

Rybonukleotydy purynowe (PNs) są niezbędne do życia, gdyż m.in. dostarczają energii do reakcji metabolicznych, np. ATP, oraz są monomerami RNA, syntetyzowanego podczas ekspresji informacji genetycznej. Co ciekawe, PNs działają zarówno jako bezpośrednie źródło energii użytecznej, a także jako regulatory wydajności biosyntezy ATP. W mitochondriach, często nazywanych elektrowniami komórki, zachodzi fundamentalny proces fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), sprzęgający zużycie tlenu z syntezą ATP dzięki aktywności łańcucha oddechowego. Regulowany i katalizowany przez odpowiednie komponenty łańcucha oddechowego obrót protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej jest kluczowy dla wydajnego zachowania energii w postaci ATP. Jednakże, transdukcja energii w mitochondriach jest procesem plastycznym i nigdy nie osiąga 100% efektywności z powodu tzw. "zwarć" w obiegu protonów (ang. *proton short-circuits*) nie związanych z syntezą ATP. Mitochondrialne białko rozprzęgające (UCP) oraz trnaslokazę nukleotydów adeninowych (ANT) uważa się za dwa główne katalizatory "bezproduktywnego" mitochondrialnego przecieku protonów. Z kolei pewna mitochondrialna kinaza, tj. kinaza difosforanów nukleozydów (mNDPK), równoważy pule PNs poprzez reakcje transfosforylacji. Wspólną cechą tych trzech białek, tj. mNDPK, UCP i ANT, jest zdolność wiązania PNs z różnym skutkiem. **Dlatego celem planowanego projektu jest ustalenie roli mNDPK w regulacji mitochondrialnego przecieku protonów zależnego od UCP i ANT. Istotę projektu stanowi poznanie skomplikowanej zależności pomiędzy wielkością mitochondrialnego przecieku protonów a rekrutacją mNDPK regulującą lokalne stężenie PNs. Nukleotydy te są z kolei potencjalnymi inhibitorami UCP oraz inhibitorami/substratami ANT.** Dotychczas całkowicie pomijano relację pomiędzy mNDPK a wielkością mitochondrialnego przecieku protonów. Charakterystyka fizjologicznych substratów, aktywatorów i inhibitorów mNDPK, UCP i ANT stanowi klucz do zrozumienia udziału mitochondrialnego przecieku protonów w utrzymywaniu homeostazy energetycznej komórki. Proponując wcześniej nieznaną funkcję mNDPK, projekt wyjaśni skomplikowany wpływ PNs na transdukcję energii w mitochondriach. Wyniki projektu dostarczą również informacji potrzebnych dla opracowania w przyszłości odpowiednich środków farmakologicznych normalizujących przeciek protonów w różnych stanach chorobowych człowieka i innych organizmów. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, dla mNDPK proponuje się funkcję molekularnego przełącznika o podwójnej naturze, tj. zaangażowanego w bioenergetykę oraz transfer fosfolipidów (zwłaszcza kardiolipiny) uwikłany w sygnalizację proapoptotyczną. Z kolei, zmienna wielkość przecieku protonów katalizowanego przez UCP, może być związana z takimi stanami patologicznymi jak: otyłość, cukrzyca typu 2, kacheksja, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimer'a i Parkinson'a), a nawet zmianami nowotworowymi.

Badania będą prowadzone na kilku organizmach modelowych, co pozwoli wyciągnąć wnioski ogólne dotyczące badanego problemu. Wykorzystane zostaną: (i) mikroorganizmy, w tym ameba *Acanthamoeba castellanii* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (nieposiadające UCP), oraz (ii) tkanki ssaków, tj. tkanki szczura (np. nerki i mięśnie szkieletowe) oraz komórki ludzkiego śródbłona. Nowatorskim podejściem będzie prowadzenie pomiarów mitochondrialnego przecieku protonów w warunkach przypominających warunki fizjologiczne, tj., promujących OXPHOS (bez inhibitorów OXPHOS) oraz w obecności wysokich stężeń nukleotydów adeninowych i guaninowych. Jedynym sposobem wyjaśnienia roli mNDPK w regulacji przecieku protonów zależnego od UCP i ANT jest selektywne wyłączenie transfosforylującej aktywności mNDPK przy równoczesnym zachowaniu możliwości importu PNs do mitochondrialnej macierzy oraz zachodzenia OXPHOS. W związku z tym, w ramach projektu zaplanowano eksperymenty z użyciem specyficznych inhibitorów mNDPK oraz wyciszenia genu mNDPK, które zweryfikują fizjologiczną rolę wybranych PNs jako inhibitorów mitochondrialnego przecieku protonów. Badania skupią się głównie na GDP, gdyż jego hamujący efekt na mitochondrialny przeciek protonów budzi największe kontrowersje. Projekt zakłada wykorzystanie zarówno izolowanych mitochondriów tzw. typu dzikiego (posiadających mNDPK i UCP) oraz mitochondriów o zmienionych cechach fenotypowych (*knockout* UCP2 u szczurów oraz wyciszenie genu mNDPK w komórkach ludzkiego śródbłona). Użycie szczurów typu *knockout* UCP2 pozwoli zbadać wpływ procesu transfosforylacji GDP na wielkość przecieku protonów niezależnego od UCP. Z kolei wyciszenie ekspresji mNDPK, przy wykorzystaniu komórek ludzkiego śródbłona, pozwoli ocenić efekt GDP na mitochondrialny przeciek protonów niezależnie od procesu transfosforylacji katalizowanej przez mNDPK. Projekt zakłada również przetestowanie w izolowanych mitochondriach (z funkcjonującą mNDPK) jak największej liczby zidentyfikowanych inhibitorów NDPK, np. kromoglikanu, leku powszechnie stosowanego w leczeniu astmy alergicznej. Pomiaru oddychania z tymi inhibitorami potwierdzą wyniki eksperymentów z wyciszeniem genu mNDPK. Ponadto, projekt zakłada również zweryfikowanie specyficzności substratowej mNDPK w warunkach przypominających warunki fizjologiczne oraz zbadanie wpływu stopnia redukcji mitochondrialnego koenzymu Q na aktywność mNDPK. Z kolei, funkcjonalna i molekularna charakterystyka mNDPK u ameby wyjaśni czy mechanizm transfosforylacji regulujący wielkość mitochondrialnego przecieku protonów powstał na wczesnych etapach ewolucji.