

Niedotlenienie miśnia sercowego oraz mózgu jest jedną z głównych przyczyn śmierci we współczesnym społeczeństwie. Ostatnie badania wskazują na kluczową rolę mitochondriów w procesach cytoprotekcji komórek poddanych niedotlenieniu. Mitochondria otoczone podwójną błoną lipidowo – białkową pełni kluczową rolę w fizjologii komórki. Mitochondria są organellami, w których w procesie fosforylacji oksydacyjnej powstaje ATP będące źródłem energii wykorzystywanej we wszystkich procesach metabolicznych. Ponadto w mitochondriach zachodzi szereg innych istotnych procesów jak cykl Krebsa czy peroksydacja lipidów. Organella ta pełni również kluczową rolę w indukcji apoptozy. Jak wykazano w ostatnich latach, mitochondria aktywnie uczestniczą w zjawisku cytoprotekcji miśnia sercowego oraz komórek neuronalnych przed skutkami niedotlenienia. Kluczową rolę w tym procesie spełniają mitochondrialne kanały potasowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wykazano, że traktowanie miśnia sercowego aktywatorami mitochondrialnego kanału potasowego o dużej przewodności regulowanego jonami wapnia typu BK_{Ca} (kanał mitoBK_{Ca}) takimi jak NS1619 prowadzi do ochrony komórek serca przed skutkami niedotlenienia. Pomimo licznych badań mechanizm cytoprotekcji nie jest do końca poznany. Szereg badań wskazywało na obecność tego kanału w mitochondriach różnych tkanek, jednak molekularna budowa kanału nie była znana. Najnowsze badania zidentyfikowały izoformę podjednostki tworzącej por kanału BK-DEC jako podjednostkę kanału mitoBK_{Ca}. Nie wiadomo jednak czy ta izoforma tworzy funkcjonalny kanał. Ponadto badania przeprowadzone w Pracowni Wewnętrznych Kanałów Jonowych Instytutu Nenckiego wykazały regulację aktywności tego kanału przez mitochondrialny łańcuch oddechowy oraz zasugerowały bezpośrednią interakcję kanału z oksydazą cytochromu c. Te najnowsze odkrycia otwierają nowy etap badań nad mitochondrialną cytoprotekcją. Umożliwiają bowiem poszukiwanie odpowiedzi na kluczowe pytanie o sposób regulacji aktywności kanału oraz interakcje tego kanału z innymi białkami mitochondrialnymi. Wydaje się bowiem, na przykładzie kanału typu BK_{Ca} z błony plazmatycznej, że regulacja aktywności kanału jest bezpośrednio zależna od partnerów białkowych kanału.

W związku z powyższymi obserwacjami celem projektu jest zbadanie regulacji kanału mitoBK_{Ca} oraz interakcji tego kanału z innymi białkami mitochondrialnymi. Zakładamy, że zidentyfikowana podjednostka kanału BK_{Ca} (BK-DEC) wraz z podjednostkami regulatorowymi tworzy funkcjonalny kanał potasowy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Podejrzewamy, że funkcjonalny kanał mitoBK_{Ca} oddziałuje z łańcuchem oddechowym, a ta interakcja jest istotna dla regulacji aktywności kanału. Oczekujemy także, że przeprowadzone badania pozwolą na zidentyfikowanie nowych, nieznanych do tej pory białek oddziałujących z kanałem mitoBK_{Ca}, które mogą mieć istotny wpływ na aktywność kanału.

Planowane badania prowadzone będą w oparciu o dwa modele komórkowe - linię HEK293 oraz komórki gwiazdki U-87 MG. Poprzednie badania wskazują, że w komórkach HEK293 kanały typu BK_{Ca} nie są ekspresjonowane. Ponadto wyniki naszych wstępnych doświadczeń pokazują, że mitochondria tych komórek nie wykazują obecności innych kanałów potasowych. Umożliwia to ekspresję wybranych podjednostek kanału, w tym BK-DEC i badanie ich aktywności elektrofizjologicznej w mitochondriach. Komórki U-87 MG wykazują z kolei dużą aktywność kanału mitoBK_{Ca} co umożliwia wykorzystanie ich do izolacji kompleksu tworzącego kanał i identyfikacji partnerów. Ponadto wykorzystując najnowsze techniki edycji genomów komórek ssaczy (np. system CRISPR/Cas9) planowane jest wygenerowanie linii delecyjnych podjednostek kanału mitoBK_{Ca} oraz wybranych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego. Pozwoli to na charakterystykę regulacji aktywności i powstawania funkcjonalnego kanału. Planowane badania obejmą także elektrofizjologiczną (technika patch-clamp izolowanych mitoplastów) i biochemiczną charakterystykę mitochondriów izolowanych z uzyskanych linii komórkowych. Równoległe planowane jest oczyszczenie i charakterystyka kompleksów białkowych tworzonych przez kanał mitoBK_{Ca} a także identyfikacja nowych partnerów kanału mitoBK_{Ca}. Realizacja projektu wymaga będzie zastosowania różnorodnych technik m.in. elektrofizjologicznych, biochemicznych czy metod biologii molekularnej.

Spodziewamy się, że bezpośrednim efektem końcowym projektu może być lepsze zrozumienie opisane nowych mechanizmów cytoprotekcyjnych funkcjonujących w komórkach. Wiedza ta może być wykorzystana w przyszłości do opracowania nowych strategii terapeutycznych wykorzystujących szlaki metaboliczne uruchamiane przez aktywację mitochondrialnych kanałów potasowych.