

Mitochondria, obok głównej funkcji jaką jest synteza komórkowej energii w formie ATP, pełnią szereg innych funkcji ważnych dla fizjologii komórki. U ludzi, zaburzenie którejkolwiek z nich prowadzi do chorób zwanych chorobami mitochondrialnymi. Choroby mitochondrialne powodowane są mutacjami w mitochondrialnym DNA (mtDNA), dziedziczonymi po matce, lub mutacjami w jądrowym DNA (nDNA). Mutacje w mtDNA to delecje, rearanżacje oraz mutacje punktowe w genach kodujących rRNA, tRNA czy białka kompleksów oddechowych wewnętrznej błony mitochondrialnej (13 u ludzi). Pomimo wielu charakterystycznych objawów defektów funkcji mitochondriów, diagnoza tych chorób jest trudna, z powodu ich ogromnej różnorodności i nasilenia, zależnych od rodzaju mutacji, poziomu heteroplazmii mtDNA u ludzi (procentowego udziału cząsteczek zmutowanego DNA w stosunku do tych typu dzikiego w komórce), czy chorej tkanki. Ponadto fenotyp tej samej mutacji zależy też od tła genetycznego.

By poznać mechanizm choroby na poziomie molekularnym wykorzystuje się organizmy modelowe i bez wątplenia drożdże *S. cerevisiae* są do tego celu najlepsze. Drożdże stosowane są jako model do badań podstawowych procesów i szlaków metabolicznych, umożliwiły zrozumienie mechanizmów molekularnych wielu chorób oraz apoptozy. Ich szczególne zalety, umożliwiające badanie funkcji mitochondrialnych, to zdolność do wykorzystywania fermentowalnych źródeł węgla i przeżycia nawet po utracie mitochondrialnego genomu. Są jedynym organizmem, w którym możliwa jest ukierunkowana mutageneza mtDNA, ponadto nie tolerują heteroplazmii - 100% cząsteczek mtDNA będzie w komórce drożdży zawsze tego samego typu, co pozwala badać skutki danej mutacji. Dzięki znajomości genetyki drożdży oraz inżynierii genetycznej moja pracownia jest jedną z dwóch-trzech na świecie, w której potrafimy wprowadzić konkretne mutacje do genomu mitochondrialnego tego organizmu. Dotychczas nasze badania koncentrowały się na mutacjach patologicznych w genie MT-ATP6, kodującym podjednostkę Atp6 kanału protonów syntazy ATP. Ten wielo-podjednostkowy enzym zlokalizowany jest w wewnętrznej błonie mitochondriów, wykorzystuje gradient protonów na tej błonie do syntezy ATP. Udowodniliśmy patogenny charakter dziewięciu mutacji w tym genie i pokazaliśmy mechanizm choroby dla każdej z nich. Wyniki naszego zespołu uzasadniają wybór drożdży jako organizmu modelowego, gdyż defekt w funkcjonowaniu syntazy ATP na skutek mutacji korelował z nasileniem objawów choroby u ludzi. Badania planujemy poszerzyć o podjednostkę Atp8 tego enzymu. U ludzi, 55 mutacji punktowych w genach MT-ATP6 i MT-ATP8 opisano dotychczas u pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Wraz z rozwojem technik sekwencjonowania DNA i wzrostem do nich dostępności, analiza sekwencji mtDNA jest obecnie powszechna i wzrasta liczba publikacji opisujących kolejne przypadki. Głównym pytaniem na jakie pozostaje znaleźć odpowiedź jest: czy są to mutacje patogenne czy polimorficzne?

W tym projekcie podejmiemy się analizy na poziomie molekularnym i biochemicznym skutków czternastu mutacji w genach MT-ATP6 i MT-ATP8, opisanych ostatnio u pacjentów, w drożdżach *S. cerevisiae* w celu i) zdefiniowania ich patogennego charakteru i mechanizmów chorób oraz ii) poznania funkcji podjednostki Atp8 syntazy ATP. Ponadto szczepy modelowe drożdży wykorzystamy do badania efektu nowych związków, wyizolowanych przez nas z biblioteki Prestwick jako potencjalne leki, na funkcjonowanie syntazy ATP w celu poznania ich mechanizmów działania.

Na modelu drożdżowym badamy następujące cechy komórek i syntazy ATP: wzrost drożdży zależny od oddychania komórkowego, stabilność mtDNA, poziom reaktywnych form tlenu, morfologię mitochondriów, zużycie tlenu przez całe komórki i wyizolowane mitochondria, efektywność syntezy i hydrolizy ATP, poziom potencjału na wewnętrznej błonie mitochondriów, stan złożenia/stabilność struktury syntazy ATP, poziom syntezy białek kodowanych mitochondrialnie. W ubiegłym roku udało się wreszcie uzyskać strukturę kanału protonów syntazy ATP wołu metodą kryo-elektromikroskopową. Wykorzystując ten model, badane mutacje wprowadzimy do struktury w celu analizy ich pozycji i patogenności *in silico*. Ta część pracy wykonana zostanie we współpracującym stale z naszym zespołem laboratorium prof. Jean-Paula di Rago, przez dr Alana Dautant.