

Warszawa, 26th March, 2025

Autor rozprawy doktorskiej: **BIOPHYSICAL SYMPTOMS OF CELLULAR STRESS**

Promotor: **prof. dr hab. ROBERT HOLYST**

dr KARINA KWAPISZEWSKA

Streszczenie

Wewnątrzkomórkowa organizacja molekularna ma kluczowe znaczenie dla przetrwania komórki eukariotycznej. Przykładem jest cytoplazma komórkowa – płyn złożony, w którym zachodzą główne procesy biochemiczne, warunkujące funkcje takie jak wzrost komórki, podział i ruch. Czynniki stresowe powodują zakłócenia w organizacji wewnątrzkomórkowej, a przetrwanie komórki w czasie stresu zależy od zmian w jej właściwościach fizycznych i biologicznych. Poznanie zmian indukowanych stresem w złożonym, zatłoczonym płynie ujawnić może istotne informacje na temat regulacji głównych procesów komórkowych i ich roli w przetrwaniu komórki. Jednakże istnieje ograniczona liczba informacji na temat procesów biofizycznych w czasie stresu komórkowego. Metody oparte na fluorescencji, takie jak spektroskopia korelacji fluorescencji (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) i obrazowanie czasów życia fluorescencji (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM), są doskonałe do mierzenia dyfuzji, interakcji molekularnych oraz czasów życia fluorescencji rozpuszczalników w niskich stężeniach ($<1\ \mu\text{M}$) i małych objętościach ($<1\ \mu\text{l}$), co czyni je idealnymi narzędziami analitycznymi do tego badania.

Stres jest nieodłącznym elementem towarzyszącym organizmom żywym. Niezależnie od tego, czy chodzi o ograniczenia w dostępności składników odżywczych, zmiany w stanach utleniania/redukcji, wzrost stężenia cząsteczek cytotoksycznych, czy zmiany w zawartości wody – formy stresu są nieograniczone. Wybrałam dwa czynniki stresowe, które wpływają na wszystkie organizmy, bez względu na ich wielkość czy złożoność – głodzenie komórek i stres mitochondrialny. Badałam wpływ zewnętrznego stresu na właściwości biofizyczne komórek rakowych. Ta praca opisuje kluczową technikę przetrwania, stosowaną przez wszystkie żywe gatunki na Ziemi – zachowanie w odpowiedzi na stres.

W rozdziale dotyczącym głodzenia komórek identyfikuję tendencje w wewnątrzkomórkowym zatłoczeniu molekularnym oraz wpływie wody z cytoplazmy i jądra komórkowego podczas

przedłużonego braku dostępu do składników odżywczych. Pomiar FCS ujawnia wpływ zatłoczenia molekularnego na zmiany współczynników dyfuzji białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*, GFP). Bez tego wewnątrzkomórkowego ruchu/transportu cząsteczek z jednego miejsca na drugie komórki nie mogą funkcjonować. W rozdziale podkreślono kluczowe punkty, takie jak odpowiedź komórki na stres głodowy w ujęciu kompartmentalnym, koncentrując się na zmianach współczynników dyfuzji i mechanizmach oszczędzania energii. Jako rozszerzenie tych wyników, badane są efekty wyciszenia (ang. *knock-out*) genu kanału anionowego na dyfuzję GFP i homeostazę objętości komórki w komórkach HeLa. *Knock-out* genu został stworzony przy użyciu narzędzi edycji genów CRISPR-CAS9, a FCS zostało użyte do badania dyfuzji wewnątrzkomórkowej.

W rozdziale dotyczącym autofluorescencji komórkowej, mierzona jest odpowiedź komórki na „indukowaną śmierć komórkową” przez stres mitochondrialny. Mierzenie tych zmian jest istotne dla zrozumienia reakcji komórki na stres przed jej śmiercią. Przy użyciu FLIM, FCS i HPLC (ang. *high pressure liquid chromatography*), koncentruję się na wzmożonej autofluorescencji komórek rakowych na lek indukujący apoptozę - staurosporynę w dwóch różnych stężeniach.

Rozdział dotyczący deplecji ATP w komórce opisuje ograniczenia czujników ATP, z dużym naciskiem na nowo odkryty chemiczny czujnik ATP. Ponieważ głodowanie było koniecznym czynnikiem stresowym w tym badaniu, zmiany w poziomach ATP zostały uwzględnione jako zjawisko wzajemnie powiązane.