Reagent-induced Spin-State Switching in Tripodal Fe(II) Iminopyridine Complexes." Inorganic Chemistry, 58(12), 7785-7793	2019	10	4,85	10.1021/acs.inorgchem.9b00340
P13	P Brennecke, D Rasina, O Aubi, K Herzog, J Landskron, B Cautain, F Vincente, J Quintana, J Mestres, B Stechmann, B Ellinger, J Brea, JL Kolanowski, R Pilarski, M Orzaez, A Pineda-Lucena, L Laraia, F Nami, P Zielenkiewicz, K Paruch, E Hansen, JP von Kries, M Neuenschwander, E Specker, P Bartunek, S Simova, Z Lesnikowski, S Krauss, L Lehtio, U Bilitewski, M Bronstrup, K Tasken, A Jirgenson, H Lickert, MH Clausen, JH Andersen, MJ Vincent, O Genilloud, A Martinez, M Nazare, W Fecke, P Gribbon	"EU-OPENSREEN: A Novel Collaborative Approach to Facilitate Chemical Biology." SLAS Discovery, 24(3), 398-413	2019	8	2,058	10.1177/2472555218816276

P14	M Harris, JL Kolanowski, ES O'Neill, C Henoumont, S Laurent, TN Parac-Vogt, EJ New	"Drawing on biology to inspire molecular design: a redox-responsive MRI probe based on Gd(III)-nicotinamide." <i>Chemical Communications</i> , 54(92), 12986-12989	2018	6	6,29	10.1039/c8cc07092j
P15	Z Lim, DG Smith, JL Kolanowski, RL Mattison, JC Knowles, S-Y Baek, W Chrzanowski, EJ New,	"A reversible fluorescent probe for monitoring Ag(I) ions." <i>Journal of the Royal Society Interface</i> , 15(144), 20180346	2018	7	3,355	10.1098/rsif.2018.0346
P16	PJ Wright, JL Kolanowski, WK Filipek, EG Moore, S Stagni, EJ New, M Massi	"Versatility of Terpyridine-Functionalised Aryl Tetrazoles: Photophysical Properties, Ratiometric Sensing of Zinc Cations and Sensitisation of Lanthanide Luminescence" <i>European Journal of Inorganic Chemistry</i> , 55(S1), 5260-5270	2017	10	2,444	10.1002/ejic.201700663
P17	A Wu*, JL Kolanowski*, BB Boumelhem, R Lee, A Kaur, ST Fraser, EJ New, LM Rendina	"A New Carborane-Containing Fluorophore as a Stain of Cellular Lipid Droplets." <i>Chemistry - An Asian Journal</i> , 12(14), 1704-1708	2017	25	4,083	10.1002/asia.201700423
P18	K Yang*, JL Kolanowski*, EJ New	"Mitochondrially targeted fluorescent redox sensors" <i>Interface Focus</i> , 7(2), 20160105	2017	19	2,693	10.1098/rsfs.2016.0105
P19	ES O'Neill, JL Kolanowski, PD Bonnitca, EJ New	"A cobalt(II) complex with unique paraSHIFT responses to anions." <i>Chemical Communications</i> , 53(25), 3571-3574	2017	7	6,319	10.1039/c7cc00619e
P20	JL Kolanowski, C Shen, EJ New	"Fluorescent probes for the analysis of labile metals in brain cells." <i>White A. (editor) Metals in the Brain. Neuromethods</i> , vol. 124, 51-70. Humana Press, New York, NY	2017	1		10.1007/978-1-4939-6918-0_4
P21	ES O'Neill, JL Kolanowski, GH Yin, KM Broadhouse, SM Grieve, AK Renfrew, PD Bonnitca, EJ New	"Reversible Magnetogenic Cobalt Complexes." <i>RSC Advances</i> , 6(36), 30021-30027	2016	12	3,289	10.1039/c6ra04643f
P22	J Hasserodt, JL Kolanowski, F Touti	"Magnetogenesis in Water Induced by a Chemical Analyte." <i>Angewandte Chemie International Edition in English</i> , 53(1), 60-73	2014	31	11,336	10.1002/anie.201305662

P23	JL Kolanowski, E Jeanneau, R Steinhoff, J Hasserodt	"Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water." Chemistry – A European Journal, 19(27), 8839-8849	2013	11	5,696	10.1002/chem.201300604
P24	SN Tverdomed, J Kolanowski, E Lork, G-V Rösenthaller	"An Effective Synthetic Route to Ortho-Difluoromethyl Arylphosphonates: Studies on the Reactivity of Phosphorus- and Fluorine-Containing Functions." Tetrahedron, 67(21), 3887-3903	2011	22	3,011	10.1016/j.tet.2011.03.076

* bez autocytowań (baza Web of Science Core Collection z 20.12.2022)

** IF z roku poprzedzającego rok publikacji (baza Web of Science Core Collection)