

Podsumowanie głównego osiągnięcia naukowego

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

Opisane w tym wniosku osiągnięcie naukowe dotyczy skuteczniejszego wykrywania trudnych, biologicznie istotnych i słabo poznanych analitów bionieorganicznych, takich jak jony metali i reaktywne formy tlenu i azotu (RONS), w warunkach biologicznych za pomocą narzędzi fluorescencyjnych. Responsywne sondy fluorescencyjne są jednym z najbardziej intensywnie wykorzystywanych i obiecujących rodzajów narzędzi do badania procesów biologicznych i cieszą się szerokim zainteresowaniem społeczności badawczej. Większość z tych narzędzi nigdy nie została jednak ponownie wykorzystana w biologii głównie z powodu niewystarczającej charakteryzacji i ograniczonej wiarygodności. Aby rozwiązać ten problem, skupiłem się na trzech wymiarach: projektowaniu i rozwoju sond oraz metodologii / praktycznych protokołach ich stosowania. Dzięki wykorzystaniu nowych strategii projektowania i zachowaniu optymalnych kryteriów, udało mi się opracować sondy oparte na zoptymalizowanej specyficzności, tzw. ratiometryczności i zmianie czasu życia fluorescencji oraz stworzyć wiarygodne metodologie i protokoły zbierania i analizy danych w modelach biologicznych.

Opracowanie nowych kryteriów i podejść do projektowania i walidacji sond fluorescencyjnych do wykrywania analitów bionieorganicznych w modelach biologicznych. Ustanowiłem ściśle kryteria projektowania wysoce specyficznych sond do detekcji RONS poprzez poprawę zrozumienia zależności pomiędzy strukturą, reaktywnością i odpowiedzią fluorescencyjną. Ponadto opracowałem i opisałem szereg wymagań niezbędnych do projektowania odwracalnych sond i protokołów ich walidacji maksymalizujących ich niezawodność. Te teoretyczne prace i metaanalizy, które doprowadziły do przełomowych wniosków, przyczyniają się do powstania i skuteczniejszego wykorzystania bardziej niezawodnych narzędzi do wykrywania w modelach komórkowych trudnych w detekcji analitów.

Wykorzystanie zależności struktura-reaktywność-odpowieź fluorescencyjna do opracowania specyficznych sond dla analitów bionieorganicznych. Zademonstrowałem wykorzystanie pogłębionej analizy związku pomiędzy strukturą, reaktywnością i specyficznością odpowiedzi fluorescencyjnej do poprawy wiarygodności detekcji analitów bionieorganicznych na przykładzie konjugatów nikotynamidu i kumaryny oraz chelatorów kompleksów platyny. To doprowadziło także do opracowania specyficznej sondy RPt1 i opartego o nią testu mikropłytkowego, aby szybko i wiarygodnie oceniać stabilność analogów transplatyny z ligandami aryłowymi o potencjale terapeutycznym.

Projektowanie i zastosowanie niezawodnych sond do wiarygodnej detekcji analitów bionieorganicznych w kontekście biologicznym. W celu zaadresowania głównych ograniczeń większości narzędzi fluorescencyjnych, opracowałem oraz zastosowałem narzędzia i protokoły wykorzystujące pomiar sygnałów niezależnych od stężenia sondy. W tym celu opracowałem dwie sondy tzw. ratiometryczne o dużej wiarygodności detekcji labilnych form jonów metali (Fe(II), Cu(I)) w złożonych modelach biologicznych, w tym w sferoidach nowotworowych 3D czy też niewielkich zmian w mitochondriach i zastosowałem je do badań mechanizmów i efektywności terapii przeciwnowotworowych. Co więcej, wyeliminowałem szereg artefaktów pomiarowych w detekcji RONS przez dobór odpowiednich sond oraz protokołów eksperymentalnych i analizy danych. To pozwoliło na skuteczne monitorowanie stresu oksydacyjnego w mitochondriach komórek ludzkich zainfekowanych wirusem RSV niezależnie od zmieniającego się potencjału błonowego i potwierdzenie jego roli w rozwoju infekcji. Zademonstrowałem też możliwość zwiększenia wiarygodności pomiaru z wykorzystaniem sond opartych o zmianę intensywności fluorescencji przez pomiar zmian czasu życia fluorescencji w komórkach.

Wprowadzenie i postępy w projektowaniu sond dwuanalitowych do zastosowań biologicznych.

Usystematyzowałem teoretyczne podstawy projektowania nowego rodzaju sond fluorescencyjnych do wyrywania dwóch analitów jednocześnie. Sondy te mogą pogłębić nasze zrozumienie zależności między bioanalitami, gdyż dostarczają dotychczas niedostępnego, nowego wymiaru danych. W tym opracowaniu wykazałem, że dwuanalitowe muszą wykazywać specyficzną odpowiedź typu AND na dwa anality jednocześnie i zidentyfikowałem parametry niezbędne do zapewnienia ich kompatybilności ze środowiskiem biologicznym. Praca ta jest szeroko cytowana a od czasu jej ukazania się opublikowano dziesiątki nowych sond dwuanalitowych do zastosowania w biologii, opartych o nasze wytyczne.