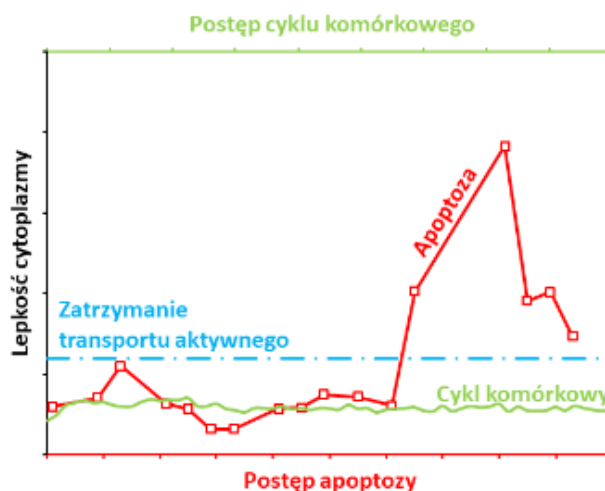


Pojęcia życia i śmierci towarzyszą człowiekowi od początku jego historii. Zdefiniowanie tych pojęć jest jednak trudne, gdyż brak jest jednoznacznych przesłanek rozgraniczających te dwa stany, a istnieją nawet organizmy niepasujące do większości definicji układów żywych (np. wirusy). Podobnie problematycznym jest określenie jednoznacznej granicy między życiem a śmiercią na poziomie pojedynczych komórek. W niniejszym projekcie prezentujemy hipotezę, iż **momentem granicznym, warunkującym śmierć komórki jest zahamowanie transportu wewnątrzkomórkowego** – a co za tym idzie – większości reakcji biochemicznych.

Proponujemy nowatorskie podejście do badania procesów wewnątrzkomórkowych, poprzez opis podstawowych fizycznych właściwości komórki. Żeby mogły zachodzić procesy życiowe (reakcje chemiczne) potrzebne jest przemieszczanie i zbliżanie się do siebie molekuł. Procesem warunkującym ruch biomolekuł jest dyfuzja, czyli samorzutny ruch cząstek. Natomiast lepkość jest właściwością ośrodka (cytoplazmy), która dyfuzję hamuje. Zespół Fizykochemii Miękkiej Materii w Instytucie Chemii Fizycznej PAN specjalizuje się w badaniu lepkości cytoplazmy komórkowej w skali nano (1-100 nm). Wieloletnia praca Zespołu pozwoliła zaobserwować stałość wartości nanolepkości cytoplazmy w różnych typach komórek oraz w trakcie trwania całego cyklu komórkowego – prawdopodobnie oznacza to istnienie nieznanego mechanizmu utrzymującego tę wartość na określonym optymalnym poziomie (ok. 2-4 lepkości wody w tych samych warunkach, dla małych białek, <40kDa). Ponadto zaobserwowaliśmy, że motory molekularne – białka warunkujące transport aktywny w komórce – ulegają zatrzymaniu przy niewielkim wzroście nanolepkości (do 6 lepkości wody). To doprowadziło do koncepcji, że **wzrost nanolepkości cytoplazmy oznacza zahamowanie procesów życiowych** i co za tym idzie – śmierć. Przeprowadziliśmy **badania wstępne, które wykazały, że programowanej śmierci komórkowej (apoptozie) towarzyszy wzrost nanolepkości >10 lepkości wody**. W niniejszym projekcie chcemy przeprowadzić systematyczne badania zaobserwowanego zjawiska.

W ramach projektu zbadana zostanie nanolepkość cytoplazmy w trakcie programowanej śmierci komórek: apoptozy oraz nekroptozy. Procesom tym zostaną poddane komórki o różnym wieku oraz pochodzeniu w celu zaobserwowania zjawisk uniwersalnych dla różnych typów tkanek. Zbadamy nanolepkość w różnych skalach długości (1-100 nm) oraz ruch cząstek w różnych skalach czasowych (od mikrosekund do sekund). Zastosujemy techniki korelacyjne: spektroskopię korelacji fluorescencji (FCS) oraz spektroskopię korelacji obrazu (RICS), które z powodzeniem są rozwijane w naszym laboratorium. Ponadto zastosowana zostanie nowa, komplementarna do FCS, technika analizy wolnych ruchów biomolekuł – BiWEC (rozwijana od podstaw w naszym Zespole). Efektem wymienionych prac będzie systematyczna analiza zmian ruchliwości składników wewnątrzkomórkowych we wszystkich skalach długości w trakcie apoptozy i nekroptozy. Prześledzimy ruch znanych próbników fluorescencyjnych, jak również natywnych składników autofluorescencyjnych. Ta druga strategia – wykorzystanie fluorescencji naturalnie występującej w komórkach – może zaowocować **nową techniką określania żywotności komórkowej, niewymagającą użycia barwnika (tzw. label-free assay)**. Techniki tego typu są poszukiwane w celu uproszczenia procedur oraz redukcji kosztów i ilości odpadów w badaniach toksykologicznych.



Rysunek: Wartości lepkości cytoplazmy (dla białka GFP) w różnych procesach życiowych. Linia zielona (cykl komórkowy) odzwierciedla wartości lepkości w trakcie niezaburzonego cyklu życia komórki ludzkiej. Linia niebieska (zatrzymanie transportu aktywnego) określa granicę, powyżej której zatrzymana zostaje kinezyzna-1 – motor molekularny odpowiedzialny za transport aktywny w komórce. Linia czerwona (apoptoza) obrazuje zmiany lepkości cytoplazmy w trakcie programowanej śmierci komórkowej – apoptozy (badania wstępne autorów projektu).