

Jedną z głównych przyczyn śmierci we współczesnym społeczeństwie jest niedotlenienie mięśnia sercowego oraz mózgu. Ostatnie badania wskazują, że bardzo ważną rolę w procesach śmierci komórek pełni mitochondria. Podstawową rolę mitochondriów, zwanych elektrowniami komórkowymi jest dostarczanie energii wykorzystywanej w wielu procesach życiowych. Okazuje się, że na skutek niedotlenienia tkanek mitochondria ulegają uszkodzeniu. Uruchamia to procesy śmierci komórkowej a w konsekwencji prowadzi do obumierania organów. Poszukiwania naturalnych mechanizmów, które mogą ochronić mitochondria przed uszkodzeniem w czasie niedotlenienia jest celem wielu badań. W ostatnich latach w mitochondriach zidentyfikowano białka regulujące przepływ jonów potasu przez ich wewnętrzną błonę – mitochondrialne kanały potasowe. Wydaje się, że właściwość tych kanałów potasowych z mitochondriów jest podobna do właściwości kanałów potasowych z błony komórkowej. Poprzednie badania wykazały, że otwarcie kanału za pomocą substancji farmakologicznych nazywanych aktywatorami kanałów potasowych może uruchomić procesy, które powodują ochronę mitochondriów przed uszkodzeniem spowodowanym różnymi czynnikami, w tym niedotlenieniem. Mechanizm tego procesu nie jest jeszcze do końca poznany.

W ostatnim czasie odkryto, że w komórkach, w niewielkich ilościach syntetyzowane są gazy (tlenek azotu, tlenek węgla czy siarkowodor), które mogą regulować pracę wielu białek, w tym niektórych kanałów potasowych. Badania wykazały, że związki te reagują z kanałami potasowymi, powodując ich otwarcie co wywołuje wiele efektów w komórkach, w tym cytoprotekcyjne. Nie wiadomo jednak czy gazotransmitery wpływają na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych. W związku z tymi obserwacjami celem prezentowanego projektu jest opisanie regulacji mitochondrialnych kanałów potasowych przez tlenek węgla, tlenek azotu oraz siarkowodor. Badania obejmą oddziaływanie wymienionych gazów z mitochondrialnym kanałem potasowym regulowanym jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>) a także mitochondrialnym kanałem potasowym regulowanym przez ATP (mitoK<sub>ATP</sub>).

Projekt podzielony jest na trzy cele badawcze. W ramach projektu opisane zostaną efekty wywoływane przez oddziaływanie wspomnianych gazów z kanałami. Ponadto, podjęta zostanie próba opisanie mechanizmu w jaki gazy te oddziałują z białkami tworzącymi por kanałów. Będzie to możliwe dzięki identyfikacji budowy molekularnej kanału mitoK<sub>ATP</sub> – odkryto, że kanał ten jest budowany przez białko ROMK2. Wygenerowane zostaną linie komórkowe ekspresjonujące zmutowane warianty białka ROMK2. Mutacje będą wprowadzone w potencjalnych miejscach oddziaływania gazów NO, CO i H<sub>2</sub>S z białkiem kanałowym. Następnie zostaną przeprowadzone badania opisujące efekty wywoływane przez gazotransmitery na kanał mitoK<sub>ATP</sub> budowany przez zmutowane białka. W ostatniej części projektu podjęta zostanie opisanie roli jak pełni gazy NO, CO i H<sub>2</sub>S w cytoprotekcji indukowanej przez kanał mitoK<sub>ATP</sub>.

Badania przeprowadzone będą z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych ekspresjonujących te kanały. W badaniach kanału mitoBK<sub>Ca</sub> modelem będzie komórki astrocytomy U-87 MG, natomiast w badaniach kanału mitoK<sub>ATP</sub> wykorzystana zostanie linia kardiomiocytów H9c2. Badania aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych przez gazy wykonywane będą z wykorzystaniem wyrafinowanej techniki elektrofizjologicznej – patch-clamp. Z komórek wyizolowane zostaną mitochondria, które poddane będą pod ciśnienie w celu wytworzenia mitoplastów. Tak uzyskane preparaty zostaną wykorzystane do rejestracji elektrofizjologicznych właściwości kanałów potasowych. W badaniach zostaną zastosowane tzw. chemiczne donory NO, CO oraz H<sub>2</sub>S. Związki te w roztworach wodnych ulegają rozkładowi generując odpowiednie gazy. Mutacje do sekwencji kodującej białko ROMK2 zostaną wprowadzone za pomocą metody zwanej „site specific mutagenesis” po czym zostaną wygenerowane linie komórkowej kodujące zmutowane białko. Aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub> tworzonego przez zmutowane białko ROMK2 i jego regulacja przez gazotransmitery zostanie przebadana w sposób opisany powyżej.

W ostatniej części projektu komórki zostaną poddane stresowi oksydacyjnemu oraz niedotlenieniu w celu uszkodzenia. Porównana zostanie przeżywalność komórek ekspresjonujących dziki wariant białka ROMK2 z komórkami posiadającymi zmutowane warianty tego białka. Poprzednie badania wykazały, że nadekspresja dzikiego białka ROMK2 chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. W celu stymulacji aktywności kanału mitoK<sub>ATP</sub> zostaną wykorzystane donory gazotransmiterów, a także znane substancje farmakologiczne modulujące aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub>. Wyniki badań uzyskane w czasie realizacji projektu pomogą w zrozumieniu naturalnych mechanizmów cytoprotekcyjnych istniejących w komórkach. Możliwe jest, że wyniki tych badań przysłużą się w przyszłości do opracowania nowych strategii terapeutycznych pomagających zmniejszyć negatywne skutki wywołane niedotlenieniem różnych tkanek, w tym komórek serca i mózgu.