

**Shur Karolina Galecka**

**Mitochondrialny kanał potasowy typu BK<sub>Ca</sub> o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapnia – budowa i interakcje**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni  
Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**Dr hab. Bogusz Kulawiak**

Warszawa, 2024



*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Promotorowi, dr hab. Boguszowi Kulawiakowi,  
za przekazaną wiedzę oraz opiekę merytoryczną.*

*Prof. dr hab. Adamowi Szewczykowi  
za życzliwość i opiekę.*

*Pracownikom i Doktorantom Pracowni Wewnątrzkomórkowej  
Kanałów Jonowych za pomoc, życzliwość i wspólnie spędzony czas.*

*Najdroższemu Mężowi za ogrom wsparcia.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania opisane w niniejszej pracy zostały sfinansowane w ramach projektu badawczego

Sonata Bis Narodowego Centrum Nauki 2015/18/E/NZ1/00737

(dla dr hab. Bogusza Kulawiaka)

Spis treści	
Indeks skrótów.....	8
1 Streszczenie .....	11
2 Abstract.....	12
3 Wstęp.....	13
3.1 Budowa mitochondriów komórek ssaczych .....	13
3.2 Podstawowe funkcje mitochondriów .....	16
3.3 Transport jonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną .....	21
3.4 Mitochondrialne kanały potasowe.....	22
3.4.1 Funkcja mitochondrialnych kanałów potasowych .....	25
3.5 Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia.....	27
3.5.1 Budowa kanału mitoBK <sub>Ca</sub> .....	28
3.5.2 Modulatory kanału mitoBK <sub>Ca</sub> .....	32
3.5.3 Interakcje kanałów typu BK <sub>Ca</sub> z innymi białkami .....	35
3.5.4 Kanał mitoBK <sub>Ca</sub> w fizjologii mitochondriów oraz cytoprotekcji.....	38
4 Założenia i cele.....	41
5 Materiały i metody .....	42
5.1 Wektory genetyczne wykorzystane w badaniach.....	42
5.2 Modele komórkowe wykorzystane w pracy.....	46
5.2.1 Linia komórkowa HEK293T .....	46
5.2.2 Linia komórkowa astrocytoma U-87 MG .....	47
5.3 Przejściowa transfekcja komórek eukariotycznych.....	47
5.4 Oczyszczenie RNA z komórek eukariotycznych .....	49
5.5 Synteza cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji .....	50
5.6 Zastosowane techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do analizy ekspresji wybranych genów .....	51
5.7 Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-qPCR).....	52
5.8 Mutageneza wybranych wektorów poprzez klonowanie DNA bez wykorzystania enzymów restrykcyjnych ( <i>restriction-free cloning</i> ) .....	53
5.9 Oczyszczanie plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych .....	55
5.10 Metody oczyszczania frakcji wzbogaconej w mitochondria.....	56
5.10.1 Oczyszczanie mitochondriów do eksperymentów elektrofizjologicznych .....	56
5.10.2 Oczyszczanie mitochondriów do eksperymentów biochemicznych .....	56

5.11	Identyfikacja potencjalnych partnerów białkowych podjednostek kanału BK <sub>Ca</sub> z wykorzystaniem biotynylacji białek .....	57
5.12	Koimmunoprecypitacyjne oczyszczanie białek (Co-IP) .....	60
5.13	Pomiar stężenia białka w próbkach .....	62
5.13.1	Pomiar stężenia białka metodą Bradforda .....	62
5.13.2	Metoda z zastosowaniem kwasu bitynchoninowego (BCA) .....	62
5.14	Metoda Western blot .....	63
5.14.1	Rozdział białek na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących Tricine SDS-PAGE .....	63
5.14.2	Elektroforeza Blue Native PAGE.....	64
5.14.3	Elektrotransfer białek na membranę PVDF oraz immunocytochemiczna identyfikacja wybranych białek.....	65
5.15	Znakowanie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego . .....	66
5.16	Technika patch-clamp.....	66
5.17	Analiza statystyczna .....	69
6	Wyniki .....	70
6.1	Charakterystyka mitochondrialnej izoformy kanału BK <sub>Ca</sub> : VEDEC .....	70
6.1.1	Analiza jakościowa ekspresji podjednostki $\alpha$ kanału BK <sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC .....	70
6.1.2	Aktywność kanałowa w mitochondriach komórek HEK293T .....	71
6.1.3	Właściwości biofizyczne kanału obserwowanego po transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK <sub>Ca</sub> .....	75
6.1.4	Regulacja aktywności kanału przez jony wapnia .....	78
6.1.5	Regulacja aktywności kanału tworzonoego przez izoformę VEDEC przez modulatory kanału mitoBK <sub>Ca</sub> .....	81
6.1.6	Analiza ekspresji podjednostki $\alpha$ i $\beta$ 4 kanału BK <sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC .....	87
6.1.7	Lokalizacja komórkowa izoformy VEDEC w komórkach HEK293T .....	91
6.1.8	Weryfikacja występowania podjednostki $\beta$ 4 w komórkach HEK293T .....	93
6.1.9	Podsumowanie.....	96
6.2	Identyfikacja białek oddziałujących z podjednostkami kanału BK <sub>Ca</sub> z wykorzystaniem techniki TurboID .....	98

6.2.1	Przygotowanie systemu do biotynylacji partnerów podjednostek kanału BK <sub>Ca</sub> /mitoBK <sub>Ca</sub> .....	99
6.2.2	Analiza funkcjonalności konstruktów kodujących enzym TurboID .....	102
6.2.3	Lokalizacja komórkowa podjednostki $\beta$ 4-TurboID kanału BK <sub>Ca</sub> .....	105
6.2.4	Identyfikacja partnerów białkowych podjednostki $\beta$ 4 w lizatach całokomórkowych .....	109
6.2.5	Identyfikacja partnerów białkowych podjednostki $\beta$ 4 we frakcjach wzbogaconych w mitochondria .....	115
6.2.6	Próba potwierdzenia wybranych, potencjalnych interakcji z podjednostką $\beta$ 4 kanału BK <sub>Ca</sub> .....	125
6.2.7	Identyfikacja oddziaływania kanałów typu BK <sub>Ca</sub> z białkiem TMX1 .....	138
6.2.8	Podsumowanie.....	147
7	Dyskusja .....	148
7.1	Izoforma VEDEC może tworzyć kanał mitoBK <sub>Ca</sub> .....	148
7.2	Identyfikacja białek oddziałujących z podjednostką $\beta$ 4 kanału BK <sub>Ca</sub> .....	154
8	Podsumowanie i wnioski .....	160
9	Bibliografia.....	161
	Wykaz publikacji Doktorantki.....	176
10	Załączniki .....	177

## Indeks skrótów

### A

- AAC** translokaza nukleotydów adeninowych (ang. *ADP/ATP carrier protein*)  
**ANT** transporter/translokaza nukleotydów adeninowych (ang. *adenine nucleotide translocator* lub ang. *ADP/ATP translocase*), inaczej AAC (ang. *ADP/ATP carrier protein*)  
**apoptoza** programowana śmierć komórki

### B

- BCA** kwas bicynchoninowy (ang. *bicinchoninic acid*)  
**BK-APS** (ang. *BK-Associated Proteins*)  
**BK<sub>Ca</sub>** kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany napięciem i jonami wapnia (ang. *big conductance calcium-activated potassium channels*)  
**BLM** technika czarnych błon lipidowych (ang. *black lipid membrane*)  
**BN-PAGE** elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem barwnika Coomassie Blue (ang. *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)  
**BSA** albumina surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin*)  
**B2M** β2-mikroglobulina (ang. *β2 microglobulin*)

### C

- CFTR** kanał chlorkowy  
**ChTx** charybdotoksyna  
**CICR** wypływ wapnia indukowany wapniem / mechanizm wzmacniający sygnał wapniowy (ang. *calcium induced calcium release*)  
**CLIC** wewnątrzkomórkowy kanał chlorkowy (ang. *Chloride Intracellular Channel*)  
**Co-IP** koimmunoprecypitacja (ang. *co-immunoprecipitation*)  
**Ct** cykl progowy (ang. *threshold cycle*)

### D

- DAPI** 4',6-diamidyno-2-fenylindol – fluorescencyjny barwnik DNA  
**DMEM** pożywka/medium hodowlane (ang. *Dulbecco's modified eagle medium*)  
**dsDNA** dwuniciowe DNA (ang. *double stranded DNA*)  
**DTT** 1,4-ditiotretitol (ang. *1,4-dithiothreitol*)

### E

- ECL** (ang. *enhanced chemiluminescence*)  
**ER** siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*)

### F

- FADH<sub>2</sub>** dinukleotyd flawinoadeninowy  
**FBS** płodowa surowica bydłowa (ang. *fetal bovine serum*)  
**FCCP** trójfluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (rozpręgacz fosforylacji oksydacyjnej)  
**FDA** amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

### G

- GAPDH** dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)  
**GFP** zielone białko fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)

### H

- HA** hemaglutynina wirusa grypy (ang. *human influenza hemagglutinin*)  
**HCN** kanał aktywowany hyperpolaryzacją i bramkowany cyklicznymi nukleotydami (ang. *hypopolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*)  
**H<sub>2</sub>CX** wymiennik sodowo-protonowy (ang. *hydrogen-calcium exchanger; H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*)  
**HEK** embrionalne komórki nerki (ang. *human embryonic kidney*)  
**HMOX2** oksygenaza hemu 2 (ang. *heme oxygenase 2*)  
**HRP** peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)  
**HT-22** mysie linie neuronalnych komórek hipokampa

### I

- I/R** ischemia/reperfuzja (ang. *ischemia/reperfusion*)  
**IbTx** iberiotoksyna (ang. *iberiotoxin*)  
**IK<sub>Ca</sub>** kanał potasowy regulowany jonami wapnia o średnim przewodnictwie (ang. *intermediate conductance calcium-activated potassium channels*)  
**IMAC** kanał selektywny na aniony (ang. *mitochondria inner membrane anion channel*)



**IMM** wewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *inner membrane*)  
**IMS** przestrzeń międzybłonowa (ang. *intermembrane space*)  
**IP3** trifosforanu inozytolu / inozytolotrisfosforan  
**IP3R** receptor trifosforanu inozytolu / inozytolotrisfosforan (IP3), kanał wapniowy

## K

**K<sub>2P</sub>** dwuporowe kanały potasowe (ang. *tandem pore domain potassium channels*)  
**K<sub>ATP</sub>** kanał potasowy blokowany przez ATP (ang. *ATP inhibited potassium channel*)  
**KCNMA1** gen kodujący podjednostkę  $\alpha$  tworząca por kanału BK<sub>Ca</sub> (ang. *potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1*), inaczej *Slo1*  
**KCNMB4** gen kodujący podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> (ang. *potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 4*)  
**KCO** aktywatory kanałów potasowych (ang. *potassium channel openers*)  
**Kv** kanał potasowy regulowany napięciem (ang. *voltage-gated potassium channel*)

## L

**LB** podłoże płynne (ang. *Luria Broth*)  
**LETM1** wymiennik Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> oraz wymiennik K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (ang. *leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1*)  
**LN229** linia komórkowa ludzkiego glejaka złośliwego mózgu

## M

**MAM** błony związane z mitochondriami (ang. *mitochondria-associated membrane*)  
**MCU** mitochondrialny uniporter wapniowy (ang. *mitochondrial calcium uniporter*)  
**Mfn2** mitofuzyna 2  
**MICOS** (ang. *mitochondrial contact site and cristae organizing system*)  
**MIM** mitochondrialna maszyna importowa (ang. *mitochondrial import machinery*)  
**MITOK** białko znane jako CCDC51; podjednostką tworząca por kanału mitoK<sub>ATP</sub> kodowana przez gen CCDC51 (ang. *coiled-coil domain-containing protein 51*)  
**mitoSlo2** aktywowany sodem mitochondrialny kanał potasowy (ang. *mitochondrial sodium-activated potassium channel*)  
**mPTP** nieselektywny megakanał mitochondrialny (ang. *mitochondrial permeability transition pore*)  
**mtDNA** mitochondrialne DNA

## N

**NADH** dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
**NCX** wymiennik sodowo-wapniowy (ang. *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*)  
**NMDAR** receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*)  
**NP-40** nonylofenoksylietoksyetanol (ang. *nonylphenoxy polyethoxy ethanol*)  
**NPo** prawdopodobieństwo otwarcia N liczby kanałów

## O

**OMM** zewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *mitochondrial outer membrane*)  
**OPA1** GTPaza dynamino-podobna (ang. *optic atrophy 1*)  
**ORF** otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)  
**OXPHOS** proces fosforylacji oksydacyjnej

## P

**PAM** motor importowy związany z translokazą ścieżki presekwencyjnej (ang. *presequence translocase-associated motor*)  
**patch-clamp** technika stabilizacji skrawka błony  
**Pax** paksylina (ang. *paxilline*)  
**PBS** buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffer solution*)  
**PCR** reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)  
**PEG** glikol polietylenowy (ang. *polyethylene glycol*)  
**PEI** polietylenoimina (ang. *polyethylenimine*)  
**PGD** domena bramkująca/filtr selektywności kanału (ang. *pore-gate domain*)  
**PM** błona plazmatyczna (ang. *plasma membrane*)  
**PMSF** fluorek fenylometylosulfonylu (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)  
**Po** prawdopodobieństwo otwarć (ang. *channels opening probability*)  
**pS** jednostka przewodności elektrycznej w układzie SI, odwrotność ohma. (ang. *picoSiemens*)  
**PVDF** polifluorek winylidenu (ang. *polyvinylidene difluoride*)  
**pz** para zasad (ang. *base pair*, bp)

## Q

**Q** koenzym Q / ubichinon

## R

**RaM** szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych (ang. *rapid uptake mode*)

**RCK1/RCK2** domeny wiążące wapń (ang. *regulator of conductance of K<sup>+</sup>*)

**RET** odwrotny transport elektronów / wsteczny przepływ elektronów (ang. *reverse electron transfer*)

**RF** klonowania bez użycia enzymów restrykcyjnych (ang. *restriction-free cloning*)

**RFT** reaktywne form tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

**ROMK** podjednostka tworząca por kanału mitoK<sub>ATP</sub> kodowana przez gen *KCNJ1* (ang. *renal outer medullary potassium channel*)

**ROS** reaktywne form tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

**RT-PCR** reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

**RT-qPCR** ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

**RyR** receptor rianodynowy

## S

**SCA7** ataksja rdzeniowo-mózdkowa-7 (ang. *spinocerebellar ataxia type 7*)

**SDH** dehydrogenaza bursztynianowa (ang. *succinate dehydrogenase*) / kompleks II łańcucha oddechowego / reduktaza bursztynian-Q (ang. *succinate-coenzyme Q reductase; SQR*)

**SDS** dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

**SDS-PAGE** elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SERCA** Ca<sup>2+</sup> ATP-aza zlokalizowana w błonie siateczki śródplazmatycznej (ang. *Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATP-ase*)

**SK<sub>Ca</sub>** kanał potasowy regulowany jonami wapnia o małym przewodnictwie (ang. *small conductance calcium-activated potassium channels*)

**SLC** białko transportowe (ang. *solute carrier*)

**Slo1** gen kodujący podjednostkę  $\alpha$  tworząca por kanału BK<sub>Ca</sub>, inaczej *KCNMA1*

**Slo2** aktywowany sodem mitochondrialny kanał potasowy (ang. *sodium-activated potassium channel*)

**SNAP25** białko związane z synaptosomem o masie 25 kDa (ang. *synaptosomal-associated protein 25*)

**SOC** pożywka do hodowli bakterii (ang. *super optimal catabolite repression*)

**SOD** dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)

**STREX** izoforma kanału BK<sub>Ca</sub> (ang. *STress axis-Regulated EXon*)

## T

**TASK-3** dwuporowy kanał potasowy (ang. *tandem pore-domain acid-sensitive potassium channel type 3*)

**TIM** translokaza błony wewnętrznej (ang. *translocase of the inner membrane*)

**T<sub>m</sub>** temperatura topnienia (ang. *melting temperature*)

**TMX1** przezbłonowe białko związane z tioredoksyną 1 (ang. *Thioredoxin-related transmembrane protein 1*)

**TOM** translokaza błony zewnętrznej (ang. *translocase of the outer membrane*)

**tRNA** transferowe RNA

## U

**UCP** białko rozprzegające

## V

**VCP** białka zawierającego walozynę (ang. *valosin-containing protein*)

**VDAC** napięciozależny nieselektywny kanał anionowy/poryna mitochondrialna (ang. *voltage dependent anion channel*)

**VEDEC** izoforma VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału mitoBK<sub>Ca</sub>

**VSD** domena wrażliwa na napięcie (ang. *voltage sensing domain*)

## INNE

**$\alpha 7$  nAChR** receptor nikotynowy

**$\Delta\mu\text{H}^+$**  siła protonomotoryczna / elektrochemiczny gradient protonowy

**$\Delta\text{pH}$**  gradient protonowy / gradient chemiczny

**$\Delta\psi$**  gradient elektryczny (ładunków) / potencjał błonowy

## 1 Streszczenie

Mitochondrialne kanały potasowe, zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, odgrywają istotną rolę w regulacji funkcji mitochondriów. Kanały te, obecne w różnych tkankach, takich jak serce, mózg czy mięśnie szkieletowe, kontrolują napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej, co wpływa na objętość mitochondriów, depolaryzację ich wewnętrznej błony oraz szybkość zużycia tlenu i syntezę reaktywnych form tlenu. Ich aktywacja chroni komórki przed uszkodzeniami wywołanymi niedokrwieniem i reperfuzją oraz reguluje metabolizm komórek nowotworowych.

Głównym obiektem badawczym w niniejszej pracy był mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowanych jonami wapnia, tzw. kanał mitoBK<sub>Ca</sub>. Aktywacja tego kanału zwiększa przeżywalność komórek w czasie niedokrwienia-reperfuzji komórek serca czy mózgu. Podstawowe właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanału mitoBK<sub>Ca</sub> odpowiadają właściwościom kanałów BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej. Kanał ten tworzą podjednostki  $\alpha$  oraz regulatorowe podjednostki typu  $\beta$ .

W pierwszej części pracy zweryfikowano hipotezę mówiącą, że izoforma VEDEC podjednostki  $\alpha$  może tworzyć kanał mitoBK<sub>Ca</sub>. Isoforma ta, będąca produktem alternatywnego składowania produktu genu *KCNMA1*, kodującego błonowe kanały BK<sub>Ca</sub>, jest kierowana do mitochondriów. Jednakże brak było bezpośrednich dowodów, że białko to tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach.

W pracy wykorzystano komórki HEK293T do ekspresji wariantu VEDEC, a następnie wykorzystując techniki patch-clamp mitoplastów rejestrowano aktywność kanału w mitochondriach. Po raz pierwszy stwierdzono, że przejściowa ekspresja izoformy VEDEC prowadzi do aktywności kanału o przewodnictwie  $290 \pm 3$  pS. Kanał był zależny od napięcia i aktywowany przez jony wapnia. Aktywność kanału była aktywowana przez NS11021 i hamowana przez heminę oraz paksylinę, które są znanymi modulatorami kanałów BK<sub>Ca</sub>. Eksperymenty immunofluorescencyjne potwierdziły częściową kolokalizację kanału z mitochondriami.

Uzyskane dane potwierdziły, że izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> tworzy funkcjonalny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dodatkowo, wykonane doświadczenia pokazały, że komórki HEK293T są obiecującym modelem doświadczalnym do badań mitochondrialnych kanałów potasowych.

W drugiej części pracy podjęto próbę identyfikacji nowych partnerów białkowych podjednostki regulatorowej  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub>. W związku z tym zastosowano biotynylację partnerów białkowych z wykorzystaniem ligazy TurboID sfuzjowanej z podjednostką regulatorową  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Identyfikacja białek biotynylowanych z wykorzystaniem spektrometrii mas ujawniła grupę białek będących potencjalnymi partnerami kanałów typu BK<sub>Ca</sub>. Jednym z białek oddziałujących z kanałem BK<sub>Ca</sub> okazało się białko TMX1 zlokalizowane we frakcjach błonowych łączących mitochondria oraz siateczkę śródplazmatyczną. Przeprowadzone badania wykorzystujące koimmunoprecypitację badanych białek oraz analizę Western blot wykazały oddziaływanie tego białka nie tylko z podjednostką  $\beta 4$ , ale też z izoformą VEDEC podjednostki  $\alpha$  tworzącą por kanału.

## 2 Abstract

Mitochondrial potassium channels, located in the inner mitochondrial membrane, play an important role in the regulation of mitochondrial function. These channels, present in various tissues, such as the heart, brain and skeletal muscles, control the influx of potassium ions into the mitochondrial matrix, which affects the volume of mitochondria, the depolarization of inner mitochondrial membrane, the rate of oxygen consumption and the synthesis of reactive oxygen species. Activation of mitochondrial potassium channels protects cells against ischemia/reperfusion damage and regulates the metabolism of cancer cells.

The main research object in this thesis was the mitochondrial large conductance calcium-activated potassium channel (mitoBK<sub>Ca</sub>). Activation of this channel increases cell survival during ischemia/reperfusion of heart or brain cells. The basic biophysical and pharmacological properties of the mitoBK<sub>Ca</sub> channel correspond to those of plasma membrane BK<sub>Ca</sub> channels. This channel is composed of  $\alpha$  subunits and regulatory  $\beta$ -type subunits.

In the first part of the thesis, the hypothesis that the VEDEC isoform of the  $\alpha$  subunit forms the mitoBK<sub>Ca</sub> channel was verified. This isoform is directed to mitochondria. It is a product of the *KCNMA1* gene alternative splicing – the same gene that encodes the BK<sub>Ca</sub> channels from plasma membrane. To this day there was no direct evidence that this protein can form a functional channel in mitochondria.

In this study, HEK293T cells were used to express the VEDEC variant. Then the channel activity in mitochondria was recorded using mitoplast patch-clamp technique. It was found for the first time that transient expression of the VEDEC isoform leads to channel activity with a conductance of  $290 \pm 3$  pS. The channel was voltage-dependent and activated by calcium ions. Channel activity was activated by NS11021 and inhibited by hemin and paxilline, known modulators of BK<sub>Ca</sub> channels. Immunofluorescence staining confirmed partial colocalization of the channel with mitochondria.

The obtained data confirmed that the VEDEC isoform of the BK<sub>Ca</sub> channel forms a functional channel in the inner mitochondrial membrane. Additionally, the experiments showed that HEK293T cells are a promising experimental model for the study of mitochondrial potassium channels.

In the second part of the thesis, an attempt was made to identify new protein partners of the  $\beta$ 4 regulatory subunit of the BK<sub>Ca</sub> channel. Protein partners were biotinylated using TurboID ligase fused to the  $\beta$ 4 regulatory subunit of the BK<sub>Ca</sub> channel. Identification of biotinylated proteins using mass spectrometry revealed potential partners of BK<sub>Ca</sub> channels. One of the proteins interacting with the BK<sub>Ca</sub> channel was the TMX1. The protein is located in the ER-mitochondria contact sites. Coimmunoprecipitation and Western Blot analysis of the protein showed an interaction of this protein not only with the  $\beta$ 4 subunit, but also with the VEDEC isoform of the  $\alpha$  subunit.

### 3 Wstęp

#### 3.1 Budowa mitochondriów komórek ssaczych

Mitochondria są organellami występującymi w komórkach zwierząt, roślin, grzybów oraz protistów. Mitochondria posiadają podwójną błonę lipidowo-białkową, a ich kształt i wielkość zależy od typu komórki, rodzaju tkanki lub organizmu oraz stanu metabolicznego komórki. Mitochondria mają wrzecionowaty lub kulisty kształt, a ich wielkość jest zmienna i z reguły długość mieści się w przedziale 1-4  $\mu\text{m}$  a szerokość 0,3-07  $\mu\text{m}$  [1].

Obecność dwóch błon białkowo-lipidowych pozwala na wyodrębnienie kilku przedziałów strukturalnych w obrębie mitochondriów. Niepofałdowana błona zewnętrzna mitochondriów (OMM, ang. *outer membrane*) oddzielona jest od wewnętrznej błony mitochondrialnej (IMM, ang. *inner membrane*) przestrzenią międzybłonową (IMS, ang. *intermembrane space*). Błona wewnętrzna jest silnie pofałdowana tworząc grzebienie mitochondrialne (ang. *cristae*). Obszar ograniczony wewnętrzną błoną mitochondrialną nazywany jest macierzą mitochondrialną (ang. *matrix*) [2]. [3]. Pofałdowanie mitochondrialnej błony wewnętrznej skutkuje znaczącym zwiększeniem jej powierzchni. Organizacja mitochondrialnej błony wewnętrznej możliwe jest dzięki obecności wyspecjalizowanych kompleksów białkowych. W szczególności istotna jest rola wielobiałkowego kompleksu MICOS (ang. *mitochondrial contact site and cristae organizing system*), oraz białka OPA1 (ang. *optic atrophy 1*), które w głównej mierze odpowiadają za powstawanie zagięć grzebieni mitochondrialnych w pobliżu błony zewnętrznej [4]. Z drugiej strony, charakterystyczny, wydłużony kształt grzebieni możliwy jest dzięki oligomeryzacji syntazy  $F_1F_0$ -ATP, która zlokalizowana jest na końcowej części grzebieni błony wewnętrznej. Organizacja błony wewnętrznej umożliwia zwiększenie efektywności fosforylacji oksydacyjnej [5]. Zaburzenia organizacji błony wewnętrznej mitochondriów, skutkujące ich dysfunkcją są jednym z czynników determinującym przekierowanie mitochondriów na drogę autofagii (tzw. mitofagii), umożliwiającej degradację uszkodzonej frakcji mitochondriów [6].

Dzięki obecności poriny mitochondrialnej zewnętrzna błona mitochondrialna jest przepuszczalna dla większości cząsteczek i jonów oraz peptydów i niewielkich białek. W przeciwieństwie do błony zewnętrznej transport przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest ściśle regulowany dzięki obecności wyspecjalizowanych białek takich jak transportery metabolitów czy kanały jonowe. Kontrolowany transport jonów i metabolitów

przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest niezbędny do utrzymania funkcji mitochondriów a tym samym całej komórki [7].

Mitochondria tworzą dynamiczną sieć ulegającą procesom łączenia (fuzji) oraz fragmentacji. Fragmentacja oraz łączenie się mitochondriów związane jest w dużej mierze ze stanem energetycznym komórki. Fragmentacja mitochondriów pozwala między innymi na ich sprawny transport w obrębie komórki do obszarów zwiększonego zapotrzebowania na ATP oraz do obszarów ze zwiększonym stężeniem jonów wapnia w cytozolu, w celu ich przejściowego magazynowania [6, 8]. Ponadto fragmentacja sieci mitochondrialnej jest sposobem na separację i degradację mitochondriów dysfunkcyjnych i nie spełniających swojej roli [4]. Proces fragmentacji sieci mitochondrialnej służy też odpowiedniej segregacji mitochondriów do komórek potomnych po podziale komórkowym [4, 9].

Mitochondria posiadają własne DNA (mitochondrialne DNA, mtDNA) oraz aparat transkrypcji i translacji dzięki czemu są organellami półautonomicznymi. DNA mitochondrialne występuje w wielu kopiach w postaci dwuniciowych, kolistych cząsteczek zlokalizowanych w macierzy mitochondrialnej. W przypadku komórek ludzkich genom mitochondrialny zawiera 37 genów. Kodują one 13 białek kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, 2 rybosomowe RNA (rRNA) oraz 22 transferowe RNA (tRNA), które uczestniczą w translacji mitochondrialnego DNA [10-12]. DNA mitochondrialne nie jest chronione przez histony przed czynnikami uszkadzającymi, w tym reaktywnymi formami tlenu (RFT; ang. *reactive oxygen species*, ROS) powstającymi dzięki aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego [11]. W przypadku uszkodzenia mtDNA, skutkującym pojawieniem się mutacji prowadzących do dysfunkcji mitochondriów, rozproszenie lub usunięcie cząsteczek mtDNA możliwe jest dzięki procesom fuzji i fragmentacji mitochondriów.

Obecność własnego DNA oraz posiadanie podwójnej błony białkowo-lipidowej są jednymi z argumentów świadczących o endosymbiotycznym pochodzeniu mitochondriów [13]. Uważa się, że symbiotyczne interakcja między bakterią a komórką gospodarza z biegiem czasu doprowadziła do znacznej utraty genomu bakterii. W trakcie ewolucji część genów stała się zbędna z powodu zmiany otaczającego środowiska na cytoplazmę gospodarza. Większość genomu, utrzymująca funkcję mitochondrium, została przeniesiona do genomu jądrowego. Transfer genów z mitochondrium do jądra komórki daje niższe ryzyko gromadzenia niekorzystnych mutacji.

Dzięki mechanizmom replikacji mtDNA możliwe jest syntetyzowanie kopii cząsteczek mtDNA, a kolejne mitochondria mogą powstać w wyniku separacji istniejącego organellum. W przypadku organizmów rozmnażających się płciowo, mitochondria dziedziczone są jedynie w oocytach komórek żeńskich [9].

Teoria endosymbiotyczna sugeruje, że mitochondria znalazły się wewnątrz organizmów, które były prekursorami dzisiejszych eukariontów, na drodze endosymbiozy  $\alpha$ -proteobacterium *Rickettsia prowazekii* [14]. Transfer genów mitochondrialnych do jądra komórki sprawił, że w efekcie mitochondria stały się półautonomiczne, uzależnione od gospodarza [15].

Mitochondrialny proteom składa się z około 1000-1500 białek, z których 99% jest kodowanych przez geny jądrowe i wymaga importu do mitochondriów [15-17]. Kluczowe role w tym procesie pełnią kompleksy TOM (translokaza błony zewnętrznej; ang. *translocase of the outer membrane*) i TIM22 oraz TIM23 (translokazy błony wewnętrznej; ang. *translocase of the inner membrane*). Kompleks TOM, znajdujący się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, rozpoznaje sekwencje kierujące i sortuje białka do odpowiednich przedziałów [18]. TOM40, główne białko tego kompleksu, ma strukturę  $\beta$ -baryłki, podobnie jak Sam50 i VDAC, które są homologami bakteryjnego BamA [19, 20]. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się kompleksy TIM23, TIM22, OXA1 i MIA, które wspomagają transport i integrację białek [17]. Większość białek mitochondrialnych powstaje jako białka prekursorowe z presekwencją na N-końcu, co umożliwia ich transport do mitochondrium [21]. Ich translokacja do macierzy wymaga potencjału transbłonowego IMM i odbywa się przez kompleks TIM23 oraz ATP-zależny motor PAM [18]. Po dotarciu do macierzy lub IMM presekwencje są usuwane przez peptydazę MPP. Niektóre białka integrują się z IMM bezpośrednio przez TIM23 lub są transportowane do macierzy, a następnie przy pomocy OXA1 do IMM [18]. Białka z motywami cysteinowymi przechodzą do przestrzeni międzybłonowej przez Tom40 w formie zredukowanej, gdzie kompleks MIA utlenia ich grupy cysteinowe, co umożliwia ich fałdowanie i zatrzymanie w IMS [18]. Białka o strukturze  $\beta$ -baryłki są kierowane do zewnętrznej błony przez Tom20, a następnie kompleks TOB/SAM, który rozpoznaje sygnał  $\beta$  i wbudowuje je do OMM [16]. Transport większości białek  $\alpha$ -helikalnych oraz tych z wieloma domenami przezbłonowymi odbywa się dzięki rozpoznaniu przez Tom70, a następnie kompleks MIM, znany także jako insertaza MIM, kieruje je do zewnętrznej błony mitochondrialnej [18, 22].

### 3.2 Podstawowe funkcje mitochondriów

Jedną z najlepiej opisanych funkcji mitochondriów jest synteza adenozyntrifosforanu (ATP) w procesie fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) [23]. Ponadto, w mitochondriach łączą się liczne komórkowe szlaki metaboliczne, szlaki sygnałowe oraz pełnią one istotną rolę w odpowiedzi na stres [24]. W macierzy mitochondrialnej przebiegają m. in. reakcje cyklu kwasu cytrynowego oraz  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych, a także część reakcji cyklu mocznikowego [25]. Poza tym mitochondria uczestniczą w syntezie hemu [26], glukoneogenezie, metabolizmie (syntezie i degradacji) aminokwasów [27] oraz formowaniu centrów żelazowo-siarkowych (Fe-S) [11, 28]. Mitochondria uczestniczą też w regulacji poziomu jonów wapnia w komórce, co jest kluczowe dla różnych procesów komórkowych, takich jak skurcz mięśni i sygnalizacja międzykomórkowa. Mitochondria odgrywają ważną rolę w regulacji apoptozy, czyli programowanej śmierci komórkowej, poprzez uwalnianie cytochromu c i innych czynników proapoptotycznych do cytoplazmy [29]. Proces apoptozy oraz utrzymywanie przez mitochondria komórkowej homeostazy jonów wapnia jest ze sobą ściśle związany [8].

Synteza ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej możliwa jest dzięki aktywności kompleksów łańcucha oddechowego zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W wyniku w glikolizy zachodzącej w cytoplazmie powstaje pirogronian, który jest transportowany do mitochondriów, gdzie przekształca się w acetylo-CoA, wchodząc do cyklu Krebsa, znanego również jako cykl kwasu cytrynowego. W cyklu Krebsa, który zachodzi w matriks mitochondrialnej, acetylo-CoA ulega serii reakcji enzymatycznych, prowadząc do powstania CO<sub>2</sub>, ATP, oraz wysokoenergetycznych związków dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) i dinukleotydu flawinoadeninowy (FADH<sub>2</sub>) będących głównymi substratami dla łańcucha oddechowego. Mitochondrialny łańcuch oddechowy, zwany również łańcuchem transportu elektronów, składa się z kompleksów białkowych I–IV, zbudowanych z wielu podjednostek białkowych, uszeregowanych zgodnie ze wzrastającym potencjałem oksydoredukcyjnym [1, 30].

W kompleksie I (oksydoreduktaza NADH-Q) następuje utlenienie NADH a elektrony przekazywane są na mitochondrialny koenzym Q (ubichinon, Q) w wyniku czego powstaje ubichinol. W kompleksie II (dehydrogenaza bursztynianowa), bursztynian ulega utlenieniu do fumaranu w wyniku czego powstaje FADH<sub>2</sub>, a elektrony pochodzące z tego związku również są przekazywane na koenzym Q. Następnie elektrony z ubichinolu przekazywane są na kompleks III (oksydoreduktaza Q-cytochrom c). Stąd elektrony transportowane



są przez małe białko – cytochrom c – na kompleks IV (oksydaza cytochromu c), który jest ostatnim elementem łańcucha oddechowego. Zachodzi w nim redukcja jednej cząsteczki tlenu ( $O_2$ ) do dwóch cząsteczek wody ( $H_2O$ ) (z wykorzystaniem czterech elektronów). Transport elektronów wewnątrz kompleksów jest możliwy dzięki centrom żelazowo-siarkowym (Fe-S). Jony żelaza w tych centrach zmieniają stopień utlenienia z  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  [30]. Podczas transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego, protony są pompowane w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej ze strony macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej przez kompleksy I, III i IV. Z tego powodu te kompleksy łańcucha oddechowego nazywa się także pompami protonowymi. Kompleks II to enzym, który nie transportuje protonów do przestrzeni błonowej i nie generuje gradientu protonowego [31]. Na skutek pompowania elektronów przez łańcuch tworzy się gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej (gradient chemiczny,  $\Delta pH$ ), a pH macierzy mitochondrialnej osiąga wartości około 7,8, natomiast w przestrzeni międzybłonowej wartość pH waha się od 6,9 do 7,4 [32, 33]. Równoległe z gradientem pH powstaje gradient elektryczny (potencjał błonowy,  $\Delta\psi$ ) ujemny od strony macierzy mitochondrialnej i może osiągać wartość około 150-180mV. Gradient protonowy wytworzony na skutek aktywności łańcucha oddechowego wykorzystywany jest do syntezy ATP. Protony, zgodnie z gradientem powracają do macierzy mitochondrialnej przez kanał syntazy ATP, a uwolniona energia powoduje rotację pierścienia syntazy ATP i tym samym umożliwia podjednostce katalitycznej syntazy ATP fosforylację ADP [34]. Zgodnie z hipotezą chemiosmotyczną Petera Mitchella suma gradientów chemicznych i elektrycznych stanowi siłę protonomotoryczną (elektrochemiczny gradient protonowy,  $\Delta\mu H^+$ ) niezbędną do syntezy ATP [35].

W trakcie aktywności łańcucha oddechowego może dojść do przejścia elektronów bezpośrednio na tlen skutkując powstaniem reaktywnych form tlenu. RFT mogą indukować zmiany w strukturze i funkcji związków biologicznych, w tym lipidów, kwasów nukleinowych czy białek. Działanie RFT może mieć funkcje sygnałowe, jednak utrzymująca się wysoka, niekontrolowana synteza RFT przez mitochondria może indukować stres oksydacyjny i w skrajnych przypadkach może doprowadzić do śmierci komórki. Nieprawidłowa, nadmierna synteza RFT przez mitochondria na skutek ich dysfunkcji leży u podłoża wielu chorób [36].

Synteza RFT jest naturalnym procesem zachodzącym w mitochondriach i jest regulowana przez wiele czynników [37]. Jednym z istotnych czynników decydujących o syntezie RFT przez mitochondria jest poziom zredukowania łańcucha oddechowego.

Wiele wskazuje na to, że im wyższy poziom zredukowania tym większa jest synteza RFT [37]. W niektórych sytuacjach synteza RFT może zwiększać się w sposób niekontrolowany na przykład przez tzw. odwrotny transport elektronów (RET, ang. *reverse electron transfer*) [38]. W tym przypadku na elektrony mogą być transportowane z kompleksu II na kompleks I, skutkując znaczącą syntezą RFT. Stopień tworzenia reaktywnych form tlenu przez RET do kompleksu I jest regulowany przez zmiany potencjału błonowego. Proces odwrotnego transportu elektronów wymaga wysokiego potencjału błonowego, a rozprężanie potencjału błonowego zmniejsza produkcję RFT. [39]. Proces odwrotnego przepływu elektronów zaobserwowano w czasie ischemii/reperfuzji serca na skutek nagromadzenia się bursztynianu podczas niedotlenienia i braku aktywności łańcucha oddechowego na skutek obniżenia się stężenia tlenu [40]. Innym przykładem może być aktywacja komórek mikrogleju, w czasie której zaobserwowano zwiększenie ilości kompleksu I oraz II a spadek kompleksów III i IV, co skutkuje powstawaniem zwiększonych ilości RFT na skutek odwrotnego przepływu elektronów [41].

Zwiększoną syntezę RFT można również zaobserwować na skutek ograniczenia przepływu elektronów przez kompleksy łańcucha przez jego inhibitory, np. poprzez blokowanie kompleksu I przez rotenon [38], kompleksu III przez antymycynę A oraz w niektórych sytuacjach wybranymi inhibitorami kompleksu II. Antymycyna A uniemożliwia przeniesienie elektronu z ubisemichinonu ( $Q^{\cdot-}$ , niestabilna forma ubichinonu) i tym samym przyczynia się do jego akumulacji [39, 42].

Reaktywne formy tlenu, podobnie jak jony wapnia mogą aktywować mitochondrialny megakanał PTP (mPTP; ang. *mitochondrial permeability transition pore*). Aktywacja PTP przez oba te czynniki może doprowadzić do niekontrolowanej utraty potencjału błonowego i uwolnienia czynników indukujących apoptozę [43, 44].

Stres oksydacyjny może być spowodowany bezpośrednio lub pośrednio przez reaktywne formy tlenu. Mitochondria, jako miejsce powstawania reaktywnych form tlenu, są jako pierwsze narażone na ich szkodliwe działanie, dlatego w mitochondriach występują mechanizmy antyoksydacyjne chroniące te organella przed uszkodzeniem. W pierwszej kolejności zapobiegają powstawaniu RFT, a w drugiej usuwają już powstałe. W system antyoksydacyjny wchodzi białka enzymatyczne, nieenzymatyczne i związki niskocząsteczkowe. Jednym z mitochondrialnych enzymów antyoksydacyjnych jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*) zależna od manganu (MnSOD) oraz dysmutaza ponadtlenkowa zależna od cynku i miedzi (Cu/ZnSOD). Dysmutaza

ponadtlenkowa to enzym katalizujący reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2 \cdot^-$ ) do tlenu ( $O_2$ ) i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Dysmutację nadtlenu wodoru, do bezpiecznych dla komórki związków (głównie wody) przeprowadza katalaza, peroksydaza glutationowa oraz peroksyredoksyny (szlak tioredoksyny). [45]. Innymi czynnikami antyoksydacyjnymi są glutation, askorbinian oraz  $\alpha$ -tokoferol (witamina E) [46, 47].

Jednym z czynników przyczyniających się do powstawania reaktywnych form tlenu jest, wcześniej wspomniany, wysoki potencjał w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wytworzony przez pompy protonowe gradient elektrochemiczny częściowo ulega niespecyficznemu rozproszeniu poprzez przeciek protonów do macierzy mitochondrialnej (ang. *proton leak*) z udziałem niektórych białek wewnętrznej błony mitochondrialnej np. ANT (translokaza nukleotydów adeninowych, inaczej AAC – ang. *ADP/ATP carrier protein*) czy białek z rodziny UCP (białko rozprzegające, ang. *uncoupling proteins*) należące do rodziny transporterów SLC25 (SLC, ang. *solute carrier*) [48, 49][50]. Białka te pozwalają na powrót protonów do macierzy mitochondrialnej, z udziałem wolnych kwasów tłuszczowych i w efekcie obniżony zostaje potencjał błonowy [39, 51]. Kwasy tłuszczowe mogą odpowiadać za nawet 30% przecieku protonów, a początkowo podejrzewano, że działają jako protonofor lub przyspieszają już istniejącą drogę przecieku protonów [52].

Reaktywne formy tlenu pełnią też istotne dla komórki funkcje. Niewielki poziom RFT zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego pochodzenia (np. anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru) jest niezbędny w wielu procesach biochemicznych. Mitochondrialne RFT pełnią rolę cząsteczek sygnałowych w ścieżkach sygnalizacji redoks, modyfikują działanie wielu szlaków, wywołują zmiany metabolizmu w różnych przedziałach komórki, wpływają na proliferację, różnicowanie, przyleganie komórki do podłoża, także wpływają na proces śmierci komórki [53-55]. Zdolność do przeprowadzenia śmierci autofagalnej jest jednym z kluczowych procesów dla prawidłowego funkcjonowania tkanek oraz całego organizmu. W warunkach stresu środowiskowego lub sytuacjach patologicznych ma na celu przywrócenie w obieg substratów. W autofagii wywołanej niedoborem składników odżywczych następuje wzrost reaktywnych form tlenu, które są niezbędnymi cząsteczkami sygnałowymi, w odpowiedzi na dany niedobór. [56, 57].

Mitochondria pełnią też kluczową rolę w buforowaniu jonów wapnia. Jony te jako przekaźniki sygnałowe, aktywując enzymy i kontrolując procesy metaboliczne regulują niemal wszystkie procesy życiowe, takie jak cykl komórkowy, apoptozę, przewodnictwo nerwowe czy skurcz mięśni. Zarówno niedobór  $Ca^{2+}$  (poprzez stres retikularny) oraz nadmiar  $Ca^{2+}$

w cytozolu mogą prowadzić do śmierci komórki. Zaburzenia stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  mogą powodować między innymi deregulację cyklu komórkowego, choroby neurodegeneracyjne, zaburzenia mięśniowe, a także wpływać na rozwój nowotworów [58, 59].

Stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w płynie międzykomórkowym wynosi około 1-5 mM, znacznie więcej niż w cytozolu (100 nM). Równowaga jonów wapnia jest precyzyjnie regulowana i polega na usuwaniu ich z komórki lub magazynowaniu w siateczce śródplazmatycznej, które są głównym magazynem tych jonów w komórce. Jony wapnia mogą występować w formie wolnej, związanej z białkami pełniącymi funkcję sensorów (kalmodulina) lub buforującą (np. kalretikulina, kalneksyna, Grp78, kalcystoryna, kalsekwesteryna i parwalbumina) [8, 60].

Jony wapnia uwolnione do cytozolu między innymi z siateczki śródplazmatycznej, są w bardzo szybkim tempie akumulowane w mitochondriach. Transport przez mitochondrialną błonę zewnętrzną możliwy jest dzięki porynie mitochondrialnej (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*), która jest nieselektywnym kanałem zależnym od napięcia, i umożliwia transport większość jonów i metabolitów. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej za napływ jonów wapnia do macierzy odpowiada uniporter wapniowy (MCU; ang. *mitochondrial calcium uniporter*), aktywowany podwyższonym stężeniem wapnia. MCU pobiera jony wapnia do mitochondrium w sposób szybki i zależny od wysokiego stężenia jonów wapnia w cytozolu (powyżej 10  $\mu\text{M}$  w domenie ER-mitochondria). MCU współdziała z białkiem LETM1 (ang. *leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1*), który pełni rolę wymiennika wapń-proton (działającym na zasadzie antyportu) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [61]. W porównaniu do MCU, transport przez LETM1 zachodzi przy niższych stężeniach jonów wapnia (poniżej 100 nM). Ten wymiennik prawdopodobnie działa także jako wymiennik proton-potas (ang.  $\text{K}^+/\text{H}^+$  *exchanger*) [62]. Wiele wskazuje również na to, że napływ jonów wapnia może być regulowany przez białka rozprzegające, w tym UCP2 czy UCP3 [63, 64]. Do rodziny białek LETM1 należą też mitochondrialne antyportery mHCX (HCX; ang. *hydrogen-calcium exchanger; H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*) [62, 64, 65]. Usuwanie jonów wapnia z mitochondriów jest zapewnione przez wymienniki sodowo-wapniowe (NCX; ang. *sodium-calcium exchanger; Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*) lub proton-wapń [66]. Ponadto, pojawiły się sugestie, że w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek serca szczura obecny jest mitochondrialny receptor rianodyny RyR1 (ang. *mitochondrial ryanodine receptors, mRyR*) [67, 68]. Większość receptorów RyR znajduje się w siateczce sarkoplazmatycznej serca i odpowiada za mechanizm wzmacniający sygnał wapniowy

(wplyw wapnia indukowany wapniem, CICR ang. *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*). Mitochondrialny receptor RyR pozwala na szybki naplyw jonow wapnia do mitochondrium przy niskim stężeniu, a wysokie stężenie jonow wapnia hamuje jego aktywność [64, 68]. Prawdopodobnie receptory te mogą pelnić w mitochondriach rolę zapobiegawczą przed przeładowaniem mitochondriów jonami wapnia oraz pęcznieniem [64, 67].

Akumulacja jonow wapnia w macierzy mitochondrialnej wplywa bezpośrednio na aktywność mitochondriów. Jony wapnia, mogą wplywać na cykl Krebsa poprzez dzialanie na dehydrogenazę pirogronianową, izocytrynianową i  $\alpha$ -ketogluutaranową, co może przyspieszać fosforylację oksydacyjną i umożliwia efektywne wytwarzanie ATP potrzebne do utrzymania homeostazy jonowej [69]. Z drugiej strony, zbyt duże stężenia jonow  $Ca^{2+}$  może skutkować indukacją apoptozy mitochondrialnej aktywując PTP [70]. Zanim jednak do tego dojdzie w sytuacji przedłużonego stresu oksydacyjnego mPTP wykazuje krótkie okresy zamknięcia i otwarcia, co powoduje fluktuacje  $\Delta\Psi_m$  i uwalnia część zakumulowanych jonow  $Ca^{2+}$  [64, 71]. Ponadto w mitochondriach występują kalpajny będące, aktywowanymi przez jony wapnia, enzymami proteolitycznymi zawierającymi motywy „EF-hand” mogącymi dzialać pro-apoptotycznie [60].

Szybkim transferowi jonow wapnia do mitochondriów z siateczki śródplazmatycznej sprzyja fizyczne oddziaływanie tych organelli. Ważną rolę w tym procesie odgrywają tzw. domeny MAM (ang. *mitochondria-associated membrane*), czyli obszary bliskiego kontaktu między błonami mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej [72]. Domeny MAM są stabilizowane przez białka opiekuńcze, takie jak Grp75. Za strukturalną integralność tych domen odpowiadają również mitofuzyna 2 (Mfn2) oraz inne białka [73, 74]. Komunikacja między mitochondriami i ER za pośrednictwem MAM jest istotna nie tylko dla utrzymania homeostazy jonow  $Ca^{2+}$ , ale także dla dynamicznej struktury mitochondriów i procesow autofagii [75]. Dodatkowo, siateczka śródplazmatyczna łączy się z mitochondriami poprzez kompleksy białkowe, takie jak drożdżowy ERMES (ang. *ER-Mitochondria Encounter Structure*), co umożliwia wymianę fosfolipidow między tymi organellami i wspomaga utrzymanie równowagi lipidowej [2].

### **3.3 Transport jonow przez wewnętrzną błonę mitochondrialną**

Zewnętrzna błona mitochondrialna wykazuje niewielką polaryzację i jest niemal całkowicie przepuszczalna dla jonow, głównie dzięki obecności VDAC. Transport jonow przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest ściśle kontrolowany, a potencjał w poprzek

wewnętrznej błony mitochondrialnej stanowi siłę napędową do napływu kationów do macierzy mitochondrialnej. Przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, poza protonami i jonami wapniowymi, odbywa się ruch jonów potasowych, sodowych, chlorkowych, magnezowych i anionów organicznych i nieorganicznych.

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej zidentyfikowano m. in. anioselektywny kanał IMAC (ang. *mitochondria inner membrane anion channel*, kiedyś nazywany *mitochondrial Centum picoSiemens* – mCS – *channel* lub 107 pS) umożliwiający transport anionów. Transportuje zarówno aniony jednowartościowe (np.  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) jak i wielowartościowe (np. cytrynian, jabłczan,  $\text{ATP}^{4-}$ ). Jest on zależny od napięcia, pH oraz jest regulowany przez jony magnezu. Bierze udział w regulacji objętości mitochondriów [76]. Ponadto, opisano także kanały chlorkowe w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w tym CIC oraz CLIC. CIC jest kanałem zależnym od napięcia [77]. Do lepiej poznanych należy wewnątrzkomórkowy kanał chlorkowy CLIC (ang. *chloride intracellular channel*) [7]. Są to białka, które mogą występować zarówno w formie rozpuszczalnej jak i wbudowane w błonę. Białka CLIC 4 i CLIC5, to dwie z sześciu izoform tego kanału, który lokalizuje się w mitochondriach [78]. Ostatnie badania na kardiomiocytach zasugerowały jednak, że CLIC4 lokalizuje się w MAM od strony ER, a nie w błonach mitochondriów [74].

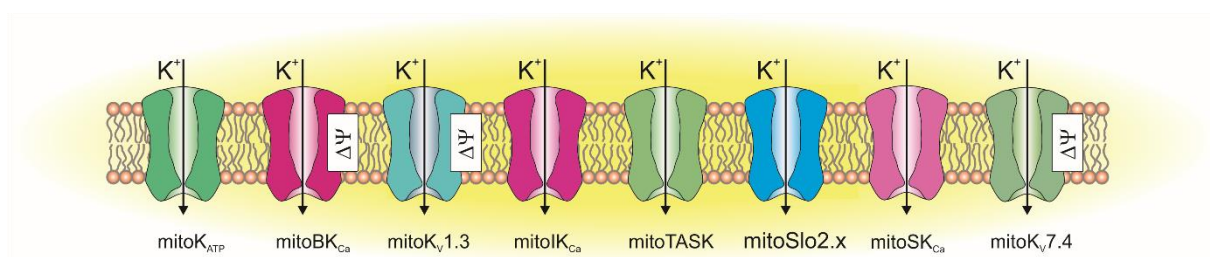
Oprócz jonów wapnia, przez wewnętrzną błonę mitochondrialną odbywa się transport jonów magnezu i sodu. Za transport  $\text{Mg}^{2+}$  odpowiedzialny jest prawdopodobnie kanał selektywny dla magnezu Mrs2, a jego aktywność zależy od stężenia  $\text{Mg}^{2+}$  [79, 80]. Ponadto, wykazano, że transporter SLC41A3 usuwa jony magnezu z mitochondrium [81]. Jony sodu transportowane są do mitochondrium w trakcie wymiany poprzez wymiennik sodowo-wapniowy (NCX, ang. *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*) [82], sodowo-protonowy (NHE, ang. *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*) [83]. Ponadto, pojawiła się hipoteza, że w mitochondriach lokalizuje się regulowany przez pH kanał AISC1a (ang. *acid-sensing ion channels*) który może brać udział w napływie jonów sodu oraz częściowo jonów wapnia do mitochondriów [84, 85].

Poza ruchem jonów wymienionych powyżej, bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu mitochondriów oraz całej komórki pełni transport jonów  $\text{K}^+$  odbywający się przez kanały potasowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

### 3.4 Mitochondrialne kanały potasowe

Kanały potasowe są rozległą grupą kanałów jonowych, występujących w komórkach wielu organizmów m. in. bakterii, prostych organizmów eukariotycznych, grzybów, roślin

i zwierząt [86, 87]. Zidentyfikowano także wirusowe kanały potasowe [88]. Kanały potasowe występują w różnych przedziałach komórkowych. Zostały zidentyfikowane nie tylko w błonie komórkowej i w błonach mitochondrialnych, ale również w błonach otaczających jądro komórkowe, siateczkę śródplazmatyczną, aparat Golgiego, lizosomy, chloroplasty, wakuole oraz peroksosomy [89]. W mitochondriach, kanały potasowe stanowią najliczniejszą grupę kanałów jonowych. Do tej pory zidentyfikowano kilka rodzajów kanałów potasowych w mitochondriach, które są regulowane wieloma czynnikami, między innymi ATP, jonami wapnia, sodu czy zmianami potencjału błonowego (Rycina 1).



**Rycina 1** Mitochondrialne kanały potasowe. Rysunek własny.

Pierwsza aktywność mitochondrialnego kanału potasowego została zarejestrowana metodą patch-clamp w 1991 roku. Kanał wykazywał przewodnictwo rzędu około 10 pS i hamowany był przez ATP, dlatego został opisany jako kanał mitoK<sub>ATP</sub>. Wrażliwość na ATP nasunęła hipotezę, że kanał ten może być aktywowany w wyniku spadku stężenia ATP w macierzy mitochondrialnej co indukuje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej [90]. Kanał mitoK<sub>ATP</sub> jest aktywowany przez diazoksyd, a hamowany przez kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) oraz glibenklamid [91]. Budowa kanału mitoK<sub>ATP</sub> jest tematem wielu badań i budzi żywą dyskusję. W 2012 roku zasugerowano, że kanał ten może tworzyć izoforma 2 kanału ROMK (ang. *renal outer medullary potassium channel*) kodowanego przez gen *KCNJ1* [92]. Kanał ten wykazuje właściwości farmakologiczne typowe dla kanału mitoK<sub>ATP</sub>. W 2019 roku pojawiła się hipoteza mówiąca, że kanał ten tworzy białko MITOK, kodowane przez gen *CCDC51* (ang. *coiled-coil domain-containing protein 51*), a drażliwość na glibenklamid możliwa jest dzięki interakcji z mitochondrialnym receptorem sulfonilomocznika ABCB8 [93]. Najnowsze badania sugerują, że kanał mitoK<sub>ATP</sub> może być też tworzony przez podjednostki mitochondrialnej syntazy ATP, o czym świadczy drażliwość na aktywator kanału mitoK<sub>ATP</sub> – diazoksyd. Ponadto zaobserwowano blokowanie kanału inhibitorem domeny F<sub>O</sub> syntazy ATP [94]. Przykład kanału mitoK<sub>ATP</sub> pokazuje,

że identyfikacja budowy molekularnej mitochondrialnych kanałów potasowych jest bardzo istotnym kierunkiem badań.

Kolejne lata pozwoliły na identyfikację innych kanałów potasowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w tym trzech kanałów aktywowanych jonami wapnia. W 1999 roku odkryto w mitochondriach linii komórkowej LN229, za pomocą metody patch-clamp, kanał potasowy o dużym przewodnictwie (około 300 pS) aktywowany jonami wapnia, tzw. kanał mitoBK<sub>Ca</sub>. Aktywność tego kanału zależna była od obecności jonów wapnia oraz potencjału błonowego a także hamowana przez charybdotoksynę, która jest inhibitorem kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej [95]. Właściwości i budowa tego kanału zostaną szerzej omówione w dalszej części pracy.

Oprócz kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w ludzkich komórkach raka jelita grubego zaobserwowano mitochondrialny kanał potasowy aktywowany jonami wapnia o średnim przewodnictwie mitoIK<sub>Ca</sub>. Prawdopodobnie kanał ten kodowany jest przez gen *KCNN4*, a jego przewodnictwo sięga 10-90 pS [59, 96-99].

Do grupy mitochondrialnych kanałów potasowych regulowanych przez jony wapnia należy również tzw. kanał potasowy aktywowany jonami wapnia o małym przewodnictwie mitoSK<sub>Ca</sub>. Białko to zidentyfikowano po raz pierwszy w wewnętrznej błonie mitochondriów serca świnki morskiej [100] oraz komórek HT-22 [96]. W mitochondriach przewodnictwo tych kanałów, rekonstruowanych do czarnych błon lipidowych, wynosiło około 70-200 pS, podczas gdy kanały tego typu z błony plazmatycznej wykazują przewodnictwo w granicach 10-30 pS. Kanały typu SK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej kodowane są przez geny *KCNN1*, *KCNN2* oraz *KCNN3* [59, 96, 98-100].

W kolejnych latach zidentyfikowano inne kanały potasowe w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w tym grupę kanałów potasowych bramkowanych napięciem (Kv). Prawdopodobne jest, że mitochondrialne kanały mitoKv1.3, mitoKv1.5 oraz mitoKv7.1-5 są kodowane kolejno przez geny *KCNA3*, *KCNA5* oraz *KCNQ1-5* [59, 64, 101]. Podjednostki  $\alpha$  tworzące por kanałów Kv posiadają domenę czułą na zmiany napięcia błonowego (VSD, ang. *voltage-sensing domain*). Aktywność kanału jest regulowana przez podjednostki  $\beta$  [102, 103].

Ponadto, w mitochondriach zidentyfikowano kanały potasowe aktywowane jonami sodu mitoSlo2[104]. Kanał potasowy aktywowany sodem Slo2.1 (inaczej Slick) jest kodowany przez gen *KCNT2*, a kanał Slo2.2 (inaczej Slack) kodowany jest przez gen *KCNT1* [105, 106]. Poza powyższymi, w wewnętrznej błonie mitochondrialnej opisano potasowe kanały



dwuporowe, w tym kanał TASK-3 (ang. *tandem pore-domain acid-sensitive potassium channel type 3*). Kanały TASK-3 z błony plazmatycznej kodowane są przez gen *KCNK9*. Obserwowano go w komórkach raka skóry (czerniak), melanocytach czy keratynocytach [107]. Kanał ten w mitochondriach wykazuje przewodnictwo 83 pS przy dodatnim potencjale błonowym oraz 12 pS przy ujemnym potencjale błonowym [108, 109]. W ostatnich latach zasugerowano także obecność w mitochondriach kanałów aktywowanych hiperpolaryzacją HCN (ang. *hypopolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*) [110, 111].

### 3.4.1 Funkcja mitochondrialnych kanałów potasowych

Aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych, a tym samym napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej wpływa na objętość mitochondrium, a przez to na ultrastrukturę samych mitochondriów i strukturę sieci mitochondrialnej [112, 113]. Ponadto aktywacja kanałów potasowych indukuje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz zwiększa szybkość oddychania mitochondrialnego [114-116]. Zauważono także, że napływ jonów potasu reguluje syntezę RFT w mitochondriach [59, 91, 117].

Mitochondrialne kanały potasowe są częścią mitochondrialnego cyklu jonów potasu (ang. *mitochondrial potassium cycle*) [112, 118]. Napływ jonów potasu do macierzy jest równoważony przez aktywność wymiennika  $K^+/H^+$ , który umożliwia usuwanie  $K^+$  do przestrzeni międzybłonowej w zamian za napływ protonów do macierzy mitochondrialnej. Protony usuwane są z macierzy dzięki zwiększonej aktywności łańcucha oddechowego. Powoduje to wzrost pH macierzy mitochondrialnej, co działa jako czynnik indukujący napływ fosforanów z powodu zwiększonej aktywności przenośnika fosforanów. Elektroneutralny napływ fosforanów powoduje napływ wody, co skutkuje wzrostem objętości macierzy mitochondrialnej. Zjawisko to jest szczególnie obserwowane w eksperymentach z wykorzystaniem oczyszczonych, funkcjonalnych mitochondriów [91, 112, 118-120].

Zmiana objętości mitochondriów, a tym samym zmiany w organizacji grzebieni mitochondrialnych, wpływa na fosforylację oksydacyjną [4]. Z nadmiernym pęcznieniem mitochondriów powiązane jest otwarcie megakanalu PTP [44]. Zauważono, że mitochondria, które nie posiadają funkcjonalnego kanału  $mitoK_{ATP}$  są mocno pofragmentowane i pozbawione struktury grzebieni mitochondrialnych [4, 93].

Szczególne role mitochondrialnych kanałów potasowych objawia się w czasie niedotlenienia/reperfuzji tkanek. Zmniejszenie przepływu krwi (niedokrwienie) powoduje spadek dostępności glukozy i tlenu, co ogranicza zdolność mitochondriów do produkcji ATP.

Spadek stężenia ATP prowadzi do zaburzenia równowagi jonowej komórki, która jest podtrzymywana przez pompy i transportery jonowe zależne od ATP. Może to skutkować wzrostem poziomu jonów wapnia, obrzękiem komórek, uszkodzeniem błon komórkowych oraz śmiercią komórkową. Obniżenie poziomu tlenu powoduje spadek aktywności oksydazy cytochromu c, co oznacza problemy z utrzymaniem potencjału błonowego. Spadek potencjału błony mitochondrialnej, prowadzący do obniżenia syntezy ATP, może skutkować odwróceniem działania syntazy ATP i hydrolizą ATP, w celu przywrócenia potencjału błonowego [104].

Podczas reperfuzji mitochondria wracają do pełnej funkcji, lecz mogą pojawić się zjawiska powodujące ich uszkodzenia. Jednym z kluczowych wydarzeń jest odbudowa potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, co może prowadzić do niekontrolowanego napływu jonów wapnia. Nadmiar wapnia może wywołać otwarcie PTP i apoptozę. Nagromadzony w fazie niedokrwiennej bursztynian może być wykorzystany przez kompleks II łańcucha oddechowego, co powoduje odwrotny przepływ elektronów z kompleksu II do I, prowadząc do nadprodukcji reaktywnych form tlenu zgodnie z mechanizmem odwróconego przepływu elektronów opisanym wcześniej. Trzy czynniki, które mają kluczowe znaczenie w uszkodzeniach komórek podczas niedokrwienia/reperfuzji, to ATP, jony wapnia oraz reaktywne formy tlenu. Dlatego mitochondria są naturalnym celem działań mających na celu ochronę serca przed uszkodzeniami wynikającymi z niedokrwienia i reperfuzji. W trakcie niedokrwienia, glikoliza beztlenowa, hydroliza ATP i uwalnianie protonów z organelli kwasowych powodują spadek pH w tkance serca. Te czynniki (ATP,  $Ca^{2+}$ , RFT/redoks oraz pH) regulują aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych. Ich aktywacja może wspierać zachowanie funkcji mitochondriów podczas niedokrwienia i reperfuzji [40, 91].

Zauważono, że zastosowanie aktywatorów kanałów potasowych (KCO, ang. *potassium channel openers*) chroni serce przed uszkodzeniem spowodowanym niedotlenieniem i reperfuzją (ang. *ischemia-reperfusion injury*). Pierwsze obserwacje dotyczące zaangażowania kanałów potasowych z mitochondriów w cytoprotekcję dotyczyły aktywacji kanału mitoK<sub>ATP</sub> [113, 121-123].

Wydaje się, że depolaryzacja następująca po aktywacji mitoK<sub>ATP</sub> może obniżać transport  $Ca^{2+}$  do macierzy mitochondrialnej, obniżać prawdopodobieństwo otwarcia mPTP oraz wpływać na syntezę RFT [117]. Wydaje się, że możliwy mechanizm uwzględnia także wpływ na działanie antyapoptotycznego białka Bcl-2 [124].

Podobnie do kanału mitoK<sub>ATP</sub>, pozostałe mitochondrialne kanały potasowe także wykazują działanie cytoprotekcyjne, w tym kanały z rodziny mitoK<sub>v</sub>, mitoSlo2 i aktywowane jonami wapnia, mitoSK<sub>Ca</sub> oraz w szczególności kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, co zostanie omówione bliżej w dalszej części [104, 106]. Aktywacja kanału mitoSK<sub>Ca</sub> chroni mitochondria przed uszkodzeniem powodowanym I/R w komórkach serca [100] czy uszkodzeniem powodowanym kwasem glutaminowym [96]. Aktywacja mitoSK<sub>Ca</sub> wiąże się z nieznacznym podwyższeniem stężenia RFT, które prawdopodobnie jest istotnym elementem mechanizmu chroniącego mitochondria przed stresem oksydacyjnym [98, 125].

Ciekawym przykładem regulacji funkcji mitochondriów są kanały napięciowo-zależne, w tym kanały mitoK<sub>v</sub>1.3, które obecne są między innymi w limfocytach T, komórkach mózgowych oraz w wielu komórkach nowotworowych [104, 126-128].

Zaobserwowano, że mitochondrialny kanał K<sub>v</sub>1.3 wpływa na aktywację szlaku apoptozy komórki. Białko proapoptotyczne Bax wiąże się kanałem K<sub>v</sub>1.3 powodując jego zahamowanie [129]. Limfocyty T (komórki CTLL-2) wykazujące się nadekspresją tego kanału były bardziej wrażliwe na działanie czynników proapoptotycznych [110]. Zahamowanie kanału mitoK<sub>v</sub>1.3 przyczynia się do śmierci komórek nowotworowych na drodze apoptozy i redukuje rozrost nowotworu, jednocześnie nie uszkadzając komórek zdrowych [130]. Z tego powodu kanał mitoK<sub>v</sub>1.3 stał się obiektem intensywnych badań w rozwoju terapii przeciwnowotworowych. Przykładem inhibitora kanałów K<sub>v</sub>1.3 jest klofazymina, która ograniczała rozwój nowotworu w układzie eksperymentalnym. Związek ten jest stosowany w leczeniu między innymi łuszczyca oraz ziarniniakowemu zapaleniu warg [108, 127].

### **3.5 Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia**

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany napięciem i jonami wapnia mitoBK<sub>Ca</sub> ma bardzo podobne właściwości do kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej [95]. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej umożliwiają wypływ jonów potasu z komórki do przestrzeni międzykomórkowej, podczas gdy kanały mitoBK<sub>Ca</sub> umożliwiają napływ jonów K<sup>+</sup> do macierzy mitochondrialnej z przestrzeni międzybłonowej. Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> po raz pierwszy odkryto w mitochondriach komórek glejaka LN229 [95]. Kolejno kanał zidentyfikowano w tkance serca [131], mózgu [114, 132], mięśni szkieletowych i gładkich [115, 133], śródbłonna (Bednarczyk, Koziel, Jarmuszkiewicz, & Szewczyk, 2013), nabłonka układu oddechowego [134, 135] czy w fibroblastach [136]. Co ciekawe, kanał

o charakterystyce mitoBK<sub>Ca</sub> występuje również w komórkach roślinnych [137] i organizmach jednokomórkowych [138].

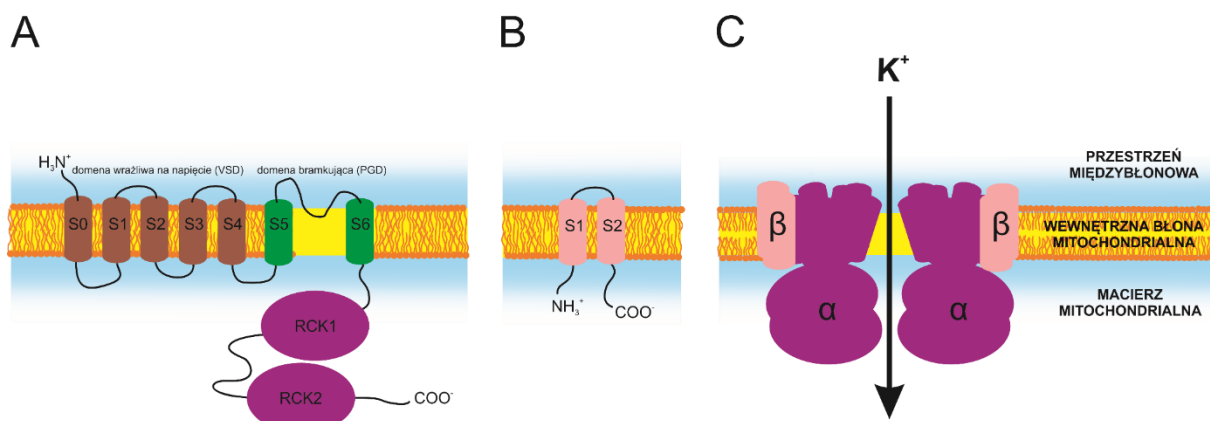
### 3.5.1 Budowa kanału mitoBK<sub>Ca</sub>

Badania ostatnich lat wskazują, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> ma zbliżoną budowę do kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> oprócz błony plazmatycznej i mitochondriów zidentyfikowano w lizosomach [139], siateczce śródplazmatycznej [140], jądrze komórkowym [141] czy egzosomach [142]. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej zbudowane są z podjednostek  $\alpha$  oraz podjednostek regulatorowych  $\beta$  [143, 144]. Podjednostka  $\alpha$  tworząca por kanału jest kodowana przez gen *KCNMA1* (ang. potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1, inaczej *Slo1*). Cztery podjednostki  $\alpha$  tworzą funkcjonalny kanał.

Podjednostka  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> została zidentyfikowana w mitochondriach z wykorzystaniem przeciwciał w komórkach różnych tkanek, w tym w komórkach mózgu [114, 132], serca [131, 145], fibroblastach [136], czy nabłonku oskrzelowym [134, 135]. Obecność tego białka we frakcji mitochondrialnej oraz właściwości biofizyczne kanału mitoBK<sub>Ca</sub> nasunęły hipotezę, że gen *KCNMA1* może kodować kanał mitoBK<sub>Ca</sub>. Ponadto, hipotezę tę wspierają badania pokazujące, że uszkodzenie genu *KCNMA1* skutkuje brakiem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> co obserwowano w kardiomiocytach myszy [146] i komórkach glioblastomy [147].

Podjednostka  $\alpha$  kanałów typu BK<sub>Ca</sub> kodowana przez gen *KCNMA1* zbudowana jest z 7 domen transbłonowych S0–S6. W obrębie segmentów S0-S4 występują domeny wrażliwe na napięcie (VSD, ang. *voltage sensing domain*). Segmenty S5-S6 wraz z łącznikiem/linkerem to domeny tworzące por kanału, który zawiera domenę bramkującą tzw. filtr selektywności kanału (PGD, ang. *pore-gate domain*). Na C-końcu białka znajdują się domeny wiążące wapń S7-S8 (RCK1, ang. *regulator of conductance of K<sup>+</sup>*) oraz S9-S10 (RCK2) [148] (Rycina 2 A). Domena RCK2 zawierają pięć reszt kwasu asparaginowego (Asp lub D), które odpowiadają za koordynacyjne powinowactwo do Ca<sup>2+</sup> [149]. Badania elektrofizjologiczne wskazują, że domena wrażliwa na jony wapnia kanału mitoBK<sub>Ca</sub> zlokalizowana jest w macierzy mitochondrialnej, dzięki czemu zwiększające się stężenie jonów wapnia w mitochondriach może prowadzić do aktywacji kanału [148, 150].

Kanał zawiera poza tym motyw zamka leucynowego, motyw wiążący hem, miejsce fosforylacji i domenę kierującą do kaweoliny [151].



**Rycina 2** A) Podjednostka  $\alpha$  zbudowana z 7 transbłonowych domen (S0–S6). Segmenty S0–S4 - domeny wrażliwe na napięcie (VSD). Segmenty S5–S6 wraz z domeną bramkującą tzw. filtr selektywności kanału (PGD). Domeny wiążące wapń: S7–S8 (RCK1) oraz S9–S10 (RCK2). B) Podjednostka  $\beta$  złożona z dwóch segmentów transbłonowych S1 oraz S2. C) Cztery podjednostki  $\alpha$  wraz z czterema podjednostkami  $\beta$  tworzące kanał. Rysunek własny.

Wykazano, że istnieje wiele izoform kodujących podjednostkę  $\alpha$  kanału  $BK_{Ca}$  i są one skutkiem alternatywnego składania transkryptu genu *KCNMA1*. Ludzki gen *KCNMA1* posiada 27 konstytutywnych egzonów, które rozłożone są na 750 kb ludzkiego genomu [145, 152]. Splicing alternatywny genu *KCNMA1* badano w kilku modelach, w tym u myszy, gdzie w uchu wewnętrznym zidentyfikowano 27 produktów alternatywnego splicingu genu *kcnma1*, [149]. Co ciekawe, u kury domowej zidentyfikowano 28 z 48 potencjalnie możliwych transkryptów w tej samej lokalizacji [153]. Wiele wskazuje na to, że rodzaj izoform obecnych w komórce może różnić się w zależności od typu komórki, organizmu, fazy rozwoju, a ekspresja danej izoformy jest także regulowana przez hormony [152, 154]. Zgodnie z bazą danych Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) odnotowano 96 transkryptów genu kodującego ludzki kanał  $BK_{Ca}$ .

Wykazano, że składanie alternatywne podjednostki  $\alpha$  obejmuje głównie część rozpuszczalną, a w szczególności C-koniec białka, podczas gdy część tworząca por prawdopodobnie nie ulega zmianom [145]. Zidentyfikowano kilka głównych izoform tej podjednostki różniących się motywem C-końca, między innymi tzw. izoformy VYR, VEDEC czy ERL [149]. Motywy znajdujące się na C-końcu białka prawdopodobnie mogą być jednym z czynników wpływających na lokalizację kanału w przedziałach komórkowych [155]. Izoformy VYR oraz ERL lokalizują się w błonie komórkowej znacznie częściej niż izoforma VEDEC [156]. Izoforma VEDEC genu *KCNMA1* zawiera wstawkę wielkości 50 aminokwasów na C-końcu. W 2013 roku zaobserwowano, że izoforma VEDEC kierowana jest do mitochondriów kardiomiocytów myszy [145]. Izoforma ta została zidentyfikowana w tych mitochondria z wykorzystaniem spektrometrii mas. Kolejne eksperymenty wykazały,

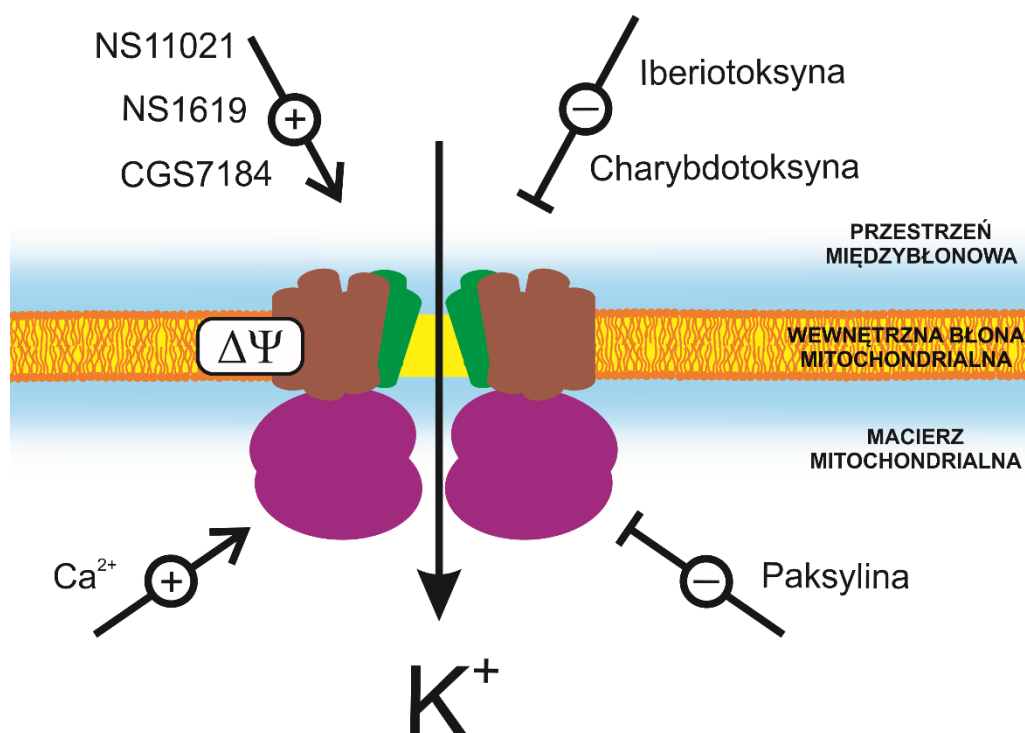
że ekspresja tej izoformy skutkuje lokalizacją kanału BK<sub>Ca</sub> wyłącznie w mitochondriach. Co ważne, w tych samych doświadczeniach zaobserwowano, że izoformy SV27 czy ZERO ekspresjonowane w tych komórkach lokalizują się w innych częściach komórki, głównie w błonie plazmatycznej [145]. Niemniej jednak wciąż brak danych pokazujących, że izoforma VEDEC może tworzyć aktywny kanał w mitochondriach. Co ciekawe, niedawne badania wykazały, że ekspresja izoformy ERL oraz jej nieaktywnej formy (mutacja G354S) w komórkach HEK293 skutkowałą kolokalizacją z sygnałem mitochondrialnym, co wykazała analiza mikroskopowa [157]. Możliwe zatem, że kilka izoform kanału BK<sub>Ca</sub> może być kierowanych do mitochondriów [91].

Poza wspomnianymi izoformami zidentyfikowano izoformy, w których zmienność dotyczy części rozpuszczalnej białka, lecz nieznajdującej się bezpośrednio na C-końcu, np. izoforma ZERO (ang. *insertless*), gBK<sub>Ca</sub> (glioma BK<sub>Ca</sub>) charakterystyczna dla komórek gliomy, izoforma SV27 (wstawka wielkości 27 aminokwasów) czy izoforma STREX (ang. *STress axis-Regulated EXon*), w której wstawiana sekwencja znajduje się między domenami RCK1 oraz RCK2 [145, 158, 159]. Prawdopodobnie izoforma STREX nadaje kanałowi BK<sub>Ca</sub> wrażliwość na zmiany ciśnienia (tzw. mechanoczułość) [158, 159]. Trzeba zauważyć jednak, że w mitochondriach komórek gliomy zaobserwowano mechanoczułość kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, lecz w tych komórkach nie jest ekspresjonowana ta izoforma [160]. Splicing alternatywny mocno wpływa na funkcję kanału i może dominować na różnych etapach życia organizmu. Izoforma STREX ulega ekspresji w komórkach poddanych działaniu alkoholu [161]. Zaobserwowano, że występują produkty składania transkryptów genu *KCNMA1*, które posiadają zmiany w kilku egzonach jednocześnie [149]. W 2006 roku grupa Enrico Stefani i Ligii Toro wysunęła przypuszczenie, że różne C-końce kanału BK<sub>Ca</sub> mogą tworzyć dodatkowe miejsca interakcji z innymi białkami, a zmiany te są zależne od typu komórek [152]. Zasugerowano, też że izoforma VEDEC może wiązać się z białkami innymi niż pozostałe izoformy np. nefryną [149].

Aktywność kanału jest regulowana przez podjednostki regulatorowe  $\beta$ 1- $\beta$ 4 kodowane odpowiednio przez geny *KCNMB1*, *KCNMB2*, *KCNMB3* and *KCNMB4*. Wraz z podjednostkami regulatorowymi  $\beta$  lub  $\gamma$  tworzą homo- lub heterotetramery. Przyłączenie się podjednostek regulatorowych zmienia wrażliwość kanału na modulatory, wapń lub potencjał błonowy. Podjednostki  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 oraz  $\beta$ 4 zidentyfikowano we frakcjach mitochondrialnych różnych tkanek [114, 115, 150, 162, 163] natomiast obecność podjednostki  $\gamma$  w mitochondriach nie została potwierdzona. Podjednostki  $\beta$  złożone są z dwóch segmentów

transbłonowych: S1 oraz S2. W kanał typu BK<sub>Ca</sub> podjednostki  $\beta$  łączą się z N-końcem podjednostek  $\alpha$  [149]. Podjednostka  $\beta 1$  lokalizuje się w mitochondriach sercowych komórek ssaków [162, 164, 165]. W linii komórkowej H9c2 pochodzącej z serca zarówno  $\beta 1$  [164], jak i  $\beta 4$  występują we frakcji mitochondrialnej [166]. Podjednostki  $\beta 4$  występuje też w komórkach mózgu [114]. Wykazano, że w kardiomiocytach myszy podjednostka tworząca por łączy się z podjednostką  $\beta 1$  [165]. W komórkach z nokautem podjednostki  $\beta 1$  aktywacja kanału przez jony wapnia zachodziła jedynie przy zastosowaniu wysokiego dodatniego napięcia, podczas gdy kanał mitoplastów izolowanych z dzikiego serca był aktywowany przez jony wapnia również przy ujemnym napięciu [165]. W tym samym badaniu stwierdzono obecność dwóch populacji kanałów o różnych właściwościach biofizycznych, co może wynikać z obecności podjednostek regulacyjnych [165]. W komórkach nabłonka oskrzelowego, również zidentyfikowano dwie populacje kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, a prawdopodobną przyczyną różnic jest występowanie dwóch podjednostek  $\beta 3$  i  $\beta 4$  [135]. Wykazano również, że współekspresja z  $\beta 1$  prowadzi do zwiększonego kierowania BK<sub>Ca</sub> do mitochondriów [165]. W mitochondriach komórek śródbłonka stwierdzono występowanie podjednostki  $\beta 2$  [134]. Nadal jednak nie jest jasny mechanizm, dzięki któremu podjednostki mitoBK<sub>Ca</sub> docierają do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

### 3.5.2 Modulatory kanału mitoBK<sub>Ca</sub>



**Rycina 3** Regulacja kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. (+) – aktywatory kanału; (-) – inhibitory kanału. Rysunek własny.

Właściwości biofizyczne kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> zostały opisane z wykorzystaniem technik elektrofizjologicznych takich jak patch-clamp na mitoplastach izolowanych z różnych tkanek i typów komórek, a także po rekonstytucji do dwuwarstw lipidowych [138]. Podobnie do kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jest modulowany przez szereg czynników endogennych oraz przez grupę modulatorów syntetycznych oraz pochodzenia naturalnego.

Pierwszej rejestracji aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> dokonano techniką stabilizacji skrawka błony (patch-clamp) w izolowanych mitoplastach komórek glejaka linii LN229. Kanał wykazywał przewodnictwo rzędu  $\sim 290$  pS w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl [95]. Ponadto, kanał wykazywał zależność od napięcia, aktywację przez jony wapnia i hamowanie charybdotoksyną. Badania aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> pochodzące z różnych tkanek pokazały, że wartości przewodnictwa kanału mitoBK<sub>Ca</sub> znacząco się różnią, sięgając nawet 120 pS w mitochondriach kardiomiocytów myszy [146]. Aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest zależna od napięcia [95].

Oprócz jonów wapnia aktywujących kanał mitoBK<sub>Ca</sub> przykładami endogennych modulatorów są hem i hemina. Podjednostki  $\alpha$  kanałów typu BK<sub>Ca</sub> zawierają zakonserwowane motywy aminokwasowe typu CXXC odpowiadające za wiązanie hemu [167]. Motyw ten zlokalizowany jest w części łączącej domeny RCK1 i RCK2. Tym samym powoduje



zmianę konformacji białka inną, niż w przypadku związania się jonów wapnia [167]. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że hem oraz hemina, która jest metabolitem hemu, hamuje aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z mózgu [168] oraz komórek glioblastomy [169, 170]. Wydaje się to szczególnie istotne, gdyż w mitochondriach zachodzi synteza hemu [171]. Wiązanie hemu przez kanał mitoBK<sub>Ca</sub> wydaje się mieć jeszcze inne konsekwencje. Zaobserwowano bowiem, że aktywność kanałów typu BK<sub>Ca</sub> może być regulowana przez gazotransmitery takie jak tlenek węgla lub siarkowodór. Zauważono jednak, że warunkiem aktywacji kanałów BK<sub>Ca</sub> przez CO jest wcześniejsze związaniem hemu prowadzące do zahamowania aktywności kanału [172-174]. Ponadto, wydaje się, że istotne znaczenie dla tej regulacji ma oddziaływanie kanałów BK<sub>Ca</sub> z hemoksygenazą, z którą kanały BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej tworzą kompleksy białkowe [175]. W przypadku kanału mitoBK<sub>Ca</sub> również zaobserwowano aktywację przez CO w obecności hemu w komórkach glioblastomy linii U-87 MG [170]. Badania opisujące aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez CO wykonywano zarówno z wykorzystaniem czystego tlenku węgla [170] jak i związków CO, tzw. CO-releasing molecules (CORMs) [170, 176]. Jednak w przypadku regulacji aktywności kanałów typu BK<sub>Ca</sub> i mitoBK<sub>Ca</sub> przez związki CORMs istnieje możliwość wystąpienia niespecyficznego oddziaływań tych związków z kanałem [170, 177]. Podobnie jak CO, również siarkowodór (H<sub>2</sub>S) może aktywować kanał mitoBK<sub>Ca</sub> poprzez reakcje z żelazem hemu w przypadku, gdy te kanały są zahamowane przez hem [169, 174, 178, 179]. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> występujące w kompleksie z podjednostką  $\beta$ 1 aktywowane są przez 17 $\beta$ -estradiol [180]. Wydaje się, że taka regulacja ma miejsce w przypadku kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z komórek serca [162].

Jednym z inhibitorów kanałów typu BK<sub>Ca</sub> jest peptyd charybdotoksyna (ChTx) będąca składnikiem jadu skorpiona *Leiurus quinquestriatus*. Peptyd ten blokuje aktywność kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej oraz kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [95, 181-183], Charybdotoksyna jest również inhibitorem kanałów IK<sub>Ca</sub>, Kv1.2, Kv1.3 i Kv1.6 [184]. Bardziej specyficznym peptydem blokującym aktywność kanału jest iberiotoksyna (IbTx) będąca składnikiem jadu skorpiona *Buthus tamulus*. Wykazuje 68% homologii względem charybdotoksyny, ale w porównaniu do niej nie hamuje innych kanałów potasowych [185, 186]. Iberiotoksyna hamuje aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, co zostało potwierdzone badaniami elektrofizjologicznymi [134]. Co ciekawe, zauważono, że obecność podjednostki  $\beta$ 4 kanału powoduje, że kanał nie jest wrażliwy na hamowanie tymi peptydami. Przyczyną tej zmiany jest blokowanie miejsca wiązania peptydów do kanału przez elementy strukturalne podjednostki  $\beta$ 4 [143, 187]. Innym inhibitorem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest paksylina (Pax), która jest diterpenem

syntetyzowanym przez grzyby *Penicillium paxilli* [116, 135, 165, 169, 188]. Paksylina prawdopodobnie oddziałuje nie tylko z kanałami typu BK<sub>Ca</sub>. Zastosowanie wyższych stężeń paksyliny powoduje zahamowanie pracy pompy SERCA [189, 190]. Wykazano, także że 10–50 μM paksyliny rozprzega oddychanie w izolowanych mitochondriach [191]. Z drugiej strony związek ten może chronić komórki HT-22 przed cytotoksycznymi skutkami stresu oksydacyjnego indukowanego glutaminianem [192].

Oprócz inhibitorów, aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest modulowana przez grupę związków należących do aktywatorów kanałów potasowych. Przykładami tych związków są pochodne benzimidazolu NS004 oraz NS1619 [193, 194]. Badania z wykorzystaniem technik elektrofizjologicznych oraz izolowanych mitochondriów wykazały, że NS1619 aktywuje kanał mitoBK<sub>Ca</sub> [134, 170]. Jednak, zarówno NS1619 jak i NS004 wykazują działanie niespecyficzne oddziałując z białkami z różnych przedziałów komórkowych. W mitochondriach NS1619 między innymi hamuje kompleks I łańcucha oddechowego [195], wpływa na aktywność mitochondrialnej syntazy ATP oraz powoduje nieselektywny przepływ jonów w poprzek IMM [196]. Jego niespecyficzne działanie wykracza także poza mitochondria, gdyż wykazano, że NS1619 hamuje ATP zależną pompą SERCA [197] oraz kanały wapniowe typu L [108, 198]. Ponadto wykazano, że NS004 aktywuje kanał CFTR [199]. Innym przykładem aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, jest NS11021, który wykazuje znacznie bardziej specyficzne działanie względem kanału niż NS1619 [200]. Jego działanie opiera się na zwiększeniu wrażliwości kanału na niższe napięcie [201]. Jednak w stężeniach 10-30 μM aktywuje kanał Kv7.4 oraz receptor nikotynowy α7 nAChR [200].

Ponadto, kanał mitoBK<sub>Ca</sub> aktywowany jest przez CGS7181 oraz CGS7184 co zostało potwierdzone w badaniach elektrofizjologicznych [116]. Związki te, aktywując kanał mitoBK<sub>Ca</sub> wpływają na m. in. zmniejszenie syntezy reaktywnych form tlenu generowanych na drodze odwróconego przepływu elektronów w mitochondriach mózgu [202]. Z drugiej strony oba związki wykazują działanie cytotoksyczne indukując śmierć komórkową na drodze niezwiązanej z aktywnością kanałów BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub> [116, 203]. Może mieć to związek z deregulacją homeostazy wapniowej, gdyż CGS7184 bezpośrednio aktywuje uwalnianie jonów wapnia przez receptor rianodynowy RyR2 do cytozolu [204].

W grupie związków modulujących aktywność kanałów BK<sub>Ca</sub> znajduje się chlorzoxazone, lek zatwierdzony przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. Food and Drug Administration) [205]. Chlorzoxazone jest także aktywatorem kanału SK<sub>Ca</sub> i IK<sub>Ca</sub> oraz hamuje też ruch jonów Ca<sup>2+</sup> zależny od kanałów typu L [205]. Aktywator ten został

wykorzystany w próbie leczenia choroby neurologicznej indukowanej mutacją w genie *KCNMA1* ( $BK_{G354S}$ ) skutkującą dezaktywacją kanału  $BK_{Ca}$  i  $mitoBK_{Ca}$ . Jest to mutacja prowadząca do zaburzeń kognitywnych. Istotną rolę w tej chorobie odgrywają mitochondria oraz kanały  $mitoBK_{Ca}$  [157].

Interesującą grupą modulatorów kanałów typu  $BK_{Ca}$  są związki pochodzenia naturalnego jak np. flawonoidy. Związki te występują między innymi w ziołach i owocach [206]. Przykładem takiego aktywatora jest naringenina obecna w grejpfrutach (*Citrus paradisi*), której działanie aktywujące mitochondrialny kanał  $BK_{Ca}$  opisano w fibroblastach skóry [207] oraz w komórkach sercach [164]. Naringenina aktywuje także kanał  $mitoK_{ATP}$  [207] oraz przepływ jonów potasu typu M przez kanały potasowe  $Kv7.2$ ,  $Kv7.3$  czy  $Kv7.5$  [208]. Innym przykładem naturalnego modulatora kanałów  $BK_{Ca}$  jest chinina, produkowana jest przez drzewo chinowiec. Chinina hamuje przepływ jonów  $K^+$  przez kanał  $BK_{Ca}$  we frakcji zawierającej oczyszczone mitochondria [209]. Chinina hamuje także kanały  $Kv2.2$  i  $K2P18.1$  [210] oraz kanały  $mitoK_{ATP}$  [211].

Rycina 3 przedstawia przykładowe modulatory kanału  $mitoBK_{Ca}$  opisane w tym rozdziale.

### 3.5.3 Interakcje kanałów typu $BK_{Ca}$ z innymi białkami

Zgodnie z doniesieniami ostatnich lat kanały typu  $BK_{Ca}$  wchodzi w interakcje z wieloma białkami posiadającymi różne funkcje w komórce. Partnerów tego kanału określa się mianem BK-APs (ang. *BK-Associated Proteins*) [151, 154]. W ostatnim czasie przeprowadzono kilka analiz dotyczących interakcji podjednostki  $\alpha$  kanału  $BK_{Ca}$  oraz  $mitoBK_{Ca}$ .

Każde z badań wykazywało liczną grupę białek pochodzących z różnych przedziałów komórkowych potencjalnie wchodzących w interakcję z kanałem  $BK_{Ca}$ . Jedno z takich badań opublikowano w 2009 rok, w którym za pomocą koimmunoprecypitacji, elektroforezy na żelu 2D, a następnie badania spektrometrią mas LC-MS/MS odnaleziono 174 potencjalnych partnerów kanału BK-VEDEC [212]. W tej grupie 37% interakcji było nieopisanych wcześniej w literaturze w kontekście interakcji z kanałami. Wśród białek związanych z metabolizmem znajdowały się dysmutaza ponadtlenkowa, białka związane z utratą słuchu, GST- $\mu$ , peroksyredoksyna oraz dehydrogenazy (dehydrogenaza dihydroliponamidowa i dehydrogenaza bursztynianowa). Ponadto, w tym badaniu zidentyfikowano, jako potencjalnych partnerów, białka związane z transportem i cytoszkieletem: kofiliny, tubuliny, neurofilamenty, Lin7c, białka

z rodziny HSP i  $\gamma$ -actin. Poza tym inne białka jak: lamina A i C, oraz białka zawierające walozyne (VCP, ang. *valosin-containing protein*), zasadowym białkiem mieliny, białko mieliny P0, izoforma L periaxin, apolipoproteina, białko podobne do hipokalcyny 1, prekursor retikulokalbina 3, kalmodulina, czynnik inicjujący syntezę 4A i kalbindyna 2. Następnie za pomocą wyciszenia genu wybranego partnera białkowego za pomocą siRNA, autorzy obserwowali zmiany w ekspresji podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Wyciszenie kalretikuliny czy GRP78 spowodowało obniżenie ekspresji BK<sub>Ca</sub> o ponad 30%. Natomiast wyciszenie HSP60 powodowało zwiększenie ekspresji kanału o 26%. W swoich badaniach wykazali interakcję między BK<sub>Ca</sub> a GAPDH oraz GST za pomocą odwrotnej koimmunoprecypitacji. Autorzy zwrócili uwagę na takie białka jak: aneksyna 5, propeptyd I  $\gamma$ -aktyny, izoformy 14-3-3 oraz kalbindyna ze względu na ich interakcje z białkami istotnymi w interakcji z BK<sub>Ca</sub> [212].

W kolejnym badaniu, w 2011 roku określono 110 potencjalnych partnerów kanałów BK<sub>Ca</sub> poprzez zastosowanie koimmunoprecypitacji, elektroforezy na żelu 2D, a następnie badania spektrometrią mas LC-MS/MS [154]. Próbkę pobrano z ucha wewnętrznego kury. Pośród białek, które stanowią potencjalnych partnerów białka BK-VEDEC znalazły się: 14-3-3 $\gamma$ , VCP, statmina (STMN), kortaktyna (CTTN) czy prohibitina (PHB) lokalizująca się w mitochondriach. W dalszych badaniach zweryfikowano interakcje za pomocą przeciwciał przeciw wybranym białkom w celu przeprowadzenia odwrotnej koimmunoprecypitacji. Wśród tych białek były: 14-3-3 $\gamma$ , aneksyna A5 (Anxa5), CTTN1, GRP78, hippocalcin1 (Hpcal1), HSP60, HSP70, HSP90, lamina A (LMNA), homolog lin-7 C (Lin7c), PHB, ras-proximate 1 (RAP1), białko związane z synaptosomem o masie 25 kDa (SNAP25, ang. *synaptosomal-associated protein 25*), dysmutaza ponadtlenkowa 1 (SOD1, ang. *superoxide dismutase 1*), VCP, and STMN. Autorzy artykułu przeprowadzili także dodatkowe badania oparte na wyciszeniu wybranych białek za pomocą siRNA. Wówczas wyróżnili z listy białka takie jak aneksyna A5,  $\gamma$ -aktyna, lamina, SOD, VCP, GSK3b i PDK1 jako te które zmniejszają ekspresję BK<sub>Ca</sub>. Natomiast wyciszenie białek typu 14-3-3 oraz Akt1 (RAC-a serine/threonine-protein kinase) zwiększają jego ekspresję. Po porównaniu listy białek z wcześniej uzyskanymi wynikami z myszy, podjęto próbę identyfikacji BK-APs wspólne dla obu organizmów. Zasugerowano, że do grona tych białek potencjalnie mogą należeć między innymi receptor NMDA (NMDAR, ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) oraz syntaza ATP [154].

W 2014 przeprowadzono badania opierające się na analizie bioinformatycznej, wykorzystując różne algorytmy, takie jak MFDp i PONDR, do przewidywania segmentów nieuporządkowanych w łańcuchach białkowych kanałów BK<sub>Ca</sub> i ich partnerów. Narzędzia te analizują także elementy rozpoznania molekularnego (MoRFs) oraz potencjalne miejsca wiązania [151]. Badanie sugeruje, że zmienność strukturalna w kanałach BK<sub>Ca</sub> jest kluczowa dla ich funkcji i interakcji z innymi białkami. Może to tłumaczyć zdolność kanałów BK<sub>Ca</sub> do interakcji z różnymi partnerami białkowymi, co jest istotne dla szerokiego zakresu procesów komórkowych. Wyniki wskazują, że kanały BK<sub>Ca</sub> oraz ich białka partnerskie są elastyczne strukturalnie, co umożliwia adaptacyjne interakcje związane z ich funkcjami w komórkach [151].

W 2016 roku ukazała się publikacja, w której podjęto próbę zidentyfikowania partnerów mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub>-VEDEC z kardiomiocytów szczura. Badanie wykazało istnienie potencjalnych interakcji z 516 partnerami białkowymi, w tym 161 białkami mitochondrialnymi. Z tej analizy wynikało, że w imporcie tego kanału do mitochondriów bierze udział receptor TOM22, gdyż wchodzi w interakcję z podjednostką  $\alpha$  kanału. Dodatkowo nowozidentyfikowanym partnerem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> była translokaza ANT. Ponadto, wśród licznej grupy potencjalnych partnerów były podjednostki łańcucha oddechowego czy białka związane z metabolizmem mitochondrialnym [213].

Następnie w 2017 roku ukazało się kolejne badanie opisujące interakcje kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach serca [214]. Na podstawie analizy spektrometrii mas LC-MS/MS autorzy wskazali białka GAT3 (ang. *sodium and chloride dependent GABA transporter 3*) oraz HSP60 (ang. *heat shock protein 60*) jako partnerów tych kanałów. Interakcję transportera kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego typu 3 z błony plazmatycznej obserwowano poprzez obrazowanie na mikroskopie konfokalnym. Komórki HEK293T kotransfekowano kanałem BK<sub>Ca</sub> oraz GAT3 z metką FLAG. Podobną weryfikację przeprowadzono dla białka szoku cieplnego 60. HSP60 to białko opiekuńcze uczestniczące w składaniu białek w mitochondriach. Poza wybranymi wyżej białkami, autorzy wskazali na inne grupy białek, których interakcje zaobserwowali w wynikach ze spektrometrii mas. Przykładami takich białek mogą być obecne w cytoplazmie duże podjednostki rybosomalne 60S, które katalizują tworzenie wiązań peptydowych. Poza tym białka cytoszkieletu, które prawdopodobnie uczestniczą w regulacji sortowania kanału wewnątrz komórki oraz regulowaniu aktywności kanału np.: dynamina 2 i 3, mitochondrialne białko podobne do dynaminy o masie 120kDa, białka oczapkowujące F-aktynę, aktyna, miozyny, białka związane z mikrotubulami czy tubuliny. Dodatkowo kanał BK<sub>Ca</sub> wchodzi w interakcję

z białkami jądrowymi. Z powodu interakcji z polimerazami DNA, topoiizomerazami, białkami naprawczymi czy polimerazami RNA, zasugerowano, że kanał może uczestniczyć w replikacji i transkrypcji [215]. W komórkach nerwowych kanał BK<sub>Ca</sub> bierze udział w przekaźnictwie neuronalnym i w związku z tym prawdopodobnie oddziałuje między innymi z fosfoproteina neuronalną regulowaną dopaminą i cAMP, napięciозależnym kanałem potasowym kodowanym przez gen *KCNQ3*, białkami SNAP25, synaptotagmina 2, synapsyna 2. Badania te zasugerowały także, że kanały typu BK<sub>Ca</sub> w czasie importu do mitochondriów, a następnie składania w macierzy mitochondrialnej prawdopodobnie wchodzi w interakcje z białkami opiekuńczymi HSP 60, 70, 71, 90 i 105 oraz z białkami kompleksu TOM: TOM34 oraz TOM70 [215].

W komórkach glejaka aktywność łańcucha oddechowego regulowała kanały mitoBK<sub>Ca</sub>; zwiększona aktywność łańcucha oddechowego, zmniejszała prawdopodobieństwo otwarcia kanału [150]. To samo badanie zasugerowało bezpośrednią interakcję podjednostki  $\beta 4$  kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z oksydazą cytochromu c (COX). Zatem sugeruje to strukturalne i funkcjonalne oddziaływanie tych białka BK<sub>Ca</sub> z elementami mitochondrialnego łańcucha oddechowego w ludzkich komórkach astrocytoma U-87 MG [150]. Co istotne, wcześniejsze badania sugerowały, że podjednostka  $\beta 1$  może oddziaływać z podjednostkami cytochromu c w mitochondriach sercowych szczura [162]. Inne badania sugerowały interakcję  $\beta 1$  z podjednostkami kompleksu I i V [216].

### 3.5.4 Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w fizjologii mitochondriów oraz cytoprotekcji

Kanały mitoBK<sub>Ca</sub> pełnią istotną rolę w regulacji funkcji mitochondriów. Tak jak opisano wcześniej, wpływa on na potencjał mitochondrialny, szybkość oddychania oraz syntezę RFT w mitochondriach. Podobnie jak kanał mitoK<sub>ATP</sub>, kanał mitoBK<sub>Ca</sub> bierze udział cytoprotekcji. Pierwsza obserwacja wskazująca na kardioprotekcyjną rolę tego kanału dotyczyła aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach serca świnki morskiej z zastosowaniem NS1619 [131] na skutek czego zauważono zmniejszenie się uszkodzenia tkanki serca.

Kardioprotekcyjną rolę kanału potwierdziły kolejne badania w różnych modelach *in vivo* i *in vitro* z wykorzystaniem zarówno NS1619, NS11021 jak i innych modulatorów [146, 217-220]. Usunięcie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> skutkuje brakiem kardioprotekcji indukowanej tymi aktywatorami [145, 146]. Inne badania wykazały, że zahamowanie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> iberotoksyną przyspiesza otwarcie mPTP przez jony wapnia co obserwowano w mitochondriach mózgu. [221].

Kanały mitoBK<sub>Ca</sub> mogą brać także udział w procesach neuroprotekcji [222]. Zostało udowodnione, że aktywacja mitoSK<sub>Ca</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> poprawia kondycję mitochondriów. Natomiast w chorobach neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimer a czy stwardnienie rozsiane) zaproponowano zastosowanie inhibitorów kanału BK<sub>Ca</sub> [222]. Zauważono, że w chorobie Alzheimer a β-amyloid (Aβ) zmniejsza aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Co więcej, w obecności agregatów Aβ zaobserwowano zwiększoną ekspresję podjednostek β4, a zmniejszoną podjednostek α. Prawdopodobnie skutkuje to zmniejszoną aktywnością kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> i zwiększonym poziomem Ca<sup>2+</sup> w mitochondrium [222, 223].

W chorobie układu nerwowego SCA7 (ataksja rdzeniowo-mózdkowa-7, ang. *spinocerebellar ataxia type 7*) obserwuje się degenerację komórek Purkiniego. Wykazano udział kanałów BK<sub>Ca</sub> w rozwoju tej choroby. Obniżona ekspresja BK<sub>Ca</sub> wpływa na spadek pobudliwości komórek obserwowanej w chorobie SCA7. Z drugiej strony nadekspresja tego kanału przywraca pobudliwość tych komórek [222]. Zaobserwowano też, że naringenina ma działanie kardioprotekcyjne, a dobroczynny efekt jej działania jest prawdopodobnie związany z aktywacją kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [164].

Mechanizm cytoprotekcji indukowany aktywacją kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> prawdopodobnie oparty jest na kilku czynnikach. Po pierwsze, zwiększony napływ K<sup>+</sup> w mitochondriach prawdopodobnie obniża napływ Ca<sup>2+</sup> do mitochondriów. Dzieje się tak, gdyż wewnętrzna błona ulega depolaryzacji. Innym kluczowym czynnikiem wydaje się być regulacja RFT w trakcie procesów kardioprotekcyjnych indukowanych otwarciem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [224]. Ponadto, niedawne badania pokazały, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> może być też celem szlaku sygnałowego wrażliwego na tlenek azotu, zależnego od cykazy guanylowej/cGMP i kinazy białkowej G typu I (PKG). W mitochondriach serca myszy zaobserwowano bezpośrednią aktywację kanału po jego fosforylacji przez PKG [225]. Obecność sygnału PKG w kardioprotekcji wywołanej przez mitoBK<sub>Ca</sub> była potwierdzona obserwacjami, że zastosowanie sildenafilu i tadalafilu, zmniejszało wielkość zawału po niedokrwieniu i reperfuzji u serc szczurów i myszy [226]. Delecja kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w sercu powodowała utratę ochronnych efektów modulatorów kanału [146, 225]. Co więcej, zahamowanie syntazy tlenu azotu zmniejszyło kardioprotekcję u myszy typu dzikiego, ale nie miało takiego efektu w przypadku delecji genu *KCNMA1* [225]. Usunięcie cykazy guanylowej wrażliwej na tlenek azotu osłabiło kardioprotekcyjne działanie sildenafilu; jednak farmakologiczna aktywacja kanału za pomocą NS11021 nadal zmniejszała uszkodzenia wywołane niedokrwieniem/reperfuzją [227].

Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> może być celem dla kinazy białkowej A (PKA) [99, 219, 228]. Aktywatory PKA znacząco zwiększyły efekty wywołane przez NS1619 na funkcję mitochondrialną, czego nie zaobserwowano w przypadku kinazy białkowej C [219]. Ponadto cilostazol, aktywator PKA, wywołał kardioprotekcję poprzez bezpośrednią aktywację kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> [229]. Co ciekawe, wykazano, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> może zwiększać aktywność w warunkach hipoksji, jednak odpowiedź ta jest odwrotna do odpowiedzi kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej [175, 221].

Należy jednak zaznaczyć, że część badań kwestionuje udział kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w efektach cytoprotekcyjnych indukowanych przez jego aktywatory zarówno w sercu jak w komórkach neuronalnych [105, 230].

Oprócz cytoprotekcji wydaje się, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> bierze udział w regulacji innych procesów komórkowych. Jedną z ostatnich obserwacji wskazuje, że w modelu indukcji starzenia komórkowego w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> spada, a towarzyszy temu spadek poziomu podjednostki  $\alpha$  kanału [133]. Nie jest jednak znana dokładna relacja między procesem starzenia a aktywnością tego kanału. Jednak wcześniejsze badania sugerowały, że kardioprotekcja z wykorzystaniem aktywatorów kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> zanika w starszych tkankach. Obserwowano też spadek poziomu podjednostek tworzących ten kanał w komórkach hodowanych *in vitro* wraz z liczbą pasaży [164, 231].

W ostatnim czasie ukazały się także badania wskazujące na istotną rolę kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w funkcjonowaniu komórek nowotworowych. Wykazano, że w komórkach nowotworów piersi kanał ten ulega nadekspresji, co wpływa na funkcje mitochondriów oraz ruchy jonów wapnia pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a mitochondriami. Wydaje się, że ma to wpływ na metabolizm mitochondrialny tych komórek [232]. Ponadto, usunięcie kanału BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach glioblastomy U-87 MG skutkowało zmianami stanu redoks mitochondriów, co również może się wiązać ze zmianami metabolicznymi [147].



#### 4 Założenia i cele

Mitochondrium to organelum, w którym łączą się liczne szlaki metaboliczne i sygnałowe. Magazynują jony  $\text{Ca}^{2+}$  oraz biorą udział w programowanej śmierci komórki. Mitochondrialne kanały potasowe pełnią kluczową rolę w procesie cytoprotekcji tkanek serca i mózgu. Wciąż niewiele jest wiadomo na temat budowy, mechanizmów transportu kanałów potasowych do mitochondriów, a także interakcji białkowych i mechanizmów cytoprotekcji. Aktywacja kanału mitoBK<sub>Ca</sub> chroni komórki serca i mózgu przed uszkodzeniami wywołanymi przez niedotlenienie/reperfuzję. Głównym obiektem badawczym niniejszej pracy był mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany napięciem i aktywowany jonami wapnia – mitoBK<sub>Ca</sub>. Kanał ten wykazuje właściwości biofizyczne i farmakologiczne zbliżone do kanałów typu BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> zbudowane są z podjednostek tworzących por  $\alpha$  i regulatorowych typu  $\beta$ . Podjednostki  $\alpha$  są produktem genu *KCNMA1*, którego produkty ulegają licznym modyfikacjom w procesie alternatywnego składania transkryptów. Poprzednie badania wykazały, że izoforma VEDEC podjednostki  $\alpha$  jest kierowana do mitochondriów, ale nie wykazano dotychczas jej aktywności w mitochondriach. Zatem istotne jest poznanie funkcjonalnej mitochondrialnej podjednostki kanału BK<sub>Ca</sub> oraz zrozumienie związku między kanałami typu BK<sub>Ca</sub>, w tym mitoBK<sub>Ca</sub> a innymi białkami. Odpowiedź na te nieznane może pomóc w lepszym zrozumieniu roli fizjologicznej mitochondrialnych kanałów. Poprzednie dane literaturowe wskazują na potencjalną interakcję kanałów mitoBK<sub>Ca</sub>/BK<sub>Ca</sub> z białkami różnych przedziałów komórkowych, w tym mitochondrialnymi.

W związku z powyższym pierwszym celem rozprawy była weryfikacja hipotezy mówiącej o tworzeniu funkcjonalnego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach. Drugim celem rozprawy była identyfikacja potencjalnych, nowych partnerów białkowych kanałów BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub> w organellach komórkowych, w tym mitochondriach. Aby osiągnąć główne założenia pracy wyznaczono szczegółowe cele badawcze obejmujące:

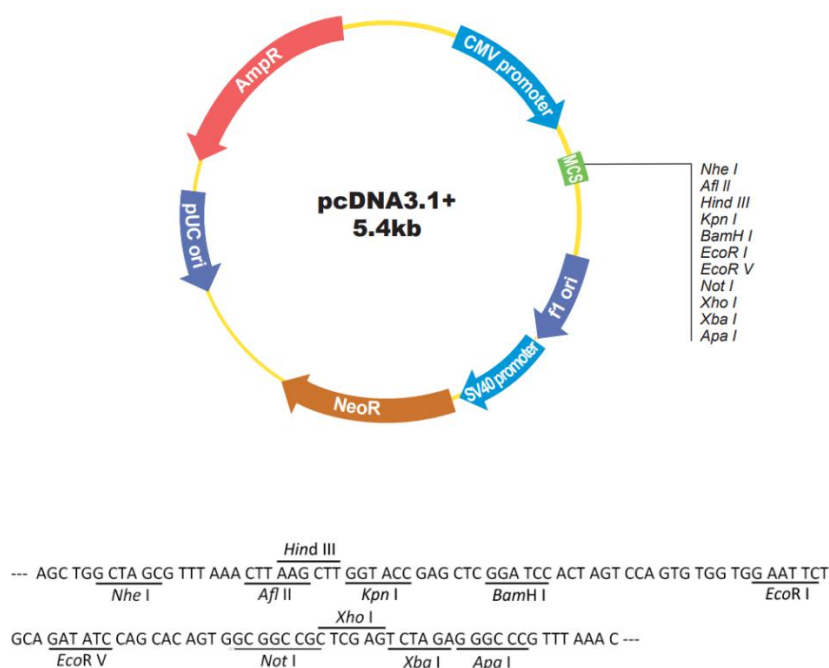
- opracowanie nowego modelu badawczego opartego o przejściową transfekcję komórek HEK293T;
- rejestrację i charakterystykę potencjalnych kanałów potasowych w mitochondriach komórek HEK293T ekspresjonujących izoformę VEDEC z zastosowaniem techniki patch-clamp izolowanych mitoplastów;
- weryfikację obecności i lokalizacji izoformy VEDEC w mitochondriach transfekowanych komórek za pomocą metod biochemicznych;
- przygotowanie wektorów umożliwiających biotynylację partnerów białkowych kanału BK<sub>Ca</sub>;
- identyfikację partnerów białkowych z wykorzystaniem biotynylacji i spektrometrii mas;
- weryfikację wybranych, potencjalnych interakcji z wykorzystaniem technik biochemicznych takich jak koimmunoprecypitacja.

## 5 Materiały i metody

### 5.1 Wektory genetyczne wykorzystane w badaniach

#### Wektor pcDNA3.1(+)

Wektor dzięki obecności promotora CMV umożliwia przejściową ekspresję białek na wysokim poziomie w komórkach ssaczy. Wielkość wektora wynosi 5428 par zasad i niesie ze sobą gen oporności na ampicylinę. Dodatkowo posiada miejsce początku replikacji pUC służący do selekcji i utrzymania plazmidu w *E. coli*.



Rycina 4 Mapa plazmidu pcDNA3.1 z podaną sekwencją polilinkera (źródło: www.genscript.com)

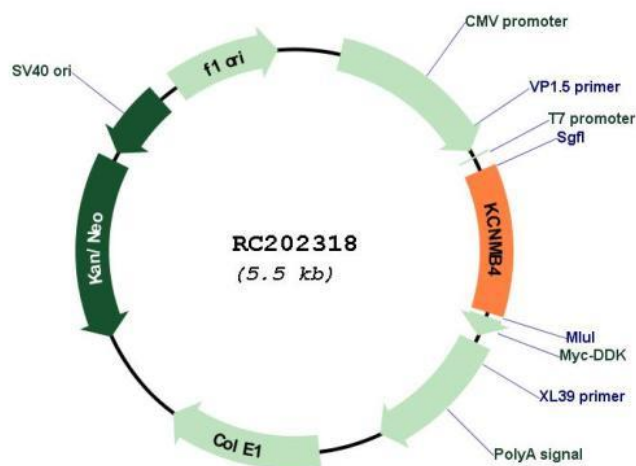
#### Wektor kodujący gen *KCNMA1* – izoforma VEDEC

Wektor został przekazany przez Prof. Harpreet'a Singh'a i poprzednio był wykorzystany do ekspresji tego białka w kardiomiocytach [145]. Gen kodujący izoformę VEDEC mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> został wklonowany do wektora pcDNA3.0 (Invitrogen). Na N-końcu białka znajduje się metka c-Myc. Wielkość wektora wynosi 9155 par zasad i niesie ze sobą gen oporności na ampicylinę.

#### Wektor β4-FLAG

Zastosowano komercyjnie dostępny wektor KCNMB4 (NM\_014505) Human Tagged ORF Clone firmy Origene (KCNMB4 (Myc-DDK-tagged)-Human potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4 (KCNMB4)). Plazmid

powstał w oparciu o wektor pCMV6, który zawiera sekwencję kodującą podjednostkę  $\beta 4$  ludzkiego kanału BK<sub>Ca</sub>. Wektor wraz ze wstawką ma wielkość 5511 par zasad. Wklonowana otwarta ramka odczytu (ORF, ang *open reading frame*) ma wielkość 630 pz. Podjednostka zawiera metkę FLAG oraz Myc na C-końcu białka. Wektor ten niesie geny oporności na kanamycynę oraz neomycynę.



**Rycina 5** Mapa plazmidu RC202318 (źródło: <https://www.origene.com>)

### **Wektor SMAC-TurboID**

Wektor kodujący białko fuzyjne SMAC-TurboID-3xHA w otwartej ramce odczytu został utworzony w naszej Pracowni przez dr. Milenę Krajewską na podstawie matrycy pSmac-GFP i wklonowany do wektora *pcDNA3.1/Hygro(+)*. pSmac-GFP została przekazana przez Douglas'a Green'a (Addgene plasmid #40881; <http://n2t.net/addgene:40881>; RRID:Addgene\_40881) [233]. Matrycą dla enzymu TurboID był utworzony przez dr Milenę Krajewską plazmid *pcDNA3.1-ROMK2-TurboID*.

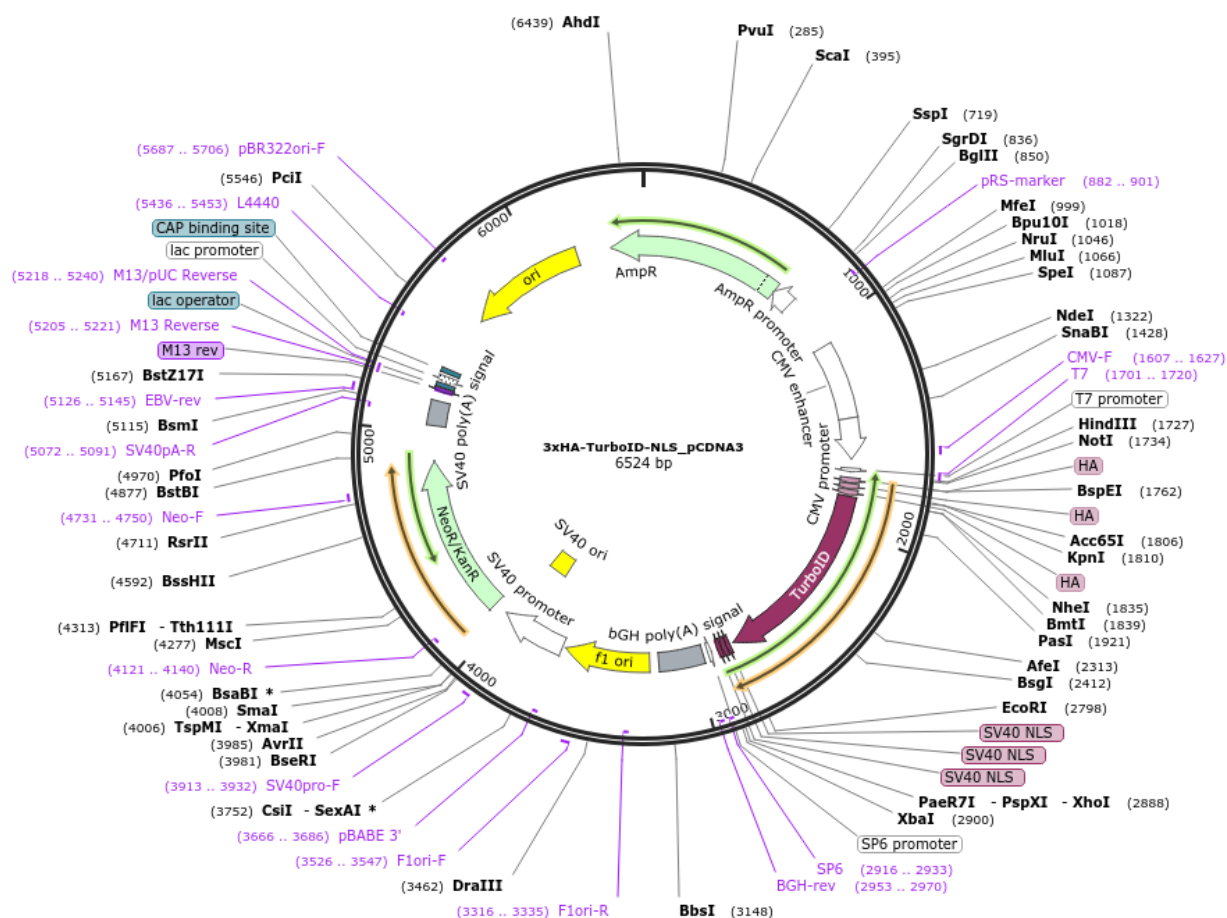
### **Wektor OTC-TurboID**

Wektor pOTC-TurboID zwany dalej OTC-TurboID koduje białko fuzyjne OTC-TurboID-3xHA. Został utworzony w naszej Pracowni przez dr. Milenę Krajewską na podstawie matrycy pOTC udostępnionej przez Nicholasa Hoogenraada (Addgene plasmid #71877; <http://n2t.net/addgene:71877>; RRID:Addgene\_71877) [234]. OTC-TurboID-3xHA zostało

wklonowane do wektora *pcDNA3.1/Hygro(+)*. Matrycą dla enzymu TurboID był utworzony przez dr Milenę Krajewską plazmid *pcDNA3.1-ROMK2-TurboID*.

### Wektor NUC-TurboID

Plazmid *3xHA-TurboID-NLS\_pCDNA3* zwany dalej NUC-TurboID został udostępniony w bazie Addgene przez Alice Ting (Addgene plasmid #107171; <http://n2t.net/addgene:107171>; RRID:Addgene\_107171) (Branon i wsp., 2018). Wielkość wektora wynosi 6524 par zasad i niesie ze sobą gen oporności na ampicylinę.



Rycina 6 Mapa plazmidu *3xHA-TurboID-NLS\_pCDNA3* (źródło: [www.addgene.org](http://www.addgene.org))

### Wektor CYT-TurboID

Plazmid CYT-TurboID uzyskano w ramach realizacji tej pracy na bazie plazmidu *3xHA-TurboID-NLS\_pCDNA3* poprzez wprowadzenie kodonu STOP przed sekwencją kierującą białko TurboID do jądra komórkowego.

### Wektor $\beta$ 4-TurboID

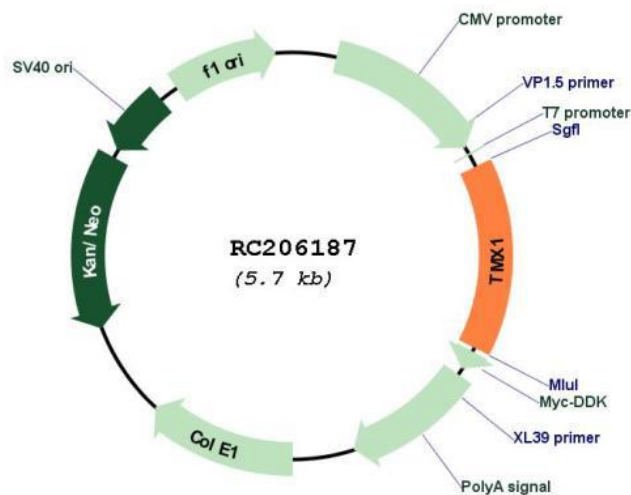
Plazmid  $\beta$ 4-TurboID koduje białko fuzyjne  $\beta$ 4-TurboID-3xHA uzyskano w ramach realizacji tej pracy na bazie plazmidu  $\beta$ 4-FLAG (Origene) poprzez wklonowanie do wektora sekwencji kodującej białko TurboID.

### Wektor $\alpha$ -TurboID

Plazmid  $\alpha$ -TurboID uzyskano w ramach realizacji tej pracy na bazie plazmidu kodujący gen *KCNMA1* – izoforma VEDEC poprzez wklonowanie do wektora sekwencji TurboID.

### Wektor TMX1-FLAG

Zastosowano komercyjnie dostępny wektor TMX1 (NM\_030755) Human Tagged ORF Clone firmy Origene (TMX1, Myc-DDK-tagged, Human thioredoxin-related transmembrane protein 1). Jest to wektor pCMV6, który zawiera sekwencję kodującą błonowe białko związane z tioredoksyną 1. Wektor wraz ze wstawką ma wielkość 5721 par zasad. Wklonowana otwarta ramka odczytu ma wielkość 840 pz. W sekwencji zawarta jest metka FLAG oraz Myc na C-końcu białka. Wektor ten niesie geny oporności na kanamycynę oraz neomycynę.



Rycina 7 Mapa plazmidu RC206187 (źródło: <https://www.origene.com>)

### Wektor $\beta$ 4-HA

Wektor został uzyskany za pomocą klonowania molekularnego. Uzyskano go na podstawie komercyjnie dostępnego wektora KCNMB4 (NM\_014505) Human Tagged ORF

Clone firmy Origene. Jest to wyżej opisany wektor  $\beta$ 4-FLAG, który zawiera sekwencję kodującą podjednostkę  $\beta$ 4 ludzkiego kanału BK<sub>Ca</sub>. Za pomocą metody klonowanie bez użycia enzymów restrykcyjnych („quickchange”) metkę FLAG zastąpiono metką HA. W tym celu zastosowano parę starterów  $\beta$ 4-FLAG-HA. Nowouzyskany wektor ma wielkość 5454 par zasad. Wklonowana otwarta ramka odczytu ma wielkość 630 pz. W wektorze zachowano oporności na kanamycynę oraz neomycynę.

## 5.2 Modele komórkowe wykorzystane w pracy

### 5.2.1 Linia komórkowa HEK293T

HEK293T jest ludzką linią komórkową wyprowadzoną z linii HEK293 embrionalnych komórek nerki (ang. *human embryonic kidney*). Komórki HEK293T posiadają wprowadzony gen kodujący duży antygen T wirusa SV40 (ang. Simian virus 40). Linia ta jest często wykorzystywana w badaniach, gdyż wykazuje szybkie tempo wzrostu oraz łatwą i wysoką wydajność transfekcji [235]. Wedle danych literaturowych komórki HEK293, a zatem też HEK293T nie ekspresjonują podjednostek kanału typu BK<sub>Ca</sub>. Stąd potencjalnie pozwala na selektywną ekspresję poszczególnych podjednostek kanału [236]. Linię HEK293T dzikiego typu oraz wybrane mutanty pochodziły z pracowni dr Davida Strouda z Monash University, Australia (obecnie The University of Melbourne, Australia). Hodowlę komórek ssaczych prowadzono w medium hodowlanym DMEM (ang. *Dulbecco's modified eagle medium*) (Pracownia Chemii Ogólnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN oraz Biowest) o zawartości glukozy 4,5 g/L wzbogaconym w 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, ang. *fetal bovine serum*, Gibco by Life Technologies USA), 100  $\mu$ g/ml penicyliny (Sigma Aldrich), 100  $\mu$ g/ml streptomycyny (Sigma Aldrich), urydynę 50  $\mu$ g/ml (Sigma) oraz 2 mM L-glutaminy lub GlutaMAX Supplement (Gibco by Life Technologies, USA). Komórki hodowano w temperaturze 37°C w sterylnej, wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO<sub>2</sub>. Medium wymieniano co 2-3 dni. Komórki hodowano w plastikowych butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>, na szalkach plastikowych lub płytkach wielodołkowych (Sarstedt, Niemcy). Konfluentne komórki pasażowano w stosunku 1/3 - 1/10 objętości.

### 5.2.2 Linia komórkowa astrocytoma U-87 MG

Ludzkie komórki gwiazdziaka astrocytoma U-87 MG (Uppsala 87 Malignant Glioma,) to linia ustabilizowana z komórek mózgu, pobrana od pacjenta chorego na nowotwór mózgu (glejak). W mitochondriach z linii komórkowej U-87 MG stwierdzono wysoką aktywność mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub>. Hodowlę komórek ssaczych prowadzono w medium hodowlanym DMEM (ang. *Dulbecco's modified eagle medium*) (Pracownia Chemii Ogólnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN oraz Biowest) o zawartości glukozy 4,5 g/L wzbogaconym w 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, ang. *fetal bovine serum*, Gibco by Life Technologies USA), 100 µg/ml penicyliny (Sigma Aldrich), 100 µg/ml streptomycyny (Sigma Aldrich), urydynę 50 µg/ml (Sigma) oraz 2 mM L-glutaminy lub GlutaMAX Supplement (Gibco by Life Technologies, USA). Komórki hodowano w temperaturze 37°C w sterylnej, wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO<sub>2</sub>. Medium wymieniano co 2-3 dni. Komórki hodowano w plastikowych butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>, na szalkach plastikowych lub płytках wielodołkowych (Sarstedt, Niemcy). Komórki pasażowano w stosunku 1/3 - 1/10 objętości.

### 5.3 Przejściowa transfekcja komórek eukariotycznych

Komórki transfekowano z wykorzystaniem polietylenoiminy (PEI, ang. *polyethylenimine*, Sigma Aldrich). Transfekcję przeprowadzano w hodowlach o średniej konfluencji 70-90%.

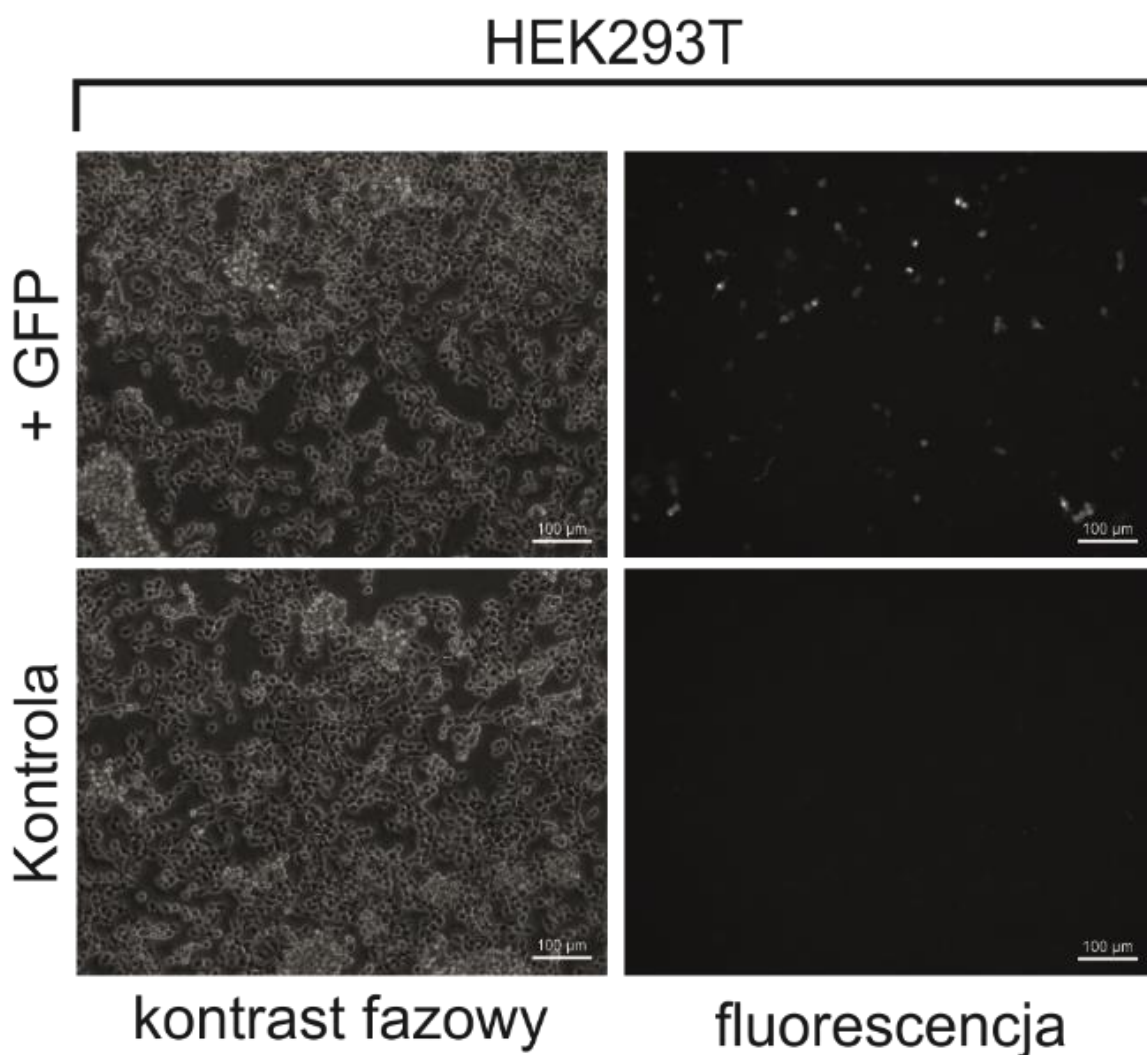
Wodny roztwór PEI sterylizowano za pomocą filtracji filtrem strzykawkowym 0,22µm. W większości doświadczeń proporcje odczynnika transfekującego do DNA wynosiła 3:1. W doświadczeniach z wykorzystaniem techniki TurboID proporcja ta wynosiła 4:1. Do dwóch sterylnych probówek dodano 1 ml medium do transfekcji Opti-MEM (Gibco) o temperaturze 37°C. W przypadku transfekcji hodowli prowadzonej z wykorzystaniem płytek hodowlanych o średnicy 150 mm do pierwszej probówki dodano 20 µg wybranego plazmidu, mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Do drugiej probówki dodano 60 µg roztworu PEI, mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5-15 minut. Następnie zawartość probówki z PEI przenoszono do probówki z DNA, delikatnie mieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu umożliwienia powstania kompleksów PEI z DNA. Kolejno do probówki dodawano pożywkę Opti-MEM do końcowej objętości roztworu równej 5 ml. W następnej kolejności wymieniano medium hodowlane

w hodowlach na medium zawierającą kompleksy DNA – PEI. Transfekowane komórki inkubowano przez 3,5 godzin w inkubatorze hodowlanym, w temperaturze 37°C w atmosferze o 5% zawartości CO<sub>2</sub>. Następnie wymieniono medium Opti-MEM na pełne medium hodowlane DMEM. Po upływie 20-24 godzin komórki zbierano w celu przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń.

W części doświadczeń mających na celu identyfikację partnerów białkowych przeprowadzano transfekcję przejściową inkubując komórki w obecności kompleksów PEI – DNA przez 24 godziny w medium hodowlanym pozbawionym antybiotyków.

Do oszacowania skuteczności transfekcji, we wstępnych doświadczeniach zastosowano plazmid kodujący zielone białko fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*). Transfekcję przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Jako kontrolę negatywną wykorzystano komórki nietransfekowane. Obserwacji skuteczności transfekcji dokonano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus IX71) wykonując zdjęcia w świetle przechodzącym w (kontraście fazowym) oraz we fluorescencji wykorzystując odpowiedni filtr w celu wzbudzenia białka GFP. Zdjęcia wykonano przy użyciu kamery DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0. (Rycina 8). Doświadczenia te wykazały skuteczność PEI jako odczynnika umożliwiającego transfekcję komórek HEK293T.





**Rycina 8** Fotografia mikroskopowa przedstawiająca komórki HEK293T po transfekcji plazmidem kodującym białko GFP z wykorzystaniem PEI (+GFP). Zdjęcie wykonane z użyciem mikroskopu optycznego Olympus IX71. Zdjęcia wykonane w świetle przechodzącym z wykorzystaniem kontrastu fazowego (lewy panel) oraz we fluorescencji po wzbudzeniu GFP (prawy panel). Zdjęcia porównano z komórkami nietransfekowanymi (kontrola).

#### 5.4 Oczyszczenie RNA z komórek eukariotycznych

W celu oczyszczenia RNA z komórek eukariotycznych, wykorzystywano zestaw RNeasy Mini Kit (QIAGEN) zgodnie z protokołem producenta.

Osad komórkowy zawieszano w odpowiedniej objętości buforu RLT (zgodnie z protokołem producenta) a następnie dodawano taką samą objętość etanolu o stężeniu 70%. Uzyskaną zawiesinę komórek przenoszono na kolumny, ze złożem do oczyszczania. Następnie wirowano przy 10 000 x g, przez 15 sekund, przesącz odrzucano. Na kolumnę nakładano 350 µl buforu RW1 i wirowano w tych samych warunkach, a przesącz odrzucano. Bufor RW1 ma na celu odplukanie z membrany białek, kwasów tłuszczowych i innych zanieczyszczeń. W celu usunięcia DNA na złożo dodawano 10 µl roztworu

deoksyrybonukelazy (DNase) zawieszanej w 70  $\mu$ l buforu RDD i inkubowano przez 15 minut. Następnie dodawano 350  $\mu$ l buforu RW1 i wirowano 10 000 x g, przez 15 sekund, po czym przesącz odrzucano. Na kolumnę ze złożem nanoszono 500  $\mu$ l buforu RPE, wirowano 10 000 x g przez 15 sekund, następnie krok powtarzano. Zadaniem buforu RPE jest usunięcie resztek soli, które były zawarte we wcześniej stosowanych buforach do płukania. RNA eluowano wodą wolną od nukleaz do sterylnej probówki wirując kolumnę z prędkością 10 000 x g przez 1 minutę. Stężenie uzyskanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop One (Thermo Scientific). Wartość absorbancji kwasów nukleinowych jest najsilniejsza przy długości fali 260 nm (A260). Stężenie kwasów nukleinowych obliczono na podstawie równania Lamberta-Beer'a przy A260. Absorbancje przy długości fali 230 nm (A230) oraz 280 nm (A280) zmierzono do oszacowania współczynnika czystości A260/A280 oraz A260/A230. Stosunek A260/A280 dla RNA powinien być zbliżony do wartości 2,0 (czyste RNA, wolne od DNA). Stosunek A260/A230 dla RNA i DNA powinien mieścić się w granicach wartości 1,8 – 2,0. Stosunek ten odnosi się do zanieczyszczeń takich jak białka, barwniki czy bufor do izolacji. Do dalszych badań uwzględniano jedynie próbki spełniające kryteria czystości.

## 5.5 Synteza cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji

Matrycą do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA (ang. *complementary DNA*) było RNA oczyszczone z komórek zgodnie z metodą opisaną powyżej. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) zgodnie z instrukcją producenta.

W pierwszym etapie przygotowano mieszaninę zawierającą 5  $\mu$ g RNA, 1  $\mu$ l starterów polinukleotydowych (Random Hexamer Primer) oraz 12  $\mu$ l wody, którą inkubowano w temperaturze 65 °C przez 5 minut. Następnie do schłodzonej mieszaniny dodawano 4  $\mu$ l buforu reakcyjnego (5X Reaction Buffer), 1  $\mu$ l inhibitora RNazy (RiboLock RNase Inhibitor, 20 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l roztworu deoksynukleotydów (10 mM dNTP Mix, ang. *deoxy nucleoside triphosphate*), oraz 1  $\mu$ l enzymu katalizującego reakcję odwrotnej transkrypcji (RevertAid RT, 200 U/ $\mu$ l).

Po wymieszaniu i zwirowaniu mieszaniny reakcyjnej przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji w termocyklerze C1000 Thermal Cycler firmy Bio-Rad Laboratories Inc.. W pierwszym etapie mieszaninę inkubowano w temperaturze 25°C przez 5 minut, następnie

w 42°C przez 60 minut, a w końcowym etapie w 70°C przez 5 min po czym schładzano próbki do 4°C. Uzyskane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

## 5.6 Zastosowane techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do analizy ekspresji wybranych genów

Ekspresję wybranych genów w komórkach HEK293T badano z wykorzystaniem łańcuchową reakcją polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*). W części eksperymentów wykorzystano jakościowy PCR do potwierdzenia obecności ekspresji wybranych genów, natomiast w innych zastosowano ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), aby określić poziom ich ekspresji. W tabeli 1 przedstawiono listę starterów wykorzystanych w niniejszej pracy do analizy ekspresji genów.

**Tabela 1** Sekwencje starterów przednich i wstecznych wykorzystanych do analizy ekspresji wybranych genów

Nazwa genu	Kodowane białko	Sekwencja startera przedniego (5'-3')	Sekwencja startera wstecznego (5'-3')	Wielkość produktu [pz]
<b>VEDEC</b>	izoforma VEDEC podjednostki $\alpha$ kanału mitoBK <sub>Ca</sub>	GGGACAAACAGAATGCAACA	GGTACTCATGGGCTTGATTT	113
<b>KCNMA1</b>	podjednostka $\alpha$ kanału BKCa	CCCGCAGACACTGGCCAATAG	GAGCATCTCTCAGCCGGTAA	167
<b>MT-CO1</b>	Podjednostka oksydazy cytochromu C	TTAGCTGACTCGCCACACTC	GGCCACCTACGGTGAAAAGA	96
<b>KCNMB4 104/105</b>	podjednostka $\beta$ 4 kanału BKCa	ATTACGGATCCAAGCTCCGGGTGG CTTAC	CGGCCGAAGCTTTGGACTCAGA GTTGTTACAGTA	278
<b>KCNMB4 118/119</b>	podjednostka $\beta$ 4 kanału BKCa	TCCTGACCAACCCCAAGTGC	GATGCAGAAGCACATCATCTGG	168
<b>KCNMB4 212/213</b>	podjednostka $\beta$ 4 kanału BKCa	GTTCGAGTGACCTTCACCT	AGGAGCACTTGGGGTTGGT	149
<b>GAPDH</b>	dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego	TCAGACACCATGGGAAGGTGAA	GAATCATATTGGAACATGTAAAC CATG	161
<b>B2M</b>	$\beta$ 2-mikroglobulina	TCTCTGCTCCCCACCTAAG	TGCTGTCTCCATGTTTGATGT	86

W eksperymentach mających na celu sprawdzenie ekspresji wybranych genów przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej mieszaniny reakcyjnej REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich). Zestaw ten zawiera polimerazę DNA *Taq*, mieszaninę deoksynukleotydów (dNTP mix), bufor reakcyjny oraz barwnik obciążający próbkę. Reakcję PCR prowadzono w objętości 25  $\mu$ l. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano

dodając 12,5 µl REDTaq ReadyMix, 1 µl matrycy cDNA, po 1 µl odpowiednich starterów oraz 9,5 µl wody. Reakcję przeprowadzano w następujących warunkach:

1. denaturacja wstępna dsDNA - 95°C, 3 min
2. denaturacja - 95°C, 1 min
3. przyłączanie starterów - 58°C -65°C, 1 min
4. wydłużanie syntetyzowanej nici DNA - 72°C, 3 min  
kroki 2-5 powtarzano 30-35 razy
5. końcowe wydłużanie syntetyzowanej nici DNA - 72°C, 5 min
6. schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 4°C

Obecność produktu po amplifikacji analizowano z wykorzystaniem elektroforezy na żelu agarozowym w obecności standardu wielkości (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Scientific, lub 100 bp TrackIt 100 bp DNA Ladder, Invitrogen). Żel o stężeniu 0,7% - 1% agarozy przygotowywano w buforze TBE o składzie 89 mM Tris-kwas borowy; 2 mM EDTA; pH 8.3. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy stałym napięciu 100 - 110 V. W celu wizualizacji uzyskanych rozdziałów elektroforetycznych wykonywano zdjęcia za pomocą urządzenie do dokumentacji żeli G:BOX transluminator UV-VIS wraz z oprogramowaniem (Syngene).

## **5.7 Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)**

Analizę ilościową ekspresji wybranych genów wykonywano z wykorzystaniem matrycy cDNA przygotowanej w sposób opisany powyżej. W doświadczeniach tych zastosowano reakcję łańcuchową polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-qPCR, ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*). Reakcje RT-qPCR przeprowadzono na urządzeniu 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych (MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode; 0,1 ml; Applied Biosystems, USA).

W celu przeprowadzenia reakcji RT-qPCR przygotowano mieszaninę zawierającą specyficzne dla badanego genu startery przednie i wsteczne w końcowych stężeniach 10µM każdy, 1 µl cDNA, 10 µl mieszaniny SYBER Green Select Master Mix (mieszanina polimerazy oraz oligonukleotydowych sond znakowanych fluoroforem) oraz 7 µl wody. Całość przenoszono do studzienki w płytce 96-dołkowej. Przygotowaną płytkę zaklejało folią

(MicroAmp Optical Adhesive Film, PCR compatible DNA/RNA/RNase Free, Applied Biosystems). Zamkniętą płytkę wytrząsano oraz wirowano przy 500 x g przez 5 minut. Temperatura na 4 etapie cyklu reakcji RT-qPCR zależna była od wybranych starterów. Reakcję rozpoczynano poprzez inkubację próbek w 50°C przez 2 min, po czym zwiększano temperaturę do 95°C i inkubowano przez 10 min. Następnie przeprowadzano 45 cykli obejmujących inkubację w 95°C przez 15 sekund, inkubację w temperaturze 50-60°C (w zależności od użytych starterów) przez 1 minutę. Otrzymane wyniki analizowano na podstawie wartości cykli progowych (Ct) dla badanego genu w badanych liniach komórkowych. Genem referencyjnym była dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego GAPDH (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). W celu uniknięcia fałszywie dodatnich odczytów zastosowano kontrole podając do mieszaniny reakcyjnej wodę zamiast cDNA.

## 5.8 Mutageniza wybranych wektorów poprzez klonowanie DNA bez wykorzystania enzymów restrykcyjnych (*restriction-free cloning*)

W trakcie realizacji niniejszej pracy przygotowano wektory kodujące wybrane białka sfuzjowane z odpowiednimi metkami lub białkiem TurboID. W tym celu zastosowano klonowanie bez użycia enzymów restrykcyjnych, tzw. RFC (ang. *restriction-free cloning*) [237]. Metoda ta pozwala na wprowadzanie, usunięcie lub modyfikację wybranego fragmentu sekwencji DNA w plazmidzie. W niniejszej pracy technikę tę wykorzystano do wprowadzenia sekwencji kodujących enzym TurboID oraz metki w genach kodujących wybrane białka. Zmiany w sekwencji kodującej wprowadzane były z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów (Tabela 2).

**Tabela 2** Sekwencje starterów wykorzystanych w pracy do mutagenazy metodą *quickchange*

Nazwa plazmidu	Cel mutagenazy	Sekwencja startera przedniego (5'-3')	Sekwencja startera wstecznego (5'-3')
<b>β4-FLAG-HA</b>	zmiana metki FLAG na HA w podjednostce β4 kanału BK <sub>Ca</sub>	ATACGATGTTCCAGATTACGCTGTTTA AACGGCCGGCCGC	TCTGGAACATCGTATGGGTAACGCG TAGAGAACTTGCGC
<b>CYT-TurboID</b>	Wprowadzenie stop kodonu do plazmidu NUC-TurboID	AAAGTAGTAATGAGAATTCAGCAGGG CCGACC	TCTCATTACTACTTTTCGGCAGACCG CAGAC
<b>TURBO-ID-B4</b>	Fuzja TurboID do podjednostki β4 kanału BK <sub>Ca</sub>	TGGATTACAAGGATGACGACGATAAG GTTAAAGACAATACTGTGCCTCTGA	TATGACCGCGCCGGCCGTTTACTTT TCGGCAGACCGCAG
<b>TURBO-ID-VEDEC</b>	Fuzja TurboID do podjednostki VEDEC kanału BK <sub>Ca</sub>	TGAGGCCACCTGGTGCCATGAAAG ACAATACTGTGCCTCTGA	ATCAGCTTCTGCTCCTCGGCGCCTTTT CGGCAGACCGCAG

Reakcję PCR prowadzono w objętości 20  $\mu$ l. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano dodając 4  $\mu$ l buforu reakcyjnego 5x Phusion HF, 2  $\mu$ l dNTP mix (200  $\mu$ M), po 0,5  $\mu$ l startera przedniego i wstecznego (w końcowym stężeniu 0,25  $\mu$ M), 50 ng matrycowego DNA (wybrany plazmid przeznaczony do modyfikacji), 0,2  $\mu$ l Phusion Hot Start II Polymerase (2U/ $\mu$ l) oraz odpowiednią objętość wody. Reakcję przeprowadzano w następujących warunkach:

1. denaturacja wstępna dsDNA - 98°C, 30 sek
2. denaturacja - 98°C, 10 sek
3. przyłączanie starterów - 55°C - 72°C, 1 min
4. wydłużanie syntetyzowanej nici DNA - 72°C, 1 min/1000 pz + 2 min  
kroki 2-4 powtarzano 18 razy
5. końcowe wydłużanie syntetyzowanej nici DNA - 72°C, 15 min
6. schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 4°C

Po przeprowadzeniu reakcji PCR próbkę inkubowano z enzymem restrykcyjnym *DpnI* (Thermo Scientific) przez 120 minut w temperaturze 37°C w celu degradacji metylovanego DNA (matryca DNA podlegająca modyfikacji).

W celu uzyskania klonów bakteryjnych niosących wybrany wektor komórki kompetentne (*E. coli* NEB Stable C2987I, New England Biolabs) transformowano z wykorzystaniem szoku cieplnego. Do zawiesiny 50 – 100  $\mu$ l bakterii dodawano 1-2  $\mu$ l produktu klonowania i inkubowano na lodzie przez 30 min. Następnie komórki poddawano 45-90 sekundowemu szokowi termicznemu (42°C) i ponownie inkubowano na lodzie przez kilka minut. Do bakterii dodawano pożywkę LB lub SOC (2% peptony roślinne; 0,5% ekstrakt z drożdży; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukoza) i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę wytrząsając hodowlę w tempie 180 obrotów/min. Po zakończeniu inkubacji bakterie wirowano (11 000 x g) przez 30 sekund. Osad bakteryjny zawieszano w pożywce, a następnie przenoszono na szalki hodowlane z medium stałym zawierającym odpowiedni antybiotyk. Szalki inkubowano w 37°C przez noc w celu uzyskania pojedynczych klonów. W celu zachowania hodowli wybrane hodowle bakteryjne zawieszano w pożywce hodowlanej LB zawierającej glicerol w końcowym stężeniu 15% wagowo-objętościowo. Zawieszone komórki bakteryjne przenoszono do krioprobówek i przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C.

Z uzyskanych klonów izolowano plazmidowe DNA i sekwencjonowano w celu identyfikacji plazmidów z pożądanymi mutacjami.

## **5.9 Oczyszczanie plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych**

W celu oczyszczenia niewielkiej ilości plazmidowego DNA wykorzystywano 5 ml pożywki płynnej LB z odpowiednim antybiotykiem (ampicyliną w stężeniu 100 µg/ml lub kanamycynę w stężeniu 25 µg/ml). Bakterie zawieszano w medium hodowlanym i inkubowano przez noc w 37°C w inkubatorze (Infors HT) wytrząsając hodowlę w tempie 180 obrotów/minutę. Po namnożeniu hodowli bakterie wirowano i izolowano plazmidy zgodnie z instrukcją zestawu GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx). Procedura ta pozwala na uzyskanie kilkudziesięciu µg plazmidowego DNA.

Mikrokolumnę wiążącą, aktywowano za pomocą 30 µl buforu aktywacyjnego Buffer PL. Bakterie zawieszono w 250 µl buforu do zawieszania Cell R po czym dodawano 250 µl buforu lizującego Lysis Blue. Po lizie komórek bakteryjnych dodawano 350 µl buforu Neutral B w celu precypitacji białek, a następnie próbki wirowano przy prędkości 11 000 x g przez 15 minut. Uzyskany supernatant przenoszono do kolumnienki wiążącej, umieszczonej w probówce odbierającej. Supernatant wirowano przy 11 000 x g przez 1 minutę. Następnie próbkę płukano z wykorzystaniem buforu Wash PLX1 i wirowano przy 11 000 x g przez 1 minutę. Następnie płukano próbkę z wykorzystaniem buforu Wash PLX2 i wirowano przy 11 000 x g przez 1 minutę. W celu usunięcia pozostałości buforu kolumnę wirowano przez 2 minuty przy 11 000 x g. Elucji DNA dokonywano z wykorzystaniem wody lub buforu do elucji wirując kolumnę przez 2 minuty przy 11 000 x g przez 1 minutę.

W celu uzyskania większych ilości plazmidowego DNA z bakterii kulturę namnażano w 250/500 ml pożywki płynnej LB zawierającej odpowiedni antybiotyk. Plazmidowe DNA izolowano wykorzystując zestaw PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega) zgodnie z instrukcją. Hodowlę inkubowano przez noc w 37°C w inkubatorze wytrząsając w tempie 180 obrotów/minutę. Następnie, bakterie wirowano 10 minut 5000 x g. Osad bakteryjny zawieszono w 12 ml buforu Cell Resuspension Solution, a następnie dodawano 12 ml buforu Cell Lysis Solution w celu przeprowadzenia lizy. Całość mieszano po czym inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po lizie komórek bakteryjnych dodawano 12 ml buforu Neutralization Solution i mieszano po czym całość wirowano przy 14 000 x g przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie za pomocą pompy próżniowej

supernatant filtrowano z wykorzystaniem kolumny PureYield Clearing Column umieszczonej w kolumnie PureYield Maxi Binding Column. Oczyszczony przesącz związany do kolumny PureYield Maxi Binding Column przepłukano za pomocą 5 ml buforu Endotoxin Removal Wash w celu usunięcia zanieczyszczeń np. RNA czy białka. Następnie kolumnę przepłukano 20 ml buforu Column Wash i suszono przez 5 minut. DNA eluowano za pomocą 1 ml wody wolnej od nukleaz. Stężenie uzyskanego DNA oznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop One (Thermo Scientific) przy długościach fal 260 nm i 280 nm, jako kontrolę wykorzystując wodę.

## **5.10 Metody oczyszczania frakcji wzbogaconej w mitochondria**

Frakcję komórkową wzbogaconą w mitochondria, oczyszczano stosując dwa protokoły w zależności od przeznaczenia uzyskanej frakcji mitochondriów.

### **5.10.1 Oczyszczanie mitochondriów do eksperymentów elektrofizjologicznych**

W celu uzyskania frakcji mitochondrialnej wykorzystywanej do eksperymentów typu patch-clamp komórki rosnące na szalkach plastikowych odrywano z wykorzystaniem trypsyny, zwirowywano przy  $600 \times g$  przez 10 min i zawieszono w roztworze izolacyjnym (250 mM sacharoza, 5 mM HEPES/KOH, 1 mM EGTA, pH 7,2) z dodatkiem 1 mM PMSF oraz inhibitorów proteaz (cOmplete, Roche). Następnie komórki homogenizowano 10-krotnie w szklanym homogenizatorze (rozmiar 19, Kontes Glass Co.). Homogenat wirowano przy  $9200 \times g$ , przez 10 min w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Osad zawieszono w 1 ml powyższego buforu i wirowano przy  $750 \times g$  przez 10 min w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie supernatant zawierający mitochondria wirowano przy  $9200 \times g$ , przez 10 min w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Osad zawierający frakcję wzbogaconą w mitochondria zawieszono w 300  $\mu\text{l}$  buforu sacharozowego.

### **5.10.2 Oczyszczanie mitochondriów do eksperymentów biochemicznych**

W celu zwiększenia wydajności oczyszczania frakcji wzbogaconych w mitochondria zastosowano protokół wykorzystujący wstępną permeabilizację komórek z wykorzystaniem digitoniny [238]. Digitonina to niejonowy detergent, który permeabilizuje błony biologiczne poprzez interakcję z cholesterolem.

Komórki oderwane od podłoża z wykorzystaniem trypsyny lub zdrapane mechanicznie (25-50 mln), po przepłukaniu PBS, zwirowywano przy  $600 \times g$  przez 10 min i zawieszano



w 8 ml schłodzonego buforu do izolacji zawierającym 210 mM mannitol, 70 mM sacharozę, 0,5 M HEPES-KOH oraz albuminę z surowicy bydłowej 1 mg/ml (BSA, ang. *bovine serum albumin*), pH 7,2. Do buforu dodawano mieszaninę inhibitorów proteaz bez EDTA (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) oraz 1 mM PMSF. Następnie do zawiesiny komórek, w celu permeabilizacji błony zewnętrznej dodawano digitoninę (Servo) rozpuszczonej w DMSO, w maksymalnym końcowym stężeniu 400 µg/ml. Po inkubacji przez 1 minutę zawiesinę rozcieńczano do 50 ml buforem do izolacji i wirowano 3000 x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Otrzymany osad zawieszono w 8 ml buforu do izolacji i homogenizowano na lodzie 10-krotnie, w szklanym homogenizatorze (rozmiar 19, Kontes Glass Co.). Na tym etapie zachowywano część homogenatu w celu wykorzystania do eksperymentów kontrolnych. Do pozostałej części homogenatu dodawano bufor do izolacji do końcowej objętości 50 ml i wirowano na rotorze wychylnym przy 1200 x g przez 10 min w temperaturze 4°C w celu usunięcia ciężkich frakcji. Zebrany supernatant wirowano kilkakrotnie przy 1200 x g przez 10 min w temperaturze 4°C do momentu gdy osad był niewidoczny. Następnie zebrany supernatant zawierający frakcję mitochondrialną wirowano przy 10 000 x g przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Uzyskany osad zawieszono w 10 ml buforu do izolacji i wirowano przy 10 000 x g przez 30 minut przy temp. 4°C. Osad mitochondriów zawieszono w 700 µl buforu izolacyjnego i wirowano przy 10 000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Następnie osad zawieszano w buforze izolacyjnym bez BSA i wirowano 10 000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Tak oczyszczone mitochondria zawieszano w 100 µl zimnego buforu izolacyjnego bez BSA. Próbkę zmrażano w ciekłym azocie i przechowywano do dalszych eksperymentów w -80°C.

### **5.11 Identyfikacja potencjalnych partnerów białkowych podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> z wykorzystaniem biotynylacji białek**

W celu uzyskania informacji dotyczących potencjalnych oddziaływań podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> wykorzystano biotynylację potencjalnych partnerów z wykorzystaniem zmodyfikowanej ligazy BirA (TurboID) [239]. Doświadczenia te obejmowały przygotowanie konstruktów kodujących wybrane podjednostki sfuzjowane z enzymem TurboID, ekspresję białek i biotynylację partnerów w komórkach HEK293T, izolację białek biotynylowanych oraz ich identyfikację.

## **Biotynylacja oraz oczyszczanie biotynylowanych białek**

Komórki HEK293T transfekowano przejściowo wybranymi plazmidami kodującymi wybrane białka sfuzjowane z enzymem TurboID z wykorzystaniem odczynnika PEI (w stosunku 4:1 do plazmidowego DNA). 24 godziny po transfekcji zmieniano medium zawierające PEI i DNA na pełną pożywkę, dodawano biotynę w stężeniu końcowym 0,5 mM i inkubowano przez 3 godziny.

Procedura oczyszczania biotynylowanych białek została przeprowadzona zgodnie z wcześniej opublikowaną metodą [240, 241].

W celu solubilizacji próbek materiał zawieszano w 5 ml buforu do solubilizacji. Następnie próbki sonikowano wykorzystując sonikator cyfrowy BRANSON Digital sonifier). Próbki sonikowano na lodzie przez 50% cyklu pracy przez 1 minutę przy pulsacyjnym trybie pracy co 0,1 sekundy (całkowity czas sonikacji trwał 2 minuty). Po sonikacji do próbek dodawano 9 ml buforu do solubilizacji i mieszano na rotatorze (Multi Bio RS-24, Biosan) przez 10 minut w temperaturze 4°C. Następnie próbkę wirowano przy 5500 x g przez 30 minut w temperaturze 4°C na rotorze wychylnym (ang. *swing-out*) (rotor 11133, Sigma). W trakcie wirowania komórek po solubilizacji przygotowano złożę magnetyczne. W tym celu 250 µg złoża magnetycznego z immobilizowaną streptawidyną Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) przepłukano buforem do solubilizacji komórek. Na statywie magnetycznym (PureProteome Magnetic Stand) zatrzymano złożę magnetyczne, a bufor odrzucono. Supernatant po wirowaniu mieszano na rotatorze ze złożem magnetycznym przez noc w 4°C. Następnego dnia złożę z biotynylowanymi białkami oddzielono od roztworu zawierającego resztę lizatu na statywie magnetycznym. Złożę przepłukano dwukrotnie na rotatorze buforem do płukania 1 (5 ml przez 10 minut). Następnie próbki dwukrotnie przepłukano na rotatorze buforem do płukania 2 (5 ml przez 10 minut). Następnie złożę dwukrotnie przepłukano na rotatorze buforem do płukania 3 (5 ml przez 10 minut). Próbki w wariacie C dodatkowo przepłukano dwukrotnie buforem do płukania 4 (5 ml przez 10 minut). Na koniec w celu usunięcia wszystkich detergentów i soli złożę przepłukano 3-krotnie za pomocą 10 mM Tris pH 7.4 (5 ml przez 10 minut) w celu rehydratacji. Złożę zatrzymano na statywie magnetycznym, usunięto bufor i zawieszano w 250 µl 10 mM Tris pH 7.4. 25 µl próbki zachowano do dalszych eksperymentów, resztę próbek przekazano do analizy spektrometrem mas do Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Parametry analizy wykonanej przez Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas. Tolerancja masy prekursora: 5 ppm. Jony produktu

przeszukiwano z tolerancją masy 0,01 Da. Maksymalny stan naładowania jonu prekursora użytego do poszukiwań: 7. Metylację cystein poszukiwano jako utrwaloną modyfikację, a utlenianie metionin jako modyfikacje zmienne. Jako enzym stosowano trypsynę. Widma spektrometrii mas przeszukiwano przy użyciu wyszukiwarki MASCOT w bazie danych sekwencji białek Homo sapiens.

Poniżej przedstawiono skład poszczególnych buforów wykorzystanych w opisanych eksperymentach.

Skład buforu do solubilizacji:

- 50 mM Tris/HCl pH 7.4
- 150 mM NaCl
- 0.4% SDS
- 1% NP-40
- 1mM EGTA
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- mieszaniny inhibitorów proteaz (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)
- 2 mM PMSF

Skład buforu do płukania 1:

- 50 mM Tris pH 7.4
- 2% SDS

Skład buforu do płukania 2:

- 0.1% (w/v) deoksyholan sodu
- 1% (w/v) Triton X-100
- 1 mM EDTA
- 500 mM NaCl
- 50 mM HEPES/NaOH pH 7.5

Skład buforu do płukania 3:

- 0.5% (w/v) deoksyholan sodu
- 0.5% (w/v) NP-40
- 1 mM EDTA

- 250 mM LiCl
- 10 mM Tris, pH 7.4

## 5.12 Koimmunoprecypitacyjne oczyszczanie białek (Co-IP)

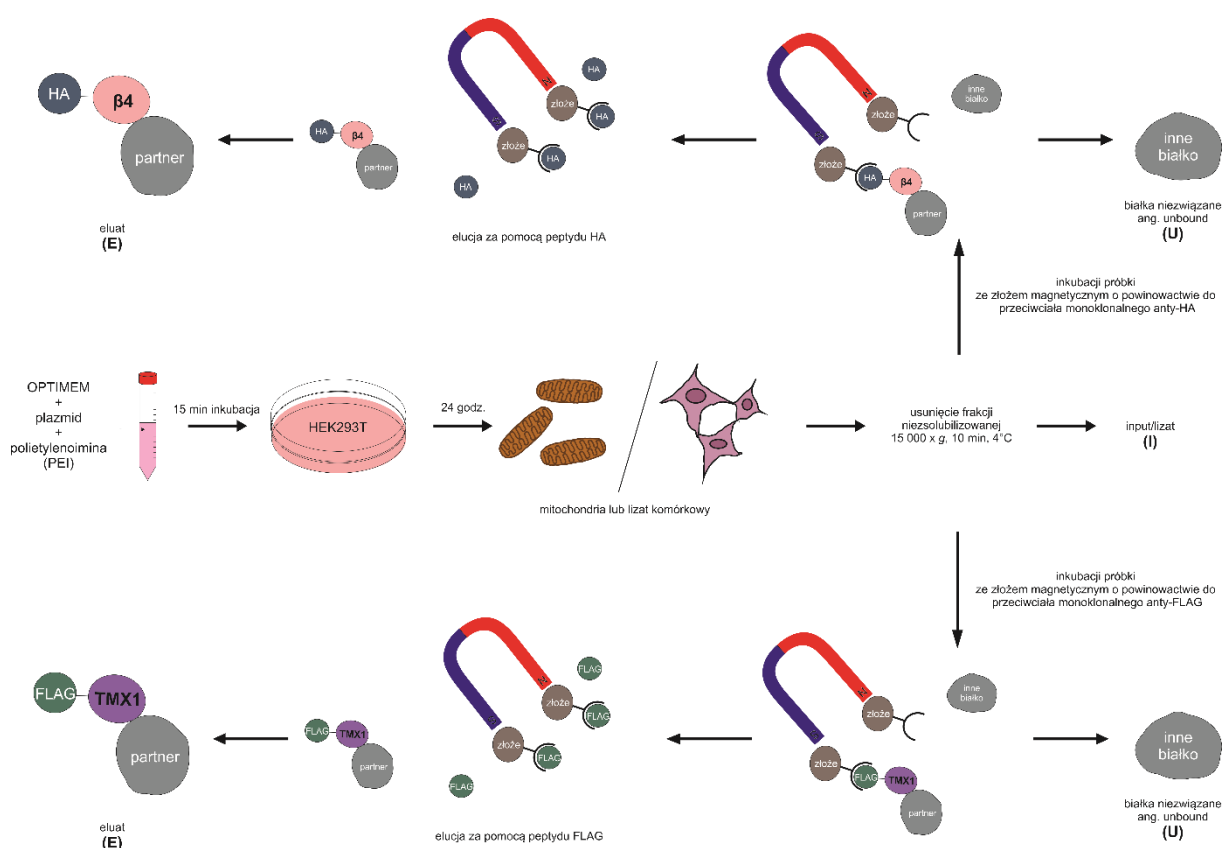
Immunoprecypitacja to metoda polegająca na oczyszczeniu wybranego białka z homogenatu bądź frakcji komórkowej. Do tego celu wykorzystuje się złożę związane kowalencyjnie ze swoistym przeciwciałem. Celem zastosowanej metody było identyfikacja interakcji pomiędzy białkami, które odnaleziono metodą biotynylacji TurboID i analizą spektrometrii mas.

Do próbki dodawano taką ilość buforu do solubilizacji (Tabela 3) by końcowe stężenie białka wynosiło 1mg/ml buforu. W przypadku próbki mitochondrialnej mitochondria zwirowywano 20 000 x g, przez 10 min w temperaturze 4°C. Mitochondria lub całe komórki solubilizowano na rotatorze przez 30 minut w temp. 4°C. Po tym czasie próbkę zwirowano w celu usunięcia części niezsolubilizowanej przy 15 000 x g przez 10 min, w 4°C. Na tym etapie zachowano około 10% próbki. Do oczyszczania przygotowano złożę magnetyczne sprzężone z przeciwciałem monoklonalnym anty-FLAG (DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science) lub przeciwciała monoklonalnego anty-HA (HA-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science). 50 µl złoża zawieszono w próbówce typu Eppendorf, którą umieszczono w statywie magnetycznym i przepłukano 500 µl buforu do płukania. Próbki po solubilizacji inkubowano ze złożem przez 1 godzinę lub przez noc w temperaturze 4°C na rotatorze. Następnego dnia odciągano bufor i zachowywano jako próbkę zawierającą białka niezwiązane ze złożem (ang. unbound). Pozostałe w probówce złożę opłukiwano 10-krotnie buforem do płukania. W kolejnym kroku przeprowadzano elucję z wykorzystaniem peptydu DDDDK o stężeniu 1 mg/ml (DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science) lub peptydu HA (Roche) o stężeniu 1 mg/ml. Elucję prowadzono przy użyciu 20 µl peptydu zawieszonego w buforze do płukania przez 30 minut w temp. 4°C. Elucję przeprowadzono 2-krotnie. Zebrany eluat połączono i zamrożono w -20°C do dalszych eksperymentów. Skład buforów wykorzystanych w tych doświadczeniach opisano w tabeli 3.

**Tabela 3 Skład buforów wykorzystanych do oczyszczania białek metodą Co-IP**

Skład	Bufor do solubilizacji		Bufor do płukania	
	komórki	mitochondria	komórki	mitochondria
digitonina	1%	1%	0,1 %	0,1 %
Tris pH 7,7	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
EDTA	5mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM
NaCl	150mM	100mM	150mM	150mM
glicerol	bez dodatku	10%	10%	10%
PMSF	1mM	1mM	1mM	1mM
cOmplete	1x	1x	1x	1x

W części doświadczeń komórki HEK293T transfekowano równocześnie dwoma plazmidami kodującymi wybrane białka szujowane z metką FLAG i HA (Rycina 9). W tych eksperymentach po solubilizacji próbkę dzielono na dwie równe części. Po czym prowadzono oczyszczanie zgodnie z opisem powyżej stosując odpowiednie złoża.



**Rycina 9** Koimmunoprecypacyjne oczyszczenie z próbki białek wraz z partnerami na złożu magnetycznym o powinowactwie wobec przeciwciała anti-FLAG lub anti-HA. Komórki HEK293T transfekowano jednym bądź dwoma plazmidami zawierającymi metki FLAG i HA. Rysunek własny

## 5.13 Pomiar stężenia białka w próbkach

Pomiarów stężenia białka w próbkach dokonywano za pomocą metody Bradforda oraz kwasu bicynochoninowego (BCA, ang. *bicinchoninic acid*).

### 5.13.1 Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Metoda Bradforda opiera się na reakcji reszt aminokwasowych lizyny, argininy oraz w mniejszym stopniu histydyny i aminokwasów aromatycznych w białkach z anionową formą błękitu Coomassie G-250.

Pomiar stężenia białka w próbce otrzymanej z preparatów pozyskanych z różnych frakcji komórkowych rozpoczęto od przygotowania krzywej wzorcowej na podstawie białka referencyjnego albuminy bydlęcej (BSA) o znanym stężeniu: 0, 1, 3, 5, 7, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Białko rozcieńczano w 100 mM NaOH do końcowej objętości 50  $\mu\text{l}$ . Próbki badane mierzono w dwóch powtórzeniach. Pobrano 1  $\mu\text{l}$  i 2  $\mu\text{l}$  próbki badanej i dodawano do niej 50  $\mu\text{l}$  NaOH (100 mM) w celu denaturacji białek. Inkubowano przez 5 minut. Podobnie zdenaturowano próbki krzywej wzorcowej. Do roztworów krzywej wzorcowej i próbki badanej dodano po 1 ml komercyjnie dostępnego barwnika Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad). Odczynnik rozcieńczonego w stosunku 1:4 zgodnie z instrukcją producenta. Następnie próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Pomiar absorbancji mierzono w kuwetkach objętości 1,5 ml (Disposable cuvettes; 1,5 ml semi-micro; PS; dimensions 12,5x12,5x45 mm; BRAND GMBH+ CO KG) z wykorzystaniem spektrofotometru Biomate3 (Thermo Scientific) przy długości fali 595 nm.

### 5.13.2 Metoda z zastosowaniem kwasu bicynochoninowego (BCA)

Metoda oznaczania białka z zastosowaniem kwasu bicynochoninowego (BCA, ang. *bicinchoninic acid*) opiera się na redukcji jonów miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{+}$  przez aminokwasy t.j. cysteinę, cystynę, tryptofan, tyrozynę i wiązanie peptydowe w środowisku zasadowym. Następnie jon  $\text{Cu}^{+}$  zostaje chelatowany przez dwie cząsteczki BCA tworząc barwny kompleks koloru fioletowego. Intensywność barwy jest proporcjonalna do stężenia białka w próbce.

Pomiar stężenia białka wykonano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu pomiarowego BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible, Pierce (Thermo Scientific). Na płytkę 96-well rozpipetowano albuminę surowicy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumine*) o znanym stężeniu (2 mg/ml). Przygotowano krzywą wzorcową do pomiaru

białka. Na krzywą składało się 8 punktów pomiarowych o różnym stężeniu białka oraz próba bez zawartości białka (ang. *blank*). Każdy punkt pomiarowy krzywej wzorcowej rozpipetowano do dwóch dołków, po 10  $\mu$ l. Pomiar próbki badanej także wykonano dwukrotnie. Do pierwszego pomiaru próbkę rozcieńczono 5-krotnie: do 2  $\mu$ l próbki badanej dodano 2  $\mu$ l 10% SDS i 6  $\mu$ l wody. Do drugiego pomiaru próbkę rozcieńczono 10-krotnie: do 1  $\mu$ l próbki badanej dodano 2  $\mu$ l 10% SDS i 7  $\mu$ l wody. W falkonie przygotowano mieszaninę A+B (BCA Protein Assay Kit, Pierce). BCA reagent A i BCA reagent B zamieszano zgodnie z instrukcją producenta w stosunku objętościowym 50:1. Do każdego dołka pomiarowego (zarówno próbki oraz standardu do krzywej wzorcowej) dodano po 200  $\mu$ l mieszaniny A+B. Całość inkubowano przez 30 min. w temperaturze 37°C. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fali 562 nm na czytniku mikropłytek (PerkinElmer). Na podstawie standardu utworzono krzywą wzorcową BCA za pomocą programu EnSpireMenager (PerkinElmer).

Badane próbki w eksperymentach wykorzystujących koimmunoprecypitację białek zawieszono w buforze do solubilizacji zawierającym detergenty. W związku z tym do przygotowania krzywej wzorcowej przy pomiarze stężenia białek, zamiast 10% SDS stosowano taką samą ilość (8  $\mu$ l) buforu do solubilizacji.

## **5.14 Metoda Western blot**

Metoda Western blot to technika pozwalająca na jakościowe wykrycie obecności białka w badanej próbce. Próbkami były lizaty całokomórkowe lub wybrane frakcje komórkowe. Procedura obejmowała przygotowanie próbek, elektroforezę, transfer rozdzielonych białek na membranę PVDF oraz immunodetekcję.

### **5.14.1 Rozdział białek na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących Tricine SDS-PAGE**

Badane próbki zawieszano w buforze Laemmliego (4x Laemmli Sample Buffer, BioRad), 100 mM DTT (1,4-ditiotreitol, ang. 1,4-dithiothreitol) oraz 1 mM PMSF. Próbki ogrzewano w temperaturze 95°C przez 5 min w celu przyspieszenia denaturacji oraz inaktywacji proteaz. W przypadku analizy białek wymagających denaturacji w niższej temperaturze (np. 37°C), czas inkubacji wynosił 15 minut oraz w niektórych przypadkach stosowano dodatkową sonifikację w łaźni wodnej przez 15 minut.

W celu przeprowadzenia elektroforetycznego rozdziału białek przygotowywano poliakryloamidowy żel rozdzielający i zagęszczający stosując bufor o składzie 1 M Tris, 0,1 %

SDS, pH 8,45. Standardowo zastosowano żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający. Żel rozdzielający wzbogacony był w 10 % glicerol. W celu określenia wielkości badanych białek na żel nanoszono 5 µl markera wielkości białek (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Elektroforezę prowadzono stosując bufor katodowy zawierający 0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS, pH 8,25 oraz anodowy o składzie 0,2 M Tris, pH 8,9/HCl przy stałym napięciu 120V i maksymalnym natężeniu 120 mA w przypadku 1 żelu oraz przy stałym napięciu 150 V i maksymalnym natężeniu 150 mA w przypadku prowadzenia równoległej elektroforezy dwóch żeli.

#### 5.14.2 Elektroforeza Blue Native PAGE

Elektroforeza Blue Native pozwala na analizę kompleksów białkowych w stanie natywnym. W przypadku analizy kompleksów we frakcjach mitochondrialnych pierwszym etapem była solubilizacja próbek w schłodzonym do 4°C buforze zawierającym 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10% glicerolu, 1 % digitoniny oraz 1mM PMSF. Po 15 minutowej inkubacji na lodzie próbki wirowano 20 000 x g, przez 10 min, w temperaturze 4°C w celu usunięcia niezsolubilizowanego materiału. Do zebranego supernatantu dodawano bufor obciążający próbkę zawierający 0,5% błękitu Coomassie G-250, 50 mM kwas ε-aminokapronowy oraz 10 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0. W przypadku próbek po koimmunoprecypitacyjnym oczyszczaniu białek, pomijano solubilizację próbek dodając jedynie bufor obciążający.

W celu przeprowadzenia elektroforezy w warunkach niedenaturujących przygotowano gradientowy, poliakryloamidowy żel rozdzielający o stężeniu 4 % - 10 % oraz 4 % żel zagęszczający. Żel rozdzielający i zagęszczający zawierał dodatkowo 65 mM kwas ε-aminokapronowy, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0. Ponadto bufor wykorzystywany do przygotowania żelu gradientowego zawierający poliakryloamid o stężeniu 10 % wzbogacony był w glicerol w stężeniu 20 %. Na żel nanoszono 50 µl markera wielkości białek wielkości 66-669 kDa (HMW Native Marker Kit, Cytiva). Rozdział białek prowadzono stosując bufor katodowy o składzie 50 mM Tricine pH 7,0, 15 mM Bis-Tris, 0,02% błękitu Coomassie G-250 oraz anodowy o składzie 50 mM Bis-Tris/Hcl pH 7,0. Niezapełnione studzienki uzupełniano mieszaniną buforu do solubilizacji oraz barwnika obciążającego. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C przy stałym, maksymalnym napięciu 600V i maksymalnym natężeniu prądu o wartości 25 mA w przypadku elektroforezy na jednym żelu lub 40-50 mA w przypadku prowadzenia równoległej elektroforezy dwóch żeli. Po wnikięciu



próbek w żel w celu usunięcia nadmiaru błękitu Coomassie G-250 bufor katodowy wymieniano na bufor bez barwnika. Po rozdzielaniu elektroforetycznym białek w stanie natywnym, przeprowadzano elektrotransfer białek na membranę PVDF.

#### 5.14.3 Elektrotransfer białek na membranę PVDF oraz immunocytochemiczna identyfikacja wybranych białek

Próbki rozdzielone na żelu były przenoszone na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF; ang. *polyvinylidene difluoride*, Bio-Rad Laboratories) stosując metodę mokrego transferu. Elektrotransfer prowadzono w buforze zawierającym 20 mM Tris, 150 mM glicynę, 0,02% SDS oraz 20% metanol. W przypadku żeli Tricine SDS-PAGE transfer prowadzono przy stałym natężeniu prądu 400 mA i maksymalnym napięciu 50V przez 2 godziny, a w przypadku żeli Blue Native przy stałym natężeniu prądu 250 mA i maksymalnym napięciu 50V przez 3 godziny. Po zakończonym transferze w celu oceny efektywności i jakości transferu przeprowadzano detekcję białek za pomocą Coomassie Blue GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo Scientific), który nietrwale wiąże się do białek obecnych na membranie. W celu odplukania nadmiaru barwnika membranę przepłukiwano w roztworze 50% metanolu i 10% kwasu octowego. Membranę odbarwiano stosując czysty metanol.

W celu immunodetekcji białek membranę PVDF płukano roztworem TBST (20 mM Tris; 125 mM NaCl; 0,2% Tween-20) a następnie blokowano w buforze TBST z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka w proszku (BioRad) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie membranę 3-krotnie płukano buforem TBST po czym inkubowano przez noc, w temperaturze 4°C, w obecności I-rzędowego przeciwciała w buforze TBST zawierającym 5% odtłuszczone mleko w proszku. Następnie, po kilkukrotnym przepłukaniu buforem TBST membranę inkubowano w buforze TBST z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka zawierającego II-rzędowe przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *horseradish peroxidase*) przez 1h w temperaturze pokojowej. Detekcję białek prowadzono z wykorzystaniem chemiluminescencji wykorzystując komercyjne zestawy ECL Prime (Amersham) bądź ECL (GE, USA). Wyniki rejestrowano za pomocą klisz rentgenowskich (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

W celu ponownego barwienia membrany przeciwciałami usuwano poprzednio wykorzystane przeciwciała wykorzystując bufor zawierający 62 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 200 mM 2-merkaptioetanol (ang. *stripping buffer*).

## **5.15 Znakowanie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego**

Analizę ekspresji i lokalizacji wewnątrzkomórkowej wybranych konstruktów wykonywano wykorzystując znakowanie immunofluorescencyjne po przejściowej transfekcji komórek HEK293T.

Komórki HEK293T wysiewano na szalki o średnicy 35 mm ze szklanym dnem (Cellvis oraz IBL Baustoff + Labor GmbH). Po osiągnięciu konfluencji 50% – 80% komórki transfekowano odpowiednim plazmidem. Po 18 – 24 godzinach w celu wyznakowania mitochondriów część hodowli komórkowych inkubowano w obecności 100nM barwnika fluorescencyjnego MitoRed (Invitrogen) przez 20 – 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie, po przepłukaniu roztworem PBS komórki utrwalono schłodzonym do 4°C roztworem 4% paraformaldehydu w PBS (Cell Signaling) przez 20 – 30 minut. Następnie po kilkukrotnym przepłukaniu roztworem PBS komórki permeabilizowano roztworem zawierającym 0,1 lub 0,05% Triton X-100 w PBS (2 razy po 3 minuty). Inkubowano komórki w Triton X-100 2-krotnie przez 3 minuty. Następnie komórki inkubowano przez noc z przeciwciałem I-rzędowym w roztworze PBS wzbogaconym w 4% FBS, w temperaturze 4°C. Następnie po przepłukaniu roztworem PBS (3 razy po 10 minut) komórki inkubowano w roztworze PBS z 4% FBS oraz przeciwciałem II-rzędowym (w rozcieńczeniu 1:1000) zawierającym odpowiedni barwnik fluorescencyjny przez 1 - 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie komórki płukano roztworem PBS (3 razy po 10 minut).

W celu ochrony sygnału fluorescencyjnego preparaty zalewano odczynnikiem VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories). W doświadczeniach zastosowano komercyjnie dostępne przeciwciała II-rzędowe zawierające fluorofor Alexa488 oraz Alexa555 (Invitrogen). Preparaty obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView 1200 (Olympus). Zdjęcia analizowano za pomocą programu ImageJ (National Institutes of Health, USA).

## **5.16 Technika patch-clamp**

Pomiary elektrofizjologiczne z wykorzystaniem techniki stabilizacji skrawka błony (technika patch-clamp) umożliwiają pomiar przepływu jonów przez kanały zlokalizowane w natywnej błonie komórkowej. W technika patch-clamp opiera się na pomiarze przepływającego prądu jonowego przez białka kanałowe rejestrowanego w czasie rzeczywistym. Białka kanałowe mogą przyjmować konformację uniemożliwiającą przepływ jonów (stan zamknięty) lub umożliwiającą przepływ jonów (stan otwarty). Zmiany pomiędzy

tymi stanami są dynamiczne i zależne od warunków środowiskowych oraz obecności substancji aktywujących bądź blokujących transport jonów przez kanał. Na podstawie analizy zmian przepływających jonów przez kanał można ustalić prawdopodobieństwo otwarcia kanału jonowego (Po). Przewodnictwo kanału wyznaczamy na podstawie zależności prądowo-napięciowej. W tej pracy wykorzystano technikę patch-clamp w konfiguracji “mitoplast inside-out”. Są to pomiary wykonywane na mitoplastach (mitochondriach pozbawionych zewnętrznej błony mitochondrialnej)

### **Przygotowanie mitoplastów oraz pomiary aktywności kanału BK-VEDEC metodą patch-clamp**

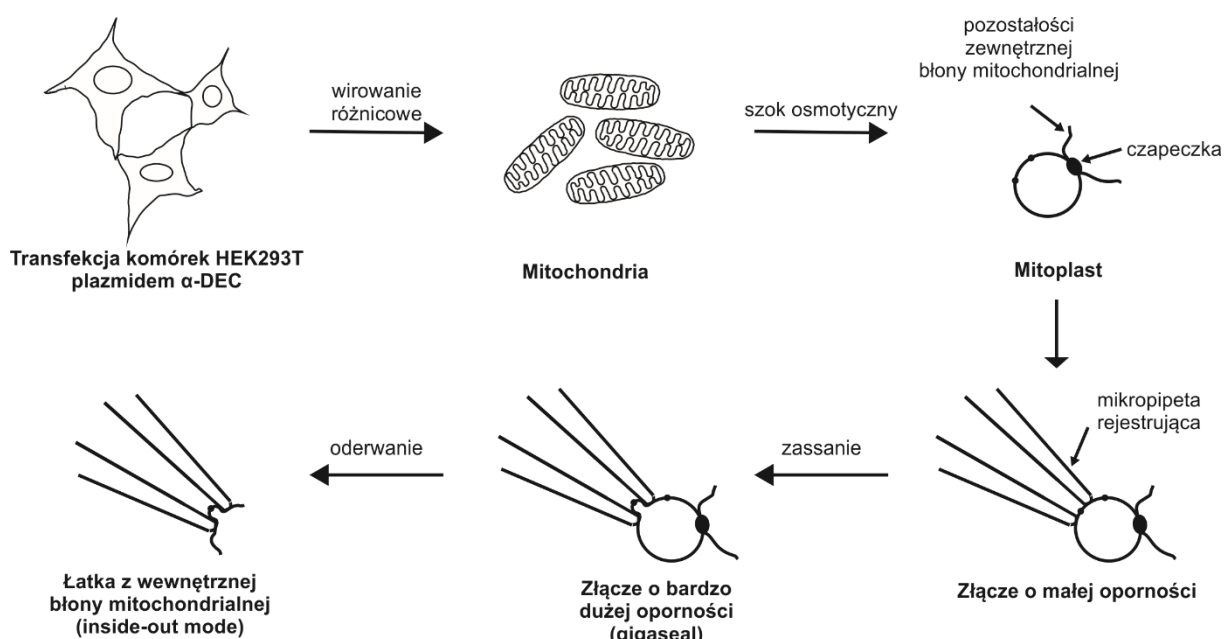
Do przeprowadzenia pomiarów elektrofizjologicznych pobrano 5-10  $\mu$ l zawiesiny mitochondriów otrzymanych zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 5.10.1 i zawieszano w 1 ml roztworu izotonicznego (150 mM KCl, 10 mM HEPES, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2).

Przygotowano mostek solny, czyli szklaną kapilarę odniesienia którą wypełniano 3M KCl w 1% agarozie. W mostku solnym umieszczono elektrodę chlorosrebrową i całość zanurzano w szalce z 2 ml buforu hipotonicznego (5 mM HEPES i 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) umiejscowionym na mikroskopie (Olympus IX71). W celu otrzymania mitoplastów, dodawano 2  $\mu$ l roztworu rozcieńczonych mitochondriów do szalki z buforem hipotonicznym. Formowanie się mitoplastów monitorowano z wykorzystaniem kontrastu fazowego stosując obiektyw 40x. Pęcznienie mitochondriów hamowano poprzez dodawanie 0,5 ml roztworu hipertonicznego (750 mM KCl, 30 mM HEPES i 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) uzyskując roztwór izotoniczny.

Do rejestracji elektrofizjologicznych wykonano szklaną mikropipetę pomiarową na pionowej wyciągarce PC-10 Puller (Narishige International) i wypełniono ją buforem izotonicznym. W mikropipecie pomiarowej umieszczono chlorosrebrową elektrodę pomiarową (Ag/AgCl). Pipety posiadały otwór o oporności rzędu ok. 15-18 M $\Omega$ . Otwór mikropipety pomiarowej delikatnie zbliżano do pęcherzyka mitoplastu. Po zassaniu, koniec mikropipety tworzy kontakt gigaomowy (G $\Omega$ , - 10 do 9 Ohm) z błoną mitoplastu. W wyniku przyłożenia potencjału dodatniego, mitoplast pękał, a w pipecie pozostawał skrawek wewnętrznej błony mitochondrialnej tworząc konfigurację inside-out (strona zewnętrzna mitochondrium znajdowała się od strony elektrody pomiarowej, a strona macierzy mitochondrialnej skierowana była w stronę roztworu w szalce). Wysoki opór styku pozwala na zminimalizowanie wpływu zakłóceń tła oraz gwarantuje pomiar przepływu prądu przez białka znajdujące się na skrawku błony przylegającej do pipety. Sygnał rejestrowano przez wzmacniacz Axopatch 200B (Microelectrode Amplifier) oraz przekształcano przez przetwornik analogowo-cyfrowy Axon

Instruments Digidata 1440A Low-noise Data Acquisition System. Sygnał wzmacniano 10-krotnie (10 mV/pA), próbkowano przy częstotliwości 100 kHz i filtrowano przy częstotliwości 1 kHz. Po zaobserwowaniu obecności kanału, prowadzono pomiar prądu jonowego w czasie rzeczywistym. Do zapisu zmian przepływającego prądu jonowego wykorzystywano oprogramowanie Clampex 10.7.

W celu identyfikacji kanału oraz badania wpływu wybranych substancji na aktywność kanału wykorzystywano system perfuzji sprzężony z pompą perystaltyczną umożliwiającą stały przepływ roztworu zawierający wybrane modulatory kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Poniżej przedstawiono schemat techniki patch-clamp (Rycina 10).



**Rycina 10** Schemat doświadczeń elektrofizjologicznych z wykorzystaniem techniki patch-clamp. Przedstawiono kolejno etapy takie jak: izolowanie mitochondriów, przygotowanie mitoplastów, zassanie skrawka błony mitoplastu przez mikropipetę oraz utworzenie połączenie błona-pipeta w konfiguracji mitoplast inside-out. Rysunek własny.

### Analiza rejestracji elektrofizjologicznych

Do analizy danych otrzymanych techniką patch-clamp wykorzystano program Clampfit 10.7 (Molecular Devices). Na podstawie zarejestrowanej aktywności przeprowadzano identyfikację kanału jonowego. Oszacowano prawdopodobieństwo otwarć ( $P_o$ , ang. *channel open probability*) poprzez ustalenie stanu otwartego i zamkniętego dla kanału. Wartość  $P_o$  to stosunek sumarycznego czasu otwarć kanału do całkowitego czasu trwania rejestracji aktywności kanału. Podejście to było wykorzystane do obliczenia  $P_o$  dla prądu zarejestrowanego dla pojedynczego kanału. W doświadczeniach, w których rejestrowano dwa

lub więcej kanałów w tym samym skrawku błony wyliczano NPo (prawdopodobieństwo otwarcia N liczby kanałów). Przy czym NPo obliczane dla skrawków zawierających od dwóch do ośmiu kanałów możliwe było dzięki dostępnej w programie wyszukiwarce pojedynczych kanałów (ang. *Single-Channel Search*). Wówczas ręcznie oznaczano poziom zamknięty oraz do ośmiu poziomów otwartych. W trakcie prowadzonych doświadczeń wielokrotnie rejestrowano większą liczbę kanałów, gdzie określenie poziomów otwarcia było trudne do oznaczenia i wyliczenia przez program. Takie multikanaly wymagały obliczeń szacunkowych. Prawdopodobieństwo otwarć wyliczano ze stosunku prądu elektrycznego przepływającego przez kanały do maksymalnego prądu, który może przepłynąć przez kanały, w danym wycinku czasowym rejestracji.

Odpowiedź kanału na zmiany napięcia prądu w czasie oraz wpływ modulatorów kanału porównywano z zapisem kontrolnym, określonym w stanie zamkniętym. Wszystkie porównania prowadzono przy takiej samej wartości potencjału przyłożonego na kanał. Zmiany porównywano względem rejestracji kontrolnej oraz po odpłukaniu związku chemicznego.

Na podstawie zarejestrowanych amplitud płynącego prądu wyliczono przewodnictwo kanału przy zadanym napięciu.

### **5.17 Analiza statystyczna**

Do przeprowadzenia analizy danych statystycznych wykorzystano programu Excel2016 (Microsoft Office), GraphPad Prism 4 oraz 9 (GraphPad Software). Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD, ang. *standard deviation*). Analizę statystyczną pomiędzy dwiema grupami badanymi przeprowadzono za pomocą testów t-Studenta (test t-Studenta dla par). Analizę statystyczną pomiędzy grupami badanymi większymi niż dwie przeprowadzono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA z testem Turkey'a (test post-hoc). Wartości istotności statystycznej oznaczano dla  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) lub  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

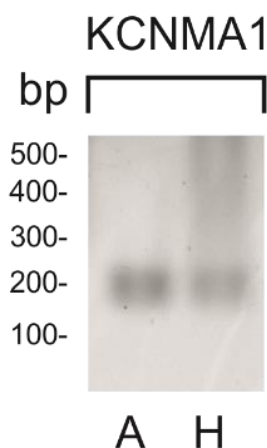
## 6 Wyniki

### 6.1 Charakterystyka mitochondrialnej izoformy kanału BK<sub>Ca</sub>: VEDEC

Pierwsza część badań pracy poświęcona była weryfikacji hipotezy mówiącej, że izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach. W celu odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono badania z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej patch-clamp umożliwiającej badanie aktywności kanałów jonowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem linii komórkowej HEK293T, która jest modelem często wykorzystywanym w badaniach kanałów typu BK<sub>Ca</sub>.

#### 6.1.1 Analiza jakościowa ekspresji podjednostki $\alpha$ kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC

Dotychczasowe badania aktywności mitochondrialnych kanałów jonowych opierały się na modelach natywnie ekspresjonujących kanały potasowe w mitochondriach. Hipoteza mówiąca, że izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> może tworzyć kanał w mitochondriach wymagała jednak zastosowania nowego podejścia metodologicznego i wykorzystania linii komórkowej, w której ekspresja kanałów typu BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub> jest niewielka. Zastosowanie takiej linii umożliwiłoby ekspresję i rejestrację badanych kanałów bez obawy o obecność innych kanałów potasowych w mitochondriach. Dane literaturowe sugerują, że w komórkach HEK293 oraz HEK293T dzikiego typu aktywność kanałów typu BK<sub>Ca</sub> jest bardzo niska [235]. W związku z tym wstępne doświadczenia miały na celu porównanie ekspresji kanału BK<sub>Ca</sub> w linii HEK293T oraz U-87 MG, w której aktywność kanałów typu BK<sub>Ca</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> jest wysoka. Z obydwu linii komórkowych wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję i wykonano reakcję PCR w celu wykrycia produktów ekspresji genu *KCNMA1*. W tym celu wykorzystano parę starterów rozpoznającą wszystkie izoformy kanału BK<sub>Ca</sub>. Produkt PCR wykryto w obu liniach komórkowych co świadczy o ekspresji genu *KCNMA1* (Rycina 11).

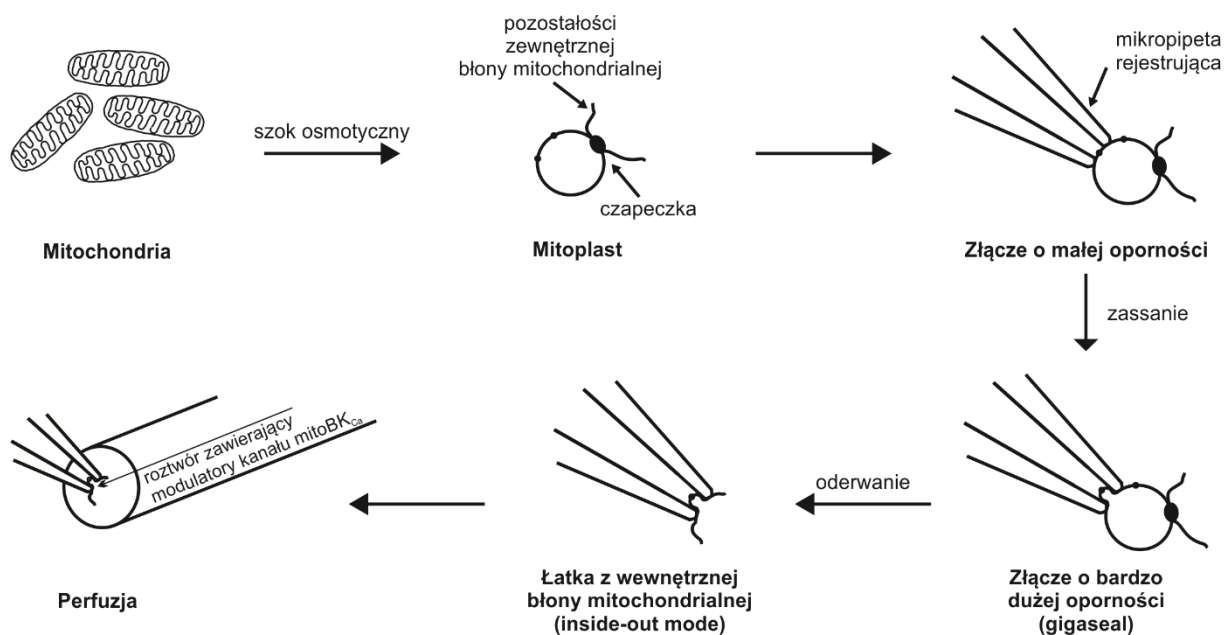


**Rycina 11** Analiza ekspresji genu *KCNMA1* w liniach komórkowych dzikiego typu HEK293T (H) oraz astrocytoma U-87 MG (A). Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego obecność produktów PCR wykonanego z wykorzystaniem starterów amplifikujących wszystkie izoformy podjednostki  $\alpha$  tworzącej por kanału BK<sub>Ca</sub> (oczekiwana wielkość produktu PCR 167 pz).

### 6.1.2 Aktywność kanałowa w mitochondriach komórek HEK293T

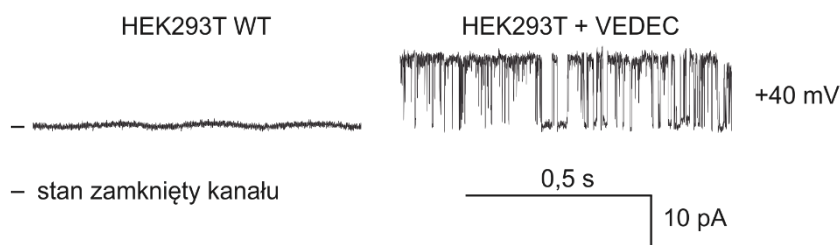
W związku z identyfikacją produktów PCR sugerujących ekspresję genu *KCNMA1* podjęto próbę zidentyfikowania aktywności białek kanałowych w mitochondriach komórek HEK293T typu dzikiego. Ponadto, dokonano przejściowej transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> w celu identyfikacji i porównania aktywności kanałów mitoBKCa w mitochondriach.

W tym celu zastosowano technikę patch-clamp izolowanych mitoplastów. Schemat doświadczenia zaprezentowano na rycinie 12. Z komórek HEK293T typu dzikiego oraz HEK293T przejściowo transfekowanych plazmidem VEDEC, izolowano mitochondria, a następnie poprzez zastosowanie szoku osmotycznego uzyskiwano mitoplasty. Następnie dokonywano zassania skrawka błony mitoplastu przez mikropipetę szklaną. Doświadczenia wykonywano w konfiguracji inside-out oznaczającej, ekspozycję mitoplastu od strony macierzy mitochondrialnej do naczynia z buforem eksperymentalnym. W trakcie doświadczeń wykorzystywano system perfuzji umożliwiającym podawanie wybranych substancji (od strony macierzy mitochondrialnej) do badanego skrawka błony.



**Rycina 12 Schemat techniki patch-clamp w procedurze otrzymywania rejestracji zmian przepływającego prądu jonowego przez kanały mitochondrialne.** Etapy doświadczenia obejmowały izolację mitochondriów z komórek, przygotowanie mitoplastów, zassanie skrawka błony mitoplastu przez mikropipetę oraz perfuzję w konfiguracji inside-out. Rysunek własny

W komórkach HEK293T typu dzikiego nie obserwowano żadnej aktywności kanałowej w izolowanych mitoplastach. Brak zmian przepływającego prądu obserwowano w 104 rejestracjach z 10 niezależnych izolacji mitochondriów. Z drugiej strony w transfekowanych komórkach HEK293T obserwowano aktywność kanałową w 76 z 646 rejestracji (~12%). Rejestracji dokonywano przy potencjale +40mV w buforze symetrycznym (150/150 mM KCl, pH 7,2) w warunkach wysokiego stężenia jonów wapnia (100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>). Na rycinie 13 przedstawiono przykładowe rejestracje uzyskane z mitoplastów komórek HEK293T dzikiego typu oraz komórek transfekowanych plazmidem VEDEC.

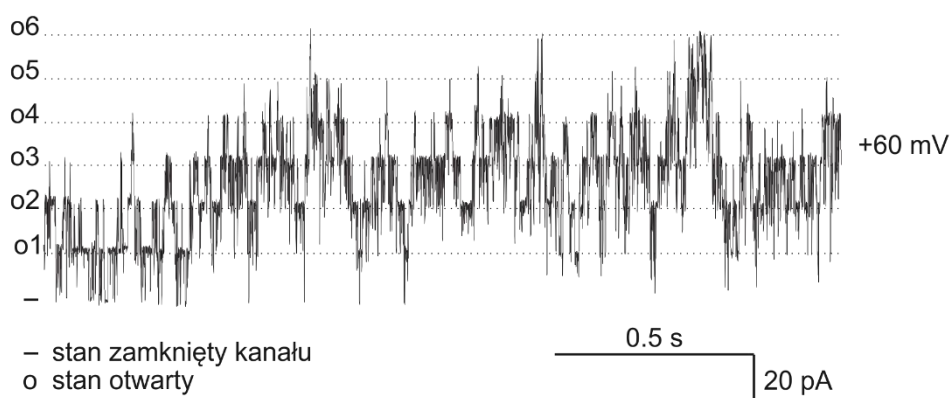


**Rycina 13 Rejestracje elektrofizjologiczne wykonane techniką patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T.** Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjale +40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Komórki dzikiego typu (HEK293T WT) porównano do komórek przejściowo transfekowanych plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> (HEK293T + VEDEC). „-” oznacza stan zamknięty kanału. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.



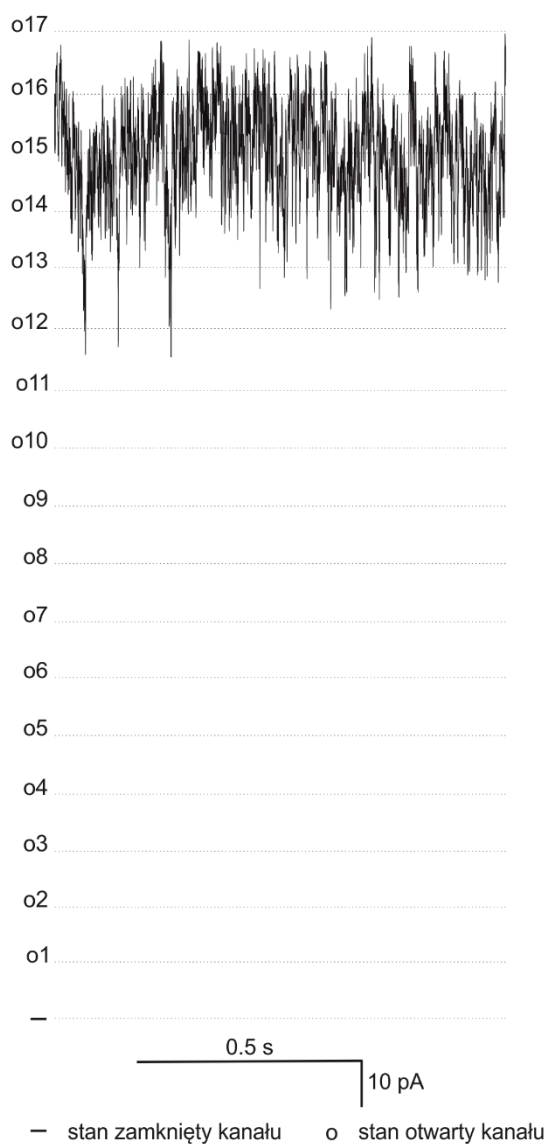
Opisane powyżej wstępne doświadczenia wykazały, że komórki HEK293T nie wykazywały aktywności kanałów mitochondrialnych rejestrowanych w zastosowanym układzie eksperymentalnym, natomiast aktywność kanałowa pojawiała się jedynie po przejściowej transfekcji. W związku z tym, komórki te są dobrym modelem umożliwiającym zweryfikowanie hipotezy mówiącej, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> może być tworzony przez izoformę VEDEC. W oparciu o powyższe przeprowadzono dokładną charakterystykę kanałów obserwowanych po transfekcji. Należy jednak podkreślić, że częstość pojawiania się kanału po transfekcji była nieregularna i nie każda transfekcja skutkowała możliwością rejestracji aktywności kanałów, dlatego nie wszystkie zaplanowane doświadczenia były możliwe do wykonania w zaplanowanym zakresie. Ponadto, w wyniku stosunkowo częstego występowania grup kanałów, część rejestracji oraz analizy statystycznej była wykonywana na grupach kanałów, a nie na rejestracjach pojedynczych kanałów.

Kolejne doświadczenia ujawniły występowanie grup kanałów w mitochondriach izolowanych z komórek HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC. Efekt ten objawiał się jako znaczne zmiany przepływu prądu jonowego w czasie, które wykraczały poza przewodnictwo jednego kanału BK<sub>Ca</sub>. Przykładowe rejestracje grup kanałów przedstawiają Rycina 14 oraz Rycina 15. Na rycinie 14 pokazano rejestrację przy potencjale +60 mV, na której można wyodrębnić sześć stanów otwartych kanału. Wartości amplitudy pomiędzy kolejnymi stanami otwartymi wynoszą około 20 pA. Takie natężenie prądu odpowiada kanałowi BK<sub>Ca</sub>.



**Rycina 14** Rejestracja aktywności sześciu kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w jednym skrawku błony mitochondrialnej. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjale +60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o6). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

Niekiedy kanały obserwowane w pojedynczym patchu były na tyle liczne, że do oszacowania ich liczby należało zastosować średnie wartości natężenia prądu pojedynczego kanału. Dzięki zastosowaniu tej metody oszacowano, że na rejestracji z ryciny 15 obserwowana była aktywność siedemnastu kanałów BK<sub>Ca</sub>.

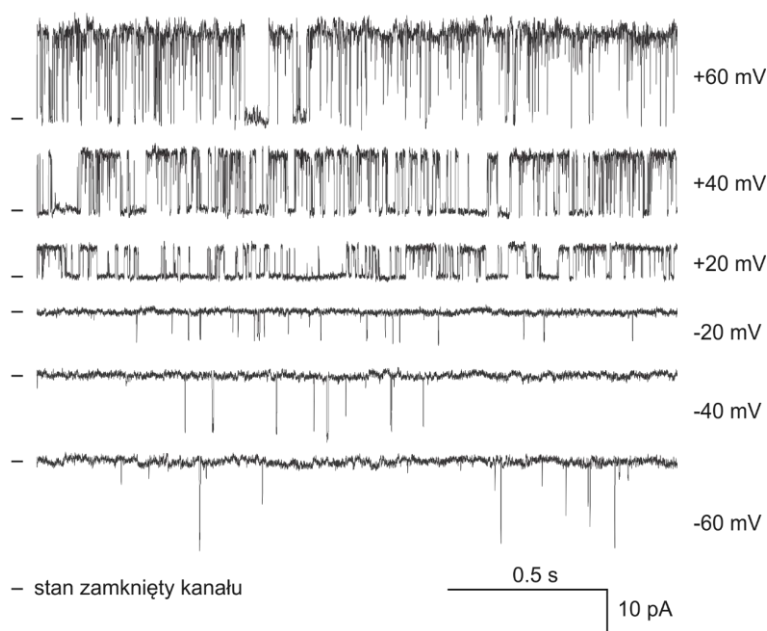


**Rycina 15** Przykładowa rejestracja aktywności siedemnastu kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w jednym skrawku błony mitochondrialnej z komórek HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach od +60 mV do -60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o17). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

### 6.1.3 Właściwości biofizyczne kanału obserwowanego po transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>

Kinetyka obserwowanych aktywności kanałów w mitoplastach po transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC przypominała aktywność kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach natywnie ekspresjonujących ten kanał (np. komórki linii U-87 MG). Jednak w celu jednoznacznego potwierdzenia tego czy obserwowana aktywność odpowiada kanałowi mitoBK<sub>Ca</sub> dokonano dokładnej analizy właściwości biofizycznych kanału obserwowanego po transfekcji.

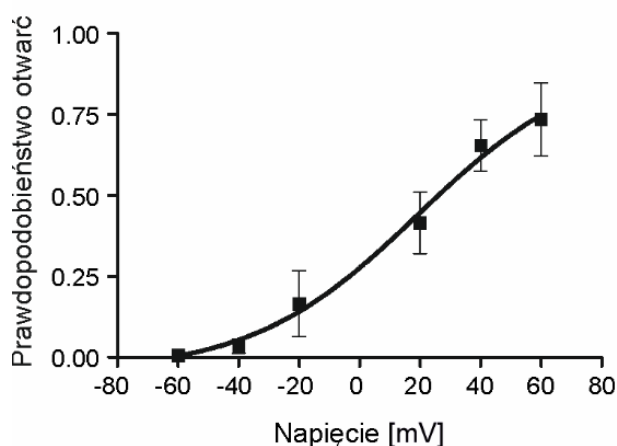
Poprzednie doniesienia literaturowe wskazują, że aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wykazuje zależność od potencjału błonowego. W związku z tym kanał obserwowany po transfekcji komórek rejestrowano w zakresie potencjałów -60mV, -40mV, -20mV oraz +20mV, +40mV oraz +60 mV (Rycina 16). Zastosowanie szerszego zakresu napięć skutkowało niestabilnością pomiarów wynikającą prawdopodobnie z uszkodzeń błony. Zamieszczone rejestracje jednoznacznie wskazują na zmiany częstości otwarć kanału w zależności od przyłożonego napięcia.



**Rycina 16** Pomiar metodą patch-clamp mitoplastów komórek HEK293T przejściowo transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach od +60 mV do -60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. „-” oznacza stan zamknięty kanału. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

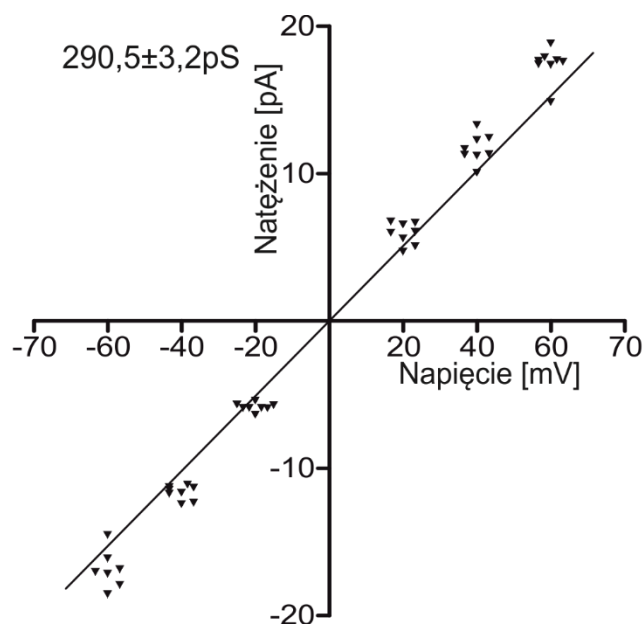
Następnie w oparciu o powyższe dane ustalone zostało prawdopodobieństwo otwarć kanału w zależności od przyłożonego napięcia (Rycina 17). Dokonana analiza wykazała,

że prawdopodobieństwo otwarcia ( $P_o$ ) kanału było niższe przy potencjałach ujemnych. Wartość  $P_o$  wynosiła około 0,006 przy  $-60$  mV, a przy przyłożeniu dodatniego napięcia zaobserwowano wzrost  $P_o$ . Szybkość zmiany wartości prawdopodobieństwa otwarcia rosła w zakresie napięć dodatnich. Maksymalną wartość  $P_o$  zaobserwowano przy  $+60$  mV i wynosiła 0,73. Punkty eksperymentalne przedstawione na rycinie 17 zostały dopasowane za pomocą funkcji sigmoidalnej. Otrzymana krzywa przedstawia rozkład prawdopodobieństw otwarcia dla kanału mitoBK<sub>Ca</sub> oraz BK<sub>Ca</sub> opisanego w literaturze.



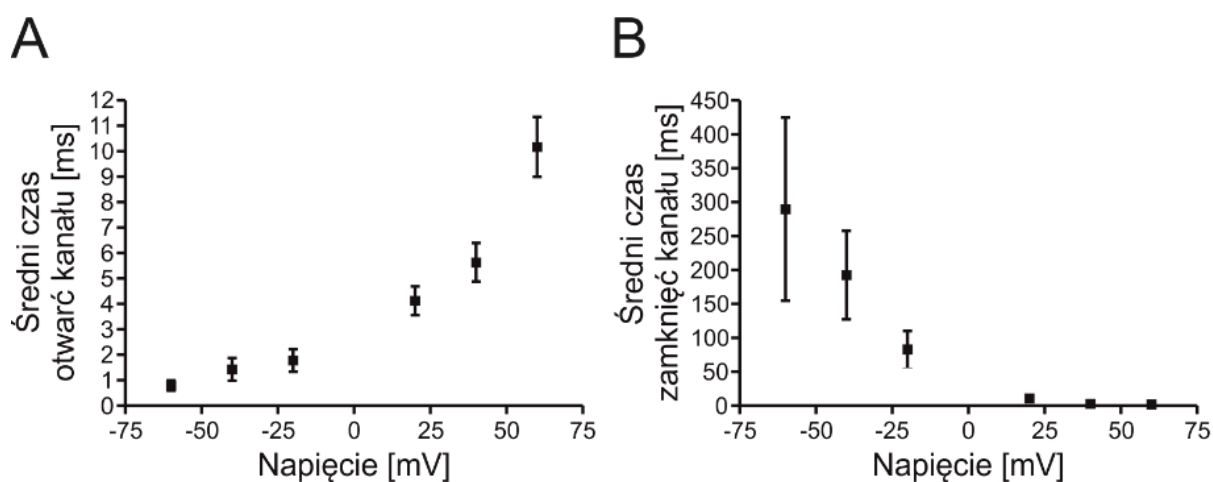
**Rycina 17** Analiza prawdopodobieństw otwarcia kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przy potencjałach od  $+60$  mV do  $-60$  mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2 w warunkach kontrolnych. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) ( $n=7$ ).

Dalsza analiza wykazała, że charakterystyka prądowo-napięciowa kanału rejestrowanego w buforze symetrycznym (150 mM KCl po obu stronach pipety) i w obecności  $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$  była typowa dla mitochondrialnego kanału o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia znanego z innych modeli doświadczalnych (Rycina 18). Na podstawie wykresu zależności prądowo-napięciowej przedstawionego na rycinie 18 wyznaczono przewodnictwo kanału. W warunkach symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl analizowano nachylenie wyznaczonej prostej do osi napięcia. Uzyskana wartość przewodnictwa rejestrowanego kanału wynosiła  $290,5 \pm 3,2$  pS i jest porównywalna z przewodnictwem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> opisanym w literaturze.



**Rycina 18** Wykresy zależność prądowo-napięciowej kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T przejściowo transfekowanych plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach od +60 mV do -60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. „-” oznacza stan zamknięty kanału. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz. Przewodnictwo wynosiło 290,5 ± 3,2 pS. n=7.

Na podstawie otrzymanych rejestracji określono także średnie czasy otwarć (Rycina 19 A) i zamknięć (Rycina 19 B) kanału przy wartościach potencjałów -60mV, -40mV, -20mV oraz +20mV, +40mV oraz +60 mV. Pomiary te zostały przeprowadzone w warunkach kontrolnych przy wysokim stężeniu jonów wapnia (100 μM Ca<sup>2+</sup>) w buforze izotonicznym. Maksymalna średnia wartość czasów otwarć zaobserwowana przy +60 mV wynosiła 10,2 ms, natomiast maksymalna średnia wartość czasów zamknięć zaobserwowana przy -60 mV wynosiła około 289,7 ms. Te właściwości biofizyczne kanału zostały określone na podstawie rejestracji pojedynczego kanału (n = 7).



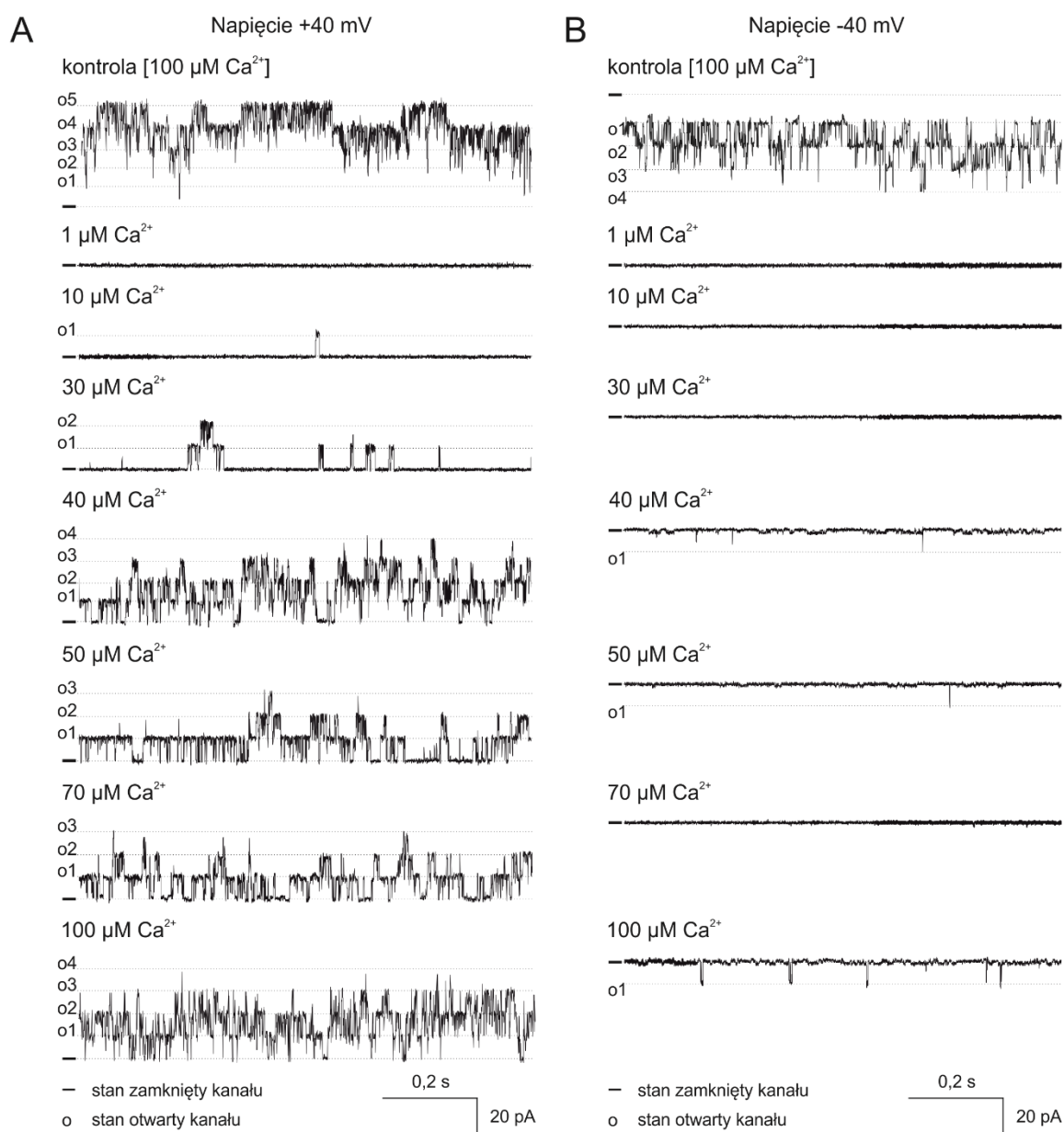
**Rycina 19** Analiza średniego czasu otwarć (A) oraz zamknięć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (B) przy potencjalach od +60 mV do -60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2 w warunkach kontrolnych. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz. Dane przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) (n=7).

#### 6.1.4 Regulacja aktywności kanału przez jony wapnia

Jedną z głównych cech charakteryzujących kanał BK<sub>Ca</sub> jest regulacja aktywności przez jony wapnia. Prawdopodobieństwo otwarć kanału wzrasta w miarę wzrostu stężenia jonów wapnia. Z tego powodu w ramach analizy właściwości obserwowanego kanału, przeprowadzono rejestracje kanału tworzonego przez izoformę VEDEC w mitochondriach z zastosowaniem buforów zawierających różne stężenia Ca<sup>2+</sup>. Bufor kontrolny zawierał wysokie, 100 μM stężenie jonów wapnia. W tych warunkach rejestrowany kanał wykazywał wysoką aktywność. Dlatego do określenia zależności od stężenia jonów wapnia zastosowano stężenia niższe: 1 μM, 10 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM, 70 μM Ca<sup>2+</sup>. Przykładowe rejestracje aktywności kanału w obecności buforów zawierających różne stężeni Ca<sup>2+</sup> zaprezentowano na rycinie 20. Rejestracje wykonano przy potencjale +40 mV oraz -40 mV.

Obserwowane kanały wykazywały spadek aktywności po wymianie buforu z zawierającego 100 μM Ca<sup>2+</sup> na bufor zawierający 1 μM Ca<sup>2+</sup>. Obserwowano również rosnącą aktywność wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia w buforze, przy potencjale +40mV (Rycina 20 A). Nie zaobserwowano znacznych zmian przy potencjale -40mV (Rycina 20 B). Na przykładowych fragmentach rejestracji zamieszczonych poniżej widoczna jest aktywność pięciu kanałów w warunkach kontrolnych przy +40mV. W tym samym czasie przy -40mV zaobserwowano cztery stany otwarte. Przy obniżeniu stężenia Ca<sup>2+</sup> do 1 μM nie zaobserwowano aktywności kanałowej zarówno przy +40mV jak i -40mV. Podwyższenie

stężenia jonów wapnia do 10  $\mu\text{M}$  pozwoliło zaobserwować sporadyczne otwarcie jednego kanału przy +40mV, jednakże nie przy -40mV. Brak aktywności utrzymywał się przy podaniu 30  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  przy -40mV, podczas gdy przy +40mV można było zaobserwować dwa stany otwarcia kanału. Przy podaniu 40  $\mu\text{M}$  oraz 50  $\mu\text{M}$  przy -40mV można było zaobserwować pojawienie się pierwszego stanu otwartego, choć ta tendencja nie została zachowana przy 70  $\mu\text{M}$ . Kanał zamknął się przy ujemnych potencjałach. Równolegle przy potencjale dodatnim zaobserwowano cztery stany otwarte przy 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  oraz po trzy stany otwarte przy podaniu 50  $\mu\text{M}$  i 70  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Na podstawie tej rejestracji zatem w zakresie 40-70  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zmiany nie są wyraźnie zdefiniowane. W ostatnim kroku aktywność kanałową rejestrowano w buforze zawierającym 100  $\mu\text{M}$  stężenie  $\text{Ca}^{2+}$ . Pomimo przywrócenia warunków kontrolnych rejestrowane aktywności kanałów nie powracały do pełnej aktywności. Niemniej zależność aktywności kanału od stężenia jonów wapnia jest wyraźnie widoczna.

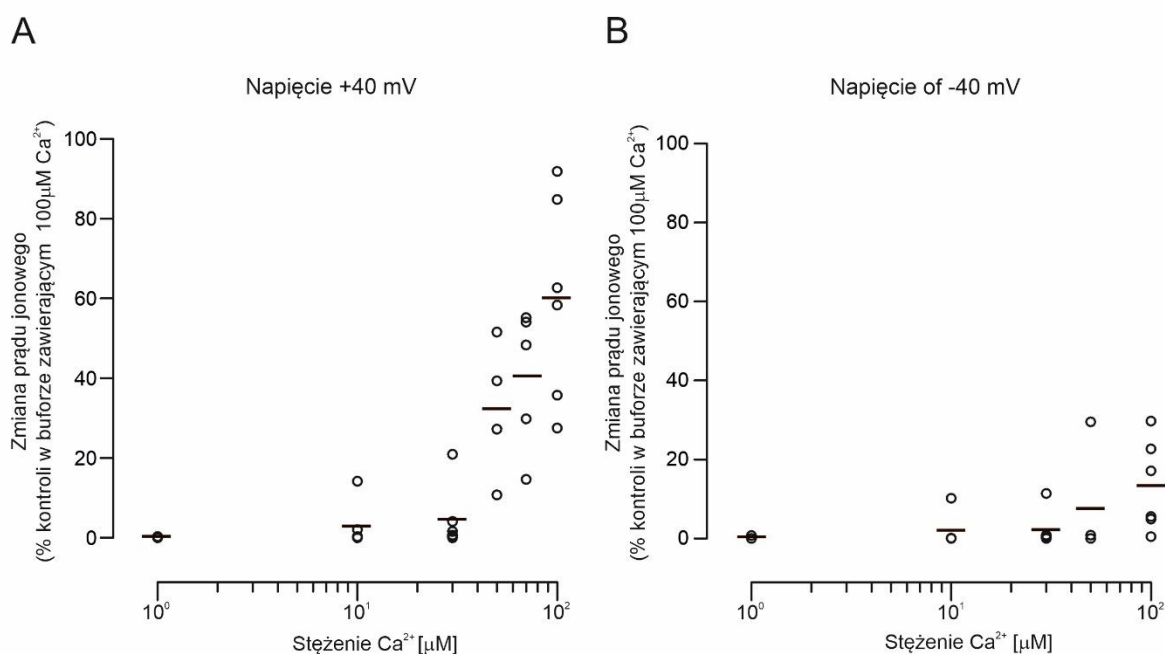


**Rycina 20** Wpływ stężenia jonów wapnia na aktywność kanału. Rejestracja aktywności kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w jednym skrawku błony mitochondrialnej. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach +40 mV (A) oraz -40 mV (B) w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o5). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

W celu ilościowej oceny obserwowanych zmian dokonano analizy statystycznej zmian prądu jonowego płynącego przez kanał BK<sub>Ca</sub> w buforze zawierającym różne stężenia jonów wapnia przy potencjałach +40mV oraz -40mV (Rycina 21 ). Za 100% aktywności przyjęto prawdopodobieństwo otwarcie kanału w warunkach kontrolnych (100 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ). Wartości prądu rejestrowanego w buforze zawierającym 1  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  sięgała 0.07% kontroli przy + 40 mV i 0.28% kontroli przy - 40 mV. Zgodnie z poniższą analizą kanały wykazywały rosnącą



aktywność w miarę zwiększania stężenia jonów wapnia w buforze. Zwiększenie stężenia jonów wapnia w buforze do 50  $\mu\text{M}$  spowodowało wzrost prądu jonowego do około 32,2% wartości kontrolnej przy +40 mV oraz 7,6% przy -40 mV. Gdy poziom wolnych jonów wapnia powrócił do poziomu kontrolnego (100  $\mu\text{M}$ ), zaobserwowany prąd jonowy wzrósł do 60,2% wartości kontrolnej przy +40 mV i jedynie 13,5% przy -40 mV. Zaobserwowano również dużą zmienność aktywności kanału w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów wapnia w zastosowanym buforze.



**Rycina 21** Analiza statystyczna zmian prądu jonowego płynącego przez kanał  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  w buforze zawierającym różne stężenia jonów wapnia przy potencjałach +40 mV (A) oraz -40 mV (B). Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . n=3-6.

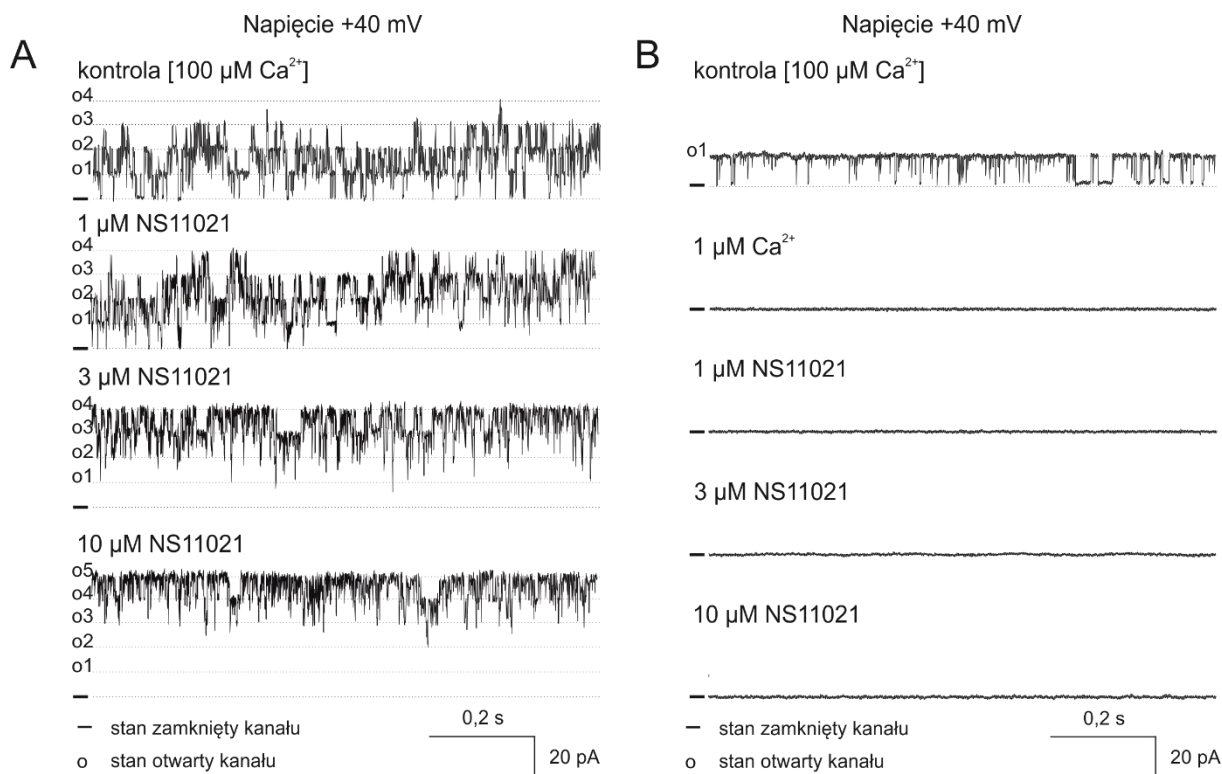
### 6.1.5 Regulacja aktywności kanału tworzonego przez izoformę VEDEC przez modulatory kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$

Jedną z metod pozwalających na identyfikację rejestrowanych kanałów metodą patch-clamp jest zastosowanie specyficznych modulatorów wpływających na aktywność danych kanałów. W przypadku kanałów  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  znana jest grupa syntetycznych aktywatorów do której należy między innymi NS11021.

W związku z tym w kolejnej części badań zastosowano wspomniany aktywator w celu określenia jego wpływu na aktywność rejestrowanego kanału. Aktywator NS11021

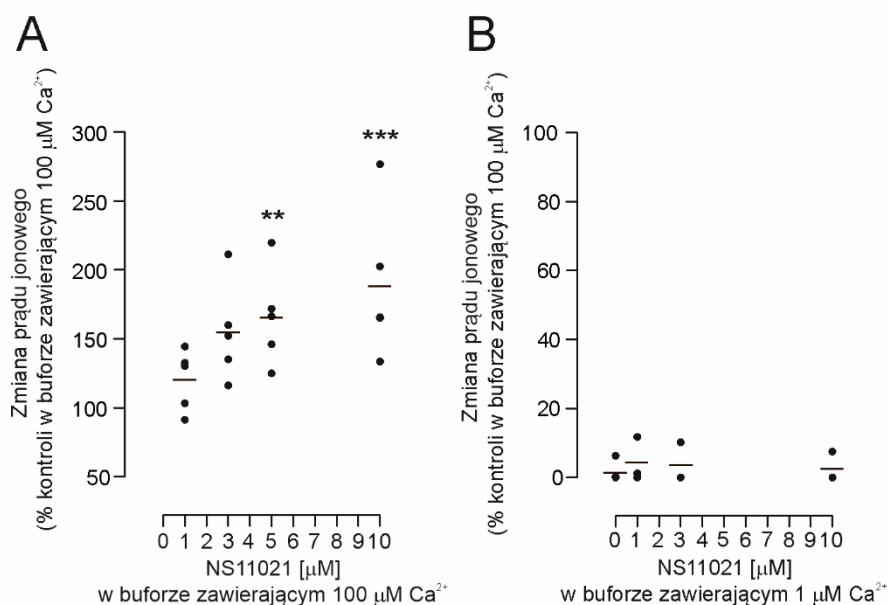
podawano w czasie rejestracji kanału w buforze zawierającym 100  $\mu\text{M}$  stężenie jonów wapnia (Rycina 22 A). W badaniach zastosowano wzrastające stężenia NS11021 - 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ . Pomiary prowadzono przy dodatnim potencjale +40mV w warunkach symetrycznego stężenia KCl (150/150 mM). Poniższa przykładowa rejestracja wykazuje, iż zastosowanie coraz wyższych stężeń NS11021 skutkowało obserwacją coraz częstszych otwarć kanału w obecności 100 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Rycina 22 A). Co więcej, w obecności 10  $\mu\text{M}$  NS11021 obserwowano 5 stanów otwartych podczas gdy w warunkach kontrolnych były maksymalnie 4 widoczne stany otwarte. Może to świadczyć o zwiększeniu się prawdopodobieństwa otwarć kanałów i nakładaniu się ich aktywności lub otwarciu się kanału nie widocznego w warunkach kontrolnych.

Ponadto, NS11021 zastosowano w obecności 1 $\mu\text{M}$  stężenia jonów wapnia w buforze, gdy aktywność kanałowa była bardzo niska. Jednakże, w tych warunkach podanie aktywatora NS11021 w buforze zawierającym 1 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , nie zwiększało prawdopodobieństwa otwarć (Rycina 22 B). Kanał pozostawał zamknięty niezależnie od stężenia aktywatora. Zaznaczyć należy, że w tym przypadku obserwowano jedynie jeden kanał w warunkach kontrolnych (100  $\mu\text{M}$  stężenie jonów wapnia).



**Rycina 22 Wpływ aktywatora NS11021 na aktywność badanego kanału.** Rejestracja aktywności kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w jednym skrawku błony mitochondrialnej. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach +40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. NS11021 rozpuszczono w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup> (A) lub 1 μM Ca<sup>2+</sup> (B). Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o5). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

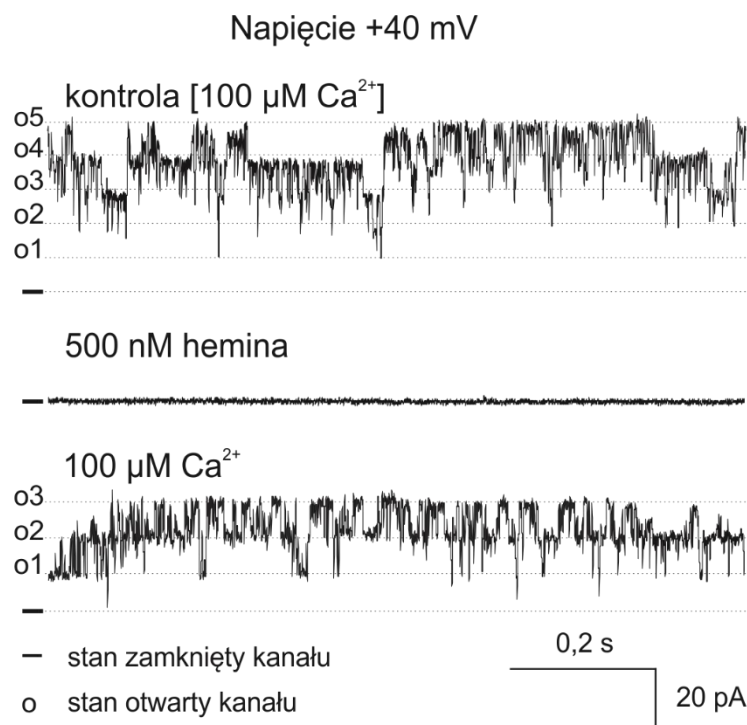
Na rycinie 23 przedstawiono analizę statystyczną wpływu aktywatora NS11021 na aktywność kanału rejestrowanego po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC. Panel A przedstawia wpływ NS11021 na aktywność kanału rejestrowaną w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>, a panel B przedstawia wpływ NS11021 na aktywność kanału rejestrowaną w buforze zawierającym 1 μM Ca<sup>2+</sup>. Zastosowanie 5 μM oraz 10 μM NS11021 zwiększa aktywność kanału w sposób istotny statystycznie w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>.



**Rycina 23** Analiza statystyczna wpływu aktywatora NS11021 na aktywność kanału rejestrowanego po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC. (A) Wpływ NS11021 na aktywność kanału rejestrowaną w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>. Panel B przedstawia wpływ NS11021 na aktywność kanału rejestrowaną w buforze zawierającym 1 μM Ca<sup>2+</sup>.

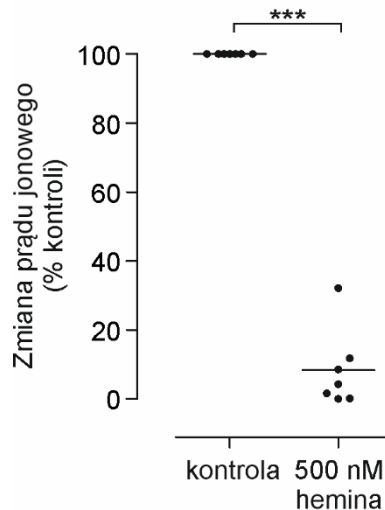
Oprócz aktywatorów kanału mitoBK<sub>Ca</sub> znana jest również grupa inhibitorów blokujących aktywność kanału. W celu pełnej identyfikacji aktywności rejestrowanej po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC zastosowano dwa inhibitory kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Pierwszym zastosowanym inhibitorem była hemina, która hamuje aktywność kanałów BK<sub>Ca</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> [168, 169]. Inhibitor ten wiąże się do motywu aminokwasowego znanego jako motyw wiążący heminę (ang. *hemin binding motif* HBM), znajdującym się pomiędzy domenami RCK podjednostki α kanału.

Na rycinie 24 przedstawiono przykład rejestracji aktywności kanału po przejściowej transfekcji plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Aktywność kanału była rejestrowana w buforze kontrolnym zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>. Podanie heminy w stężeniu 500 nM w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup> skutkowało całkowitym hamowaniem kanału. Ponowna perfuzja buforem zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>, niezawierającym heminy, skutkowało powrotem aktywności kanału. Świadczy to o przejściowej interakcji heminy z podjednostką α kanału. Taka kinetyka reakcji pokrywa się z właściwościami mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub>.



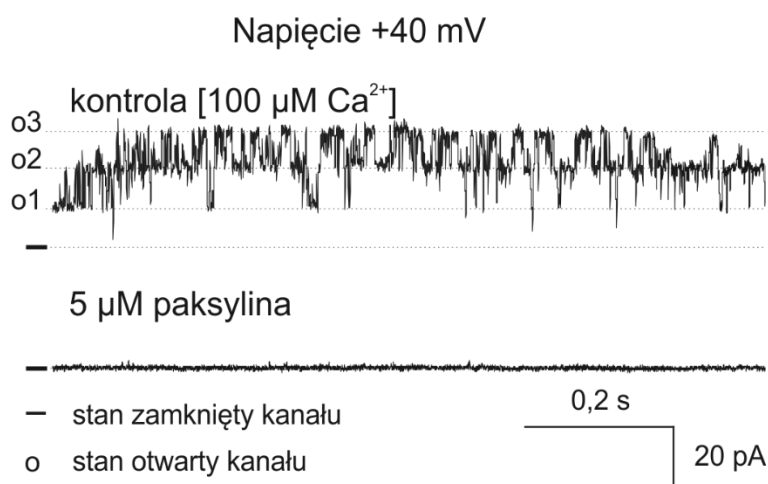
**Rycina 24 Wpływ 500 nM heminy na aktywność rejestrowanego kanału.** Rejestracja aktywności kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w jednym skrawku błony mitochondrialnej. Pomiar metodą patch-clamp z mitoplastów komórek HEK293T. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie przy potencjałach +40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Heminę rozpuszczono w buforze kontrolnym zawierającym 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o5). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

Na rycinie 25 przedstawiono analizę statystyczną wpływu heminy na aktywność rejestrowanego kanału. Średnia wielkość prądu jonowego po podaniu heminy wynosiła 8,3% wartości kontrolnej rozumianej jako prąd płynący w buforze zawierającym 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (n=7). Obserwowana zmiana jest istotna statystycznie.



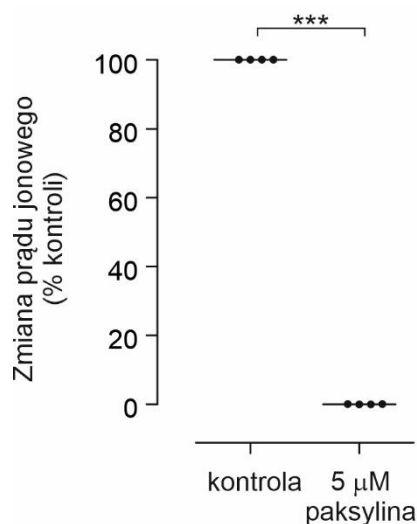
**Rycina 25** Analiza statystyczna wpływu heminy na aktywność kanału rejestrowanego po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC. n=7.

Kolejnym zastosowanym inhibitorem kanałów typu BK<sub>Ca</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> była paksylina. Zastosowanie 5 μM paksyliny w buforze zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup> skutkowało całkowitym hamowaniem rejestrowanego kanału. Na rycinie 26 przedstawiono przykładową rejestrację kanału aktywnego w buforze kontrolnym o wysokim stężeniu jonów wapnia oraz hamowanie aktywności po podaniu 5 μM paksyliny rozpuszczonej w buforze kontrolnym. Ponadto, paksylina była stosowana jako kontrolny inhibitor w każdym z opisywanych wcześniej doświadczeń.



**Rycina 26** Wpływ 5 μM paksyliny na aktywność rejestrowanego kanału. Rejestracja zmian przepływu prądu jonowego w czasie dokonywana była przy potencjale +40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2. Paksylinę rozpuszczono w buforze kontrolnym zawierającym 100 μM Ca<sup>2+</sup>. Komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodujących izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. „-” oznacza stan zamknięty kanału. „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o3). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

Zgodnie z obserwacją, wyniki analizy statystycznej potwierdzają istotną zmianę w przepływie prądu jonowego przed i po podaniu inhibitora kanału mitoBK<sub>Ca</sub> co przedstawiono na rycinie 27.



**Rycina 27** Analiza statystyczna wpływu paksyliny na aktywność kanału rejestrowanego po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC. n=4

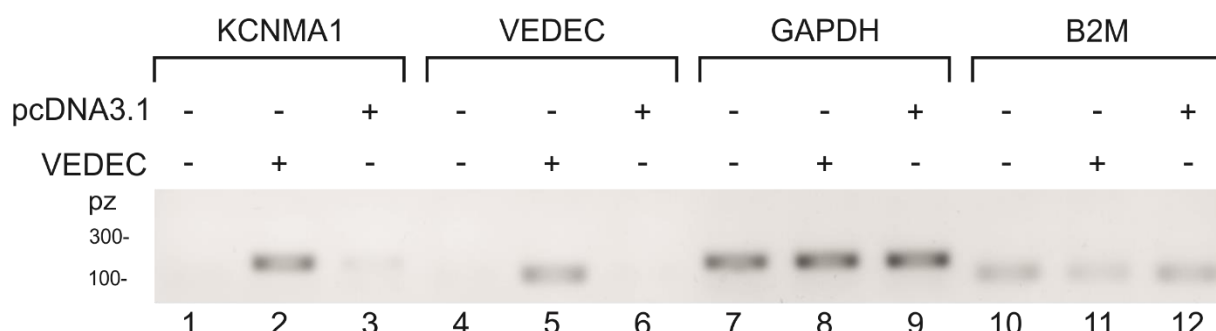
Powyższe dane jednoznacznie wskazują, że kanał rejestrowany po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC wykazuje wszystkie cechy kanału mitoBK<sub>Ca</sub> opisanego wcześniej. Świadczą o tym zarówno właściwości biofizyczne kanału takie jak przewodnictwo czy zależność od potencjału błonowego, a także regulacja przez jony wapnia czy heminę oraz wybrane modulatory.

#### 6.1.6 Analiza ekspresji podjednostki $\alpha$ i $\beta 4$ kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC

W kolejnej części doświadczeń dokonano analizy ekspresji izoformy VEDEC oraz lokalizacji tej izoformy w komórkach HEK293T typu dzikiego oraz po transfekcji.

W pierwszej części tych doświadczeń przeprowadzono odwrotną transkrypcję RNA wyizolowanego z komórek HEK293T typu dzikiego po przejściowej transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> oraz plazmidem pcDNA3.1 niekodującym białka. Następnie, w celu jakościowej analizy transkryptów wybranych genów w komórkach, wykonano reakcję PCR. Do analizy jako geny referencyjne zastosowano startery rozpoznające produkt genu GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa) oraz B2M ( $\beta 2$ -mikroglobulina).

Na rycinie 28 przedstawiono przykładowy wynik analizy ekspresji genu *KCNMA1* oraz izoformy VEDEC w badanych komórkach. W badaniach zastosowano startery rozpoznające wszystkie potencjalne izoformy podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> (ścieżki oznaczone jako KCNMA1) oraz startery rozpoznające specyficznie izoformę VEDEC. Jak widać na rysunku poziom ekspresji genu *KCNMA1* w komórkach HEK293T dzikiego typu był bardzo niski (ścieżka 1). Można także zaobserwować śladowy poziom ekspresji izoformy VEDEC (ścieżka 4). Równie niską intensywność prążków zaobserwowano w przypadku transfekcji plazmidem pcDNA3.1 (ścieżki 3 i 6). Jednakże po transfekcji komórek plazmidem kodującym izoformę VEDEC intensywność sygnału produktów amplifikowanych przez startery rozpoznające wszystkie izoformy podjednostki  $\alpha$  oraz izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> były znacząco wyższe (ścieżki 2 i 5). W przypadku zastosowania starterów rozpoznających produkty genów referencyjnych (*GAPDH* i *B2M*) sygnał był wykrywalny we wszystkich próbach (ścieżki 7-12).

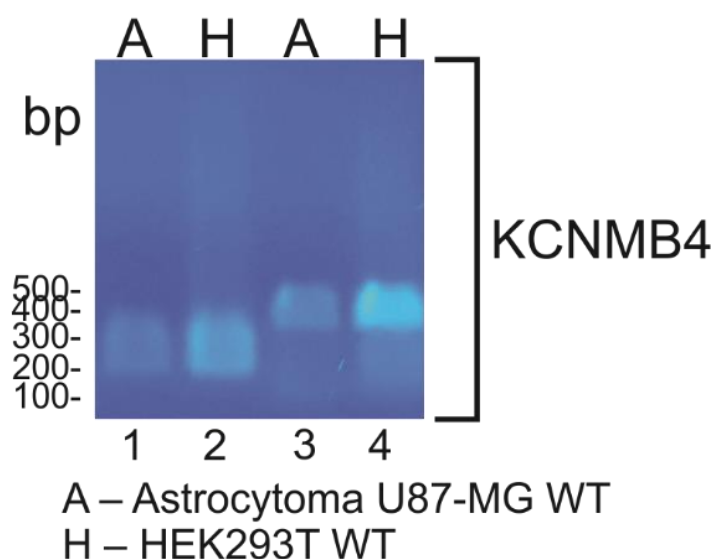


**Rycina 28** Analiza ekspresji wybranych genów w linii komórkowej HEK293T po przejściowej transfekcji plazmidem BK-VEDEC kodującym izoformę VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające obecność produktów jakościowego PCR dla podjednostki tworzącej por kanału  $\alpha$  (167 pz) i jej izoformy VEDEC 113 pz) oraz markerów komórkowych GAPDH (161 pz) oraz B2M (86 pz). n=3.

Aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest regulowana przez podjednostki regulatorowe  $\beta$ , w tym podjednostkę  $\beta$ 4, która została zidentyfikowana w mitochondriach różnych tkanek i została zidentyfikowana jako jednostka potencjalnie oddziałująca z podjednostkami łańcucha oddechowego [150]. Z tego względu pierwsze doświadczenia tej części pracy poświęcone były próbie odpowiedzi na pytanie czy podjednostka  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> jest ekspresjonowana w komórkach HEK293T dzikiego typu. Równolegle porównano ekspresję tej podjednostki w komórkach astrocytomy U-87 MG, w których kanał mitoBK<sub>Ca</sub> był opisany poprzednio [150, 163]. W związku z tym z obydwu linii komórkowych wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję i wykonano reakcję PCR z zastosowaniem dwóch par starterów

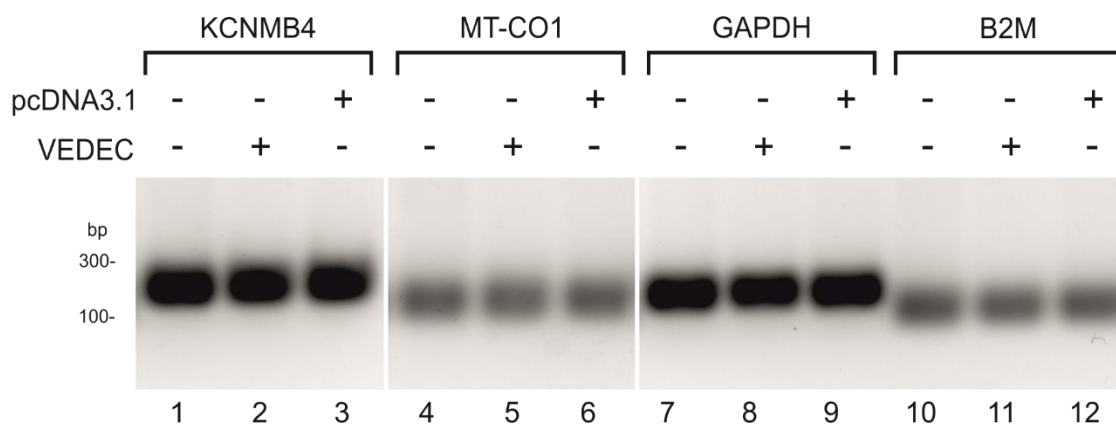


rozpoznających transkrypt genu *KCNMB4* kodującego podjednostkę  $\beta 4$ . Wykorzystano pary starterów rozpoznających inne odcinki transkryptu. W doświadczeniu wykorzystano jako matrycę cDNA pochodzące z tej samej transkrypcji. Na rycinie 29 pokazano zdjęcie żelu agarozowego zawierające produkty amplifikacji transkryptu genu *KCNMB4*. Na poziomie jakościowej analizy genu nie zaobserwowano znacznej różnicy w ekspresji genu kodującego podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub>, w obu typach komórek co świadczy o tym, że w komórkach HEK293T zachodzi ekspresja genu *KCNMB4*.



**Rycina 29** Analiza ekspresji genów podjednostek  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> w dwóch liniach komórek dzikiego typu HEK293T oraz astrocytoma U-87 MG. Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego obecność produktów PCR dla podjednostki  $\beta 4$  z wykorzystaniem starterów: ścieżka 1/2 (118/119, 168 pz), ścieżka 3/4 (104/105, 278 pz).

W następnym kroku podjęto próbę porównania ekspresji podjednostki  $\beta 4$  w komórkach HEK293T transfekowanych podjednostką VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Wyniki zaprezentowano na rycinie 30. W analizie uwzględniono również transkrypt podjednostki I oksydazy cytochromu c, która jest kodowana przez genom mitochondrialny oraz dwóch genów referencyjnych GAPDH oraz B2M. Jak zaprezentowano na rysunku, analiza PCR nie wykazała zmian ekspresji podjednostki  $\beta 4$  zależnej od izoformy VEDEC.

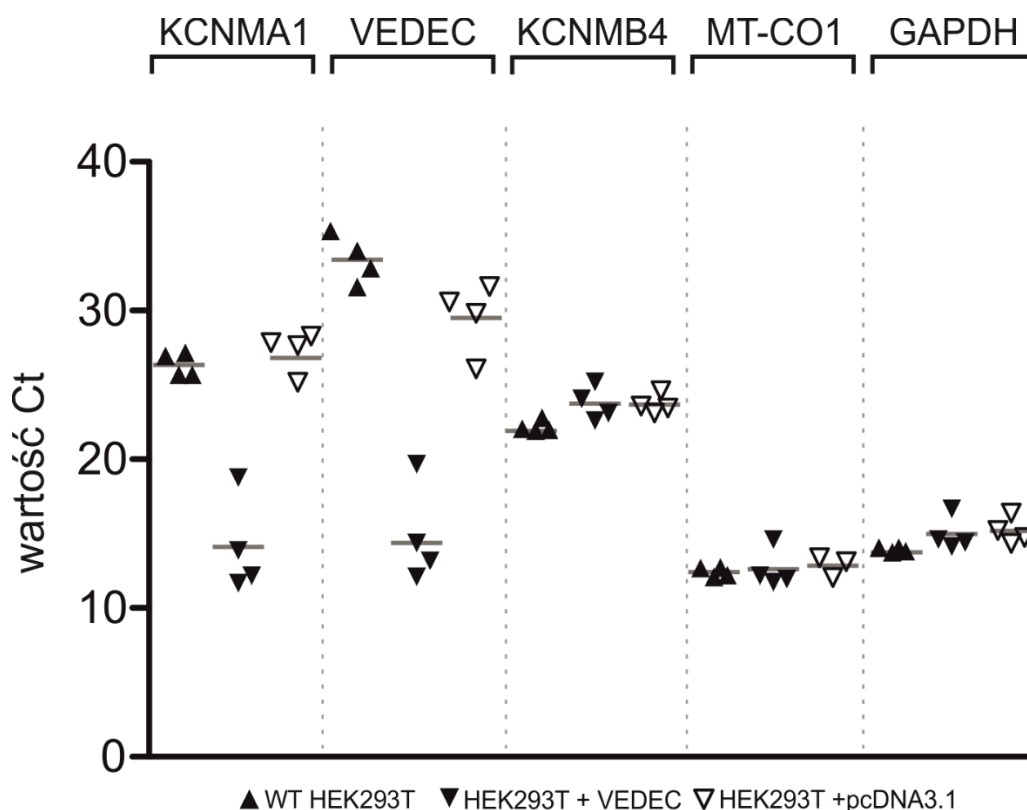


**Rycina 30** Analiza ekspresji wybranych genów w linii komórkowej HEK293T po przejściowej transfekcji plazmidem BK-VEDEC kodującym izoformę VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające obecność produktów jakościowego PCR dla podjednostki  $\beta$ 4 kanału (149 pz) oraz markera mitochondrialnego COXIV (MT-CO1, 96 pz) oraz markerów komórkowych GAPDH (161 pz) i B2M (86 pz).

Po analizie jakościowej z wykorzystaniem techniki PCR przeprowadzono także analizę ilościową za pomocą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Wyniki analizy przedstawiono poniżej w postaci wykresu wartości Ct na rycinie 31. Wartość Ct oznacza liczbę cykli reakcji przy której obserwowany jest produkt amplifikacji.

Przeanalizowano wartości Ct dla komórek typu dzikiego oraz po przejściowej transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> oraz plazmidem pcDNA3.1. W nietransfekowanych komórkach HEK293T średnia wartość Ct dla genu *KCNMA1* (dla wszystkich izoform) wynosiła 26. W komórkach transfekowanych pustym plazmidem pcDNA3.1 średnia wartość Ct wynosiła 27. W przypadku starterów rozpoznających izoformę VEDEC wartość Ct w komórkach HEK293T nietransfekowanych wynosiła 33 a w komórkach transfekowanych plazmidem pcDNA3.1 wynosiła 29,5. Wartości poziomu amplifikacji genu *KCNMA1* znacząco spadały po przejściowej transfekcji komórek plazmidem BK-VEDEC. W tym przypadku wartość Ct dla wszystkich izoform wynosiła 12 (po odrzuceniu wartości odbiegającej równej Ct=19), a Ct dla izoformy VEDEC wartość Ct wynosiła 13 (po odrzuceniu wartości odbiegającej równej Ct=20). Takie zmiany oznaczają znaczący wzrost poziomu transkryptów po transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC. W tych doświadczeniach zanalizowano także ekspresję podjednostki  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub>. W nietransfekowanych komórkach HEK293T średnia wartość Ct dla genu *KCNMB4* wynosiła 22. W komórkach transfekowanych pustym plazmidem pcDNA3.1 średnia wartość Ct wynosiła 24. Po transfekcji plazmidem kodującym izoformę VEDEC, poziom transkryptu genu *KCNMB4* nie ulega statystycznie istotnej zmianie.

W przypadku poziomu ekspresji markera mitochondrialnego którym była podjednostka 1 kompleksu IV łańcucha oddechowego kodowanej przez gen *MT-CO1* poziom Ct był również zbliżony między poszczególnymi typami komórek i wynosił 12. W przypadku genu referencyjnego *GAPDH* średnia wartość Ct była zbliżona dla wszystkich badanych komórek i wynosiła 14.



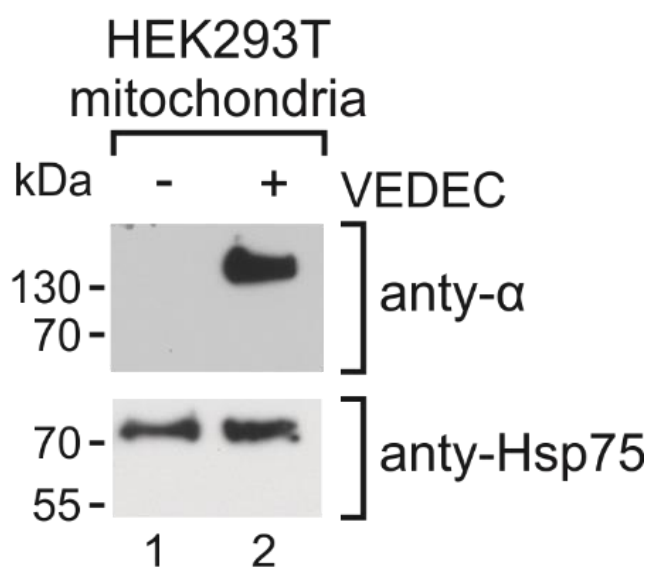
**Rycina 31** Analiza ekspresji wybranych genów w linii komórkowej HEK293T po przejściowej transfekcji plazmidem kodującym izofর্মę VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Wykres przedstawia wartość Ct. Obserwowano produkty RT-qPCR dla podjednostki tworzącej por kanału –  $\alpha$  i jej izofর্মę VEDEC, podjednostki  $\beta$ 4 kanału, podjednostki 1 kompleksu IV łańcucha oddechowego kodowanego przez gen *MT-CO1* oraz markera komórkowego *GAPDH* (dehydrogenaza gliceroaldehidofosforanowa). n=4.

### 6.1.7 Lokalizacja komórkowa izofর্মę VEDEC w komórkach HEK293T

Celem kolejnej części doświadczeń było potwierdzenie lokalizacji izofর্মę VEDEC w mitochondriach komórek HEK293T po przejściowej transfekcji. W tym celu wykorzystano technikę Western blot oraz analizę immunofluorescencyjną wykorzystującą mikroskopię konfokalną.

W pierwszej części wykonano eksperymenty wykorzystujące elektroforezę SDS oraz analizę Western blot frakcji mitochondrialnych izolowanych z komórek HEK293T typu

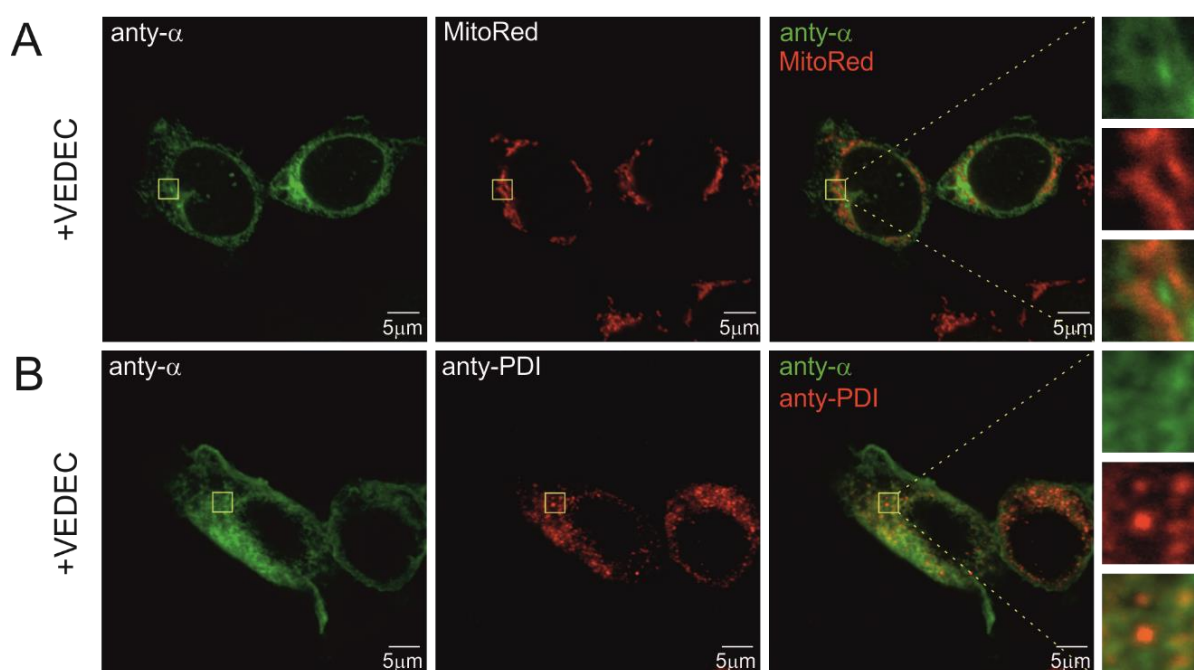
dzikiego oraz po przejściowej transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC. Przykładowy wynik tego eksperymentu pokazano na rycinie 32. Membranę PVDF znakowano przeciwciałem rozpoznającym podjednostkę  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> oraz markerem mitochondrialnym, którym było białko Hsp75. Ścieżka 1 zawierała próbkę nietransfekowaną plazmidem VEDEC. Podjednostka  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> wykrywalna była jedynie we frakcji zawierającej mitochondria izolowane z komórek transfekowanych HEK293T. Zgodnie z informacją producenta zastosowane przeciwciało przeciwko podjednostce  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> powinno rozpoznawać wszystkie izoformy tej podjednostki kanału BK<sub>Ca</sub>. Wynik ten sugeruje, że w komórkach HEK293T pomimo obecności transkryptów genu *KCNMA1* prawdopodobnie nie występuje białko tworzące kanał BK<sub>Ca</sub>. Jednocześnie barwienie białka Hsp75 wykazywało wyraźny sygnał w obu testowanych frakcjach (ścieżka 1 i 2; anti-Hsp75).



**Rycina 32** Analiza obecności podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T dzikiego typu oraz w komórkach przejściowo transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Analiza techniką Tricine – SDS – PAGE Western blot z oczyszczonych mitochondriów komórek HEK293T. Zdjęcia kliszy z wyznakowania immunologicznego podjednostki kanału BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$  (~120 kDa) oraz markera mitochondrialnego – Hsp75 (~80 kDa). „-” – komórki nietransfekowane plazmidem VEDEC oraz „+” – komórki transfekowane plazmidem VEDEC. Do wykrywania białek zastosowano mysie przeciwciało anti- $\alpha$  (1:200, NeuroMab, L6/60) oraz królicze przeciwciało anti-Hsp75 (1:1000, Abcam, ab182775). n=6.

W ostatniej serii eksperymentów tej części pracy podjęto próbę określenia lokalizacji izoformy VEDEC w komórkach HEK293T po przeprowadzeniu przejściowej transfekcji. Izofорма VEDEC była poprzednio zidentyfikowana w mitochondriach serca [145]. Ponadto ekspresja tej izoformy w komórkach HEK293 również skutkowałą częściową lokalizacją w mitochondriach. W opisanych doświadczeniach wykonano znakowanie immunofluorescencyjne podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> skorelowane z barwieniem

mitochondriów markerem fluorescencyjnym MitoRed. Ponadto wykonano znakowanie siateczki śródplazmatycznej wykorzystując jako marker białko PDI (ang. *protein disulfide isomerase*). Podsumowanie wykonanych doświadczeń zaprezentowano na rycinie 33. Podjednostkę  $\alpha$  znakowano barwnikiem zielonej fluorescencji, natomiast kompartmenty komórkowe przedstawiono w kolorze czerwonym. Wykonane doświadczenia wykazały częściową lokalizację podjednostki VEDEC z frakcją mitochondrialną (Rycina 33A). Sygnał pochodzący z barwienia izoformy VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> kolokalizował się również z siateczką endoplazmatyczną (Rycina 33B). Kolokalizacja białka z wybranymi przedziałami komórkowymi objawiała się barwą pomarańczową (zdjęcia po prawej stronie w panelach A i B). Ponadto, przedstawiono powiększone obrazy przykładowej kolokalizacji sygnałów.

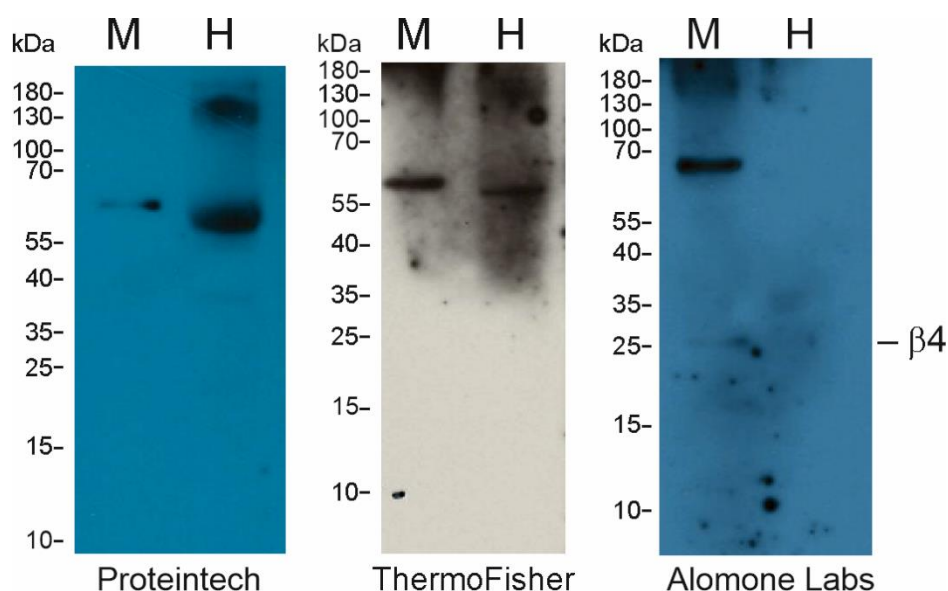


**Rycina 33** Analiza obecności podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T dzikiego typu oraz w komórkach przejściowo transfekowanych plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Zdjęcia lokalizacji komórkowej uzyskane za pomocą mikroskopii konfokalnej. Obrazowanie lokalizacji komórkowej izoformy VEDEC za pomocą przeciwciała anti- $\alpha$  (królicze, 1:200, Alomone Labs, APC021) – kanał zielony. A) Badanie kolokalizacji z mitochondriami za pomocą markera mitochondrialnego MitoRed (Sigma-Aldrich) – kanał czerwony. B) Badanie kolokalizacji z siateczką śródplazmatyczną za pomocą przeciwciała anti-PDI (mysie, 1:500, Abcam, ab2792) – kanał czerwony. Superimpozycja kanałów czerwonego oraz zielonego w kolorze pomarańczowym. Skala 5  $\mu$ m.

### 6.1.8 Weryfikacja występowania podjednostki $\beta$ 4 w komórkach HEK293T

Analiza ekspresji genu *KCNMB4* wskazuje na obecność transkryptów tego genu w komórkach HEK293T. W związku z tym przeprowadzono eksperymenty mające na celu

potwierdzenie obecności podjednostki  $\beta 4$  na poziomie białka. W tym celu wykonano elektroforezę Tricine SDS-PAGE próbek zawierających homogenat komórkowy lub oczyszczone mitochondria komórek HEK293T dzikiego typu i przeprowadzono znakowanie z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających podjednostkę  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$ . W poprzednich badaniach, prowadzonych w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, mających na celu identyfikację tej podjednostki w mitochondriach komórek mózgowych wykorzystano przeciwciało poliklonalne firmy Alomone Lab. Niemniej jednak, w celu uzyskania bardziej wiarygodnych wyników postanowiono wykonać tę analizę z wykorzystaniem większej liczby przeciwciał pochodzących od trzech producentów - Proteintech, ThermoFisher (Invitrogen) oraz Alomone Labs. Na rycinie 34 zaprezentowano wyniki analizy Western blot z zastosowaniem powyższych przeciwciał.



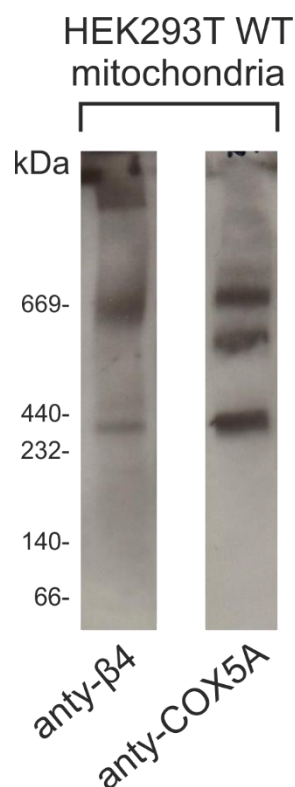
**Rycina 34** Analiza Western blot po elektroforezie Tricine –frakcji homogenatów całokomórkowych (H) oraz mitochondrialnych (M) z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających podjednostkę  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$ . Do barwienia immunologicznego podjednostki  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$  (~24 kDa) w komórkach HEK293T zastosowano przeciwciała anty- $\beta 4$  firmy Proteintech (mysie, 1:1000, 60122-1-Ig), ThermoFisher (Invitrogen) (królicze, 1:200, PA5-50692) oraz Alomone (królicze, 1:200, APC-061).

Podjednostka  $\beta 4$  to białko o masie około 24kDa. Analiza wykazała, że zastosowane przeciwciała znakują białka o masie znacznie większej niż przewidziana dla podjednostki  $\beta 4$ . Przeciwciało firmy Proteintech znakowało prążek na żądanej wysokości, jedynie we frakcji zawierającej homogenat komórkowy. W przypadku przeciwciała firmy Alomone Labs widoczny był słaby prążek na wysokości około 24 kDa we frakcji mitochondrialnej, co może sugerować obecność podjednostki  $\beta 4$  w mitochondriach. Znakowanie prążków o większej

masie niż przewidywana dla białka  $\beta 4$  mogłyby sugerować pojawienie się klastrów podjednostki  $\beta 4$ . Jednak należy zauważyć, że przeciwciała znakowały prążki o różnych masach, co może wskazywać na niespecyficzne znakowanie innych białek.

Potwierdzeniem obecności białka  $\beta 4$  w tych komórkach mogłoby być zastosowanie techniki CRISPR/Cas9 w celu uzyskania klonów ze zmutowanym genem *KCNMB4* skutkującym brakiem funkcjonalnego białka. W trakcie realizacji tej pracy podjęto próbę uzyskania takich linii, jednak próby te nie zakończyły się powodzeniem. Niemniej jednak, analiza z wykorzystaniem przeciwciała firmy Alomone Labs sugeruje obecność podjednostki  $\beta 4$  w mitochondriach komórek HEK293T.

Pomimo prawdopodobieństwa częściowo niespecyficznego znakowania podjęto próbę analizy kompleksów białkowych w mitochondriach komórek HEK293T z wykorzystaniem przeciwciała firmy Alomone Labs. Poprzednie doświadczenia wykonane w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych wskazały na interakcję podjednostki  $\beta 4$  z oksydazą cytochromu c w komórkach U-87 MG [150]. Dlatego postanowiono wykonać analizę Blue Native w celu porównania potencjalnych kompleksów tworzonych w komórkach HEK293T przez podjednostkę  $\beta 4$  z kompleksami tworzonymi przez oksydazę cytochromu c (Rycina 35). Analiza wykazała obecność prążków o tej samej wysokości znakowanych we frakcji mitochondrialnej przez przeciwciało rozpoznające podjednostkę  $\beta 4$  jak i oksydazę cytochromu c. Podobny wynik obserwowano w przypadku komórek linii U-87 MG, jednak w przypadku komórek HEK293T należy wziąć pod uwagę potencjalne niespecyficzne znakowanie części widocznych kompleksów. Jednym z potencjalnych doświadczeń mogących rozstrzygnąć wyżej wskazane wątpliwości mogłoby być wykonanie w przyszłości analizy z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej, która pozwala na wskazanie masy monomerów białek tworzących analizowane kompleksy białkowe.



**Rycina 35** Porównanie z wykorzystaniem elektroforezy Blue Native kompleksów białkowych rozpoznawanych przez przeciwciała anti-β4 oraz kompleksów oksydazy cytochromu c w komórkach HEK293T dzikiego typu. W analizie zastosowano przeciwciała anti-β4 firmy Alomone (królicze, 1:200, APC-061). Do znakowania podjednostki Va oksydazy cytochromu c wykorzystano przeciwciała firmy Thermo Fisher Scientific (królicze, 1:1000, PA5-27432).

Ekspresja podjednostki β4 w komórkach HEK293T stawia pytanie o jej lokalizację w przedziałach komórkowych. Poprzednie dane literaturowe wskazują, że ta podjednostka może się lokalizować w mitochondriach, między innymi komórek mózgu oraz nowotworowych komórek astrocytomy [150, 163]. Niemniej, na uzyskane wyniki należy spojrzeć krytycznie z uwagi na niespecyficzne barwienia ujawnione w analizie Western blot po elektroforezie Tricine SDS-PAGE. Stawia to pod znakiem zapytania, choć nie wyklucza obecności natywnej podjednostki β4 kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach/mitochondriach komórek HEK293T.

#### 6.1.9 Podsumowanie

Podsumowując pierwszą część pracy można stwierdzić, że przeprowadzone eksperymenty wykazały, że ekspresja izoformy VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> w komórkach HEK293T prowadzi do pojawienia się funkcjonalnego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach tych komórek. Kluczowym narzędziem w tych badaniach były doświadczenia elektrofizjologiczne z zastosowaniem techniki patch-clamp, które umożliwiły precyzyjne pomiary aktywności



kanału w izolowanych mitochondriach. Rejestracje wykazały charakterystyczne dla kanału BK<sub>Ca</sub> właściwości, takie jak aktywacja zależna od jonów wapnia i napięcia.

Dodatkowo, lokalizację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach potwierdzono za pomocą analizy immunofluorescencyjnej. Zastosowanie specyficznych przeciwciał wykazało częściowe współwystępowanie sygnału z markerem mitochondrialnym, co wskazuje na ukierunkowanie i integrację białka w mitochondriach. Wyniki te jednoznacznie potwierdzają, że izoforma VEDEC może być rozpoznawana jako białko mitochondrialne i jest zdolna do formowania aktywnego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w transfekowanych komórkach HEK293T.

## 6.2 Identyfikacja białek oddziałujących z podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> z wykorzystaniem techniki TurboID

Jak wspomniano wcześniej kanały typu BK<sub>Ca</sub> odgrywają istotną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak regulacja potencjału błonowego, homeostaza wapniowa czy kontrola napięcia mięśniowego. Wiadomo też, że kanały mitoBK<sub>Ca</sub> pełnią również istotną funkcję w mitochondriach, wpływając na ich prawidłowe działanie i adaptację do stresu komórkowego. W mitochondriach kanały te mogą odgrywać rolę w regulacji potencjału błony mitochondrialnej, produkcji ATP oraz generowaniu reaktywnych form tlenu.

Badania opisane powyżej wykazały, że izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> tworzy funkcjonalny kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach. Co więcej, istnieją przesłanki sugerujące, że kanały mitoBK<sub>Ca</sub> mogą oddziaływać z komponentami łańcucha oddechowego mitochondriów, co prawdopodobnie jest elementem mechanizmu regulującego funkcjonowanie mitochondriów. Tego typu interakcje mogłyby wyjaśniać, w jaki sposób mitoBK<sub>Ca</sub> przyczynia się do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym oraz wspomaga funkcje energetyczne mitochondriów.

Dotychczasowe próby badania interakcji kanałów BK<sub>Ca</sub> z partnerami białkowymi, w tym w mitochondriach opierały się na metodach biochemicznych, takich jak immunoprecypitacja połączona ze spektrometrią mas. W opisywanych badaniach postanowiono wykorzystać technikę TurboID, która pozwala na biotynylację białek w bezpośrednim sąsiedztwie badanego białka. Dzięki temu podejściu eksperymentalnemu możliwa jest identyfikacja potencjalnych partnerów podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> w naturalnym środowisku w różnych przedziałach komórkowych, w tym mitochondriów. To podejście pozwoli na określenie bliskiego otoczenia tych białek, niekoniecznie jednak muszą być to białka trwale oddziałujące z kanałem BK<sub>Ca</sub>.

Zastosowanie techniki TurboID, w połączeniu z mikroskopią i zaawansowaną analizą proteomiczną, pozwoli uzyskać obraz interakcji kanałów BK<sub>Ca</sub> z innymi białkami, co może otworzyć nowe możliwości badawcze w kontekście ich roli w funkcjonowaniu całych komórek oraz mitochondriów.

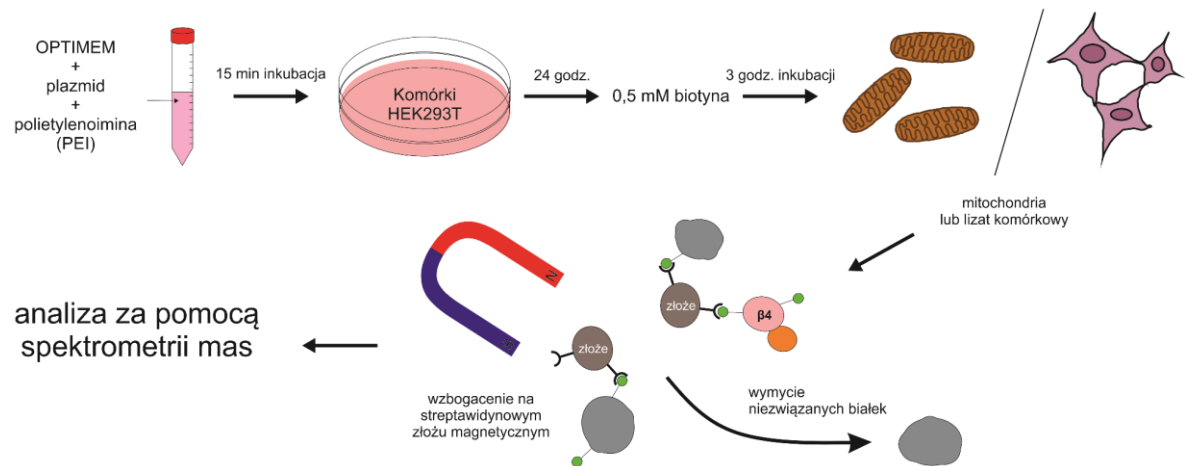
Jako model do badań wybrano komórki HEK293T, mimo że komórki te nie wykazują naturalnej, wysokiej ekspresji kanałów typu BK<sub>Ca</sub>. Jednak komórki te są powszechnie stosowane w badaniach kanałów BK<sub>Ca</sub>. Ponadto wykorzystano tę linię w badaniach opisanych powyżej do badania aktywności izoformy VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach. Wskazuje, to, że jest ona prawidłowo rozpoznawana jako białko kierowane do mitochondriów. Komórki

HEK293T charakteryzują się łatwością i wysoką wydajnością transfekcji, co umożliwia skuteczną ekspresję badanego białka. Podjęto również próby wykorzystania komórek U-87 MG, w których kanał BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach występuje naturalnie, jednak komórki te są trudne do transfekcji, a próby wyprowadzenia stabilnych linii kodujących podjednostki kanału BK<sub>Ca</sub> nie powiodły się z powodu szybkiej adaptacji komórek do antybiotyków selekcyjnych.

### **6.2.1 Przygotowanie systemu do biotynylacji partnerów podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub>**

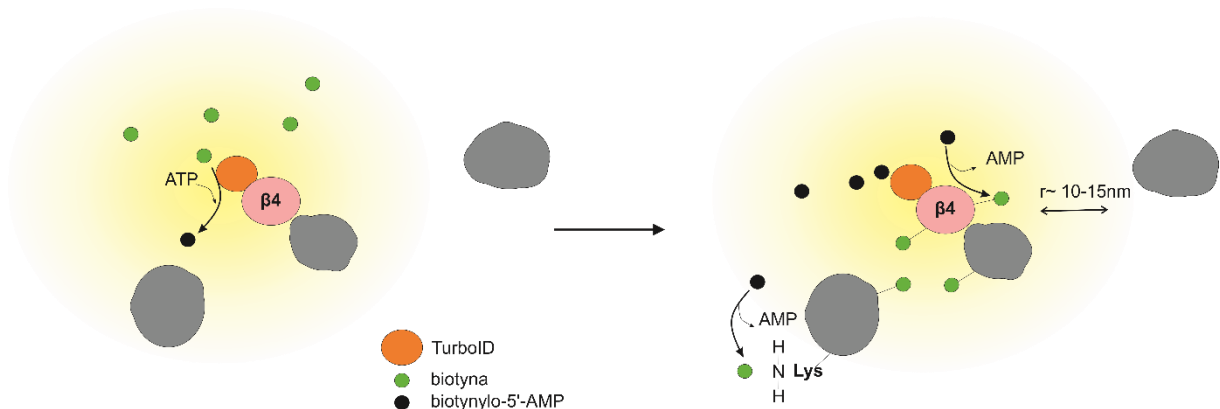
Poprzednie badania wykazały, że w komórkach HEK293T izoforma VEDEC tworzy funkcjonalny kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, a komórki te prawdopodobnie ekspresjonują podjednostkę  $\beta$ 4 kanału. Ponadto, wykazały, że podjednostka ta może oddziaływać z mitochondrialnym łańcuchem oddechowym. W związku z tym podjęto próbę przygotowania systemu do znakowania poprzez biotynylację i późniejszą identyfikację białek będących w pobliżu podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub>.

Zaplanowane doświadczenia obejmowały przygotowanie odpowiednich konstruktów, weryfikację ekspresji, lokalizacji oraz funkcjonalności podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> oraz biotynylację i identyfikację potencjalnych partnerów białkowych. Schemat zaplanowanego doświadczenia zaprezentowano na rycinie 36. Schemat przedstawia proces przejściowej transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym wybrane białka sfuzjowane z enzymem TurboID, biotynylacji oraz oczyszczania biotynylowanych białek z próbki mitochondrialnej lub całokomórkowej na streptawidynowym złożu magnetycznym.



**Rycina 36 Schemat doświadczeń mających na celu identyfikację partnerów białkowych podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub>.** Doświadczenia obejmowały przejściową transfekcję komórek plazmidami kodującymi białka sfuzjowane z ligazą TurboID, biotynylację, koimmunoprecypitacyjne oczyszczanie białek biotynyloowanych przez ligazę TurboID oraz identyfikację białek biotynyloowanych z wykorzystaniem spektrometrii mas. Rysunek własny.

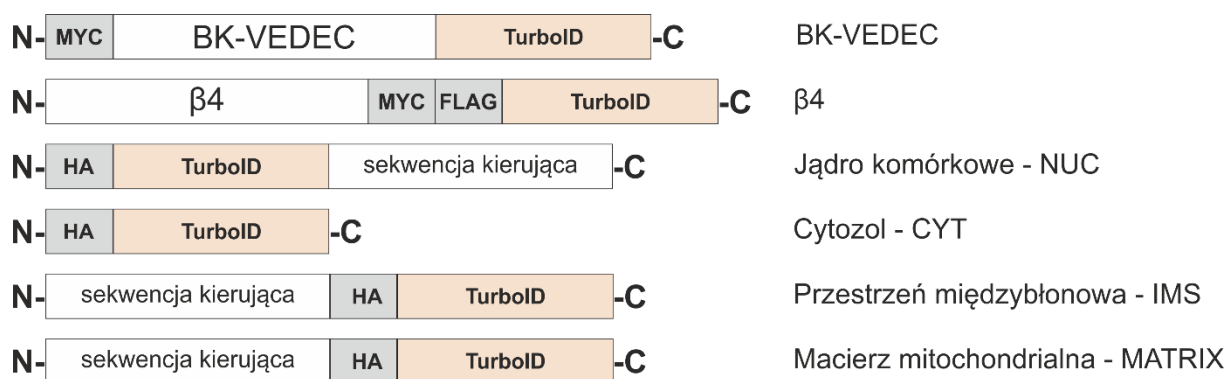
W doświadczeniach zaplanowano wykorzystanie ligazy TurboID, będącej zmodyfikowaną formą enzymu BirA. Ligaza TurboID przeprowadza adenylację biotyny w wyniku czego powstaje reaktywne biotynylo-AMP. Biotynylo-AMP przeprowadza atak nukleofilowy na lizynę znajdującą się w promieniu 10-15 nm. Schemat biotynylacji zachodzącej w czasie opisywanych doświadczeń zamieszczono na rycinie 37, na przykładzie konstruktów zawierających podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> sfuzjowaną z ligazą TurboID. Zmodyfikowana ligaza sfuzjowana była na C-końcu badanego białka (podjednostki  $\beta 4$  lub  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>).



**Rycina 37 Zasada działania ligazy TurboID w obecności biotyny.** Schemat zjawiska biotynylacji na przykładzie konstruktów zawierających podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> oraz ligazę TurboID. Rysunek własny.

W celu wykonania zaplanowanych doświadczeń przeprowadzono serię klonowań mających na celu uzyskanie wybranych konstruktów. W niniejszej pracy wykorzystano, poza konstruktami  $\alpha$ -TurboID oraz  $\beta$ 4-TurboID, także konstrukty kodujące ligazę TurboID kierowaną do dwóch przedziałów mitochondrialnych (macierzy oraz przestrzeni międzybłonowej), jądra komórkowego lub pozostającą w cytozolu.

Podstawą do przygotowania konstruktów był plazmid kodujący podjednostkę  $\alpha$  wykorzystaną w doświadczeniach opisanych powyżej oraz plazmid kodujący podjednostkę  $\beta$ 4, regulującą aktywność kanału BK<sub>Ca</sub> pochodzący z firmy ORIGENE (nr RC202318). W celu wklonowania ligazy TurboID do obu plazmidów posłużono się metodą klonowania bez udziału enzymów restrykcyjnych znaną jako „quickchange” zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale Materiały i metody. W celu kierowania enzymu TurboID do przestrzeni międzybłonowej do genu kodującego ten enzym sfuzjowano sekwencję kierującą białka SMAC (mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy ang. *second mitochondria-derived activator of caspases*). W celu kierowania enzymu TurboID do macierzy mitochondrialnej gen kodujący ten enzym sfuzjowano z sekwencją kierującą transkarbamylazy ornitiny (OTC, ang. *ornithine transcarbamylase*) lokalizującej się w macierzy mitochondrialnej. Oba konstrukty wykorzystane zostały z powodzeniem w poprzednich badaniach prowadzonych w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych [241]. W przypadku konstruktów kierowanych do jądra komórkowego wykorzystano plazmid dostępny w bazie Addgene 3xHA-TurboID-NLS\_pCDNA3 (Plazmid #107171). Plazmid ten zawiera sekwencje kierujące do jądra komórkowego sfuzjowane na C-końcu białka TurboID. Plazmid kodujący białko TurboID pozostające w cytozolu przygotowano na bazie powyższego plazmidu poprzez wprowadzenie stop kodonu pomiędzy ligazą TurboID a sekwencjami kierującymi do jądra komórkowego. Dzięki zastosowaniu tych konstruktów możliwe było wyselekcjonowanie specyficznych i unikatowych białek biotynylowanych przez podjednostki kanału BK<sub>Ca</sub>. Schemat konstruktów wykorzystanych do przeprowadzenia opisywanych doświadczeń zaprezentowano na rycinie 38.

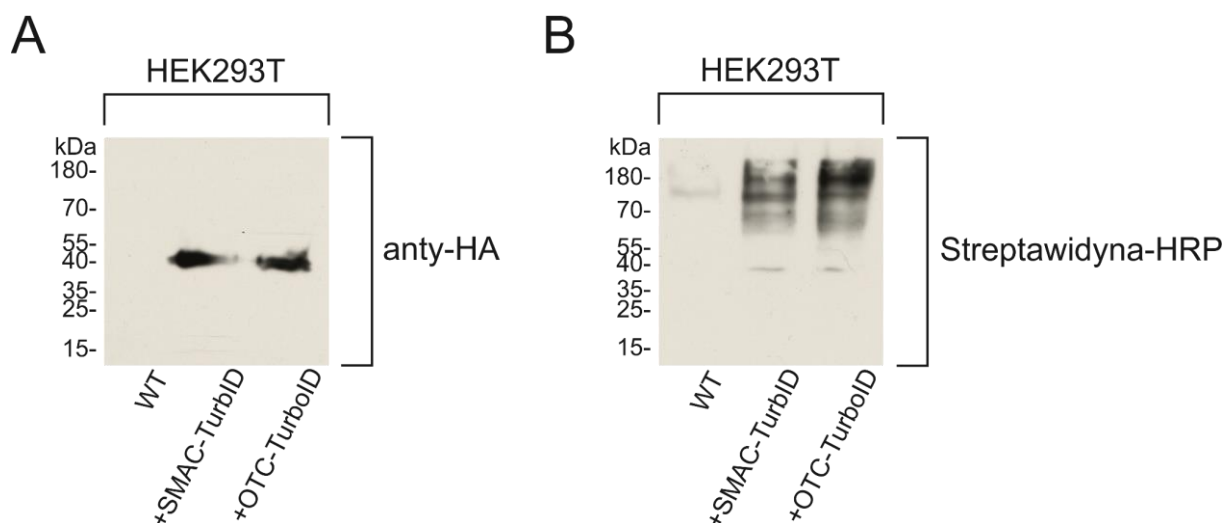


**Rycina 38** Konstrukty wykorzystane do identyfikacji białek metodą biotynylacji pobliskich białek z wykorzystaniem ligazy TurboID. Rysunek własny.

### 6.2.2 Analiza funkcjonalności konstruktów kodujących enzym TurboID

Jak wspomniano wcześniej, w poprzednich badaniach prowadzonych w naszej Pracowni wykorzystano dwa konstrukty kontrolne biotynylujące białka mitochondrialne. W związku z tym wstępna analiza ekspresji oraz funkcjonalności enzymu TurboID w komórkach HEK293T została wykonana z wykorzystaniem tych konstruktów. Mitochondrialne konstrukty kontrolne: OTC oraz SMAC zawierały metkę 3xHA. Białko SMAC-TurboID-3HA ma przewidywaną wielkość ~46kDa, a OTC-TurboID-3HA ~43kDa. W celu wykrycia obecności białka oraz aktywności enzymu TurboID wykonano ekspresję tych białek w komórkach HEK293T. Następnie przygotowano lizaty komórkowe, które poddano analizie z wykorzystaniem techniki Western blot. W tym celu wykonano elektroforezę Tricine SDS-PAGE, a następnie transfer białek z żelu na membranę PVDF. Membranę PVDF znakowano mysim przeciwciałem anti-HA (1:2000, Sigma, H9658) w celu wykrycia białek OTC-TurboID oraz SMAC-TurboID (Rycina 39 A). Analiza wykazała, obecność prążków na wysokości odpowiadającej przewidywanej wielkości badanych konstruktów. W następnej kolejności zbadano zdolność obu białek do biotynylacji innych białek. W tym celu przeprowadzono inkubację transfekowanych komórek w obecności biotyny. Do wykrycia biotynylacji wykorzystuje się fakt biotynylacji białek, z którymi TurboID jest sfuzjowane oraz biotynylacji pobliskich białek. Za pomocą analizy Western blot możliwe jest wykrycie biotynylowanych białek wykorzystując barwienie membran konjugatem streptawidyny sfuzjowanej z peroksydazą chrzanową (streptawidyna-HRP, 1:10000, ThermoScientific, 21130). Streptawidyna wykazuje silne powinowactwo względem biotyny. Analiza wykazała,

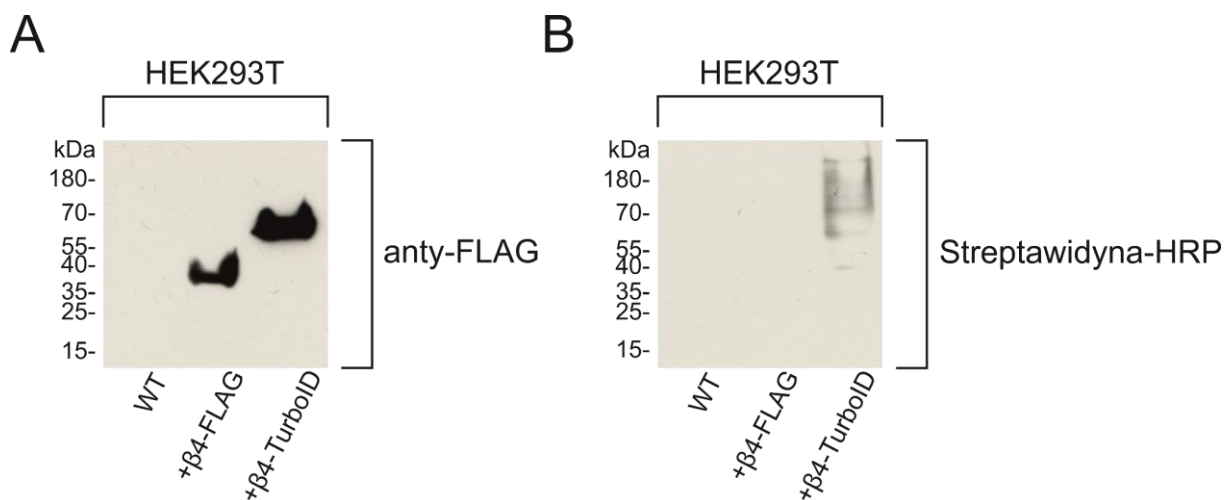
pojawienie się wielu prążków w lizatach z nadekspresją zarówno OTC-TurboID jak i SMAC-TurboID (Rycina 39 B). Powyższe analizy wskazują na pełną funkcjonalność obu konstruktyw.



**Rycina 39** Analiza lizatów komórkowych z komórek HEK293T po przejściowej transfekcji wybranymi konstruktywami: SMAC zawierający TurboID oraz OTC zawierający TurboID. WT, to nietransfekowane komórki dzikiego typu. A) Barwienie przeciwciałem anty-HA. B) Znakowanie streptawidyną sprzężoną z HRP po biotynylacji.

W kolejnym etapie przeprowadzono wstępne doświadczenia mające na celu weryfikację funkcjonalności nowouzyskanych konstruktyw kodujących podjednostkę  $\beta 4$  oraz  $\alpha$  (izofornę VEDEC) sfuzjowanych z ligazą TurboID. W związku z tym wykonano przejściową transfekcję komórek HEK293T obydwoma plazmidami. Po transfekcji i uzyskaniu lizatów komórkowych przeprowadzono analizę Western blot w celu wykrycia obecności białek w komórce.

W przypadku analizy ekspresji konstruktyw kodującego podjednostkę  $\beta 4$  sfuzjowanego z ligazą TurboID wykorzystano mysie przeciwciało anty-FLAG (1:1000, Sigma, F1804). Jako kontrolę wykorzystano oryginalny plazmid kodujący białko  $\beta 4$ , które zawierało metkę FLAG oraz myc sfuzjowaną na C-końcu białka (ORIGENE). Łączna wielkość białka  $\beta 4$  sfuzjowanego z metkami wynosiła około 27,5 kDa. Ligaza TurboID jest wielkości 35kDa i zawiera 15 mutacji w porównaniu do klasycznej ligazy BirA dzikiego typu [239]. Zatem znakowanie membrany przeciwciałem FLAG powinno wykazać obecność badanych białek na wysokości ~27 kDa dla  $\beta 4$ -FLAG oraz ~62 kDa dla  $\beta 4$ -FLAG-TurboID (Rycina 40 A).

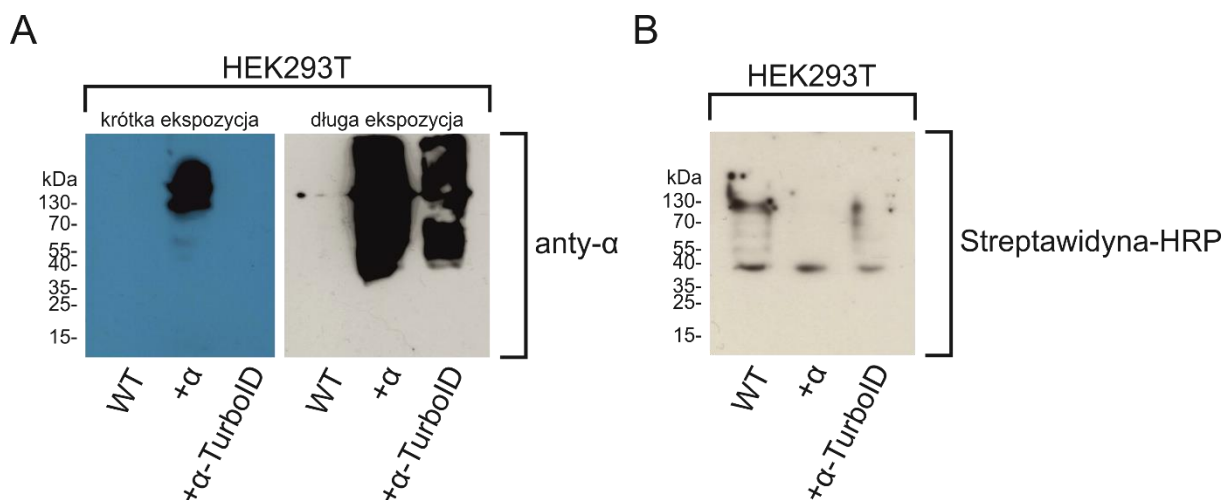


**Rycina 40** Analiza lizatów komórkowych z komórek HEK293T po przejściowej transfekcji wybranymi konstrukcjami:  $\beta$ 4-FLAG oraz  $\beta$ 4-FLAG zawierający dodatkowo TurboID. WT, to nietransfekowane komórki dzikiego typu. A) Barwienie przeciwciałem anti-FLAG M2). B) Znakowanie streptawidyną sprzężoną z HRP po biotynylacji.

Analiza  $\beta$ 4-FLAG oraz  $\beta$ 4-TurboID wykazała, że oba konstrukty ulegają ekspresji, a powstałe białka nie ulega degradacji. Ponadto, zaobserwowano różnicę w wysokości prążka między konstruktem zawierającym ligazę TurboID i konstruktem oryginalnym. Wartość ta odpowiada wielkości wstawki TurboID. W następnej kolejności zbadano zdolność białka  $\beta$ 4-TurboID do biotynylacji innych białek (Rycina 40 B). W tym celu przeprowadzono inkubację transfekowanych komórek w obecności biotyny. Analiza wykazała, pojawienie się wielu prążków w lizatach z nadekspresją białka  $\beta$ 4-TurboID (Rycina 41 B). Powyższa analiza wskazuje na pełną funkcjonalność konstrukt  $\beta$ 4-TurboID.

W następnej kolejności wykonano analizę ekspresji stabilności powstającego białka oraz jego funkcjonalności w przypadku fuzji podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> z ligazą TurboID (Rycina 41). Na panelu A zaprezentowano wynik barwienia przeciwciałem rozpoznającym podjednostkę  $\alpha$  (1:200, NeuroMab, L6/60). W przypadku transfekcji konstruktem kontrolnym wykryto prążki na oczekiwanej wysokości oraz prawdopodobne agregaty białka. Jednak w przypadku ekspresji podjednostki  $\alpha$ -TurboID wykrycie sygnału wymagało dłuższej ekspozycji. Wydłużenie czasu ekspozycji uwidocznilo prążki w ścieżce zawierającej  $\alpha$ -TurboID (Rycina 41 A). Ponadto, zaobserwowano wiele prążków o niższych masach co sugeruje niestabilność tego białka. Analiza biotynylacji wykazała, że konstrukt  $\alpha$ -TurboID nie wykazywał większych właściwości biotynylujących w porównaniu do próbki zawierającej lizat z komórek dzikiego typu oraz uprzednio transfekowanych plazmidem niezawierającym ligazy TurboID (Rycina 41 B).





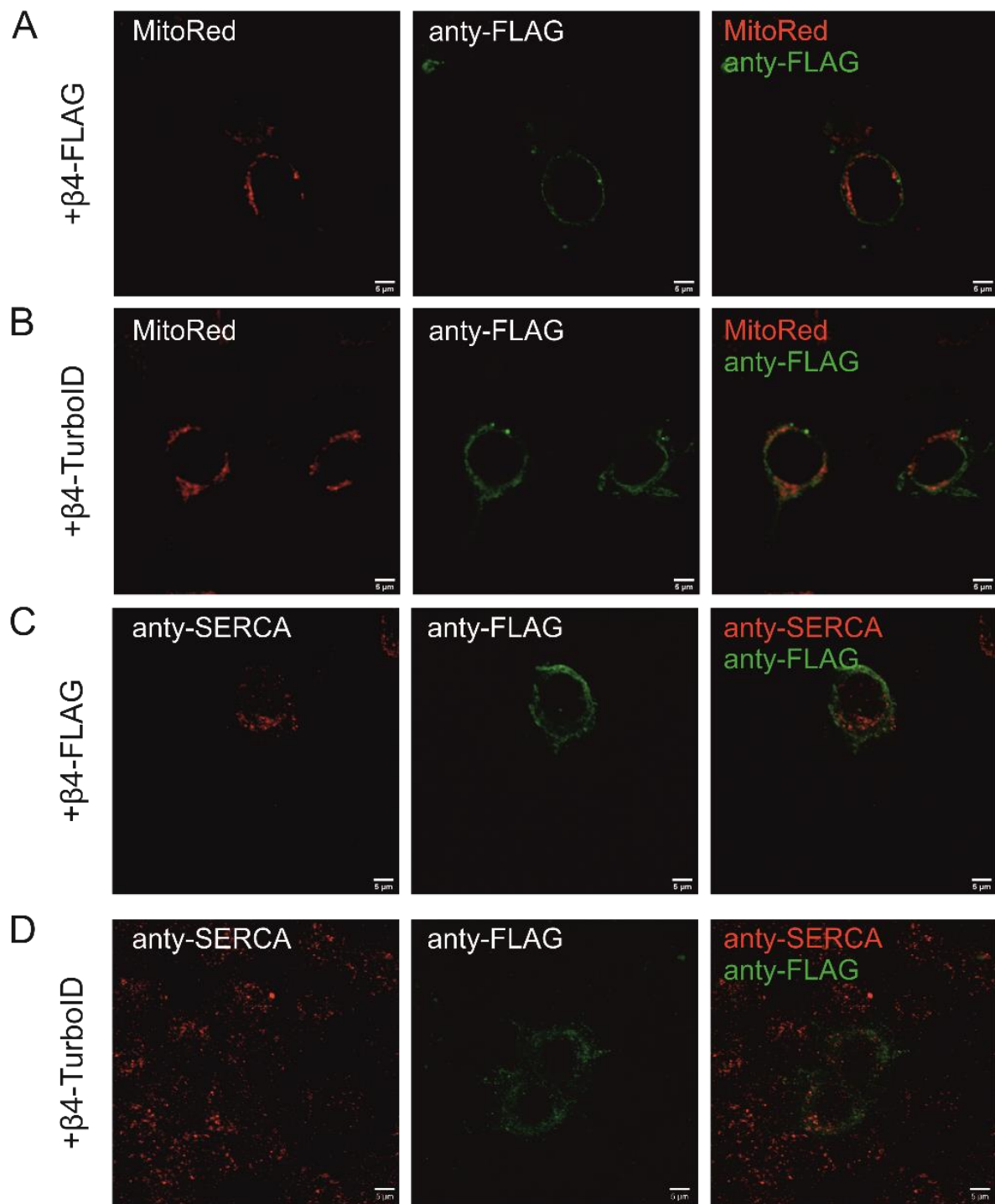
**Rycina 41** Analiza lizatów komórkowych komórek HEK293T po przejściowej transfekcji konstruktami kodującymi podjednostkę  $\alpha$  oraz  $\alpha$ -TurboID. WT, to nietransfekowane komórki dzikiego typu. A) Barwienie przeciwciałem anti- $\alpha$  ). krótka ekspozycja - 3 sekundy, długa ekspozycja - 3 minuty. B) Znakowanie streptawidyną sprzężoną z HRP.

W związku z problemami ze stabilnością podjednostki  $\alpha$ -TurboID oraz wątpliwościami związanymi ze zdolnością do biotynylacji białek do dalszych badań wykorzystano jedynie konstrukt kodujący białko  $\beta$ 4-TurboID.

### 6.2.3 Lokalizacja komórkowa podjednostki $\beta$ 4-TurboID kanału BK<sub>Ca</sub>

W następnych doświadczeniach zbadano czy obecność enzymu TurboID wpływa na lokalizację białka  $\beta$ 4 po transfekcji komórek HEK293T poprzez przeprowadzenie obrazowania z wykorzystaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. W tym celu komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4-FLAG-TurboID. Następnie znakowano podjednostkę  $\beta$ 4 mysim przeciwciałem anti-FLAG (1:500, Sigma, F1804). Lokalizację konstruktów  $\beta$ 4-FLAG oraz  $\beta$ 4-FLAG-TurboID obserwowano przy wykorzystaniu markera mitochondrialnego (fluorescencyjny barwnik MitoRed) oraz przeciwciała rozpoznającego SERCA (ang. *Sarco-Endoplasmic Retikulum Calcium ATP-ase*), jako markera siateczki śródplazmatycznej. MitoRed po wnikięciu do komórek emituje światło barwy czerwonej. SERCA natomiast zostało znakowane anti-króliczym przeciwciałem pierwszorzędowym anti-SERCA2 (1:100, PA5-78837, ThermoFisher), a następnie drugorzędowym zawierającym fluorofor Alexa555 (Invitrogen). Anty-mysie przeciwciało Alexa488 (Invitrogen) zastosowano wobec podjednostki  $\beta$ 4. Wzbudzenie Alexa555 powoduje emisję barwy czerwonej, a Alexa488 barwy zielonej. Nałożenie barw świadczy o kolokalizacji i objawia się barwą pomarańczowo-żółtą.

Na zdjęciach z obrazowania mikroskopią konfokalną zauważono częściową kolokalizację zarówno  $\beta$ 4-FLAG, jak i  $\beta$ 4-FLAG-TurboID z mitochondriami oraz siateczką śródplazmatyczną. Jednak duża część sygnału pochodziła prawdopodobnie z innych przedziałów komórkowych. Wydaje się, że obecność ligazy TurboID nie wpływa znacząco na lokalizację komórkową podjednostki  $\beta$ 4.

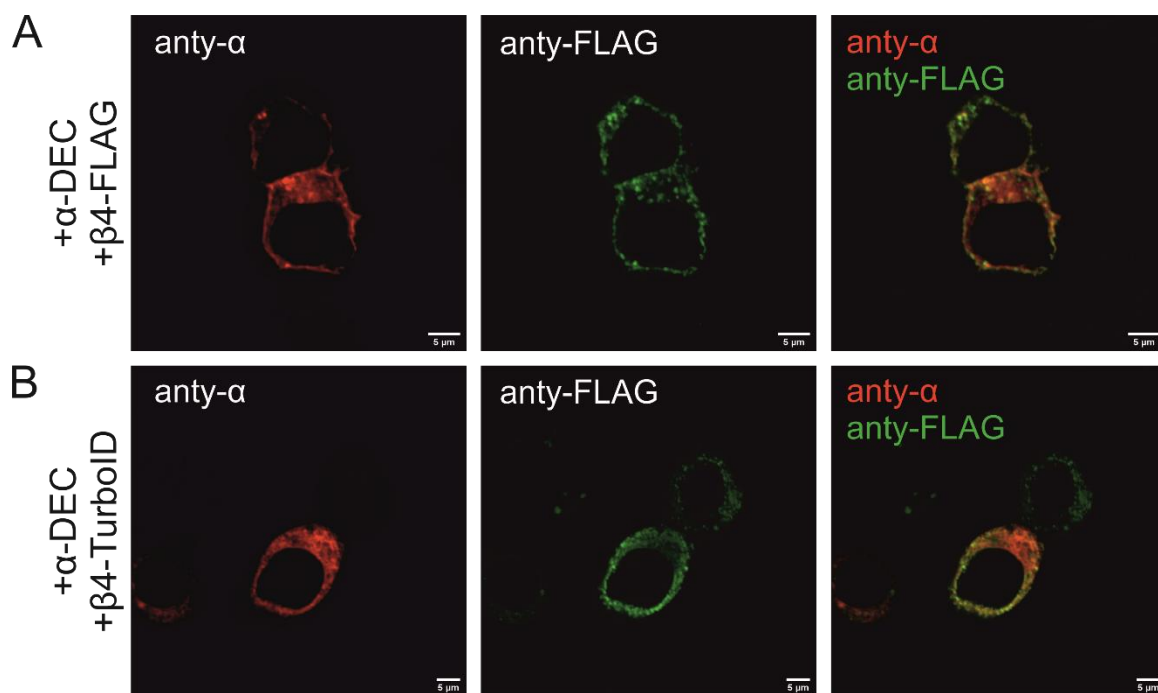


**Rycina 42** Analiza lokalizacji komórkowej podjednostki  $\beta 4$  sfuzowanej z ligazą TurboID. Komórki HEK293T były przejściowo transfekowane plazmidem kodujący podjednostkę  $\beta 4$ -FLAG lub  $\beta 4$ -FLAG-TurboID (kanał zielony). Równolegle komórki barwione były markerem mitochondrialnym MitoRed lub znakowane przeciwciałem anti-SERCA (kanał czerwony). Transfekcja podjednostką  $\beta 4$  bez ligazy TurboID (A) oraz z ligazą TurboID (B) w obecności MitoRed. Transfekcja podjednostką  $\beta 4$  bez ligazy TurboID (C) oraz z ligazą TurboID (D) oraz znakowanie anti-SERCA. Skala 5  $\mu\text{m}$ .

W następnym doświadczeniu zweryfikowano czy podjednostka  $\beta 4$  kanału  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kolokalizuje się z podjednostką  $\alpha$  tego kanału i czy obecność enzymu TurboID wpływa

na tę kolokalizację. W tym celu komórki HEK293T WT przejściowo kotransfekowano plazmidami kodującymi kolejno podjednostkę VEDEC oraz  $\beta$ 4-FLAG lub  $\beta$ 4-FLAG-TurboID (Rycina 43). Na podstawie obrazu mikroskopii konfokalnej zaobserwowano kolokalizację sygnałów z podjednostki  $\beta$ 4 zawierającej ligazę TurboID (Rycina 43 B) oraz podjednostki  $\beta$ 4 nie zawierającej ligazę TurboID (Rycina 43 A) względem podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>.

Znakowano podjednostkę  $\alpha$  króliczym przeciwciałem anti- $\alpha$  (1:100, Alomone, APC-021) oraz podjednostkę  $\beta$ 4 mysim przeciwciałem anti-FLAG (1:500, Sigma, F1804). W celu wykrycia obu przeciwciał zastosowano komercyjnie dostępne anti-królicze przeciwciała II rzędowe zawierające fluorofor Alexa555 (Invitrogen) oraz anti-mysie Alexa488 (Invitrogen) (Rycina 43). Uzyskane dane wskazują, że obecność ligazy TurboID nie wpływa na kolokalizację podjednostki  $\beta$ 4 z podjednostką  $\alpha$ . Dodatkowym potwierdzeniem tej interakcji mogłoby być wykonanie doświadczenia typu pull-down w celu zaobserwowania interakcji obu białek. Pomimo tych zastrzeżeń przeprowadzono eksperymenty mające na celu identyfikację białek biotynylowanych przez białko  $\beta$ 4.



**Rycina 43** Analiza kolokalizacji podjednostki  $\beta$ 4 sfuzowanej z ligazą TurboID z podjednostką  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. Komórki HEK293T przejściowo transfekowano plazmidami kodującymi podjednostkę VEDEC (kanał czerwony) oraz  $\beta$ 4-FLAG i  $\beta$ 4-FLAG TurboID (kanał zielony). A) Kontransfekcja podjednostką  $\beta$ 4 bez ligazy TurboID oraz B) z ligazą TurboID. Skala 5  $\mu$ m.

#### 6.2.4 Identyfikacja partnerów białkowych podjednostki $\beta 4$ w lizatach całokomórkowych

Pierwsze eksperymenty tej części pracy miały na celu optymalizację warunków przygotowania próbek przeznaczonych do analizy za pomocą spektrometrii mas. Głównym celem tych testów była redukcja tła pochodzącego z detergentów, których budowa molekularna oparta jest o glikol polietylenowy (PEG), zastosowanych do solubilizacji materiału biologicznego. W związku z tym, w porozumieniu ze Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, przygotowano kilka wariantów buforów zawierających różne detergenty stosowane do oczyszczania badanych prób. Biotynylowane próbki oczyszczono z zastosowaniem kulek magnetycznych opłaszczonych streptawidyną zgodnie z ogólnym protokołem opisanym w rozdziale Materiały i metody, stosując bufor zawierający detergenty takie jak NP-40, SDS, Triton X-100 i deoksycholan sodu. W wyniku przeprowadzonych testów, w porozumieniu ze Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN, wybrano oczyszczanie próbek w buforze zawierającym 1% NP-40 oraz 0,4% SDS. Poszczególne etapy oczyszczania opisano w rozdziale 5.11. Na koniec próbki zawieszano w 10 mM Tris pH 7.4

W pierwszej części doświadczeń podjęto próbę identyfikacji białek biotynylowanych przez podjednostkę  $\beta 4$  z wykorzystaniem lizatów całokomórkowych. Komórki HEK293T przejściowo transfekowano konstruktem kodującym podjednostkę  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$  sprzężoną z ligazą TurboID oraz konstruktem kodującym kontrolę - ligazę TurboID kierowaną do jądra komórkowego oraz ligazę TurboID pozostającą w cytozolu, a także plazmidem pcDNA3.1, który nie kodował białka. Po inkubacji komórek, przez czas odpowiedni do uzyskania ekspresji białek kodowanych przez plazmidy, do medium hodowlanego podano biotynę. Po upływie czasu, potrzebnego na biotynylację, komórki zebrano, lizowano i przeprowadzono oczyszczanie próbek na złożu streptawidynowym. Uzyskane złoża przekazywano do Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w celu identyfikacji z wykorzystaniem spektrometrii mas białek związanych ze złożem.

Przyjęty protokół identyfikacji białek w spektrometrii mas obejmował jednoczesne przygotowanie wszystkich badanych prób w celu umożliwienia potencjalnej analizy ilościowej uzyskanych wyników. W pracy nie zastosowano pogłębionej analizy statystycznej uzyskanych danych, jednak istnieje taka możliwość i analiza ta zostanie wykonana we współpracy z Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w najbliższej przyszłości. Niemniej, na podstawie liczby zidentyfikowanych peptydów

przygotowano listę białek będących potencjalnymi partnerami podjednostkami białka  $\beta 4$ . Trzeba jednak zaznaczyć, że do selekcji tej należy podejść z ostrożnością, niemniej pokazuje ona pełniejszy obraz interakcji podjednostki  $\beta 4$ .

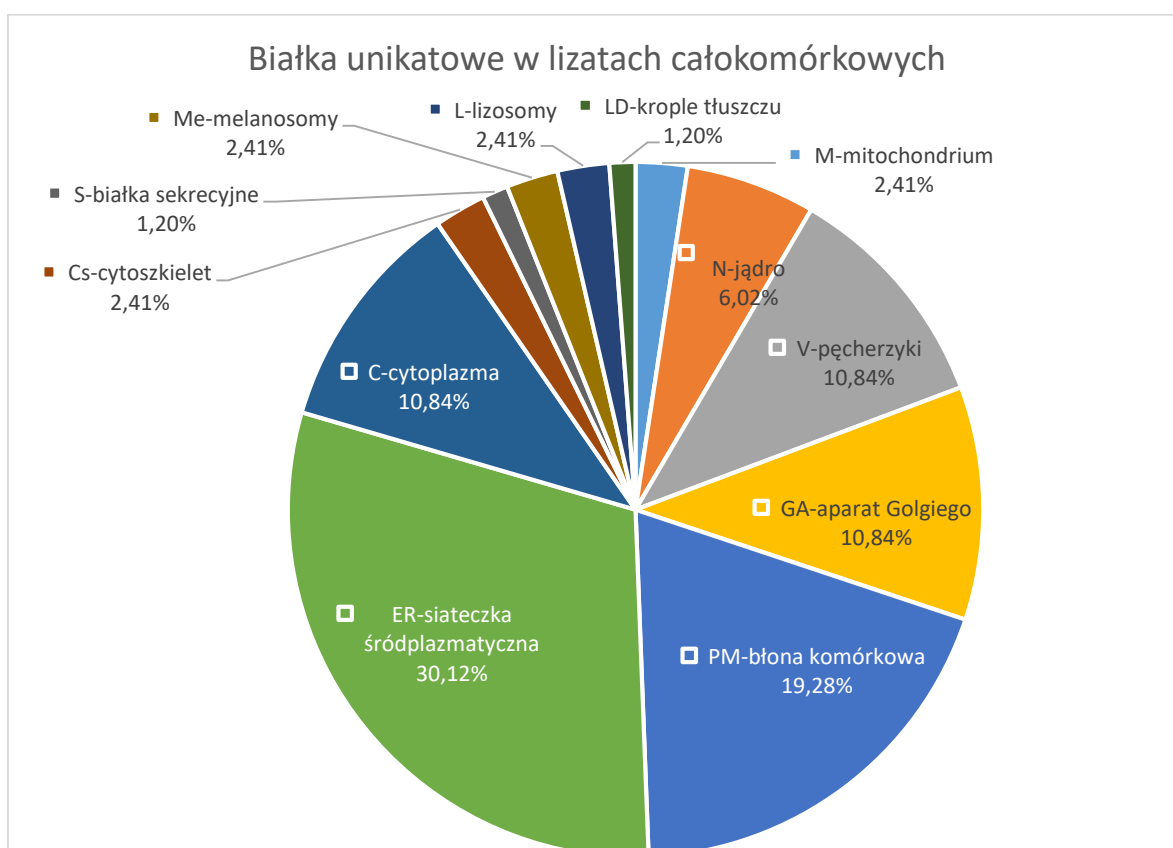
W wyniku analizy uzyskanych danych przygotowano dwie listy białek będących potencjalnymi partnerami podjednostki  $\beta 4$ . Pierwsza lista zawiera białka biotynylowane jedynie w komórkach transfekowanych po odrzuceniu białek zidentyfikowanych w próbach uzyskanych z komórek ekspresjonujących konstrukty kontrolne. Ponadto, kryterium selekcji stanowiło występowanie białka w co najmniej 2 z 3 powtórzeń. Białka te zaprezentowano w tabeli 4. Identyfikację białek i ich lokalizację ustalono z wykorzystaniem bazy Uniprot. W celu uproszczenia analizy i zwiększenia czytelności uzyskanych wyników przyjęto podział na następujące frakcje komórkowe: CS – cytoskielet, C – cytoplazma, GA – aparat Golgiego, N – jądro komórkowe, ER – siateczka śródplazmatyczna, PM – błona plazmatyczna, V – białko znajdujące się w pęcherzykach komórkowych (vesicle), M – mitochondria, L – lizosom, Me – melanosom, LD – krople lipidowe (lipid droplet), S – białko wydzielane przez komórkę (secretet protein). Frakcja pęcherzykowa obejmuje różne rodzaje pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Jak można zauważyć wiele zidentyfikowanych białek lokalizuje się w kilku frakcjach komórkowych. Wynika to z kilku powodów, m. in. rzeczywistej lokalizacji tego samego białka w kilku przedziałach komórkowych, istnienia wielu izoform jednego białka, które jednak z uwagi na podobieństwo budowy są niemożliwe do rozróżnienia w analizie spektrometrii mas czy istnienia białek należących do jednej rodziny (grupy białek) o zbliżonej budowie i zawierającej takie same fragmenty/domeny zidentyfikowane w spektrometrii mas. W związku z powyższym wiele zidentyfikowanych peptydów przypisanych jest do kilku białek (numerów ID w bazie Uniprot).

Całkowita liczba zidentyfikowanych białek we frakcji całokomórkowej wynosiła 1171. Z tej listy 596 białek zostało co najmniej raz odnotowanych, jako białko biotynylowane przez  $\beta 4$ -TurboID. Pozostałe 575 białek zostało zidentyfikowanych jedynie w grupach kontrolnych pcDNA3.1, NUC-TurboID oraz CYT-TurboID.

W wyniku analizy zidentyfikowano 126 białek, które uznano za unikatowe dla biotynylacji przez podjednostkę  $\beta 4$ , czyli były to białka, których peptydy były wykryte jedynie w grupie badanej  $\beta 4$ -TurboID (Załącznik: Tabela Z1). Jednakże ze względu na znaczą liczbę tych białek obrano znacznie bardziej restrykcyjne kryterium wyboru białek unikatowych. W tabeli białek unikatowych dla frakcji całokomórkowej zamieszczono listę białek, których identyfikacja występowała jedynie w 2 z 3 powtórzeń w grupie badanej

$\beta$ 4-TurboID. W tabeli znalazło się 41 białek. Pozostałe białka zidentyfikowano jedynie w jednym doświadczeniu.

Uzyskane dane przeanalizowano pod kątem występowania zidentyfikowanych białek w organelach komórkowych. Na rycinie 44 zaprezentowano rozkład białek w organelach. W analizie zidentyfikowanych interakcji białka  $\beta$ 4 w lizatach komórkowych największą grupę stanowiły białka lokalizujące się w siateczce śródplazmatycznej (~30%), błonie komórkowej (~19%), cytozolu (~11%), aparacie Golgiego (~11%) i pęcherzykach (~11%).



**Rycina 44 Rozkład lokalizacji białek biotynylowanych przez białko  $\beta$ 4-TurboID.** Białka unikatowe dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych w badaniach całokomórkowych. Identyfikacja wybranego białka w co najmniej 2 z 3 próbek.

**Tabela 4 Lista białek unikatowych dla próbki β4-TurboID względem próbek kontrolnych w badaniach całokomórkowych. Identyfikacja wybranego białka w co najmniej 2 z 3 próbek.**

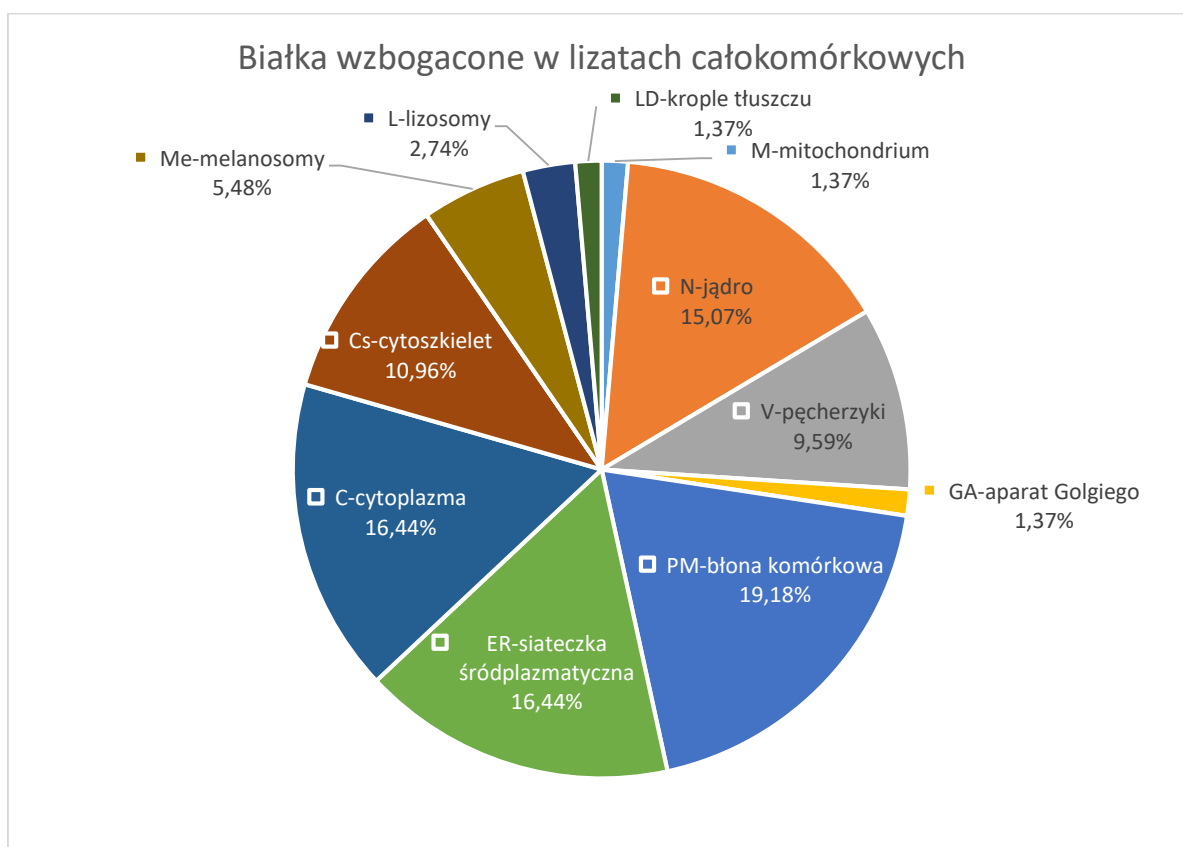
CS (cytoskielet), C (cytoplazma), GA (aparat Golgiego), N (jądro komórkowe), ER (siateczka śródplazmatyczna), PM (błona komórkowa), V (pęcherzyki), and M (mitochondria), L – lizosomy, Me – melanosom, LD – krople tłuszczu, S-białka sekrecyjne

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score i liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce			Lokalizacja
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	
Q9H3P7	Golgi resident protein GCP60	441.0 (8)	153.0 (4)	-	GA, M
Q9HCU5	Prolactin regulatory element-binding protein	733.0 (8)	117.0 (2)	-	ER, N
P62491, Q15907	Ras-related protein Rab-11A, Ras-related protein Rab-11B	464.0 (7)	268.0 (4)	-	PM, V, GA,
Q9BZF1	Oxysterol-binding protein-related protein 8	388.0 (7)	139.0 (2)	188.0 (3)	ER, N
P35613	Basigin	358.0 (6)	105.0 (2)	103.0 (2)	Me, PM, V, ER,
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	275.0 (6)	110.0 (2)	-	ER
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	197.0 (5)	166.0 (4)	-	ER
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	514.0 (5)	424.0 (3)	-	ER, PM,
Q8TCJ2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	249.0 (5)	173.0 (3)	-	ER
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	281.0 (5)	110.0 (3)	-	ER
O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	541.0 (5)	100.0 (2)	-	GA, V,
Q9ULC3	Ras-related protein Rab-23	268.0 (5)	90.0 (2)	-	PM, C, V,
Q86W47	Calcium-activated potassium channel subunit beta-4	1823.0 (4)	1661.0 (4)	620.0 (3)	PM
Q9H3N1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	281.0 (4)	251.0 (4)	216.0 (3)	ER, M, S
Q8NFO8	Torsin-1A-interacting protein 2	273.0 (4)	219.0 (4)	-	ER, N
P30519	Heme oxygenase 2	188.0 (4)	207.0 (4)	-	ER, V
O75915	PRA1 family protein 3	833.0 (4)	592.0 (2)	176.0 (3)	ER, PM, C, Cs
P05556	Integrin beta-1	233.0 (4)	107.0 (2)	93.0 (2)	PM, Me, V
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	406.0 (4)	75.0 (2)	-	ER
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	217.0 (4)	143.0 (2)	-	ER, GA, PM, LD
Q9Y6N7	Roundabout homolog 1	202.0 (4)	86.0 (2)	-	ER, PM,
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	203.0 (3)	164.0 (3)	-	ER
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a	288.0 (3)	85.0 (2)	112.0 (2)	ER, GA, C, L
Q9Y6B6	GTP-binding protein SAR1b	271.0 (3)	119.0 (2)	-	ER, GA, C, L
P20340, Q9NRW1	Ras-related protein Rab-6A,Ras-related protein Rab-6B	156.0 (3)	73.0 (2)	-	GA, V, ER
O95208	Epsin-2	142.0 (2)	125.0 (3)	-	C, V
Q9NPA0	ER membrane protein complex subunit 7	82.0 (2)	94.0 (2)	160.0 (2)	ER
P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	271.0 (2)	185.0 (2)	-	ER
Q02952	A-kinase anchor protein 12	88.0 (2)	203.0 (2)	-	C, Cs, PM
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	161.0 (2)	92.0 (2)	-	PM
P43307	Translocon-associated protein subunit alpha	136.0 (2)	104.0 (2)	-	ER
Q9Y5V3	Melanoma-associated antigen D1	90.0 (2)	149.0 (2)	-	C, PM, N
Q9H2H9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	86.0 (2)	150.0 (2)	-	PM
Q9HDC5	Junctophilin-1	91.0 (2)	125.0 (2)	-	PM, ER
P62330	ADP-ribosylation factor 6	114.0 (2)	87.0 (2)	-	C, PM, V, GA
Q96A33	PAT complex subunit CCDC47	101.0 (2)	90.0 (2)	-	ER
Q9H8Y8	Golgi reassembly-stacking protein 2	81.0 (2)	104.0 (2)	-	GA, ER
Q14160	Protein scribble homolog	79.0 (2)	86.0 (2)	-	PM, C
O94906	Pre-mRNA-processing factor 6	-	88.0 (2)	103.0 (2)	N



W dalszej części analizy podjęto się selekcji tzw. białek wzbogaconych we frakcji transfekowanych plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta 4$ -TurboID. Wytypowano 37 białek, które uznano za wzbogacone (Tabela 5). Kryterium do określenia wzbogacenia było częstsze występowanie danego peptydu w grupie badanej, względem grupy kontrolnej. Na liście białek wzbogaconych nie umieszczono białek unikatowych.

Uzyskane dane przeanalizowano pod kątem występowania zidentyfikowanych białek w organellach komórkowych. W rycinie 45 zaprezentowano rozkład białek w organellach. W analizie interakcji białka  $\beta 4$  w lizatach komórkowych największą frakcję stanowiły białka błony plazmatycznej (~19%), siateczki śródplazmatycznej (~16%), cytoplazmy (~16%), jądra komórki (~15%), cytoszkieletu (~11%) i pęcherzyków (~10%).



**Rycina 45 Rozkład lokalizacji białek biotynylowanych przez białko  $\beta 4$ -TurboID.** Białka wzbogacone dla próbki  $\beta 4$ -TurboID względem próbek kontrolnych uzyskanych po izolacji białek biotynylowanych z lizatów całokomórkowych.

**Tabela 5** Lista białek wzbogaconych dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych uzyskanych po izolacji białek biotynylowanych z lizatów całokomórkowych

CS (cytoskielet), C (cytoplazma), GA (aparat Golgiego), N (jądro komórkowe), ER (siateczka śródplazmatyczna), PM (błona komórkowa), V (pęcherzyki), and M (mitochondria), L – lizosomy, Me – Melanosom, LD – krople tłuszczu, S-białka sekrecyjne

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce												Lokalizacja
		B4-TurboID			pcDNA3.1			CYT-TurboID			NUC-TurboID			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Q86UP2	Kinectin	5943.0 (56)	3397.0 (39)	3727.0 (42)	-	-	-	590.0 (10)	521.0 (8)	339.0 (6)	-	82.0 (2)	-	ER
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	5423.0 (32)	3023.0 (27)	2792.0 (25)	-	-	-	150.0 (3)	130.0 (3)	121.0 (2)	-	89.0 (2)	-	ER, PM, CS
Q86UE4	Protein LYRIC	3526.0 (20)	2568.0 (19)	1865.0 (17)	-	-	-	1984.0 (17)	1058.0 (15)	1319.0 (16)	1197.0 (15)	344.0 (6)	446.0 (11)	ER, N, C
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	2930.0 (35)	1961.0 (25)	2304.0 (32)	-	-	-	773.0 (15)	449.0 (9)	419.0 (9)	323.0 (5)	178.0 (4)	319.0 (8)	ER
Q13885, Q9BVA1	Tubulin beta-2A chain, Tubulin beta-2B chain	-	870.0 (7)	751.0 (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	928.0 (9)	C, CS
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2323.0 (41)	1046.0 (21)	616.0 (15)	-	-	-	949.0 (20)	675.0 (13)	769.0 (15)	202.0 (5)	116.0 (3)	-	N
Q43491	Band 4.1-like protein 2	1727.0 (20)	878.0 (15)	854.0 (9)	167.0 (3)	-	405.0 (8)	729.0 (11)	759.0 (10)	460.0 (8)	185.0 (5)	377.0 (7)	256.0 (6)	C, CS, PM
Q14126	Desmoglein-2	1564.0 (19)	809.0 (11)	462.0 (9)	-	-	-	339.0 (5)	179.0 (5)	156.0 (3)	91.0 (2)	-	-	PM
P51149	Ras-related protein Rab-7a	1491.0 (11)	444.0 (4)	195.0 (3)	-	-	-	-	-	121.0 (2)	-	146.0 (3)	-	V, M, L, LD, Me
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	1083.0 (11)	766.0 (6)	642.0 (5)	-	-	219.0 (3)	187.0 (2)	275.0 (3)	181.0 (2)	-	-	203.0 (3)	PM, Me
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1558.0 (12)	628.0 (9)	347.0 (6)	-	-	-	-	-	145.0 (2)	166.0 (3)	83.0 (2)	95.0 (2)	N, ER, V
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	870.0 (16)	301.0 (7)	160.0 (3)	-	-	-	-	117.0 (2)	-	-	-	-	GA, V
Q14247	Src substrate cortactin	686.0 (10)	356.0 (7)	143.0 (4)	-	-	-	482.0 (8)	355.0 (6)	324.0 (7)	111.0 (3)	-	-	C, CS, PM, ER
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	972.0 (14)	293.0 (6)	166.0 (3)	-	-	309.0 (5)	124.0 (3)	-	247.0 (5)	-	153.0 (3)	281.0 (7)	PM, Me
Q14739	Delta(14)-sterol reductase LBR	593.0 (10)	345.0 (5)	363.0 (6)	132.0 (3)	-	-	220.0 (3)	404.0 (6)	196.0 (4)	410.0 (5)	342.0 (5)	83.0 (2)	N, ER, C,
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	591.0 (10)	496.0 (8)	380.0 (6)	-	-	175.0 (3)	103.0 (2)	289.0 (5)	254.0 (4)	-	144.0 (2)	265.0 (6)	PM, L, Me
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	568.0 (5)	117.0 (2)	-	-	-	-	-	170.0 (2)	-	-	-	-	ER
Q9NQC3	Reticulon-4	506.0 (5)	260.0 (3)	184.0 (2)	-	-	-	-	188.0 (2)	-	-	-	-	ER, PM
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	466.0 (8)	288.0 (5)	-	-	-	-	262.0 (4)	203.0 (5)	267.0 (5)	262.0 (4)	143.0 (3)	-	PM
Q16181	Septin-7	542.0 (7)	88.0 (2)	-	-	-	-	220.0 (4)	145.0 (3)	-	-	-	-	C, CS,
O60716	Catenin delta-1	473.0 (8)	158.0 (2)	188.0 (2)	-	-	-	-	222.0 (3)	-	91.0 (2)	-	-	C, N, PM
Q16625	Occludin	371.0 (5)	184.0 (3)	-	-	-	-	106.0 (2)	-	-	-	-	-	PM
Q9Y2I2	Band 4.1-like protein 3	403.0 (6)	-	112.0 (2)	-	-	-	-	112.0 (2)	-	-	-	-	C, CS, PM
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	408.0 (6)	94.0 (2)	-	-	-	-	-	105.0 (3)	-	-	-	-	N
Q8WYP5	Protein ELYS	360.0 (7)	189.0 (3)	-	-	-	-	-	93.0 (2)	-	230.0 (5)	86.0 (2)	-	N, C
Q722W4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	253.0 (5)	-	86.0 (2)	-	-	-	-	171.0 (3)	-	-	-	-	C, N
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3	362.0 (3)	108.0 (2)	102.0 (2)	-	-	-	-	95.0 (2)	-	-	-	-	V
Q9H490	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein	223.0 (2)	180.0 (3)	87.0 (2)	-	-	-	-	-	151.0 (2)	-	-	-	ER
P08240	Signal recognition particle receptor subunit alpha	328.0 (8)	97.0 (2)	86.0 (2)	-	-	-	-	-	84.0 (2)	-	-	-	ER
P53990	IST1 homolog	120.0 (3)	158.0 (4)	-	-	-	-	-	113.0 (3)	-	-	-	-	N, C, CS, V
Q8TA86	Retinitis pigmentosa 9 protein	250.0 (5)	115.0 (3)	96.0 (2)	-	-	-	119.0 (3)	84.0 (2)	-	134.0 (3)	-	84.0 (2)	N
O60831	PRA1 family protein 2	-	161.0 (3)	111.0 (2)	-	112.0 (2)	-	-	-	-	-	97.0 (2)	-	V
O60749	Sorting nexin-2	-	160.0 (4)	86.0 (2)	-	-	-	-	114.0 (3)	-	-	-	-	V
P04899, P08754, P63096	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2, Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3, Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	76.0 (2)	121.0 (3)	106.0 (2)	-	-	182.0 (3)	-	-	-	-	-	81.0 (2)	PM, N, C, CS

### 6.2.5 Identyfikacja partnerów białkowych podjednostki $\beta 4$ we frakcjach wzbogaconych w mitochondria

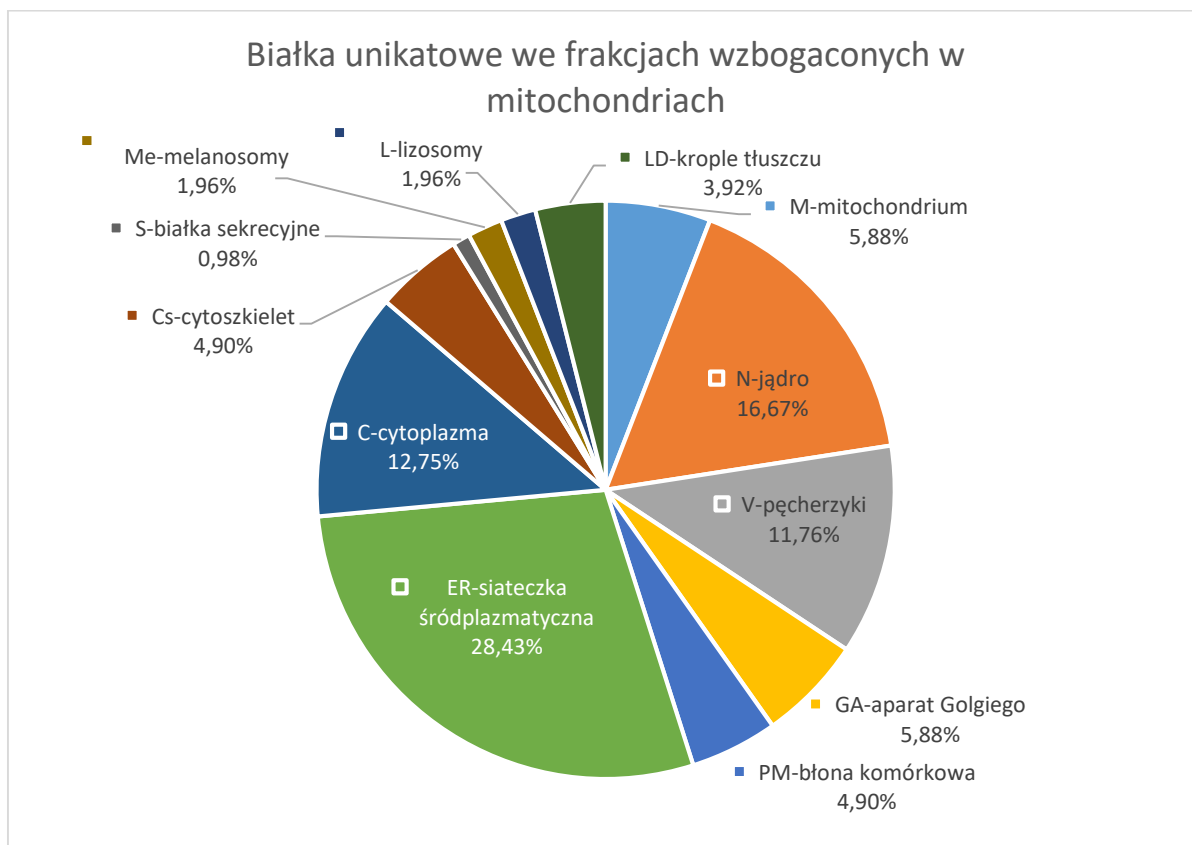
W kolejnych doświadczeniach postanowiono zidentyfikować potencjalnych partnerów podjednostki  $\beta 4$  po izolacji frakcji wzbogaconych w mitochondria. W związku z tym komórki HEK293T przejściowo transfekowano plazmidem kontrolnym (pcDNA3.1) oraz konstrukcjami kodującymi białka kontrolne (SMAC-TurboID, OTC-TurboID) oraz podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> sprzężona z ligazą TurboID. Następnie, po odpowiednim czasie inkubacji w celu uzyskania ekspresji białek sfuzgowanych z ligazą TurboID, do medium hodowlanego podano biotynę. Po upływie czasu potrzebnego na biotynylację komórki zebrano i oczyszczono frakcje wzbogacone w mitochondria (tzw. crude mitochondria). Kolejno przeprowadzono oczyszczanie próbek na złożu streptawidynowym. Po analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas otrzymano listę białek, które potencjalnie wchodzi w interakcję z białkiem  $\beta 4$ -TurboID oraz białkami kontrolnymi.

Podobnie jak w przypadku analizy frakcji całokomórkowych uzyskane dane analizowano pod kątem uzyskania listy białek biotynylowanych wyłącznie przez białko  $\beta 4$ -TurboID. W poniższej analizie przyjęto, że białka unikatowo biotynylowane przez podjednostkę  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub>, to takie które nie wchodzi w interakcję z grupą kontrolną pcDNA3.1, OTC-TurboID oraz SMAC-TurboID. Uzyskane wyniki zaprezentowano w tabeli 6. Podobnie jak we wcześniejszej analizie, w celu przypisania lokalizacji wykorzystano dane zawarte w bazie Uniprot.

Całkowita liczba zidentyfikowanych peptydów we frakcji mitochondrialnej odpowiadała 1633 białkom. Z tej listy 1069 białek zostało co najmniej raz odnotowanych, jako białko biotynylowane przez  $\beta 4$ -TurboID. Pozostałe 564 peptydów zidentyfikowano jedynie w grupach kontrolnych pcDNA3.1, OTC-TurboID oraz SMAC-TurboID.

Na liście unikatowych identyfikacji znalazło się 550 białek (Załącznik, Tabela Z2). Podobnie jak opisano to wyżej, za białka unikatowe, uznano te których peptydy były wykryte jedynie w grupie badanej  $\beta 4$ -TurboID. Jednakże ze względu na znaczną liczbę tych białek obrano znacznie bardziej restrykcyjne kryterium wyboru białek unikatowych. W tabeli białek unikatowych dla frakcji mitochondrialnej zamieszczono listę 58 białek, których identyfikacja występowała jedynie w grupie badanej  $\beta 4$ -TurboID w 3 z 4 powtórzeń.

Uzyskane dane przeanalizowano pod kątem występowania zidentyfikowanych białek w organellach komórkowych. Na rycinie 46 zaprezentowano rozkład białek w wybranych organellach. W przypadku analizy lokalizacji białek zidentyfikowanych we frakcjach wzbogaconych w mitochondria największą grupę stanowiły białka lokalizujące się w siateczce śródplazmatycznej (~28%), jądrze komórkowym (~17%), cytoplazmie (~13%) oraz pęcherzykach (~12%).



**Rycina 46 Rozkład lokalizacji białek biotynylowanych przez białko  $\beta$ 4-TurboID.** Białka unikatowe dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych we frakcjach wzbogaconych w mitochondria. Identyfikacja wybranego białka w co najmniej 3 z 4 próbek.

**Tabela 6 Lista białek unikatowych dla próbki β4-TurboID względem próbek kontrolnych we frakcjach wzbogaconych w mitochondria. Identyfikacja wybranego białka w co najmniej 3 z 4 próbek.**

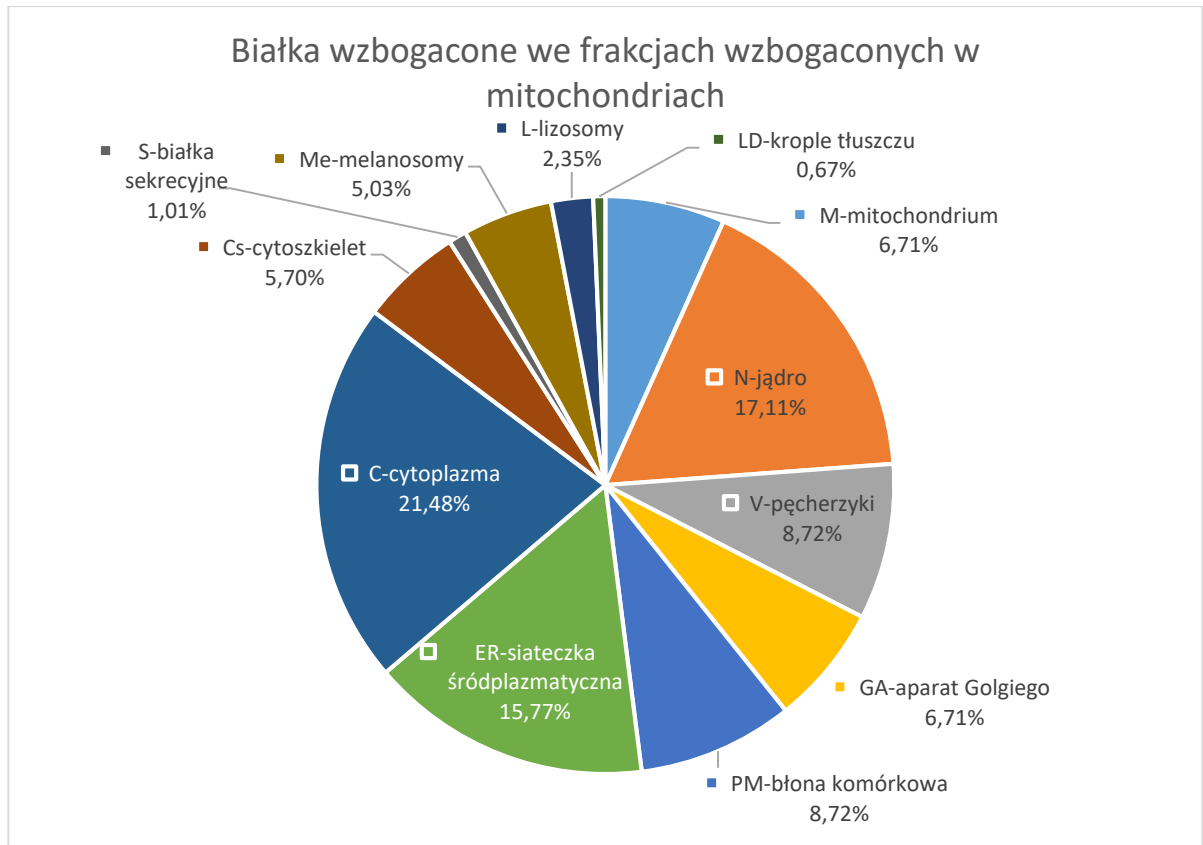
CS (cytoszkielet), C (cytoplazma), GA (aparat Golgiego), N (jądro komórkowe), ER (siateczka śródplazmatyczna), PM (błona komórkowa), V (pęcherzyki), and M (mitochondria), L – lizosomy, Me – Melanosom, LD – krople tłuszczu, S-białka sekrecyjne

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce				Lokalizacja
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	
P20700	Lamin-B1	176.0 (3)	1124.0 (18)	571.0 (11)	931.0 (15)	N
Q02952	A-kinase anchor protein 12	73.0 (1)	388.0 (9)	391.0 (8)	-	C, CS, PM.
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	73.0 (1)	400.0 (8)	109.0 (2)	-	C, N, CS,
Q14254	Flotillin-2	55.0 (1)	325.0 (7)	549.0 (10)	-	PM, V
O95573	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	58.0 (1)	422.0 (7)	357.0 (7)	106.0 (2)	M, P, V, ER
P27824	Calnexin	62.0 (1)	404.0 (7)	374.0 (7)	-	ER, M, Me
Q96124	Far upstream element-binding protein 3	-	274.0 (7)	134.0 (3)	97.0 (2)	N
Q86W47	Calcium-activated potassium channel subunit beta-4	769.0 (5)	1932.0 (6)	1846.0 (6)	813.0 (6)	PM
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	63.0 (1)	344.0 (5)	431.0 (7)	56.0 (1)	ER
Q9HD20	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	53.0 (1)	198.0 (5)	96.0 (2)	148.0 (3)	ER
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	-	263.0 (4)	259.0 (5)	76.0 (1)	ER, GA, PM, LD
O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2	71.0 (1)	210.0 (4)	185.0 (4)	71.0 (1)	PM, N, ER, S
Q9UM00	Calcium load-activated calcium channel	-	250.0 (4)	367.0 (4)	61.0 (1)	C, N, M, ER, GA
Q9Y4P3	Transducin beta-like protein 2	-	176.0 (4)	203.0 (3)	64.0 (1)	ER
Q5SWX8	Protein odr-4 homolog	-	228.0 (4)	84.0 (2)	61.0 (1)	PM
O95721	Synaptosomal-associated protein 29	83.0 (1)	164.0 (4)	53.0 (1)	-	C, GA, V,
Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	-	176.0 (4)	53.0 (1)	112.0 (2)	ER, N
P51572	B-cell receptor-associated protein 31	196.0 (3)	242.0 (3)	414.0 (7)	65.0 (1)	ER, MAMs
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11	57.0 (1)	147.0 (3)	223.0 (3)	185.0 (2)	ER
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	54.0 (1)	138.0 (3)	177.0 (3)	64.0 (1)	ER, M, C
Q96HY6	DDRKG domain-containing protein 1	70.0 (1)	174.0 (3)	292.0 (3)	62.0 (1)	ER
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	56.0 (1)	116.0 (3)	148.0 (3)	-	ER
O75534	Cold shock domain-containing protein E1	-	142.0 (3)	143.0 (3)	63.0 (1)	C
Q86XL3	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	-	151.0 (3)	152.0 (3)	60.0 (1)	ER
O14983, P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 & 2	52.0 (1)	135.0 (3)	99.0 (2)	70.0 (1)	ER
Q8N4V1	ER membrane protein complex subunit 5	55.0 (1)	138.0 (3)	103.0 (2)	59.0 (1)	ER, GA, V
Q15629	Translocating chain-associated membrane protein 1	-	239.0 (3)	156.0 (2)	61.0 (1)	ER
Q6NUQ4	Transmembrane protein 214	-	138.0 (3)	121.0 (2)	77.0 (1)	ER
Q9BTX1	Nucleoporin NDC1	-	174.0 (3)	64.0 (1)	60.0 (1)	N
P61619, Q9H9S3	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 & 2	63.0 (1)	118.0 (3)	-	122.0 (2)	ER
Q96KC8	DnaJ homolog subfamily C member 1	60.0 (1)	97.0 (2)	217.0 (5)	-	ER, N, V
Q00341	Vigilin	56.0 (1)	98.0 (2)	218.0 (4)	-	C, N
O95772	STARD3 N-terminal-like protein	57.0 (1)	91.0 (2)	86.0 (2)	-	V
Q9Y385	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	51.0 (1)	110.0 (2)	125.0 (2)	-	ER
P05067	Amyloid-beta precursor protein	-	114.0 (2)	110.0 (2)	58.0 (1)	PM, V, ER
Q9UG63	ATP-binding cassette sub-family F member 2	-	82.0 (2)	95.0 (2)	72.0 (1)	PM
Q9Y490	Talin-1	-	99.0 (2)	95.0 (2)	57.0 (1)	CS, PM, V,

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce				Lokalizacja
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	
Q7L5N7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	62.0 (1)	104.0 (2)	57.0 (1)	57.0 (1)	ER, GA, PM, LD
O15504	Nucleoporin NUP42	-	99.0 (2)	47.0 (1)	54.0 (1)	N
P12277	Creatine kinase B-type	-	111.0 (2)	100.0 (1)	55.0 (1)	C, M, PM
Q9Y6I9	Testis-expressed protein 264	-	102.0 (2)	52.0 (1)	56.0 (1)	ER, V, C, N
Q13586	Stromal interaction molecule 1	-	119.0 (1)	214.0 (5)	67.0 (1)	PM, ER, Cs
Q15738	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	-	74.0 (1)	178.0 (4)	66.0 (1)	ER, LD
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	-	53.0 (1)	173.0 (3)	56.0 (1)	N, C
O60282, P33176, Q12840	Kinesin heavy chain isoform 5A & 5C, Kinesin-1 heavy chain	-	56.0 (1)	140.0 (2)	56.0 (1)	C, Cs, L
P51159	Ras-related protein Rab-27A	74.0 (1)	105.0 (1)	81.0 (1)	-	PM, L, Me, V
Q6P2E9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	48.0 (1)	63.0 (1)	47.0 (1)	-	C, N
A1LOT0	2-hydroxyacyl-CoA lyase 2	-	105.0 (1)	70.0 (1)	63.0 (1)	ER
A6NHQ2, P22087	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin-like protein 1, rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	-	37.0 (1)	40.0 (1)	65.0 (1)	N
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	-	48.0 (1)	87.0 (1)	70.0 (1)	C, M, N
P53365	Arfaptin-2	-	47.0 (1)	57.0 (1)	65.0 (1)	GA
Q8NFH5	Nucleoporin NUP35	-	73.0 (1)	69.0 (1)	61.0 (1)	N
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	-	52.0 (1)	73.0 (1)	71.0 (1)	PM, LD, ER

W dalszej części analizy podjęto się selekcji tzw. białek wzbogaconych we frakcji transfekowanych plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta 4$ -TurboID podobnie jak wykonano to w przypadku lizatów całokomórkowych. Na podstawie liczby zidentyfikowanych peptydów przygotowano listę białek będących potencjalnymi partnerami podjednostkami białka  $\beta 4$ . Wyniki zaprezentowano w tabeli 7. W wyniku tej analizy wytypowano 194 białek (unikatowych rekordów w bazie Uniprot), które uznano za wzbogacone. Kryterium do określenia wzbogacenia była identyfikacja co najmniej w 3 doświadczeniach oraz większa liczba zidentyfikowanych peptydów w grupie badanej, względem grup kontrolnych. Trzeba jednak zaznaczyć, że do selekcji tej należy podejść z ostrożnością, niemniej pokazuje ona pełniejszy obraz interakcji podjednostki  $\beta 4$ . Poniższa lista nie uwzględnia białek unikatowych.

Uzyskane dane przeanalizowano pod kątem występowania zidentyfikowanych białek w organellach komórkowych. Na rycinie 47 zaprezentowano rozkład białek w organellach. W przypadku analizy lokalizacji białek zidentyfikowanych we frakcjach wzbogaconych w mitochondria największą grupę stanowiły białka lokalizujące się kolejno w cytoplazmie (~21%), jądrze komórkowym (~17%), siateczce śródplazmatycznej (~16%), błonie komórkowej (~9%), pęcherzykach (~9%), błonie komórkowej (~9%) i mitochondriach (~7%).



**Rycina 47 Rozkład lokalizacji białek biotynylowanych przez białko  $\beta$ 4-TurboID.** Białka wzbogacone dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych w analizie frakcji wzbogaconych w mitochondria



**Tabela 7 Lista białek wzbogaconych dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych w analizie frakcji wzbogaconych w mitochondria.**

CS (cytoskielet), C (cytoplazma), GA (aparat Golgiego), N (jądro komórkowe), ER (siateczka śródplazmatyczna), PM (błona komórkowa), V (pęcherzyki), and M (mitochondria), L – lizosomy, Me – Melanosom, LD – krople tłuszczu, S-białka sekrecyjne

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce																Lokalizacja w komórce
		B4-TurboID				pcDNA3.1				SMAC-TurboID				OTC-TurboID				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	330.0 (6)	1449.0 (25)	1495.0 (27)	145.0 (3)	160.0 (3)	987.0 (17)	487.0 (6)	303.0 (5)	407.0 (9)	510.0 (9)	461.0 (7)	197.0 (4)	249.0 (6)	233.0 (5)	143.0 (1)	190.0 (4)	ER
Q86UP2	Kinectin	156.0 (3)	1024.0 (23)	2106.0 (33)	59.0 (1)	-	-	-	-	-	-	52.0 (1)	-	-	52.0 (1)	126.0 (3)	-	ER
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	267.0 (5)	1379.0 (23)	2404.0 (30)	835.0 (15)	-	-	-	-	-	110.0 (2)	209.0 (4)	-	-	-	223.0 (4)	-	ER, PM, C, CS
P08670	Vimentin	108.0 (2)	1141.0 (18)	720.0 (12)	698.0 (8)	-	-	-	-	177.0 (3)	379.0 (7)	102.0 (2)	50.0 (1)	61.0 (1)	267.0 (3)	670.0 (8)	107.0 (2)	C, CS, N, PM
P19338	Nucleolin	649.0 (11)	981.0 (17)	1511.0 (21)	196.0 (4)	387.0 (8)	768.0 (11)	703.0 (11)	717.0 (10)	670.0 (9)	582.0 (10)	841.0 (15)	352.0 (7)	647.0 (9)	549.0 (11)	842.0 (12)	712.0 (11)	N, C
P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	442.0 (7)	1220.0 (17)	1147.0 (17)	233.0 (3)	45.0 (1)	-	-	-	-	458.0 (6)	-	-	-	-	253.0 (5)	-	ER, Me, C, PM
P05023																		
P13637	Na/K transporting ATPase subunit alpha-1, 2, 3	90.0 (2)	1022.0 (16)	1219.0 (17)	117.0 (2)	-	-	-	-	70.0 (1)	491.0 (9)	349.0 (6)	96.0 (2)	-	312.0 (7)	644.0 (9)	-	PM, Me
P50993																		
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	138.0 (2)	891.0 (15)	1021.0 (16)	144.0 (2)	-	-	-	-	113.0 (2)	494.0 (8)	274.0 (4)	167.0 (3)	104.0 (2)	176.0 (4)	415.0 (6)	97.0 (1)	PM, L, Me
O14654	Insulin receptor substrate 4	99.0 (2)	1016.0 (15)	567.0 (10)	56.0 (1)	-	-	-	-	425.0 (8)	640.0 (12)	326.0 (5)	370.0 (6)	-	54.0 (1)	93.0 (2)	105.0 (2)	PM
P42166,	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha, and isoforms beta/gamma	183.0 (2)	858.0 (14)	869.0 (13)	609.0 (9)	-	-	-	-	268.0 (5)	543.0 (10)	324.0 (6)	556.0 (6)	137.0 (3)	380.0 (7)	464.0 (7)	173.0 (3)	C, N
P42167																		
O00203,	AP-3 complex subunit beta-1, AP-3 complex subunit beta-2	192.0 (4)	532.0 (13)	461.0 (11)	146.0 (3)	161.0 (4)	596.0 (14)	570.0 (11)	347.0 (7)	182.0 (4)	421.0 (9)	287.0 (7)	223.0 (4)	80.0 (2)	54.0 (1)	529.0 (10)	483.0 (10)	GA, V
Q13367																		
P08240	Signal recognition particle receptor subunit alpha	130.0 (2)	918.0 (13)	958.0 (10)	118.0 (2)	-	41.0 (1)	-	-	151.0 (3)	348.0 (4)	67.0 (1)	102.0 (2)	-	108.0 (2)	265.0 (4)	126.0 (2)	ER
Q14126	Desmoglein-2	-	634.0 (11)	977.0 (15)	-	-	-	-	-	52.0 (1)	378.0 (8)	573.0 (11)	93.0 (2)	-	-	240.0 (5)	-	PM
P09651,	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, Heterogeneous nuclear	159.0 (3)	1038.0 (11)	871.0 (9)	138.0 (2)	-	-	-	-	343.0 (4)	405.0 (5)	344.0 (3)	43.0 (1)	252.0 (3)	386.0 (6)	726.0 (8)	98.0 (2)	N, C
Q32P51,	ribonucleoprotein A1-like 2																	
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	52.0 (1)	425.0 (10)	571.0 (11)	92.0 (1)	-	-	-	-	-	50.0 (1)	-	-	-	51.0 (1)	226.0 (5)	50.0 (1)	PM, ER
P0DPH7																		
P0DPH8																		
P68363,	Tubulin alpha-3C chain, Tubulin alpha-3D chain, Tubulin alpha-1B chain, Tubulin	459.0 (5)	1349.0 (10)	1238.0 (10)	1002.0 (8)	-	160.0 (3)	55.0 (1)	146.0 (2)	361.0 (5)	593.0 (4)	564.0 (6)	766.0 (8)	50.0 (1)	66.0 (1)	909.0 (8)	275.0 (3)	C, CS
Q6PEY2,	alpha-3E chain, Tubulin alpha-1A chain, Tubulin alpha-1C chain																	
Q71U36																		
Q9BQE3																		
O43491	Band 4.1-like protein 2	-	625.0 (10)	486.0 (10)	72.0 (1)	-	-	-	-	-	166.0 (3)	169.0 (3)	-	50.0 (1)	122.0 (2)	189.0 (3)	-	C, CS, PM
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	359.0 (5)	1030.0 (10)	941.0 (9)	471.0 (6)	45.0 (1)	141.0 (3)	-	-	731.0 (8)	939.0 (8)	951.0 (8)	781.0 (8)	-	-	303.0 (6)	214.0 (5)	C, M
O00571,	ATP-dependent RNA helicase DDX3X and DDX3Y, Probable ATP-dependent RNA	58.0 (1)	496.0 (10)	527.0 (9)	104.0 (2)	-	-	-	-	170.0 (3)	430.0 (8)	154.0 (2)	67.0 (1)	-	74.0 (1)	181.0 (4)	89.0 (2)	PM, N, C, CS
O15523,	helicase DDX4																	
Q9NQI0																		
P68104,	Elongation factor 1-alpha 1, Elongation factor 1-alpha 2, Putative elongation factor	146.0 (2)	833.0 (10)	506.0 (7)	467.0 (7)	-	270.0 (3)	126.0 (2)	91.0 (2)	159.0 (3)	223.0 (3)	249.0 (3)	359.0 (5)	56.0 (1)	123.0 (2)	310.0 (5)	63.0 (1)	C, N, PM
Q05639,	1-alpha-like 3																	
Q5VTE0																		
Q86UE4	Protein LYRIC	98.0 (2)	620.0 (10)	518.0 (7)	159.0 (3)	-	58.0 (1)	86.0 (2)	129.0 (2)	190.0 (3)	214.0 (3)	276.0 (3)	162.0 (3)	59.0 (1)	124.0 (2)	351.0 (7)	131.0 (2)	ER, N, PM, C
O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	55.0 (1)	385.0 (9)	439.0 (9)	-	-	-	-	-	-	60.0 (1)	59.0 (1)	-	-	53.0 (1)	53.0 (1)	-	M, P, V, ER, PM
P55011	Solute carrier family 12 member 2	105.0 (1)	387.0 (9)	399.0 (7)	102.0 (1)	-	-	-	-	100.0 (1)	152.0 (2)	143.0 (2)	71.0 (1)	-	-	144.0 (3)	-	PM
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	174.0 (3)	501.0 (9)	428.0 (6)	195.0 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.0 (1)	-	ER
P51149	Ras-related protein Rab-7a	357.0 (5)	955.0 (8)	1164.0 (9)	169.0 (3)	-	-	-	-	162.0 (2)	272.0 (3)	456.0 (5)	62.0 (1)	-	77.0 (1)	271.0 (3)	-	V, Me, LD, M
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	532.0 (5)	565.0 (8)	672.0 (7)	185.0 (3)	128.0 (2)	292.0 (6)	490.0 (5)	113.0 (2)	538.0 (5)	813.0 (5)	520.0 (6)	206.0 (3)	383.0 (4)	515.0 (4)	728.0 (5)	184.0 (2)	M, PM
A6NMY6																		
P07355	Putative annexin A2-like protein, Annexin A2	56.0 (1)	399.0 (8)	388.0 (7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60.0 (1)	124.0 (1)	53.0 (1)	S, Me
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	193.0 (4)	492.0 (8)	345.0 (6)	264.0 (5)	-	-	-	-	65.0 (1)	118.0 (2)	59.0 (1)	108.0 (2)	-	-	75.0 (1)	-	C, N
P13639	Elongation factor 2	97.0 (2)	362.0 (8)	248.0 (6)	257.0 (5)	-	-	-	-	-	71.0 (1)	-	61.0 (1)	-	-	54.0 (1)	-	C, N
Q9BSI8	Extended synaptotagmin-1	112.0 (2)	529.0 (8)	361.0 (5)	217.0 (4)	-	-	-	-	-	132.0 (2)	57.0 (1)	62.0 (1)	-	66.0 (1)	125.0 (2)	85.0 (2)	ER, PM
P61011	Signal recognition particle 54 kDa protein	97.0 (2)	426.0 (8)	331.0 (5)	-	-	-	-	-	71.0 (1)	99.0 (2)	198.0 (4)	57.0 (1)	-	142.0 (2)	158.0 (3)	82.0 (1)	N, C, ER
P19320,	Vascular cell adhesion protein 1, Centromere protein F	55.0 (1)	345.0 (8)	128.0 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62.0 (1)	127.0 (2)	-	PM, S, C, N, Cs

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce																Lokalizacja w komórce
		B4-TurboID				pcDNA3.1				SMAC-TurboID				OTC-TurboID				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
P49454 P04350 P07437 Q13509 Q13885 Q9BVA1 Q96AG4 A5A3E0, POCG38, POCG39, P60709, P62736, P63261, P63267, P68032, P68133, Q562R1, Q658J3, Q9BYX7	Tubulin beta-4A chain, Tubulin beta chain, Tubulin beta-3 chain, Tubulin beta-2A chain, Tubulin beta-2B chain	113.0 (2)	581.0 (7)	551.0 (8)	908.0 (11)	-	59.0 (1)	-	-	86.0 (1)	320.0 (5)	165.0 (3)	467.0 (5)	-	-	240.0 (5)	185.0 (4)	Cs, C
Q96AG4 A5A3E0, POCG38, POCG39, P60709, P62736, P63261, P63267, P68032, P68133, Q562R1, Q658J3, Q9BYX7	Leucine-rich repeat-containing protein 59	142.0 (2)	472.0 (7)	524.0 (8)	187.0 (3)	-	-	-	-	-	82.0 (2)	-	-	-	-	49.0 (1)	-	V, ER, N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	POTE ankyrin domain family member E, F, I, J, Actin, cytoplasmic 1, Actin, aortic smooth muscle, Actin, cytoplasmic 2, Actin, gamma-enteric smooth muscle, Actin, alpha cardiac muscle 1, Actin, alpha skeletal muscle, Beta-actin-like protein 2, Putative beta-actin-like protein 3	235.0 (4)	353.0 (7)	465.0 (7)	402.0 (6)	-	47.0 (1)	163.0 (4)	-	60.0 (1)	129.0 (3)	119.0 (2)	326.0 (6)	63.0 (1)	-	327.0 (6)	160.0 (3)	C, Cs, N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	650.0 (7)	962.0 (7)	554.0 (6)	55.0 (1)	-	-	-	-	-	56.0 (1)	108.0 (2)	-	-	-	192.0 (3)	-	PM, C, Cs
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Neutral amino acid transporter B(0)	133.0 (3)	640.0 (7)	656.0 (6)	256.0 (4)	-	-	-	-	129.0 (1)	360.0 (5)	75.0 (1)	57.0 (1)	-	212.0 (3)	332.0 (4)	-	PM, Me
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	58.0 (1)	379.0 (7)	344.0 (6)	-	-	-	-	-	-	58.0 (1)	53.0 (1)	70.0 (1)	97.0 (2)	175.0 (3)	394.0 (7)	52.0 (1)	N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	-	384.0 (7)	385.0 (6)	156.0 (3)	-	-	-	-	72.0 (1)	209.0 (3)	72.0 (1)	59.0 (1)	50.0 (1)	151.0 (3)	135.0 (2)	-	ER,
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Emerin	173.0 (3)	427.0 (7)	280.0 (5)	61.0 (1)	-	157.0 (3)	64.0 (1)	76.0 (1)	102.0 (2)	131.0 (3)	52.0 (1)	84.0 (1)	148.0 (3)	110.0 (2)	96.0 (2)	94.0 (1)	N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Transport and Golgi organization protein 1 homolog	67.0 (1)	350.0 (7)	173.0 (3)	78.0 (1)	-	-	-	-	-	63.0 (1)	-	-	-	-	-	-	ER
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	61.0 (1)	302.0 (7)	90.0 (2)	183.0 (4)	-	-	-	-	-	50.0 (1)	-	89.0 (2)	-	-	-	53.0 (1)	N, C, Cs, PM
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	AP-3 complex subunit delta-1	58.0 (1)	333.0 (7)	136.0 (2)	69.0 (1)	-	-	-	-	-	190.0 (3)	71.0 (1)	-	-	-	111.0 (2)	93.0 (2)	C, GA
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	54.0 (1)	262.0 (6)	561.0 (10)	99.0 (2)	-	-	-	-	100.0 (2)	343.0 (7)	431.0 (9)	165.0 (3)	-	52.0 (1)	156.0 (4)	-	GA, V
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	94.0 (2)	271.0 (6)	485.0 (9)	207.0 (4)	-	-	-	-	-	57.0 (1)	-	57.0 (1)	-	-	-	-	ER, Me
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	97.0 (2)	296.0 (6)	367.0 (7)	-	-	-	-	-	60.0 (1)	105.0 (2)	-	47.0 (1)	-	48.0 (1)	65.0 (1)	-	C
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Regulator of nonsense transcripts 1	-	319.0 (6)	310.0 (7)	111.0 (2)	-	-	-	-	-	158.0 (3)	-	55.0 (1)	-	-	-	-	C, N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	53.0 (1)	577.0 (6)	417.0 (6)	113.0 (2)	-	-	-	-	-	-	52.0 (1)	-	-	-	-	-	ER, PM, N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	-	243.0 (6)	299.0 (6)	61.0 (1)	-	-	-	-	-	184.0 (4)	103.0 (2)	-	-	-	140.0 (2)	-	C, N
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	240.0 (4)	486.0 (6)	418.0 (5)	135.0 (1)	-	227.0 (3)	112.0 (2)	58.0 (1)	403.0 (4)	450.0 (4)	354.0 (5)	300.0 (4)	296.0 (4)	277.0 (3)	488.0 (4)	222.0 (3)	M, PM
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	211.0 (3)	585.0 (6)	493.0 (5)	233.0 (4)	-	-	-	-	-	92.0 (2)	51.0 (1)	-	-	-	57.0 (1)	-	ER, M, S, MAMs
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Minor histocompatibility antigen H13	182.0 (2)	711.0 (6)	652.0 (5)	275.0 (1)	-	-	-	-	-	56.0 (1)	-	-	-	-	-	-	ER, PM
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Ras-related protein Rab-21	58.0 (1)	407.0 (6)	329.0 (5)	77.0 (1)	-	-	-	-	-	67.0 (1)	178.0 (4)	-	-	52.0 (1)	-	-	ER, GA, V,
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Long-chain fatty acid transport protein 4	-	234.0 (6)	225.0 (5)	61.0 (1)	-	-	-	-	-	55.0 (1)	-	-	-	-	-	-	ER
P29966 Q15758 Q15233 P18031 P50402 Q5JRA6 Q00839 O14617 P11717 P04843 P78344 Q92900 Q9P0L0 Q7Z2W4 Q9Y277 Q9H3N1 Q8TCT9 Q9UL25 Q6P1M0 Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	-	267.0 (6)	233.0 (3)	108.0 (2)	-	-	-	-	-	140.0 (2)	-	54.0 (1)	-	-	-	-	C
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Peroxiredoxin-1, Peroxiredoxin-4	95.0 (2)	295.0 (5)	364.0 (8)	107.0 (2)	-	113.0 (2)	213.0 (4)	-	147.0 (2)	156.0 (2)	243.0 (4)	58.0 (1)	-	162.0 (2)	229.0 (4)	189.0 (3)	Me, C, ER
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Vesicle-trafficking protein SEC22b	427.0 (3)	442.0 (5)	512.0 (6)	266.0 (3)	-	-	-	-	268.0 (2)	413.0 (4)	446.0 (5)	470.0 (5)	63.0 (1)	190.0 (3)	402.0 (4)	174.0 (1)	ER, GA, Me
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Regulator of microtubule dynamics protein 3	208.0 (3)	281.0 (5)	370.0 (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82.0 (1)	-	-	M, C, N, CS
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	118.0 (2)	281.0 (5)	386.0 (6)	472.0 (7)	-	142.0 (2)	153.0 (3)	383.0 (5)	170.0 (3)	234.0 (3)	309.0 (4)	319.0 (5)	69.0 (1)	77.0 (1)	154.0 (2)	401.0 (6)	N
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Tudor and KH domain-containing protein	52.0 (1)	245.0 (5)	288.0 (6)	-	-	-	-	-	75.0 (1)	237.0 (5)	198.0 (4)	-	-	160.0 (3)	219.0 (3)	-	C, M
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Heme oxygenase 2	54.0 (1)	308.0 (5)	327.0 (5)	59.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49.0 (1)	-	PM, V, ER
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Ras-related protein Rab-10	139.0 (3)	313.0 (5)	345.0 (4)	93.0 (1)	-	-	-	-	92.0 (2)	-	122.0 (2)	105.0 (2)	-	159.0 (3)	170.0 (3)	-	Cs, V, GA, ER, L
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Ras-related protein Rab-1A, Putative Ras-related protein Rab-1C, Ras-related protein Rab-1B	98.0 (2)	308.0 (5)	290.0 (4)	93.0 (1)	-	-	-	-	-	154.0 (2)	125.0 (2)	-	-	-	192.0 (2)	-	GA, ER, V, C, Me,
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Signal recognition particle subunit SRP68	97.0 (1)	448.0 (5)	260.0 (4)	-	-	-	-	-	112.0 (2)	111.0 (1)	221.0 (4)	60.0 (1)	-	61.0 (1)	108.0 (1)	59.0 (1)	C, N, ER
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	MARCKS-related protein	89.0 (1)	404.0 (5)	213.0 (3)	64.0 (1)	-	-	-	-	-	100.0 (2)	78.0 (1)	-	-	61.0 (1)	214.0 (3)	-	Cs, PM
PRDX1_HUMAN, Q06830, Q13162 O75396 Q96TC7 Q9Y2W1 Q9Y2W6 P30519 P61026 P62820, Q92928, Q9H0U4 Q9UH89 P49006 P53985	Monocarboxylate transporter 1	63.0 (1)	291.0 (5)	317.0 (3)	126.0 (1)	-	97.0 (1)	-	-	-	149.0 (2)	136.0 (1)	-	-	133.0 (2)	240.0 (2)	-	PM

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce												Lokalizacja w komórce					
		B4-TurboID				pcDNA3.1				SMAC-TurboID					OTC-TurboID				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		1	2	3	4	
Q5T9L3	Protein wntless homolog	64.0 (1)	245.0 (5)	166.0 (3)	66.0 (1)	-	-	-	-	-	76.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	GA, V, PM, ER,
Q96PK6	RNA-binding protein 14	-	224.0 (5)	144.0 (3)	106.0 (2)	-	-	-	-	154.0 (2)	136.0 (2)	222.0 (4)	72.0 (1)	104.0 (1)	193.0 (3)	185.0 (3)	65.0 (1)	N, C	
P18085	ADP-ribosylation factor 4	-	257.0 (5)	201.0 (2)	59.0 (1)	-	-	-	-	58.0 (1)	49.0 (1)	105.0 (2)	51.0 (1)	-	-	-	-	GA, PM	
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	61.0 (1)	342.0 (5)	54.0 (1)	225.0 (3)	-	-	-	-	-	160.0 (2)	-	61.0 (1)	-	-	-	96.0 (2)	N, C, Cs,	
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	-	327.0 (4)	716.0 (7)	74.0 (1)	-	-	-	-	-	-	66.0 (1)	-	-	-	-	-	ER	
P20340	Ras-related protein Rab-6A	62.0 (1)	238.0 (4)	314.0 (6)	-	-	-	-	-	89.0 (2)	101.0 (2)	-	-	-	-	-	-	GA, V	
Q7Z434	mitochondrial antiviral-signaling protein	171.0 (3)	232.0 (4)	250.0 (5)	111.0 (2)	-	-	-	-	193.0 (3)	216.0 (4)	203.0 (3)	52.0 (1)	69.0 (1)	73.0 (1)	196.0 (4)	60.0 (1)	M, P	
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	209.0 (3)	278.0 (4)	408.0 (5)	210.0 (2)	-	-	-	161.0 (2)	-	-	-	186.0 (2)	-	-	276.0 (4)	264.0 (2)	C, N	
Q6IAA8	Regulator complex protein LAMTOR1	127.0 (2)	376.0 (4)	547.0 (5)	62.0 (1)	-	-	-	-	159.0 (2)	135.0 (2)	257.0 (3)	66.0 (1)	146.0 (2)	243.0 (4)	305.0 (2)	55.0 (1)	L, V	
Q14318	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	118.0 (1)	379.0 (4)	374.0 (5)	107.0 (1)	-	-	-	-	112.0 (2)	338.0 (4)	130.0 (2)	94.0 (1)	82.0 (1)	100.0 (2)	201.0 (3)	84.0 (1)	M	
P57721, Q15366	Poly(rC)-binding protein 3,Poly(rC)-binding protein 2	133.0 (2)	312.0 (4)	201.0 (4)	63.0 (1)	-	-	-	-	-	87.0 (2)	109.0 (2)	-	-	-	65.0 (1)	-	N, C	
Q43865, Q96HN2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1,Adenosylhomocysteinase 3	65.0 (1)	199.0 (4)	240.0 (4)	109.0 (2)	-	-	-	-	-	72.0 (1)	62.0 (1)	68.0 (1)	-	-	54.0 (1)	-	ER, C, PM, V	
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19	65.0 (1)	208.0 (4)	242.0 (4)	60.0 (1)	-	-	-	-	-	103.0 (2)	170.0 (3)	-	-	58.0 (1)	122.0 (2)	-	M, C, N	
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	61.0 (1)	289.0 (4)	289.0 (4)	132.0 (1)	-	-	-	-	-	79.0 (1)	187.0 (3)	-	-	-	132.0 (2)	-	PM	
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	77.0 (1)	209.0 (4)	172.0 (4)	70.0 (1)	-	-	-	-	54.0 (1)	119.0 (2)	88.0 (2)	-	-	-	93.0 (2)	-	C,N, Me	
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	-	298.0 (4)	200.0 (4)	121.0 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65.0 (1)	-	N, C	
P61006	Ras-related protein Rab-8A	-	235.0 (4)	242.0 (4)	93.0 (1)	-	-	-	-	-	127.0 (2)	98.0 (2)	-	-	99.0 (2)	-	-	PM, GA, V, Cs, L	
Q15058	Kinesin-like protein KIF14	69.0 (1)	228.0 (4)	173.0 (3)	-	-	-	-	-	-	184.0 (3)	-	70.0 (1)	56.0 (1)	57.0 (1)	-	-	N, C, Cs	
Q14781	Chromobox protein homolog 2	-	237.0 (4)	126.0 (3)	70.0 (1)	-	77.0 (2)	141.0 (3)	77.0 (1)	66.0 (1)	53.0 (1)	-	93.0 (2)	49.0 (1)	-	89.0 (2)	119.0 (2)	N	
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	-	239.0 (4)	193.0 (3)	61.0 (1)	-	-	-	-	-	63.0 (1)	-	-	-	52.0 (1)	-	-	C, N	
P18583	Protein SON	122.0 (2)	181.0 (4)	137.0 (2)	317.0 (5)	-	55.0 (1)	49.0 (1)	-	-	141.0 (3)	52.0 (1)	234.0 (4)	-	57.0 (1)	54.0 (1)	-	N	
Q8IX11	mitochondrial Rho GTPase 2	112.0 (2)	209.0 (4)	102.0 (2)	139.0 (2)	-	-	-	-	134.0 (2)	118.0 (2)	137.0 (2)	142.0 (2)	95.0 (2)	115.0 (2)	207.0 (3)	68.0 (1)	M	
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	58.0 (1)	252.0 (4)	139.0 (2)	138.0 (2)	-	-	-	-	53.0 (1)	54.0 (1)	53.0 (1)	-	58.0 (1)	145.0 (3)	105.0 (2)	-	N	
Q8NE01	Metal transporter CNNM3	78.0 (1)	188.0 (4)	113.0 (2)	-	-	-	-	-	-	70.0 (1)	68.0 (1)	50.0 (1)	-	64.0 (1)	63.0 (1)	-	PM	
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	-	171.0 (4)	154.0 (2)	115.0 (2)	-	-	-	-	57.0 (1)	-	-	-	-	-	147.0 (3)	-	N, C	
Q9NVH1	Dnal homolog subfamily C member 11	72.0 (1)	159.0 (4)	62.0 (1)	-	-	-	52.0 (1)	-	72.0 (1)	99.0 (2)	56.0 (1)	-	67.0 (1)	103.0 (2)	-	-	M	
Q96RL7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	54.0 (1)	169.0 (4)	50.0 (1)	-	-	-	-	-	-	71.0 (1)	80.0 (1)	-	-	-	-	-	M, ER, V, L, LD,	
P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7	52.0 (1)	144.0 (2)	164.0 (2)	-	47.0 (1)	67.0 (1)	279.0 (4)	-	202.0 (4)	585.0 (7)	359.0 (5)	178.0 (3)	233.0 (5)	724.0 (5)	960.0 (8)	334.0 (5)	GA,	
Q9BZF1	Oxysterol-binding protein-related protein 8	56.0 (1)	245.0 (3)	434.0 (7)	-	-	-	-	-	-	48.0 (1)	75.0 (1)	-	-	-	124.0 (2)	-	C	
Q51TV8	Torsin-1A-interacting protein 1	73.0 (1)	230.0 (3)	260.0 (5)	195.0 (3)	-	-	-	-	68.0 (1)	60.0 (1)	107.0 (2)	68.0 (1)	-	-	103.0 (2)	68.0 (1)	ER, N	
Q9NRW1	Ras-related protein Rab-6B	62.0 (1)	149.0 (3)	317.0 (5)	-	-	-	-	-	89.0 (2)	101.0 (2)	-	-	-	-	-	-	N,	
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	150.0 (3)	115.0 (3)	186.0 (4)	-	-	64.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GA, ER, V	
P51153	Ras-related protein Rab-13	-	177.0 (3)	256.0 (4)	93.0 (1)	-	-	-	-	-	87.0 (2)	92.0 (2)	-	-	-	-	-	N, C, Me, PM, M	
Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like	115.0 (2)	195.0 (3)	177.0 (3)	102.0 (2)	-	-	-	-	-	72.0 (1)	68.0 (1)	75.0 (1)	-	-	65.0 (1)	-	PM, V, GA,	
Q9BVC6	Transmembrane protein 109	169.0 (2)	246.0 (3)	225.0 (3)	150.0 (2)	-	-	-	-	-	69.0 (1)	68.0 (1)	50.0 (1)	-	-	80.0 (1)	-	N, C	
P10599	Thioredoxin	203.0 (2)	265.0 (3)	275.0 (3)	87.0 (1)	-	-	-	-	76.0 (1)	82.0 (1)	133.0 (2)	121.0 (2)	93.0 (1)	-	223.0 (3)	91.0 (1)	ER, N	
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	64.0 (1)	119.0 (3)	219.0 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78.0 (1)	-	N, C, S	
Q9NZJ7	mitochondrial carrier homolog 1	-	170.0 (3)	185.0 (3)	68.0 (1)	-	-	-	-	56.0 (1)	79.0 (1)	74.0 (1)	-	55.0 (1)	59.0 (1)	81.0 (1)	-	C, N	
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a	108.0 (2)	127.0 (3)	129.0 (2)	59.0 (1)	-	-	-	-	-	-	60.0 (1)	57.0 (1)	-	-	-	-	M	
Q15286	Ras-related protein Rab-35	61.0 (1)	192.0 (3)	150.0 (2)	93.0 (1)	-	-	-	-	-	53.0 (1)	93.0 (2)	68.0 (1)	-	60.0 (1)	115.0 (2)	-	ER, GA, C, L	
Q02878	60S ribosomal protein L6	68.0 (1)	129.0 (3)	121.0 (2)	55.0 (1)	-	-	-	94.0 (1)	64.0 (1)	47.0 (1)	-	63.0 (1)	88.0 (1)	65.0 (1)	60.0 (1)	57.0 (1)	PM, V, Me	
Q9NPA0	ER membrane protein complex subunit 7	66.0 (1)	159.0 (3)	197.0 (2)	91.0 (1)	-	-	-	-	-	68.0 (1)	-	-	-	-	-	-	C, ER	
P13984	General transcription factor IIF subunit 2	63.0 (1)	154.0 (3)	133.0 (2)	-	-	-	-	-	90.0 (1)	62.0 (1)	96.0 (1)	-	-	55.0 (1)	86.0 (1)	-	ER	
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	62.0 (1)	220.0 (3)	146.0 (2)	-	-	-	-	-	-	-	53.0 (1)	-	-	-	-	-	N	
O75179	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	-	167.0 (3)	121.0 (2)	77.0 (1)	-	66.0 (1)	-	-	54.0 (1)	-	-	-	-	53.0 (1)	47.0 (1)	64.0 (1)	V, ER, M, S	
O00767	Stearoyl-CoA desaturase	-	165.0 (3)	125.0 (2)	55.0 (1)	-	-	-	-	-	57.0 (1)	-	-	-	-	-	-	C, N	
P15880	40S ribosomal protein S2	52.0 (1)	175.0 (3)	70.0 (1)	72.0 (1)	-	-	-	-	-	59.0 (1)	-	-	-	-	56.0 (1)	-	ER	
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	-	214.0 (3)	48.0 (1)	69.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	70.0 (1)	-	-	60.0 (1)	60.0 (1)	N, C	
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	63.0 (1)	173.0 (3)	-	71.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53.0 (1)	-	-	N	
P62424	60S ribosomal protein L7a	95.0 (2)	112.0 (2)	195.0 (4)	-	-	-	-	-	56.0 (1)	-	-	58.0 (1)	-	-	87.0 (2)	58.0 (1)	C	
O43402	ER membrane protein complex subunit 8	-	173.0 (2)	283.0 (4)	82.0 (1)	-	-	-	-	-	-	57.0 (1)	-	-	-	-	-	ER	
P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	56.0 (1)	124.0 (2)	110.0 (2)	73.0 (1)	-	-	-	-	-	60.0 (1)	53.0 (1)	-	-	-	-	-	ER	

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce																Lokalizacja w komórce
		B4-TurboID				pcDNA3.1				SMAC-TurboID				OTC-TurboID				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Q15717	ELAV-like protein 1	68.0 (1)	108.0 (2)	114.0 (2)	55.0 (1)	-	-	-	-	-	53.0 (1)	-	78.0 (1)	-	-	-	-	C, N, C
Q9H490	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein	52.0 (1)	102.0 (2)	95.0 (2)	-	-	-	-	-	-	52.0 (1)	-	-	-	-	51.0 (1)	-	ER
Q07812	Apoptosis regulator BAX	58.0 (1)	85.0 (2)	114.0 (2)	-	-	-	-	-	-	53.0 (1)	70.0 (1)	-	-	-	-	-	M, N, C
P05388,	60S acidic ribosomal protein P0,60S acidic ribosomal protein P0-like	-	96.0 (2)	87.0 (2)	175.0 (3)	-	-	-	-	-	-	-	85.0 (1)	-	-	75.0 (1)	-	N, C
Q8NHW5	GTP-binding protein SAR1b	-	133.0 (2)	79.0 (2)	59.0 (1)	-	-	-	-	-	-	60.0 (1)	57.0 (1)	-	-	-	-	ER, GA, C, L
P31943,	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H,Heterogeneous nuclear	-	90.0 (2)	94.0 (2)	65.0 (1)	-	-	-	-	66.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	N
P55795	ribonucleoprotein H2	-	141.0 (2)	150.0 (2)	93.0 (1)	-	-	-	-	53.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	PM
P59190	Ras-related protein Rab-15	54.0 (1)	94.0 (2)	54.0 (1)	60.0 (1)	-	53.0 (1)	-	-	-	-	-	46.0 (1)	-	60.0 (1)	35.0 (1)	42.0 (1)	C
P62829	60S ribosomal protein L23	42.0 (1)	136.0 (2)	48.0 (1)	54.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	96.0 (2)	-	-	-	-	C,N
P27708	CAD protein	68.0 (1)	122.0 (2)	55.0 (1)	-	-	-	-	-	-	57.0 (1)	74.0 (1)	-	-	60.0 (1)	49.0 (1)	-	M
Q15390	mitochondrial fission regulator 1	-	103.0 (2)	47.0 (1)	153.0 (3)	-	64.0 (1)	-	-	-	-	60.0 (1)	96.0 (2)	-	-	-	-	N
O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	-	101.0 (2)	64.0 (1)	137.0 (2)	-	-	-	-	71.0 (1)	-	-	116.0 (2)	-	-	-	-	GA
Q14789	Golgin subfamily B member 1	-	138.0 (2)	84.0 (1)	73.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	77.0 (1)	-	-	71.0 (1)	71.0 (1)	C
P83731	60S ribosomal protein L24	-	131.0 (2)	89.0 (1)	79.0 (1)	-	-	-	-	-	76.0 (1)	-	71.0 (1)	-	-	72.0 (1)	-	N
Q14498	RNA-binding protein 39	-	170.0 (2)	72.0 (1)	59.0 (1)	-	-	-	-	-	67.0 (1)	-	-	-	56.0 (1)	-	-	M
Q9H019	mitochondrial fission regulator 1-like	-	95.0 (2)	72.0 (1)	75.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.0 (1)	N
B2RXH8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1, 2, 3, 4, C1/C2	-	113.0 (2)	70.0 (1)	94.0 (1)	-	-	-	55.0 (1)	-	-	-	141.0 (2)	-	-	-	-	N
B7ZW38	Serine/arginine-rich splicing factor 5	72.0 (1)	116.0 (2)	-	158.0 (3)	-	-	-	-	-	-	-	56.0 (1)	-	-	-	-	N
O60812	Prelamin-A/C	55.0 (1)	72.0 (1)	125.0 (3)	68.0 (1)	-	-	-	-	-	74.0 (1)	90.0 (1)	-	-	-	-	-	ER, Me, GA, V,
P07910	Ras-related protein Rab-2A	54.0 (1)	286.0 (1)	431.0 (3)	73.0 (1)	-	-	-	-	-	-	67.0 (1)	-	-	-	-	-	ER
PODMR1	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	-	82.0 (1)	144.0 (3)	79.0 (1)	-	-	-	-	-	53.0 (1)	60.0 (1)	96.0 (2)	-	-	-	-	GA
Q13243	Golgi pH regulator A, Golgi pH regulator B	57.0 (1)	74.0 (1)	106.0 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90.0 (2)	-	ER
P02545	Serpin H1	-	56.0 (1)	89.0 (2)	101.0 (2)	-	-	-	-	-	52.0 (1)	-	-	-	-	-	-	C, N, ER, GA
P52292	Importin subunit alpha-1	-	57.0 (1)	122.0 (2)	62.0 (1)	-	92.0 (1)	64.0 (1)	55.0 (1)	60.0 (1)	95.0 (1)	-	96.0 (1)	-	69.0 (1)	-	56.0 (1)	N
Q13595	Transformer-2 protein homolog alpha	-	64.0 (1)	234.0 (2)	64.0 (1)	-	-	-	-	-	68.0 (1)	-	-	-	-	-	-	PM
P43003	Excitatory amino acid transporter 1	-	62.0 (1)	140.0 (2)	74.0 (1)	-	-	-	-	-	50.0 (1)	-	-	-	-	-	-	V, ER
P51648	Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	55.0 (1)	119.0 (1)	94.0 (1)	64.0 (1)	-	-	-	-	80.0 (1)	-	-	94.0 (1)	-	-	63.0 (1)	-	PM, C, GA, Cs
O14966	Ras-related protein Rab-7L1	69.0 (1)	80.0 (1)	76.0 (1)	63.0 (1)	-	-	55.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	56.0 (1)	-	V
O60831	PRA1 family protein 2	50.0 (1)	70.0 (1)	67.0 (1)	-	-	-	-	-	-	79.0 (1)	72.0 (1)	-	-	-	79.0 (1)	-	C, N
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	-	61.0 (1)	66.0 (1)	68.0 (1)	-	-	-	-	-	62.0 (1)	62.0 (1)	-	-	-	-	-	C, S, N
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	-	82.0 (1)	76.0 (1)	56.0 (1)	-	-	-	-	-	62.0 (1)	-	56.0 (1)	-	-	-	-	N
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	-	68.0 (1)	55.0 (1)	68.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	68.0 (1)	-	-	-	-	C, Me, N, ER
P23526	Adenosylhomocysteinase	-	68.0 (1)	55.0 (1)	68.0 (1)	-	-	-	-	-	-	-	68.0 (1)	-	-	-	-	

W obu podejściach eksperymentalnych liczba zidentyfikowanych białek mitochondrialnych uznanych za białka potencjalnie oddziałujące z białkiem  $\beta 4$  stanowiła kilka procent populacji. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że zastosowanie kontroli wyeliminowało dużą populację białek, które były biotynylowane przez  $\beta 4$  oraz biotynylowane przez białka kontrolne. Ponadto, trzeba uwzględnić fakt, że wiele białek lokalizuje się w kilku przedziałach komórkowych, a uzyskane dane nie wskazują w którym przedziale komórkowym zaszła biotynylacja.

#### **6.2.6 Próba potwierdzenia wybranych, potencjalnych interakcji z podjednostką $\beta 4$ kanału BK<sub>Ca</sub>**

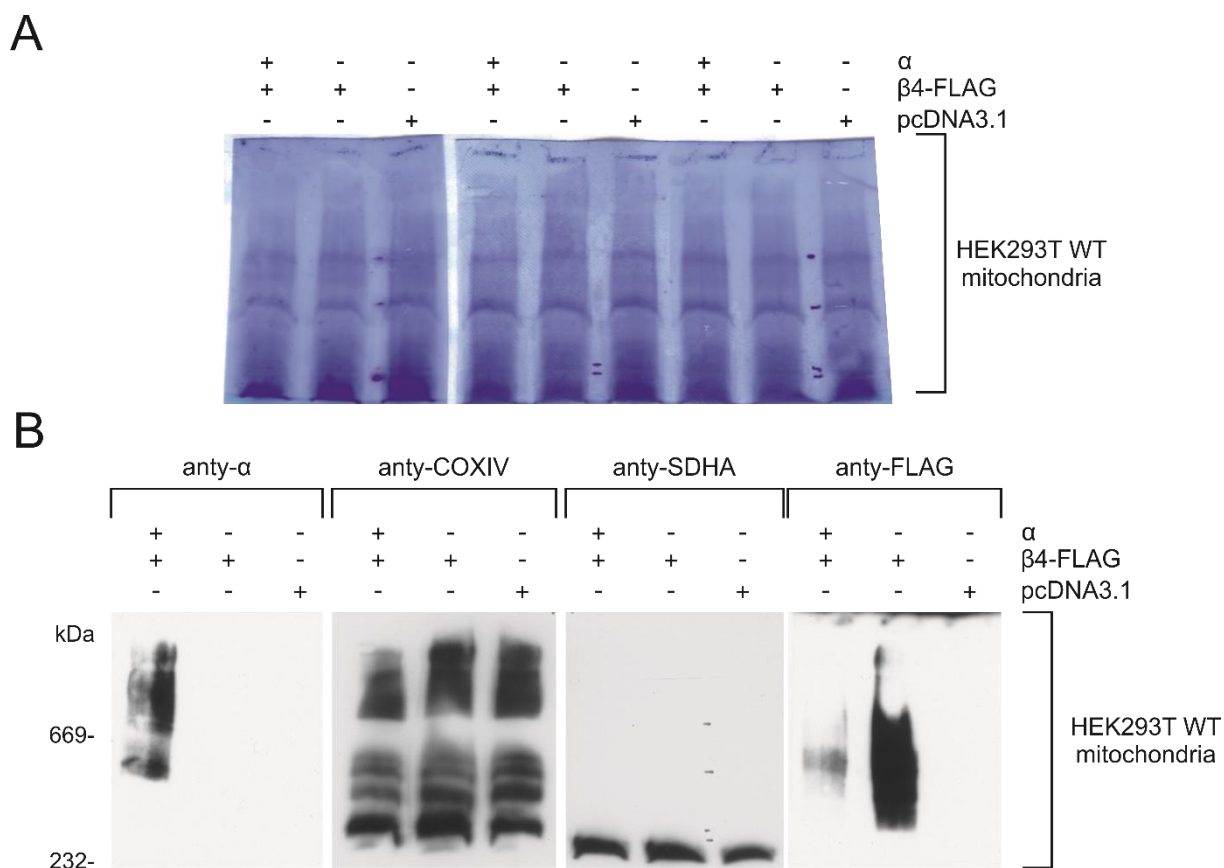
Analiza proteomiczna z zastosowaniem spektrometrii mas ujawniła, że podjednostka  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> biotynyluje wiele białek, reprezentujących różne przedziały komórkowe, w tym mitochondria. Wyniki te wskazują na szeroki zakres potencjalnych interakcji, które mogą być istotne dla funkcji podjednostki  $\beta 4$  zarówno w mitochondriach, jak i innych strukturach komórkowych. Na podstawie lokalizacji oraz potencjalnych funkcji tych białek wytypowano kilku interesujących kandydatów do dalszych badań, które mogą mieć znaczenie dla mechanizmów regulacyjnych związanych z podjednostką  $\beta 4$ . Aby zweryfikować te interakcje, przeprowadzono eksperymenty typu Co-IP (koimmunoprecypitacja białek), które miały na celu potwierdzenie fizycznej interakcji między podjednostką  $\beta 4$  a wybranymi białkami. Wyniki tych badań mogą dostarczyć informacji na temat złożonej sieci interakcji podjednostki  $\beta 4$  oraz jej potencjalnej roli w komórkowych procesach regulacyjnych.

Aby potwierdzić wybrane interakcje podjednostki  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub>, przeprowadzono serię eksperymentów z wykorzystaniem komórek HEK293T w celu wykonania analizy możliwości powstawania i izolacji kompleksów białkowych tworzonych przez podjednostkę  $\beta 4$ . W pierwszym etapie komórki transfekowano przejściowo plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta 4$ . Dodatkowo wykonano kotransfekcję z plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$ , aby umożliwić tworzenie pełnego kompleksu kanału BK<sub>Ca</sub>. Następnie izolowano mitochondria za pomocą frakcjonowania subkomórkowego, co pozwoliło na uzyskanie frakcji wzbogaconych w mitochondria.

Izolowane mitochondria poddano analizie elektroforezą Blue Native (BN-PAGE), która umożliwia ocenę tworzenia się kompleksów białkowych w ich natywnym stanie. Dzięki tej technice sprawdzono czy podjednostka  $\beta 4$  tworzy kompleksy z podjednostką  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> oraz czy tworzy kompleksy z innymi białkami. Na rycinie 48 zaprezentowano przykładowy

wynik analizy kompleksów po transfekcji podjednostkami  $\beta$ 4-FLAG oraz VEDEC. W zaprezentowanym doświadczeniu próbki rozciągnięto na żelu gradientowym o stężeniu akryloamidu 4-10%. Takie warunki pozwalają na obserwowanie większych kompleksów. Wybór stężenia był podyktowany spodziewaną wielkością kompleksów tworzonych przez kanał BK<sub>Ca</sub> obserwowanych natywnie w komórkach U-87 MG [147]. Znakowanie przeciwciałem rozpoznającym metkę FLAG ukazało prążki jedynie w ścieżkach zawierających frakcje izolowane z komórek przejściowo transfekowanych plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub>. Jednak intensywność sygnału była wyraźnie większa w ścieżce z próbkami transfekowanymi jednym plazmidem. W przypadku kotransfekcji sygnał był wyraźnie słabszy. Barwienia kompleksów tworzonych przez podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> mysim przeciwciałem anti- $\alpha$  ukazało prążki jedynie w ścieżce, gdzie mitochondria pochodziły z próbki przejściowo transfekowanej plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$ . Analiza wykazała, że podjednostka  $\beta$ 4 tworzy wiele kompleksów, o czym świadczy rozciągnięty sygnał. Z drugiej strony podjednostka  $\alpha$  również tworzy wiele kompleksów, a wykryty sygnał nie tworzył skupionych prążków.

Dla porównania wyznakowano wybrane podjednostki kompleksu II (podjednostka SDHA) oraz IV łańcucha oddechowego (podjednostka COXIV). Barwienie przeciwciałem anti-FLAG przeprowadzono po odmyciu z membrany przeciwciała anti-SDHA.



**Rycina 48** Analiza techniką Blue Native. Mitochondria komórek HEK293T oczyszczone za pomocą wirowania różnicowego z wykorzystaniem permeabilizacji komórek digitoniną. Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę β4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG oraz plazmidem kodującym podjednostkę α (α). A) Zdjęcie membrany PVDF po transferze Western blot i barwieniu Coomassie. B) Zdjęcie klisz z wyznakowania immunologicznego podjednostki α kanału BK<sub>Ca</sub> mysim przeciwciałem anti-α (1:200, NeuroMab, L6/60), podjednostki mitochondrialnej oksydazy cytochromu c anti-COXIV (królicze, 1:1000, Cell Signaling, 4844C), podjednostki SDHA mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej anti-SDHA (królicze, 1:1000, Abcam, Ab137040) oraz podjednostki β4 kanału BK<sub>Ca</sub> przeciwciałem rozpoznającym metkę FLAG anti-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804). „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji.

Powyższa analiza pokazała, że transfekcja podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> skutkuje tworzeniem się kompleksów białkowych możliwymi do wykrycia za pomocą technik elektroforetycznych. W związku z tym celem kolejnych doświadczeń była koimmunoprecypitacja podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> i próba identyfikacji potencjalnych partnerów na podstawie uzyskanych danych w doświadczeniach opisanych wcześniej.

Koimmunoprecypitację kompleksów tworzonych przez białko β4 w komórkach HEK293T przeprowadzono zgodnie z protokołem zamieszczonym w rozdziale Materiały i metody. W pierwszej kolejności komórki HEK293T dzikiego typu przejściowo transfekowano plazmidem kodującym podjednostkę β4-FLAG kanału BK<sub>Ca</sub> oraz koekspresję białka β4-FLAG z podjednostką VEDEC. Grupę kontrolną stanowiła transfekcja komórek plazmidem pcDNA3.1, który nie zawierał wstawki kodującej białko (pcDNA3.1). Następnie

przeprowadzono izolację frakcji wzbogaconej w mitochondria i przeprowadzono immunoprecypitacyjne oczyszczanie białek zawierających metkę FLAG. Do tego celu zastosowano złożę magnetyczne związane z przeciwciałem rozpoznającym metkę FLAG.

Pierwsze eksperymenty miały na celu porównanie wpływu zastosowania buforu zawierającego digitoninę w stężeniu 1% lub Triton X-100 w stężeniu 1%. Oba detergenty są wykorzystywane w tego typu doświadczeniach, jednak digitonina jest łagodniejszym detergentem.

Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano plazmidami: pcDNA3.1,  $\beta$ 4-FLAG lub kotransfekowano  $\beta$ 4-FLAG wraz z plazmidem kodującym podjednostkę VEDEC. Zebrane komórki podzielono i zsolubilizowano w buforze zawierającym wybrany detergent. Następnie przeprowadzono izolację kompleksów białkowych wykorzystując złożę anti-FLAG (DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science). Elucji białek ze złoża dokonano wykorzystując peptyd FLAG. Następnie przeprowadzono elektroforezę w warunkach denaturujących z wykorzystaniem żelu Tris-Tricine-SDS oraz transfer na membranę PVDF. Na rycinie 49 przedstawiono uzyskane wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Barwienie przeciwciałem anti-FLAG (mysie, 1:1000, Sigma, F1804) ukazało sygnał we frakcjach „I” (ang. *input*, frakcja przed inkubacją ze złożem), „E” (ang. *elution*, elucja peptydem FLAG) oraz „U” (ang. *unbound*, frakcja w której występują białka niezwiązane ze złożem).

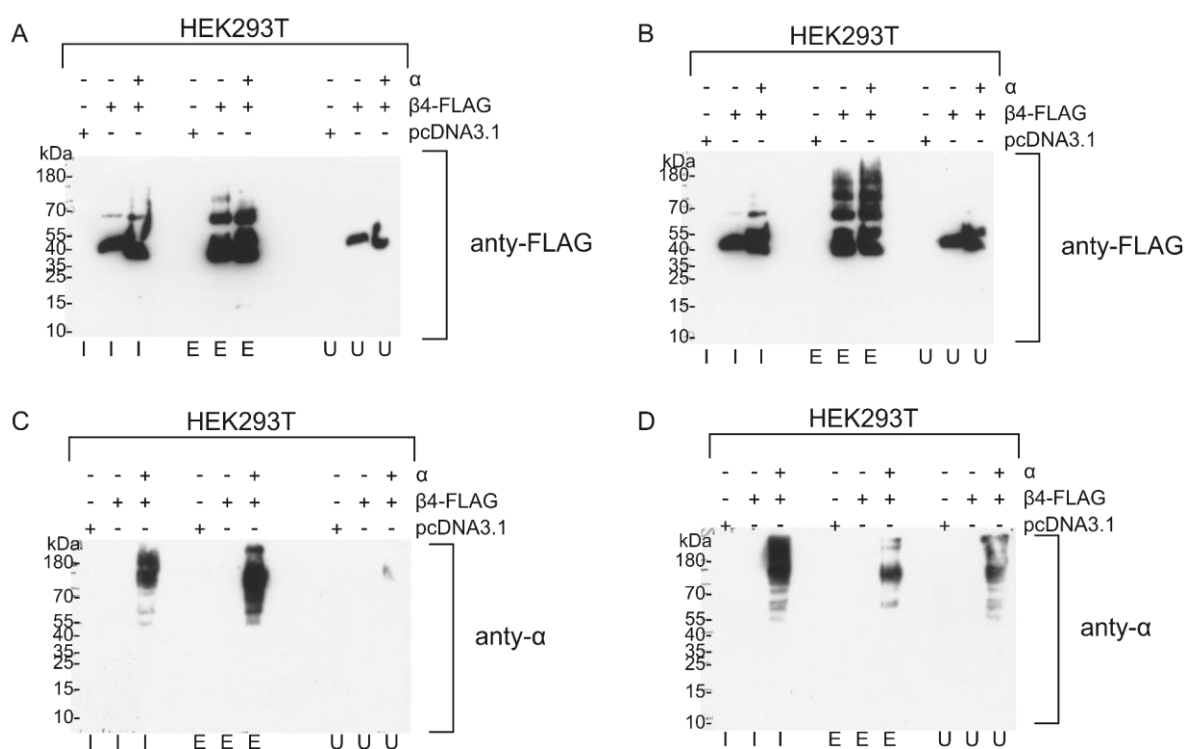
Wyniki oczyszczania białek były zbliżone w obu próbach. Wysokość oraz intensywność obserwowanych prążków były zbliżone dla obu prób po solubilizacji oraz we frakcji niezwiązanej ze złożem. Sygnał po elucji w próbce solubilizowanej digitoniną był skupiony w przedziale 35 kDa – 70 kDa. Wyraźnie mocniejszy sygnał był na wysokości 35-40 kDa. Zaobserwowano także prążek na wysokości około 100 kDa dla próbki transfekowanej wyłącznie plazmidem  $\beta$ 4-FLAG (Rycina 49 A). Sygnał po elucji w próbce solubilizowanej Tritonem X-100 był skupiony w przedziale 37 kDa – 180 kDa. Prążki były wyraźnie zaznaczone o porównywalnej intensywności (Rycina 49 B). W porównaniu do próbki traktowanej digitoniną, w próbkach solubilizowanych Tritonem X-100 zaobserwowano dodatkowe prążki na powyżej 100 kDa co sugeruje powstawanie dodatkowych agregatów, podczas gdy próbki po solubilizacji digitoniną pozostawały w znacznej części w formie monomeru.

Następnie podjęto próbę określenia wpływu detergentu na stabilność kompleksu tworzonego przez podjednostki  $\beta$ 4 oraz VEDEC. Podjednostka  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> jest białkiem regulującym aktywność kanałów BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub> tworzonych przez podjednostki  $\alpha$ . W celu



wykrycia podjednostki  $\alpha$  (VEDEC) w uzyskanych eluatach, membrany wybarwiono przeciwciałem rozpoznającym tę podjednostkę (Rycina 49 C i D).

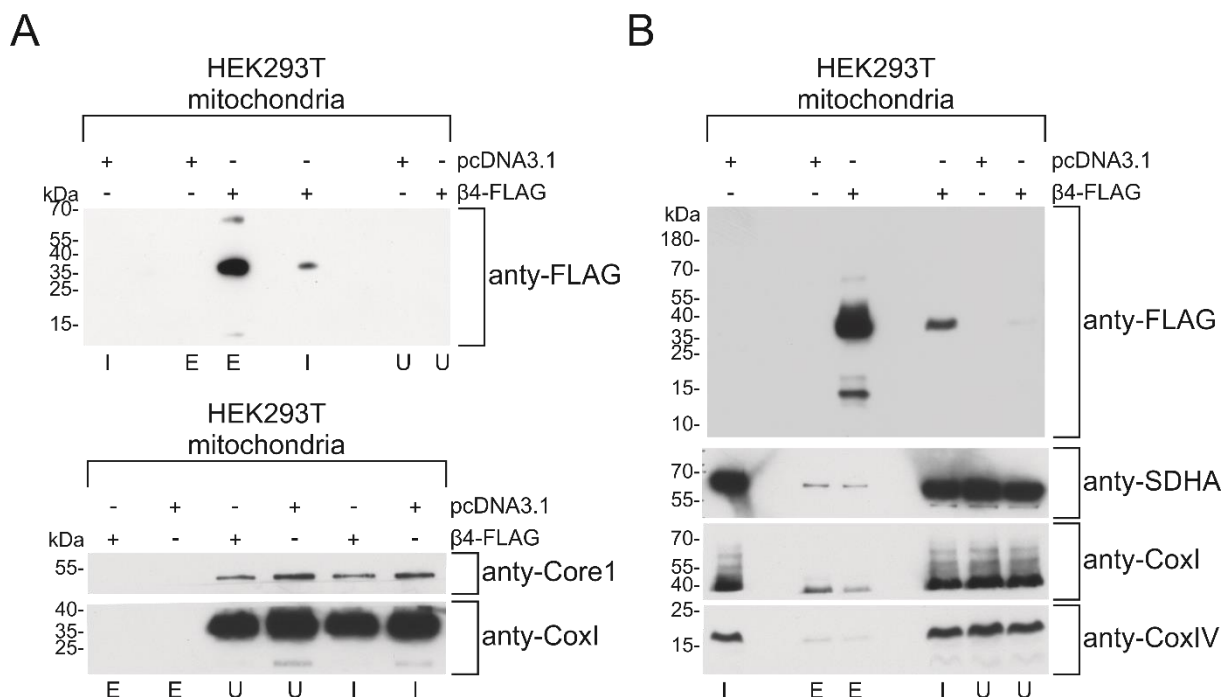
Znakowanie immunologiczne przeciwciałem anti- $\alpha$  wykazało sygnał we wszystkich frakcjach w próbkach po transfekcji plazmidem VEDEC. Wysokość oraz intensywność obserwowanych prążków były zbliżone dla obu prób po solubilizacji we frakcji „I”. Sygnał dla próbki solubilizowanej Tritonem X-100 zawierał więcej agregatów o masie przekraczającej 180 kDa. Sygnał po elucji w próbce solubilizowanej digitoniną był rozłożony w przedziale 55 kDa – 180 kDa. Wyraźnie mocniejszy sygnał był na wysokości 100 – 130 kDa odpowiadającej monomerom podjednostki  $\alpha$  (Rycina 49 D). Obecność prążków na niższej wysokości może świadczyć o degradacji znakowanego białka. W porównaniu do próbek solubilizowanych digitoniną, zastosowanie Tritonu X-100 skutkowało słabszym sygnałem w elucji przy porównywalnym sygnale we frakcji I. Może to świadczyć o mniejszej stabilności kompleksu przy zastosowaniu Tritonu X-100. Z tego powodu kolejne doświadczenia wykonywano jedynie stosując digitoninę jako detergent do solubilizacji.



**Rycina 49 Analiza Western blot interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG z podjednostką VEDEC po elektroforezie Tricine-SDS-PAGE.** Komórki przejściowo transfekowano plazmidami pcDNA3.1,  $\beta$ 4-FLAG lub  $\beta$ 4-FLAG i VEDEC ( $\alpha$ ). Zastosowanie buforu do lizy zawierającego 1% digitoninę (panele A, C) lub 1% Triton X-100 (panele B, D). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złoże magnetyczne anti-FLAG. (U) frakcja zawierająca część próbki, która nie uległa związaniu ze złożem magnetycznym. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anti-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG – eluat. Stężenie białka we frakcjach I oraz U stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji.

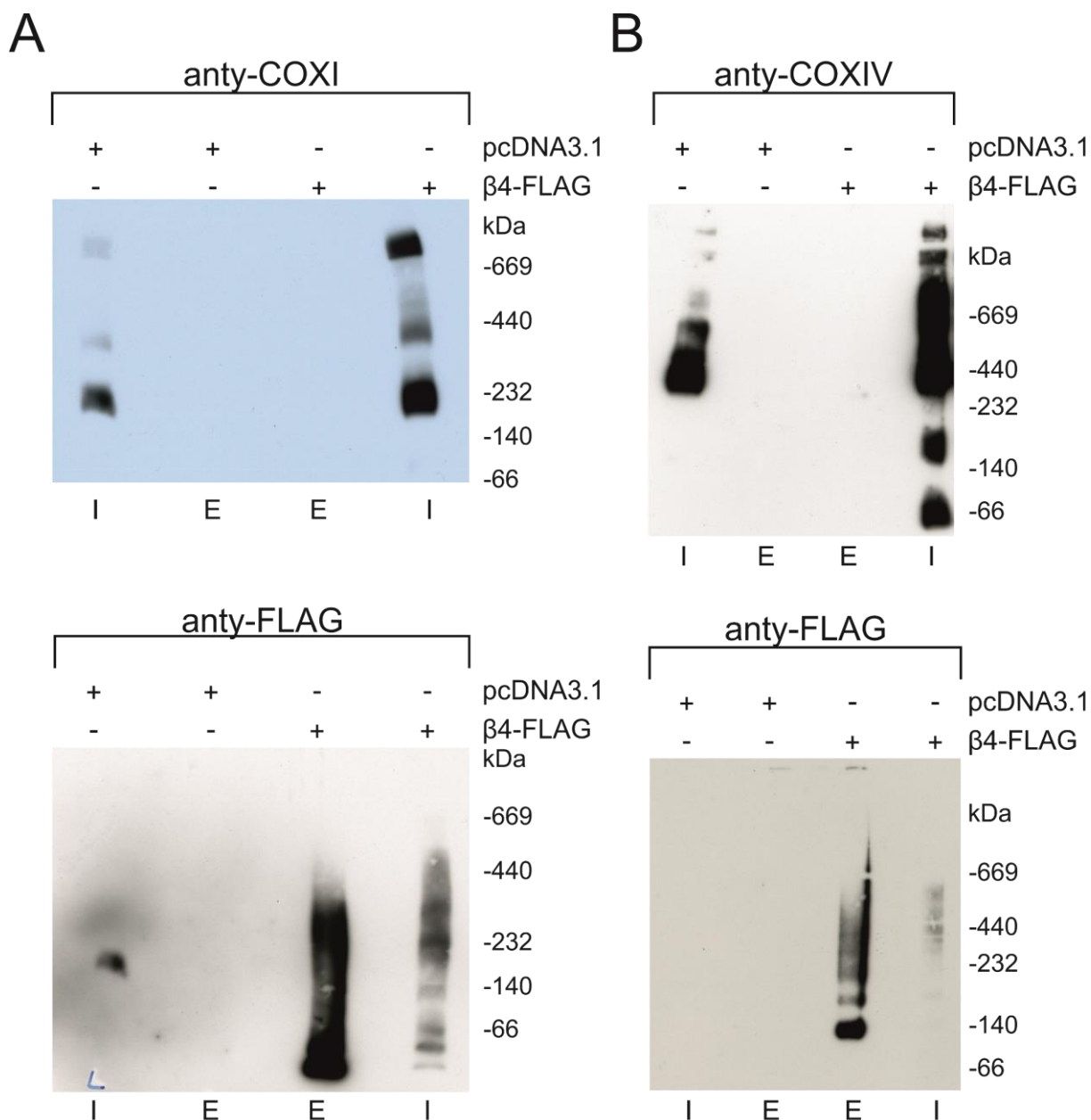
Poprzednie doświadczenia potwierdziły możliwość wykonania doświadczeń koimmunoprecypitacji podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> po transfekcji w komórkach HEK293T. W następnej kolejności wykonano eksperymenty mające na celu zweryfikowanie hipotezy o interakcji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z podjednostkami łańcucha oddechowego, co było sugerowane poprzednio. W związku tym komórki przejściowo transfekowano plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4-FLAG oraz plazmidem pcDNA3.1, po czym izolowano frakcje wzbogacone w mitochondria. W następnej kolejności przeprowadzono izolację kompleksów białkowych wykorzystując złożę anti-FLAG. Do solubilizacji frakcji mitochondrialnych wykorzystano bufor zawierający 1% digitoninę. Kompleksy związane ze złożem eluowano wykorzystując peptyd FLAG, a uzyskane frakcje analizowano techniką Western blot z wykorzystaniem elektroforezy Tricine SDS-PAGE oraz elektroforezy Blue-Native.

W przypadku elektroforezy Tricine SDS-PAGE analizowano obecność kilku podjednostek oksydazy cytochromu c (COXI oraz COXIV) oraz dehydrogenazy bursztynianowej (SDHA). Przykładowy wynik tych doświadczeń zaprezentowano na rycinie 50 B. Podobny wynik otrzymano dla eksperymentów zakończonych znakowaniem membrany przeciwciałami wobec kompleksu III łańcucha oddechowego: anti-Core1 (Rycina 50 A). W celu wyznaczenia poszczególnych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego zastosowano przeciwciała anti-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804); anti-Core1 (mysie, 1:1000, Abcam, ab14745, anti-COXI (mysie, 1:2000, Invitrogen, 459600, Klon 1D6E1A8); anti-SDHA (królicze, 1:1000, Abcam, Ab137040) oraz anti-COXIV (królicze, 1:1000, Cell Signaling, 4844C). W uzyskanych próbkach po elucji peptydem FLAG stwierdzono brak tych podjednostek w elucji lub niespecyficzne wiązanie się podjednostek łańcucha oddechowego (obecność we frakcji uzyskanej po transfekcji plazmidem pcDNA3.1) i brak wzbogacenia we frakcjach zawierających białko  $\beta$ 4-FLAG. Podobny wynik uzyskano kilkakrotnie co sugeruje brak bezpośredniej trwałej interakcji badanych białek z podjednostką  $\beta$ 4. Na rycinie 50 A próbki znakowano równolegle na dwóch membranach anti-FLAG (panel górny) oraz przeciwciałami wobec kompleksu IV i III łańcucha oddechowego (panel dolny).



**Rycina 50 Analiza Western blot interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG z podjednostkami łańcucha oddechowego po elektroforezie Tricine SDS-PAGE.** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmid pcDNA3.1 (pcDNA3.1) oraz plazmid kodującym podjednostkę  $\beta$ 4-FLAG. Zastosowanie buforu do płukania zawierającego digitoninę. Panel A) – analiza obecności wybranych podjednostek kompleksu I oraz III. Panel B) – analiza obecności w elucjach wybranych podjednostkę kompleksu II oraz IV (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożo magnetyczne anty-FLAG . (U) frakcja zawierająca część próbki, która nie uległa związaniu ze złożem magnetycznym . (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG - eluat. Zdjęcie klisz z „+” – transfekcja, „-” – brak transfekcji. Stężenie białka we frakcjach I oraz U stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji.

W przypadku zastosowania elektroforezy Blue Native potencjalne kompleksy znakowano przeciwciałami rozpoznającymi wybrane podjednostki kompleksu IV (COXI Rycina 51 panel A, górne zdjęcie, oraz COXIV, Rycina 51 panel B, górne zdjęcie). Następnie, po inkubacji membran w buforze umożliwiającym usunięcie przeciwciał, membrany barwiono przeciwciałem anty-FLAG w celu weryfikacji izolacji kompleksów tworzonych przez białko  $\beta$ 4-FLAG (Rycina 51 panele A i B, dolne zdjęcia). Na załączonym zdjęciu w przypadku membrany uprzednio barwionej przeciwciałem anty-COXI we frakcji I (input) widać pozostałość sygnału białka COXI. Co istotne, mimo obecności w eluowanych frakcjach kompleksów białka  $\beta$ 4 nie wykryto sygnału pochodzącego z oksydazy cytochromu *c*. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi po elektroforezie Tricine SDS-PAGE opisywanymi wyżej.

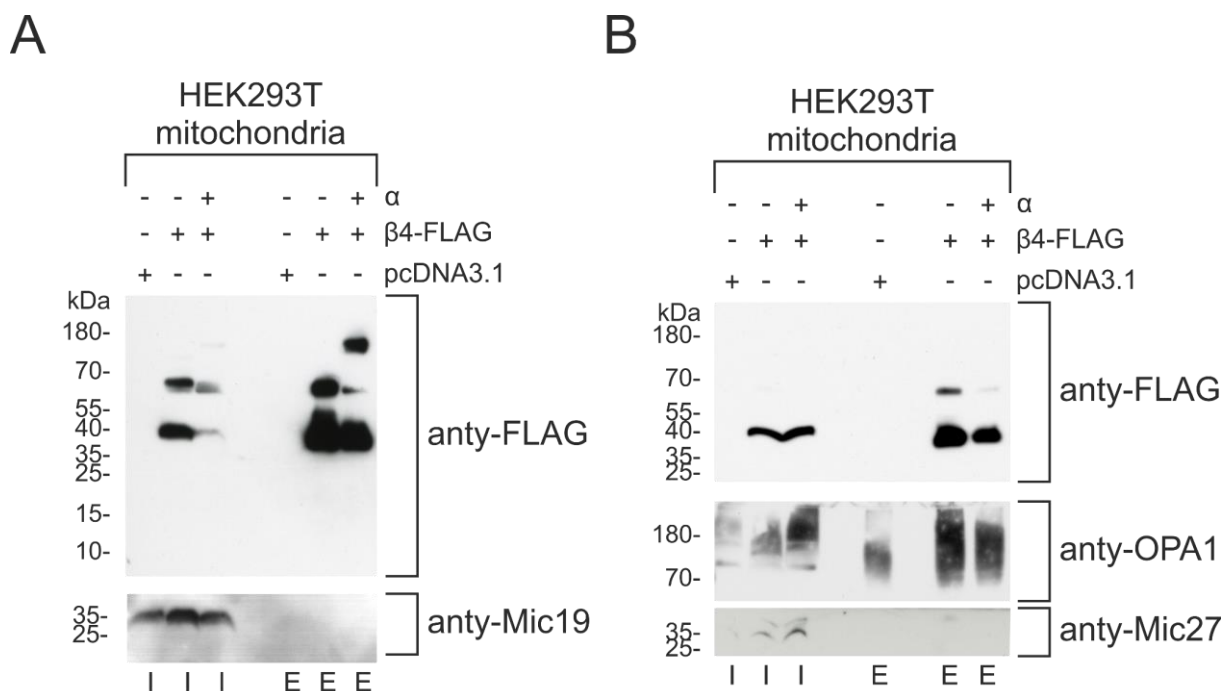


**Rycina 51 Analiza Western blot interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG z podjednostkami łańcucha oddechowego (po elektroforezie Blue Native PAGE).** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1) lub plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG ( $\beta$ 4-FLAG). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożę magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Zdjęcie kliszy ze znakowania immunologicznego przeciwciałem anty-COXIV (królicze, 1:1000, Cell Signaling, 4844C), anty-COXI (mysie, 1:2000, Invitrogen, 459600, Klon 1D6E1A8) oraz anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804); Stężenie białka we frakcjach I oraz U stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji. „+” – transfekcja, „-” – brak transfekcji.

W ostatniej części pracy głównym zadaniem była weryfikacja wybranych potencjalnych interakcji zidentyfikowanych dzięki eksperymentom z wykorzystaniem biotynylacji.

Na wstępie wytypowano kilka białek mitochondrialnych tworzących kompleks MICOS. Wyniki biotynylacji zasugerowały, że w pobliżu podjednostki  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> mogą znajdować

się komponenty tego kompleksu. Kompleks MICOS odpowiedzialny jest m. in. za regulację pofałdowań mitochondrialnej błony wewnętrznej. Białko Mic19 kompleksu MICOS było wzbogacone we wszystkich 4 próbkach mitochondrialnych przebadanych po biotynylacji za pomocą spektrometrii mas. Białko Mic27 (27 kDa) było zidentyfikowane jedynie w próbce ekspresjonującej  $\beta$ 4-FLAG-TurboID. Aby zweryfikować te obserwacje wykonano serię koimmunoprecypitacji białka  $\beta$ 4-FLAG po izolacji frakcji mitochondrialnych z komórek HEK293T po przejściowej transfekcji konstruktem kodującym tę podjednostkę. Barwienia na obecność podjednostek Mic19 i Mic27 nie wykazały ich obecności w uzyskanych eluatach (Rycina 52). Wyznakowano również białko OPA1 (GTPaza dynamino-podobna, ang. *optic atrophy 1*) ze względu na jego bliskość względem kompleksu MICOS oraz jego znaczenie w utrzymaniu morfologii mitochondriów. Jedynie barwienie na obecność białka OPA1 wykazało lekkie wzbogacenie w frakcjach elucji uzyskanych z komórek transfekowanych białkiem  $\beta$ 4-FLAG. Jednakże w białko OPA1 widoczne było także we elucji uzyskanej z komórek transfekowanych plazmidem kontrolnym (pcDNA3.1) (Rycina 52 B). Uzyskane wyniki nie wskazują, aby podjednostka  $\beta$ 4 tworzyła trwałe kompleksy z elementami kompleksu MICOS, a potencjalna interakcja może być przejściowa. Potwierdzenie tej potencjalnej interakcji wymaga weryfikacji innymi metodami badawczymi.



**Rycina 52 Analiza Western blot interakcji białka β4-FLAG z podjednostkami kompleksu MICOS.** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmid pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmid kodującym podjednostkę β4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG (β4-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę α (α). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożę magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Zdjęcia klisz ze znakowania immunologicznego przeciwciałami anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804); anty-Mic19 (królicze, 1:8000, Proteintech, 25625-1-AP); anty-OPA1 (mysie, 1:2000, BD Transduction Laboratories, 612607) oraz anty-Mic27 (królicze, 1:1000, Abxexa, abx027862). „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji.

Na podstawie wyników biotynylacji wytypowano kilka białek potencjalnie wchodzących w interakcje z podjednostką β4, których interakcje spróbowano potwierdzić za pomocą koimmunoprecypitacji. Kryterium przy selekcji potencjalnych partnerów była rola transportowa wymienionych białek, lokalizacja oraz poprzednie informacje dotyczące interakcji z kanałami typu BK<sub>Ca</sub>. Sumaryczne podsumowanie uzyskanych danych zaprezentowano na rycinie 53.

Pierwszym białkiem testowanym w tej serii doświadczeń był transporter z wewnętrznej błony mitochondrialnej SLC25A3 (ang. *Solute carrier family 25 member 3*). Białko to odpowiedzialne jest za transport jonów miedzi lub fosforanów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej do macierzy mitochondrialnej [242]. Uległo ono wzbogaceniu w 2 z 4 próbek badanych. Niemniej analiza Tricine SDS-PAGE Western blot nie wykazała koimmunoprecypitacji tego białka z białkiem β4-FLAG. W 3 powtórzeniach nie obserwowano w sygnale w elucji (Rycina 53, panel A).

Kolejno w tym bloku doświadczeń testowana była interakcja z hemoksygenazą 2 (HMOX2, ang. *heme oxygenase 2*), która lokalizująca się głównie w siateczce

śródpłazmatycznej [243-246]. Wyniki biotynylacji pokazały wzbogacenie tego białka we wszystkich powtórzeniach próbki mitochondrialnej  $\beta$ 4-FLAG-TurboID oraz w 2 na 3 powtórzeniach próbki całokomórkowej. Interakcje między kanałem BK<sub>Ca</sub> a hemoksygenazą 1 i 2 była opisywana poprzednio [175]. W przeprowadzonych doświadczeniach nie wykryto trwałej interakcji natywnego białka HMOX2 z podjednostką  $\beta$ 4-FLAG (Rycina 53, panel B). Do barwienia białka wykorzystano przeciwciało anti-HMOX2 (królicze, 1:500) firmy Proteintech, 14817-1-AP.

Kolejnym białkiem, którego oddziaływanie z podjednostką  $\beta$ 4 było zweryfikowane w pracy było białko CLAC (ang. *Calcium load-activated calcium channel*) kodowane przez gen *TMCO1*. Białko to jest zlokalizowane w błonie siateczki śródpłazmatycznej i opisywane jest jako potencjalny kanał wapniowy oraz jako element systemu importu białek do ER [247, 248]. W próbkach mitochondrialnych zaobserwowano unikatową biotynylację tego białka 3-krotnie na 4 powtórzenia, a próbce całokomórkowej raz. Pomimo kilku prób nie udało się zaobserwować trwałego oddziaływania tego białka z podjednostką  $\beta$ 4 (Rycina 53, panel C). Do barwienia białka wykorzystano przeciwciało anti-CLAC (królicze, 1:1000) firmy Proteintech, 27757-1-AP. Na rycinie 53 C przedstawiono barwienie anti-FLAG, które zostało wykorzystane na rycinie 52 B, ze względu na to, że oba barwienia pochodzą z jednego doświadczenia.

Kolejnym testowanym białkiem było NKCC1, kotransporter jonów sodowych, potasowych i chlorkowych (ang. *sodium potassium chloride cotransporter 1*). Wzbogacenie występowało w próbce zawierającej frakcję mitochondrialną oraz w próbce całokomórkowej. NKCC1 kodowane jest przez gen *SLC12A2*. Białko pojawiło się w 2 powtórzeniach w 4 eksperymentach opartych na koimmunoprecypitacji (Rycina 53, panel D). Przeciwciało anti-NKCC1 (królicze, 1:2000, Proteintech, 13884-1-AP) uwidaczniało słabe prążki w eluacie próbek  $\beta$ 4-FLAG oraz  $\beta$ 4-FLAG/ $\alpha$  na wysokości ok 100-130 kDa.

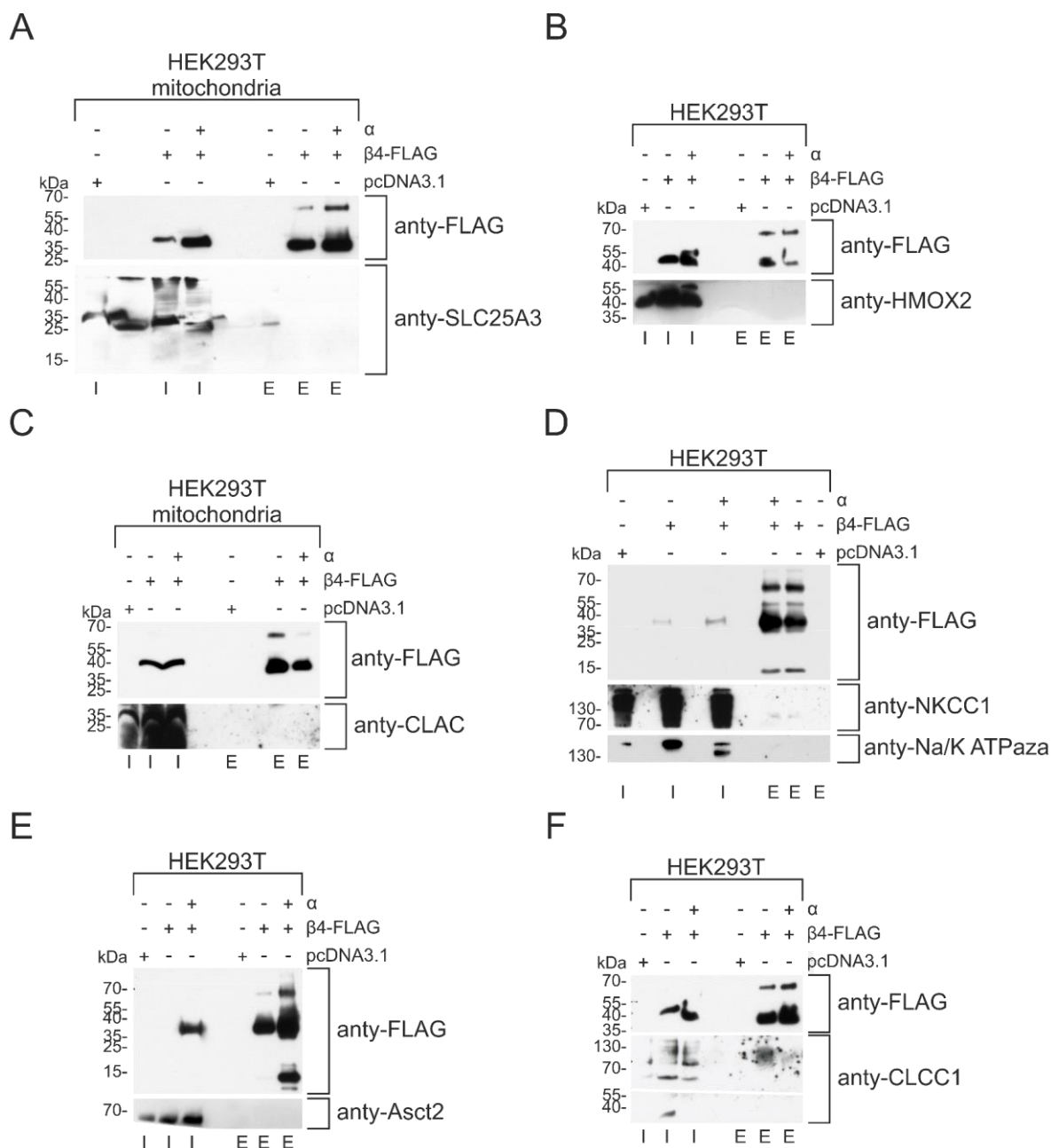
W następnej kolejności zweryfikowano interakcję między  $\beta$ 4 a dwoma białkami błony plazmatycznej pompą sodowo-potasową (ang. *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*) oraz transporterem SLC1A5. Pompa sodowo-potasowa kodowana jest przez gen *ATP1A1* i jest odpowiedzialna za wymianę jony K<sup>+</sup> na Na<sup>+</sup> w poprzek błony plazmatycznej. W eksperymentach z użyciem ligazy TurboID pompa sodowo-potasowa ulegała wyraźnemu wzbogaceniu zarówno w próbkach mitochondrialnych jak i z całych komórek. W wyniku koimmunoprecypitacyjnego oczyszczania białek nie obserwowano sygnału w 2 kolejnych powtórzeniach (Rycina 53,

panel D). W tej analizie zastosowano przeciwciało anti-Na/K ATPaza (mysie, 1:1000) firmy Abcam, ab7671.

Następnie zweryfikowano interakcję podjednostki  $\beta 4$  z transporterem SLC1A5 (ang. *Neutral amino acid transporter B(0)*), inaczej znanym jako transporter ASCT2, który jest kodowany przez gen *SLC1A5*. Białko to jest trimerem odpowiedzialnym za import glutaminy do wnętrza komórek i jest nadekspresjonowany w komórkach nowotworowych [249]. Transporter SLC1A5 był wzbogacony we wszystkich próbkach zawierających  $\beta 4$ -FLAG-TurboID niezależnie od frakcji komórkowej. Jednakże w badaniach koimmunoprecypitacyjnych nie obserwowano elucji w 5 kolejnych powtórzeniach (Rycina 53, panel E). W analizie wykorzystano przeciwciało anti-Asct2 (królicze, 1:2000) firmy Proteintech, 20350-1-AP.

Ostatnim testowanym białkiem w tej serii było białko CLCC1 (ang. *chloride channel CLIC-like protein 1*). Białko to uległo biotynylacji przez  $\beta 4$ -FLAG-TurboID w próbce z całych komórek oraz z frakcji mitochondrialnej. W analizie całokomórkowej białko to nie było biotynylowane we frakcjach kontrolnych. Przeprowadzone koimmunoprecypitacje eksperymenty wykazały obecność tego białka we frakcjach elucji w 1 z 3 powtórzeń (Rycina 53, panel F). W analizie wykorzystano przeciwciało anti-CLCC1 (królicze, 1:3000), firmy Proteintech, 26680-1-AP. Na rycinie 53 F przedstawiono barwienie anti-FLAG, które zostało wykorzystane na rycinie 49 A, ze względu na to, że oba barwienia pochodzą z jednego doświadczenia.





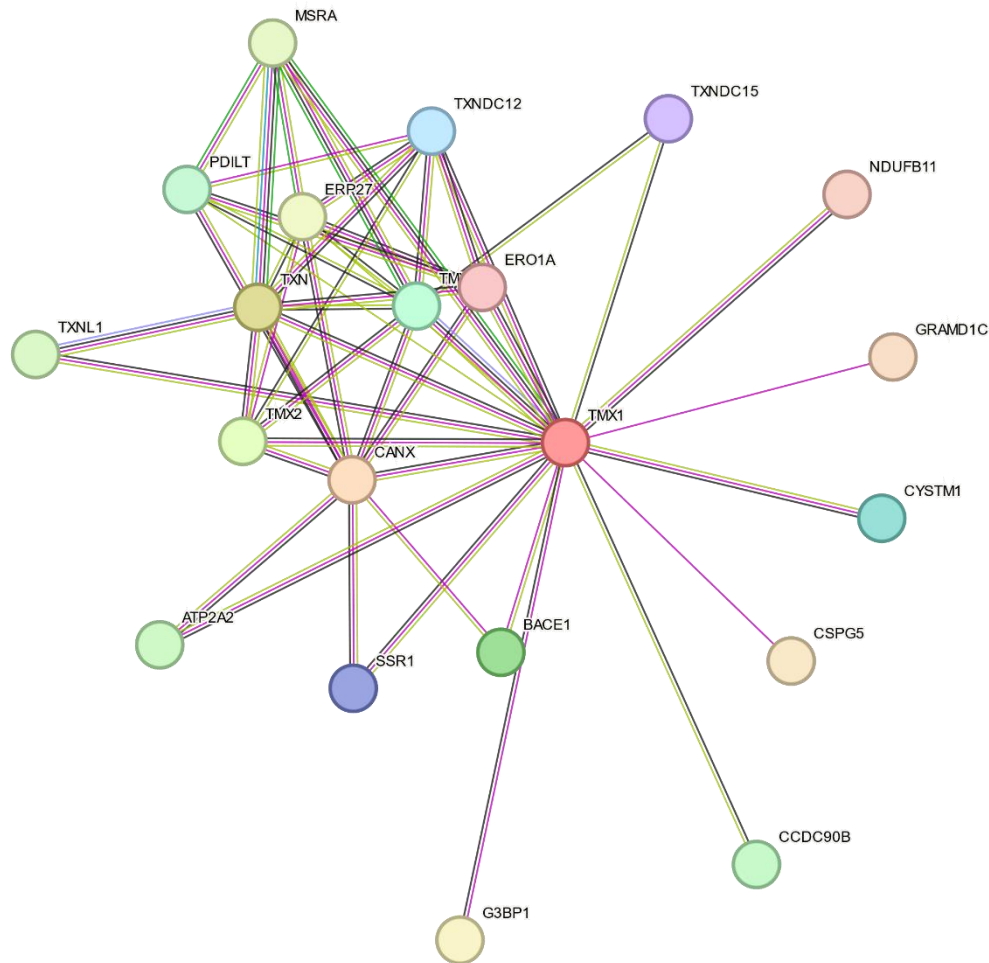
**Rycina 53 Analiza Western blot potencjalnych, wybranych interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG.** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG ( $\beta$ 4-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$  ( $\alpha$ ). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złoże magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji.

Podsumowując, powyższe wyniki koimmunoprecypitacji nie dostarczyły wystarczających dowodów na jednoznaczne potwierdzenie interakcji podjednostki  $\beta$ 4 z wytypowanymi białkami. Dalsze badania z wykorzystaniem alternatywnych metod są niezbędne do weryfikacji tych interakcji.

### 6.2.7 Identyfikacja oddziaływania kanałów typu BK<sub>Ca</sub> z białkiem TMX1

Ostatnim białkiem, którego potencjalna interakcja z podjednostką  $\beta_4$  była weryfikowana za pomocą koimmunoprecypitacji było błonowe białko TMX1 (ang. *Thioredoxin-related transmembrane protein 1*). Białko TMX1 w analizie spektrometrii mas w eksperymentach z wykorzystaniem ligazy TurboID wykazało wzbogacenie w próbce mitochondrialnej. Odnotowano go w każdym z 4 powtórzeń eksperymentów TurboID. Co więcej był to unikatowy wynik dla próbki  $\beta_4$ -FLAG-TurboID w badaniach biotynylowanych białek dla próbek całokomórkowych (3 z 3 powtórzeń). Biotynylacji uległy także inne białka typu TMX. Tioredoksyna była wzbogacona w próbkach całokomórkowych, białko TMX2 znajdowały się na listach białek unikatowych zarówno w próbce całokomórkowej, jak i wzbogaconej w mitochondria, a białko TMX4 na liście białek unikatowych w próbce wzbogaconej w mitochondria. Wynik spektrometrii mass dla tioredoksyny świadczył o niewielkim stopieniu wzbogacenia. Białko TMX2 wystąpiło w 1 z 3 powtórzeń dla próbek całokomórkowych i 2 z 4 powtórzeń dla próbek wzbogaconych w mitochondria. Białko TMX4 wystąpiło zaledwie w 2 z 4 powtórzeń dla próbek wzbogaconych w mitochondria. Ze względu na restrykcyjne kryterium wyboru wszystkich białek unikatowych nie kontynuowano badań pod kątem interakcji podjednostki  $\beta_4$  kanału BK<sub>Ca</sub> z białkami tioredoksyny, TMX2 oraz TMX4.

Na wstępie badania interakcji podjednostki  $\beta_4$  z białkiem TMX1 przeprowadzono analizę sieci powiązań białka TMX1 z innymi białkami z wykorzystaniem bazy STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <https://string-db.org>). Na schemacie zaprezentowano pierwsze 20 interakcji z największym prawdopodobieństwem wystąpienia.



**Rycina 54 Schemat potwierdzonych i przewidywanych oddziaływań białka TMX1 na podstawie bazy STRING (<https://string-db.org>). Krawędzie wskazują zarówno funkcjonalne, jak i fizyczne powiązania między białkami. W analizie pokazano 20 interakcji z największym prawdopodobieństwem (score). Linie w kolorze niebieskim i fioletowym oznaczają interakcje potwierdzone (na podstawie baz danych oraz eksperymentów). Linie w kolorze zielonym i czerwonym i ciemnoniebieskim oznaczają przewidywane interakcje.**

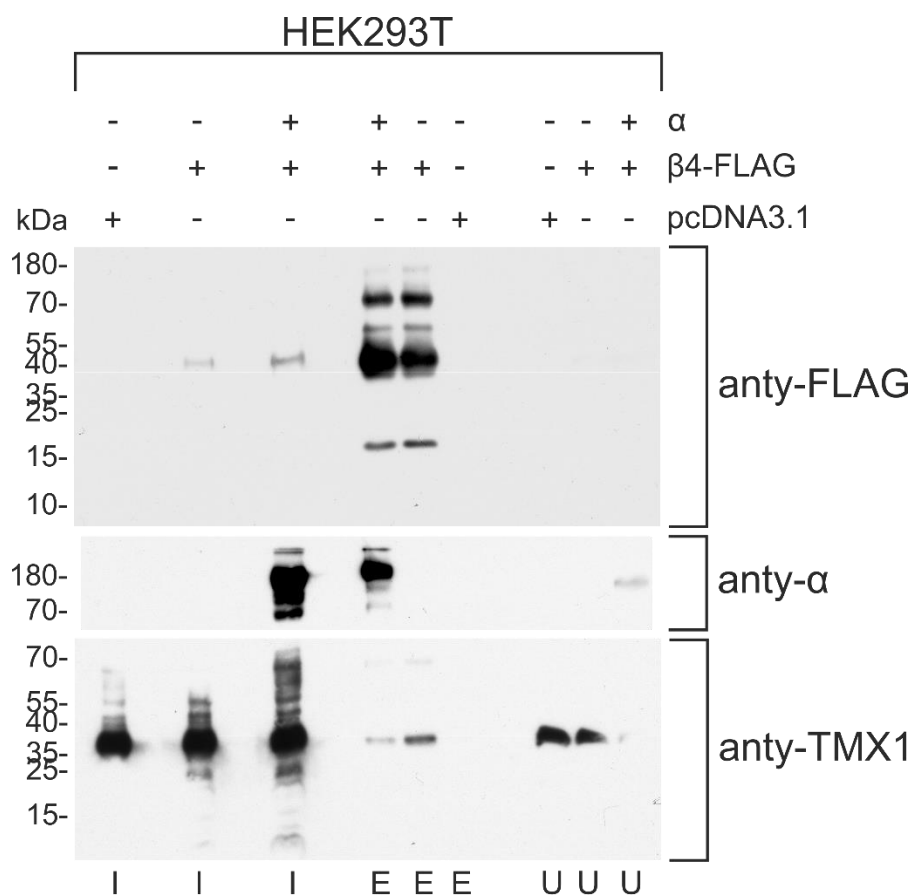
W tabeli 8 zaprezentowano listę białek z ryciny 54 ułożonych według malejącego wskaźnika **score**, czyli liczbowego wskaźnika, który określa wiarygodność przewidywanych interakcji między białkami. Jest on obliczany na podstawie różnych źródeł danych i metod analizy. Białka, które zostały wytypowane w tej analizie zlokalizowane są w siateczce śródplazmatycznej, a część to białka mitochondrialne. Warto zauważyć, że białko TMX1 oddziałuje ze wcześniej wspomnianymi białkami tioredoksyną oraz TMX2. Na liście nie ma za to kanału BK<sub>Ca</sub>. Niemniej postanowiono zweryfikować interakcję pomiędzy białkiem TMX1 oraz podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub>.

**Tabela 8 Lista białek oddziałujących z białkiem TMX1 wg. bazy danych STRING.**

Symbol białka	Angielska nazwa białka	Score
CANX	Calnexin;	0.872

TXN	Thioredoxin;	0.858
TMX2	Thioredoxin related transmembrane protein 2.	0.792
BACE1	Beta-secretase 1;	0.604
TMX3	Protein disulfide-isomerase TMX3;	0.579
CYSTM1	Cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein 1;	0.574
TXNDC12	Thioredoxin domain-containing protein 12;	0.557
SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha;	0.541
TXNDC15	Thioredoxin domain-containing protein 15;	0.540
ERO1A	ERO1-like protein alpha;	0.518
NDUFB11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial;	0.516
GRAMD1C	Protein Aster-C;	0.515
CSPG5	Chondroitin sulfate proteoglycan 5;	0.512
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1;	0.499
ERP27	Endoplasmic reticulum resident protein 27;	0.485
MSRA	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase;.	0.483
TXNL1	Thioredoxin-like protein 1;	0.481
ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2;	0.478
CCDC90B	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial; Coiled-coil domain containing 90B.	0.470
PDILT	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis;	0.457

Koimmunoprecypitacja natywnych partnerów z białkiem  $\beta$ 4-FLAG wykazała obecność TMX1 w elucjach po inkubacji ze złożem anty-FLAG specyficznie w próbkach izolowanych z komórek transfekowanych plazmidem  $\beta$ 4-FLAG oraz kotransfekowanych plazmidami  $\beta$ 4-FLAG i  $\alpha$ -VEDEC (Rycina 55). Rycina przedstawia barwienie membrany uzyskanej po elektroforezie w warunkach denaturujących z wykorzystaniem żelu Tricine SDS-PAGE. Podobny wynik uzyskano w 4 niezależnych izolacjach. TMX1 nie uległo oczyszczeniu w próbce kontrolnej po ekspresji plazmidu pcDNA3.1. Na rycinie 55 przedstawiono barwienie anty-FLAG, które zostało wykorzystane na rycinie 53 D, ze względu na to, że oba barwienia pochodzą z jednego doświadczenia.

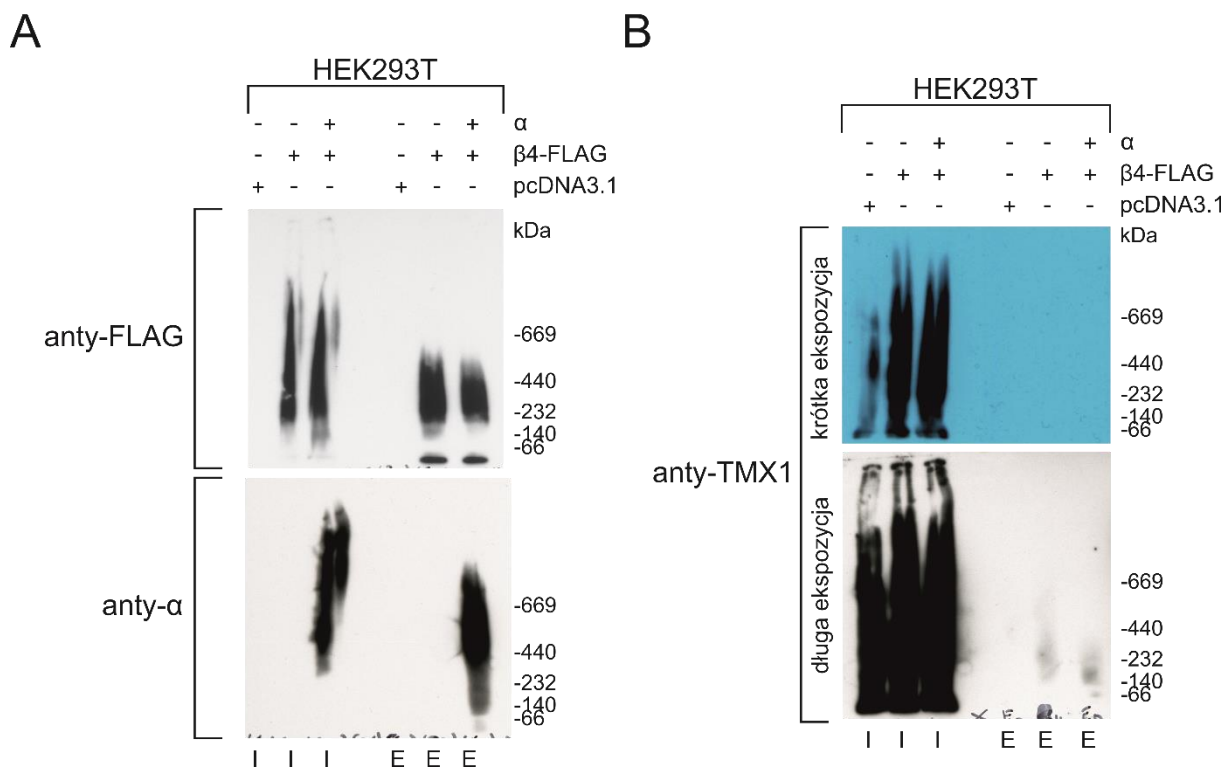


Intup (I) and unbund (U) 79,815ug each. Elution(E) 798ug  
Nowe PEI

**Rycina 55 Analiza Western blot interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG z natywnym białkiem TMX1.** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG ( $\beta$ 4-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$  ( $\alpha$ ). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożo magnetyczne anty-FLAG. (U) frakcja zawierająca część próbki, która nie uległa związaniu ze złożem magnetycznym. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Zdjęcie klisz z wyznakowania immunologicznego przeciwciałem anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804); anty-TMX1 (królicze, 1:5000, Proteintech, 27489-1-AP), 31 kDa. n=4 „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji. Stężenie białka we frakcjach I oraz U stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji.

W kolejnych doświadczeniach podjęto próbę identyfikacji natywnych kompleksów tworzonych przez białko TMX1 i podjednostkę  $\beta$ 4 z wykorzystaniem Blue Native-PAGE. W pierwszej kolejności komórki HEK293T przejściowo transfekowano plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG ( $\beta$ 4-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$  ( $\alpha$ ). Komórki solubilizowano i oczyszczono na złożu anty-FLAG, a otrzymane frakcje analizowano z wykorzystaniem elektroforezy Blue Native. W tym celu próbki nałożono na ciągły żel gradientowy 4-10% (bez żelu zagęszczającego) i przeprowadzono elektroforezę, po czym wykonano transfer z żelu na membranę PVDF.

Po wykonaniu transferu na membranę PVDF wykonano znakowanie przeciwciałem anti-FLAG oraz anti- $\alpha$  w celu wykrycia podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> w badanych frakcjach. Przykładowy wynik przedstawiono na rycinie 56 A. Uzyskane barwienia wykazały rozciągnięty sygnał, który nie układał się w klarowne prążki. W przypadku barwienia przeciwciałem anti-FLAG sygnał był wykrywalny we frakcjach, w których występowało białko  $\beta$ 4, a sygnał anti- $\alpha$  jedynie we frakcji uzyskanej z komórek transfekowanych plazmidem kodującym podjednostkę VEDEC. Trzeba zauważyć, że wykryty sygnał nie tworzył klarownych prążków i był rozciągnięty. Kolejno membranę znakowano przeciwciałem anti-TMX1 (Rycina 56 B). W wyniku znakowania zidentyfikowano bardzo intensywny sygnał we frakcjach I (input) prawdopodobnie odpowiadający natywnym kompleksom białka TMX1. Jednak sygnał był rozciągnięty na dużą część ścieżki i nie tworzył wyraźnych prążków. Dłuższa ekspozycja pozwoliła na uwidocznienie prążków o niskiej intensywności w elucji jedynie w ścieżkach zawierających białko  $\beta$ 4-FLAG. Możliwe jest, że sygnał ten pochodzi z kompleksów  $\beta$ 4-FLAG-TMX1.



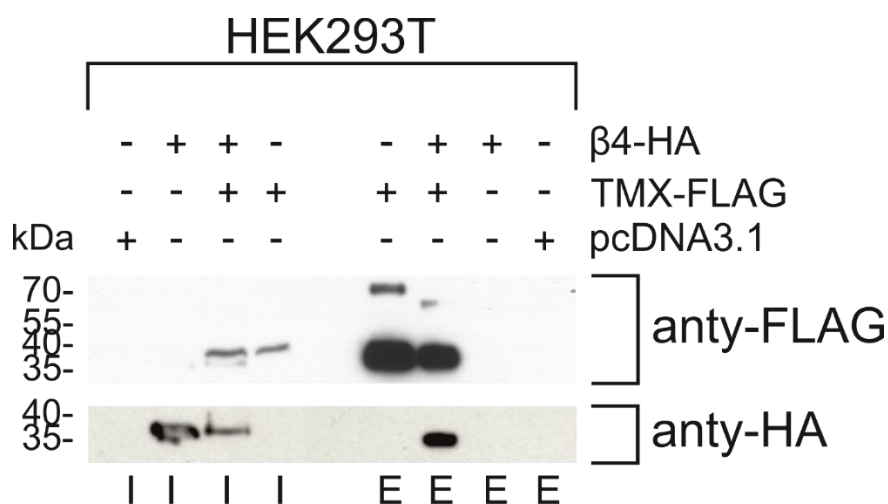
**Rycina 56 Analiza Western blot interakcji białka β4-FLAG z natywnym białkiem TMX1 po elektroforezie Blue Native.** Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę β4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką FLAG (β4-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę α (α). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożo magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. W analizie zastosowano przeciwciała anty-α (mysie, 1:200, NeuroMab, L6/60); anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804) oraz anty-TMX1 (królicze, 1:5000, Proteintech, 27489-1-AP). „+” – transfekcja, „-” – brak transfekcji. Stężenie białka we frakcjach I stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji.

W celu potwierdzenia interakcji białka TMX1 z podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> postanowiono wykonać koimmunoprecypitację z wykorzystaniem metkowanego białka TMX1. W tym celu zakupiono plazmid kodujący białko TMX1 (ORIGENE). Plazmid ten podobnie jak plazmid kodujący białko β4 na C-końcu koduje metki MYC i FLAG. Uniemożliwiało to wykonanie koimmunoprecypitacji w oparciu o metkę FLAG w celu potwierdzenia interakcji (oba białka wiązałyby się do złoża anty-FLAG). Aby rozwiązać ten problem postanowiono wykonać wymianę metki FLAG w podjednostce β4 na metkę HA (cząsteczka hemaglutyniny (HA) wirusa grypy ludzkiej odpowiadająca aminokwasom 98-106). W związku z tym zastosowano technikę klonowania molekularnego bez wykorzystania enzymów restrykcyjnych (tzw. quickchange) polegającą na jednoczesnej delecji metki FLAG i insercji metki HA. Do zaplanowanych eksperymentów wykorzystano startery zaprezentowane

w tabeli 2. Startery zaprojektowano wykorzystując algorytm firmy TakaraBio. Prawidłowość uzyskanej wymiany sekwencji potwierdzono sekwencjonowaniem DNA.

Następnie komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano odpowiednimi plazmidami w celu uzyskania ekspresji białka TMX1-FLAG oraz  $\beta$ 4-HA i wykonania koimmunoprecypitacji potencjalnych kompleksów  $\beta$ 4-HA oraz TMX1-FLAG.

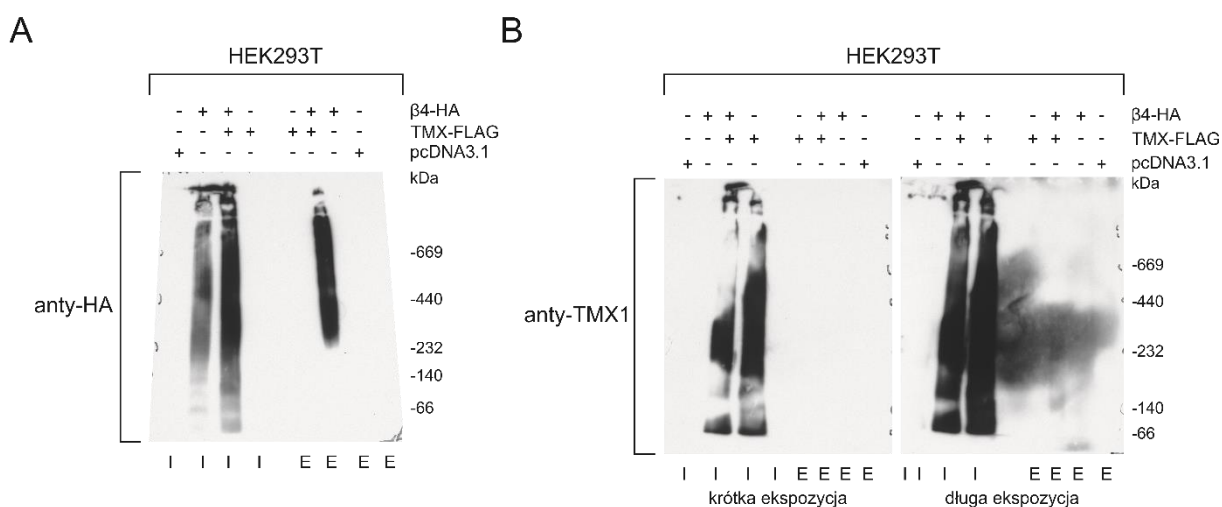
Komórki solubilizowano i białka oczyszczono koimmunoprecypitacyjne na złożu anty-FLAG. Następnie przeprowadzono elektroforezę Tricine SDS-PAGE lizatów całokomórkowych, a następnie transfer białek na membranę PVDF. Membrany znakowano immunologicznie przeciwciałem rozpoznającym metkę HA (podjednostka  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub>) oraz FLAG (białko TMX1). Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, iż podjednostka  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> ulega koimmunoprecypitacji z białkiem TMX (Rycina 57). W wyniku znakowania uwidoczniły się prążki wielkości około 35-40 kDa we frakcjach zawierających zsolubilizowane próbki  $\beta$ 4-HA, przed podaniem na złoże magnetyczne anty-FLAG. Zaobserwowano również prążek wielkości około 35-40 kDa w elucji próbki TMX-FLAG kotransfekowanej  $\beta$ 4-HA. Tym samym potwierdzono interakcje między tymi białkami z wykorzystaniem białka TMX1 jako białka „przynęty” (ang. *bait*).



**Rycina 57 Analiza Western blot interakcji białka  $\beta$ 4-FLAG z białkiem TMX1.** Białka oczyszczono koimmunoprecypitacyjnie względem metki FLAG. Komórki HEK293T przejściowo transfekowano plazmidami: pcDNA3.1,  $\beta$ 4-HA i/lub TMX-FLAG. (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złoże magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Białka znakowano immunologicznego przeciwciałem anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804) oraz anty-HA (mysie, 1:2000, Sigma, H9658). Stężenie białka we frakcjach I stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji, n=3.



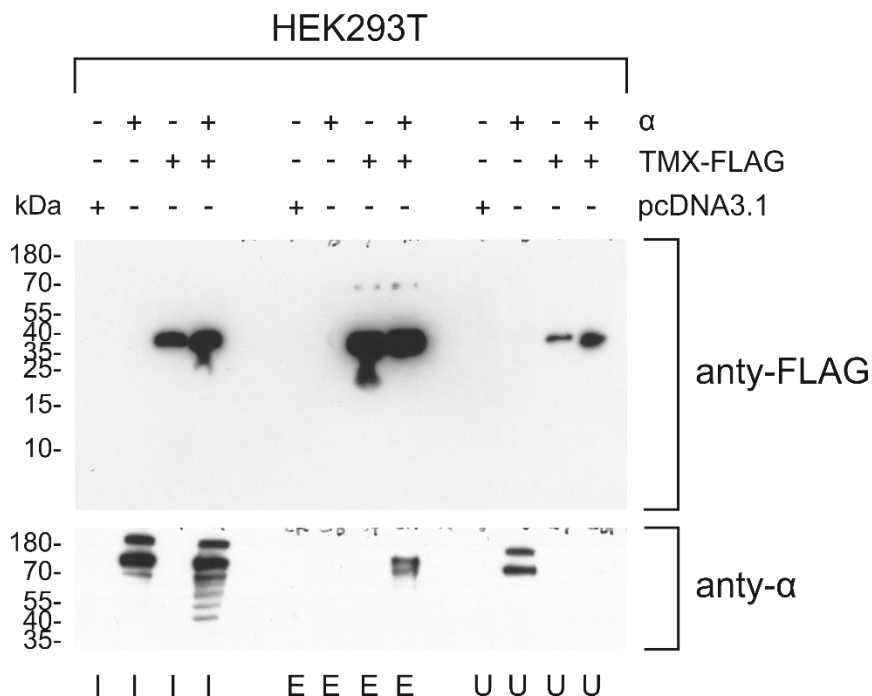
Następnie po przeprowadzeniu przejściowej transfekcji komórek HEK293T plazmidami kodującym białko TMX1-FLAG oraz  $\beta$ 4-HA oraz koimmunoprecypitacji, kompleksy rozdzielono na żelu Blue Native-PAGE. Białko TMX1 oczyszczono z próbki całokomórkowej koimmunoprecypitacyjnie na złożu rozpoznającym metkę FLAG, a następnie znakowano  $\beta$ 4-HA przeciwciałem anti-HA (Rycina 58 A). Analogicznie podjednostką  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> oczyszczono na złożu rozpoznającym metkę HA, a następnie znakowano TMX1-FLAG przeciwciałem anti-TMX1 (Rycina 58 B). Niestety w elucji sygnał białka TMX1 był niewyraźny.



**Rycina 58** Analiza techniką Blue Native-PAGE białek po koimmunoprecypitacyjnym oczyszczaniu na metkę FLAG. Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym podjednostkę  $\beta$ 4 kanału BK<sub>Ca</sub> wraz z metką HA ( $\beta$ 4-HA) oraz plazmidem kodującym białko TMX1 wraz z metką FLAG (TMX-FLAG). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożo magnetyczne anti-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anti-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. A) Zdjęcie klisz z wyznakowania immunologicznego anti-HA (mysie, 1:2000, Sigma, H9658) po oczyszczeniu na złożu anti-FLAG. B) Zdjęcie klisz z wyznakowania immunologicznego anti-TMX1 (królicze, 1:5000, Proteintech, 27489-1-AP) po oczyszczeniu na złożu anti-HA (krótka oraz długa ekspozycja). Stężenie białka we frakcjach I stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji.

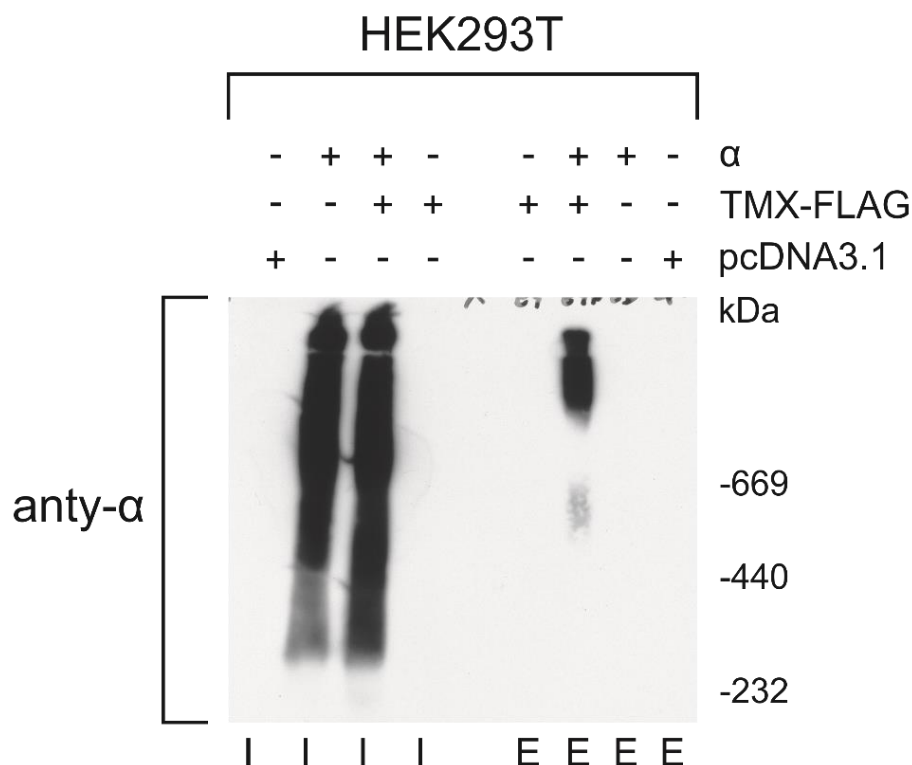
Ostatnie przeprowadzone doświadczenia miały odpowiedzieć na pytanie czy białko TMX1 oddziałuje też z podjednostką  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>. W tym celu w komórkach HEK293T wykonano serię kotransfekcji plazmidami kodującymi białko VEDEC i TMX1-FLAG. Następnie wykonano serię koimmunoprecypitacji, a uzyskane frakcje analizowano metodą Western blot z wykorzystaniem elektroforezy Tris-Tricine SDS i Blue Native. Jak zaprezentowano na rycinie 59, analiza frakcji po elektroforezie w warunkach denaturujących wykazała jednoznacznie obecność podjednostki VEDEC we frakcji po kotransfekcji z białkiem TMX1 (Rycina 59). We frakcjach oznaczonych jako I (input) białko VEDEC było obecne

w dwóch próbkach ( $\alpha$  oraz  $\alpha$ +TMX1). Ponadto, we frakcji U (unbound) sygnał podjednostki  $\alpha$  nie był widoczny w próbkach  $\alpha$ +TMX1. Uzyskane wyniki jednoznacznie świadczą o powstawaniu kompleksów podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> z białkiem TMX1.



**Rycina 59 Analiza Western blot interakcji białka VEDEC z białkiem TMX1-FLAG po elektroforezie Tricine SDS-PAGE.** Na rycinie przedstawiono analizę próbek całokomórkowych po koimmunoprecypitacyjnym oczyszczeniu białek zawierających metkę FLAG. Komórki HEK293T przejściowo transfekowano plazmidami: pcDNA3.1, TMX-FLAG i/lub  $\alpha$ . (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na żel magnetyczny anty-FLAG. (U) Frakcja zawierająca część próbki, która nie uległa związaniu ze złożem magnetycznym. (E) Frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Zdjęcie kliszy ze znakowania immunologicznego przeciwciałem anty-FLAG M2 (mysie, 1:1000, Sigma, F1804) oraz przeciwciałem anty- $\alpha$  (1:200, NeuroMab, L6/60). Stężenie białka we frakcjach I stanowiło około 10% stężenia we frakcji elucji. n=3.

Następnie wykonano analizę uzyskanych frakcji z wykorzystaniem elektroforezy Blue Native. Barwienie membrany z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających podjednostkę  $\alpha$  wykazało obecność wielu kompleksów tej podjednostki o dużej masie (Rycina 60). Może to świadczyć o interakcji tetramerów podjednostek  $\alpha$  oraz kompleksów kanału BK<sub>Ca</sub> z białkiem TMX1. Wykonana analiza wykazała obecność niewielkiej frakcji kompleksów o niższej masie (między 440 a 669 kDa). Co istotne sygnał podjednostki  $\alpha$  w elucji był obecny jedynie we frakcji zawierającej białko TMX1 oraz  $\alpha$ . Uzyskane dane świadczą o tym, że oba typy podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> mogą oddziaływać z białkiem TMX1. Niemniej, w celu dokładniejszej analizy tych interakcji wymagane są dalsze badania szczegółowo analizujące oddziaływanie między tymi białkami oraz ich znaczenie fizjologiczne.



**Rycina 60** Analiza techniką Blue Native-PAGE kompleksów białkowych po koimmunoprecypitacyjnym oczyszczeniu na metkę FLAG. Komórki HEK293T WT przejściowo transfekowano następującymi plazmidami: pustym plazmidem pcDNA3.1 (pcDNA3.1), plazmidem kodującym białko TMX1 wraz z metką FLAG (TMX-FLAG) oraz plazmidem kodującym podjednostkę  $\alpha$  kanału BKCa ( $\alpha$ ). (I) frakcja zawierająca zsolubilizowaną próbkę, przed podaniem na złożo magnetyczne anty-FLAG. (E) frakcja zawierająca białka, które związały się ze złożem anty-FLAG, a następnie uległy elucji peptydem FLAG. Zdjęcie klisz z wyznakowaniem immunologicznym anty- $\alpha$  (1:200, NeuroMab, L6/60). Stężenie białka we frakcjach I stanowiło około 5% stężenia we frakcji elucji „+” – transfekcja, „-”, – brak transfekcji.

### 6.2.8 Podsumowanie

Podsumowując drugą część pracy można stwierdzić, że przeprowadzone eksperymenty wykazały potencjalne interakcje podjednostki  $\beta 4$  kanału BKCa z wieloma partnerami białkowym. Kluczowym narzędziem w tych badaniach było zastosowanie biotynylacji jako metody znakowania pobliskich białek oraz spektrometrii mas jako metody identyfikacji białek. Uzyskane interakcje podjednostki  $\beta 4$  dotyczyły białek znajdujących się w różnych przedziałach komórkowych, w tym w błonie plazmatycznej, siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach. Wśród wytypowanych interakcji potwierdzono oddziaływanie podjednostek kanału BKCa z białkiem TMX1. Białko to wchodzi w interakcje zarówno z podjednostką  $\alpha$  jak i  $\beta$  kanału BKCa. Rola tej interakcji pozostaje nieznana i wymaga dalszych badań.

## 7 Dyskusja

Niniejsza praca skupia się na dwóch głównych zagadnieniach związanych z funkcjonowaniem kanału BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach. Pierwszym było potwierdzenie hipotezy, że izoforma VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub> jest zdolna do formowania aktywnego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach. Badania te miały na celu wykazanie, że specyficzna izoforma  $\alpha$ , znana z lokalizacji mitochondrialnej, tworzy funkcjonalny kanał o charakterystycznych właściwościach elektrofizjologicznych.

Drugim zagadnieniem było zidentyfikowanie potencjalnych partnerów białkowych regulatorowej podjednostki  $\beta_4$  kanału BK<sub>Ca</sub> w organellach komórkowych, w tym mitochondriach komórek HEK293T. Podjednostka  $\beta_4$ , znana ze swojej roli modulacyjnej, została przebadana pod kątem możliwych interakcji z innymi białkami, w tym komponentami mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Analiza interakcji miała na celu dostarczenie potencjalnych nowych informacji pozwalających na lepsze zrozumienie roli kanałów BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub>.

Przeprowadzone badania dostarczają istotnych informacji na temat mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> oraz interakcji jego podjednostek, co może mieć znaczenie dla dalszych badań nad rolą tych białek w mitochondriach i innych przedziałach komórkowych.

### 7.1 Izofорма VEDEC może tworzyć kanał mitoBK<sub>Ca</sub>

Przez wiele lat, od odkrycia w mitochondriach wątroby pierwszego kanału potasowego, czyli kanału mitoK<sub>ATP</sub> [90], mitochondrialne kanały potasowe w różnych typach komórek i tkanek były identyfikowane głównie na podstawie ich aktywności elektrofizjologicznej oraz właściwości farmakologicznych [59, 250]. Z tego względu kanały potasowe w mitochondriach były początkowo opisywane jako zjawisko bez jednoznacznie zdefiniowanego podłoża molekularnego. Ponadto, obecność w wewnętrznej błonie mitochondrialnej białek o charakterystyce kanałów jonowych była trudna do zaakceptowania. Białka rozpraszające potencjał błonowy, takie jak kanały jonowe, nie są oczywistym i obligatoryjnym elementem teorii chemiosmotycznej opisującej proces fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [106, 118, 251, 252].

Pomimo wielu lat badań, wciąż pozostaje wiele pytań dotyczących struktury i funkcji mitochondrialnych kanałów potasowych, w tym kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [250]. Z uwagi na istotną rolę kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w regulacji funkcji mitochondriów, a w szczególności rolę w cytoprotekcji tkanki serca oraz mózgu temat budowy tego kanału jest szczególnie interesujący. Dzięki intensywnym badaniom poprzednich lat wykazano, że izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> znajduje się w mitochondriach tkanki sercowej [145]. Jednak nie było dowodów na to, że białko to mogłoby tworzyć aktywny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Badania przedstawione w tej pracy miały na celu zweryfikowanie tej hipotezy.

W opisanych badaniach zastosowano technikę patch-clamp izolowanych mitoplastów, aby wykryć aktywność kanału potasowego po transfekcji komórek HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub>. Na podstawie uzyskanych danych można wyciągnąć dwa główne wnioski. Po pierwsze, ekspresja izoformy VEDEC prowadzi do aktywności mitoBK<sub>Ca</sub> w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Po drugie, nasze dane wskazują, że komórki HEK293T mogą być potencjalnie odpowiednim modelem do badań nad ekspresją i elektrofizjologią mitochondrialnych kanałów potasowych.

Kanał zaobserwowany po transfekcji z izoformą VEDEC wykazywał przewodnictwo wynoszące około 290 pS, co jest zbliżone do przewodnictwa opisanego wcześniej dla kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. W tkance mózgowej i kilku liniach komórkowych glejaka średnie przewodnictwo tego kanału, zarejestrowane w podobnych warunkach eksperymentalnych, wynosiło od ~275 pS do ~295 pS [95, 114, 150, 183, 253, 254]. Podobne wartości zaobserwowano dla kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mięśniach szkieletowych i komórkach śródbłonna [115, 134]. Przewodnictwo zarejestrowanego kanału było również bliskie wartościom zaobserwowanym w błonie plazmatycznej w komórkach HEK293, gdzie po ekspresji kanałów BK<sub>Ca</sub> zaobserwowano kanał o przewodnictwie około 250 pS [255]. Jednak przewodnictwo kanału mitoBK<sub>Ca</sub> może różnić się od podanych wyżej wartości. Szczególnym przykładem jest tkanka sercowa. W mitochondriach kardiomiocytów myszy, wartość przewodnictwa kanału opisywanego jako mitoBK<sub>Ca</sub> była znacznie mniejsza i nie przekraczała 190 pS w zależności od warunków eksperymentalnych [146, 225]. Z drugiej strony, w kardiomiocytach serca szczura przewodnictwo kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wynosiło około 308 pS [165]. Podsumowując można stwierdzić, że przewodnictwo kanału obserwowane po transfekcji komórek HEK293T izoformą VEDEC odpowiada przewodnictwu kanału mitoBK<sub>Ca</sub> znanemu z literatury.

Inne analizowane cechy biofizyczne zarejestrowanych kanałów są również podobne do tych opisywanych w przypadku kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> występujących natywnie. Zarówno

zależność prawdopodobieństwa otwarć od przyłożonego napięcia, jak i wartości średniego czasu otwarcia i zamknięcia odpowiadają kanałowi mitoBK<sub>Ca</sub> z tkanki sercowej i są zbliżone do wartości obserwowanych dla kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w śródbłonku oraz w komórkach nowotworowych, w szczególności w glejakach [134, 146, 165]. Ponadto aktywność kanału była zależna od obecności jonów wapnia. Ta właściwość jest jedną z kluczowych cech kanałów BK<sub>Ca</sub> [159].

Co więcej, zastosowanie aktywatora kanałów BK<sub>Ca</sub>, – NS11021 – indukowało wzrost prądu jonowego w obecności 100 μM jonów wapnia. Wcześniejsze badania wykazały, że NS11021 jest silnym aktywatorem BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej, co było obserwowane po ekspresji tych białek w oocytach *Xenopus laevis* i komórkach HEK293 [200]. Ponadto wykazano, że aktywacja kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach serca po podaniu NS11021 prowadzi do indukcji mechanizmów cytoprotekcyjnych [227, 256]. Dane literaturowe wskazują, że NS11021 może aktywować kanały BK<sub>Ca</sub> w szerokim zakresie stężeń jonów wapnia, w tym w środowisku nominalnie pozbawionym Ca<sup>2+</sup> oraz może aktywować kanały pozbawione domeny wykrywającej wapń [201]. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych badań, w opisywanych eksperymentach nie zaobserwowano wzrostu aktywności kanału po podaniu NS11021 w obecności 1 μM Ca<sup>2+</sup> w buforze eksperymentalnym. Jednym z możliwych wyjaśnień zaobserwowanych różnic może być mitochondrialna lokalizacja kanału i potencjalne interakcje z proteomem mitochondrialnym i/lub różnice w składzie lipidowym między mitochondriami a błoną plazmatyczną. Z drugiej strony możliwe jest, że pomiary w szerszym zakresie napięć potwierdziłyby aktywację kanału przez NS11021 w obecności 1 μM Ca<sup>2+</sup>. Jednakże w zastosowanym systemie użycie wyższych napięć podczas eksperymentu z wykorzystaniem techniki patch-clamp izolowanych mitoplastów powoduje niestabilność błony.

Poprzednie prace wykazały także, że NS11021 wpływa na funkcje mitochondrialne, a efekty te były odwracane przez zastosowanie paksyliny, co potwierdzało zaangażowanie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [134]. W prezentowanych eksperymentach paksylina hamowała aktywność kanału co świadczy o tym, że rejestrowana aktywność to kanał typu BK<sub>Ca</sub>.

Oprócz wpływu aktywatora NS11021 w opisywanych badaniach zastosowano heminę, która jest znanym inhibitorem kanałów BK<sub>Ca</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> [167, 257]. Zastosowanie heminy spowodowało spadek prawdopodobieństwa otwarcia kanału. Wcześniej wykazano, że hem i hemina blokują aktywność mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach glejaka i śródbłonka [168, 170, 176]. Co istotne, oba inhibitory blokują kanały BK<sub>Ca</sub> w błonie plazmatycznej [172, 258].

Wszystkie powyższe dane stanowią mocne argumenty za wsparciem hipotezy mówiącej, że izoforma VEDEC podjednostki  $\alpha$  kanałów BK<sub>Ca</sub> tworzy funkcjonalny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Ekspresja VEDEC w komórkach HEK293T skutkuje obecnością podjednostki  $\alpha$  w różnych przedziałach komórkowych, w tym w siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniej opublikowanymi danymi [212, 214, 215]. Równie ważne jest, że w przeciwieństwie do komórek HEK293T, w tkance serca izoforma VEDEC jest kierowana wyłącznie do mitochondriów [212]. Należy jednak wskazać, że izoforma VEDEC nie jest jedyną izoformą, która może być kierowana do mitochondriów. W komórkach astrocytoma U-87 MG nie wykryto izoformy VEDEC pomimo tego, że aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w tych komórkach jest dobrze udokumentowana [160]. Podobne obserwacje opisano w przypadku komórek nabłonka oskrzeli, gdzie nie wykryto ekspresji izoformy VEDEC pomimo aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [259]. Ponadto wykazano, że izoformy BK<sub>Ca</sub> VYR i ERL mogą być zlokalizowane w mitochondriach po ekspresji w komórkach HEK293 [214]. Jednak dane te nie mają jeszcze potwierdzenia na gruncie badań elektrofizjologicznych, a jedynie oparte są na badaniach obecności białka we frakcjach mitochondrialnych lub doświadczeniach wykorzystujących immunofluorescencję.

Budowa molekularna mitochondrialnych kanałów potasowych jest tematem intensywnych badań, czego przykładem jest budowa kanału mitoK<sub>ATP</sub> [92, 93, 106]. Kanał ten był pierwszym kanałem potasowym odkrytym w mitochondriach [90].

Wnioski dotyczące budowy kanałów mitoK<sub>ATP</sub> oraz innych mitochondrialnych kanałów potasowych wyciągano głównie na podstawie ich właściwości biofizycznych i farmakologicznych. Uważa się, że mitochondrialne kanały potasowe mają pewne podobieństwa do kanałów potasowych obecnych w błonie plazmatycznej. W związku z tym większość mitochondrialnych kanałów potasowych to prawdopodobnie izoformy (warianty splicingowe) kanałów potasowych błony plazmatycznej. Dotyczy to również białek pomocniczych, takich jak podjednostki  $\beta$  kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> czy receptorów sulfonilomoczników (SUR) [59, 93, 158]. Jednak nie musi to być regułą czego przykładem jest wspomniany kanał mitoK<sub>ATP</sub>. W ostatnim czasie zasugerowano, że kanał ten jest tworzony przez białko CCDC51. Jest to białko mitochondrialne co sprawia, że potencjalnie kanał ten, jako jedyny byłby tworzony przez unikatowe białko mitochondrialne [93]. Sekwencja aminokwasowa CCDC51 sugeruje obecność dwóch segmentów transbłonowych, co czyni je dobrym kandydatem na substrat translokazy TIM23.

Jednak odpowiedź na pytanie o budowę tego kanału nie jest tak jednoznaczna. Wcześniejsze badania zasugerowały, że kanał ten może być tworzony przez kanał ROMK2 [92, 260]. Ponadto inne badania zasugerowały, że za aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub> może odpowiadać również syntaza ATP [94]

W ostatnim czasie pojawiły się prace jednoznacznie wskazujące, że podjednostka  $\alpha$  kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest kodowana przez gen *KCNMA1*. Zastosowanie techniki CRISPR/Cas9 w celu wprowadzenia mutacji w tym genie, skutkujących brakiem podjednostki  $\alpha$  doprowadziła do utraty aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Zaobserwowano to w komórkach astrocytomy U-87 MG oraz komórkach nabłonka oskrzelowego [147, 259]. Wydaje się zatem, że dane świadczące o tym, że białko tworzące kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jest kodowane przez gen *KCNMA1* jest oparte na solidnych podstawach.

Oddzielnym zagadnieniem wymagającym dogłębnych badań jest problem importu podjednostki  $\alpha$  do mitochondriów i sortowania do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Temat importu kanałów potasowych do mitochondriów nie był do tej pory szeroko studiowany. Jednak w przypadku kanału ROMK2 wydaje się, że białko to może być importowane przez translokazę TIM23. ROMK2 posiada bowiem sekwencję kierującą do mitochondriów na N-końcu białka [92]. W przypadku kanału mitoBK<sub>Ca</sub> sytuacja wydaje się inna. Podjednostka  $\alpha$ , tworząca por kanału, posiada siedem domen transbłonowych, co sugeruje, że import do mitochondriów może przebiegać inną ścieżką [158], Prawdopodobnie za pośrednictwem translokazy TIM22. Badania dotyczące biogenezy mitochondriów wskazują bowiem, że ta translokaza w dużej części odpowiada za import białek z wieloma domenami błonowymi [24]. Jednak ostatnie badania wykazały, że import mitochondrialny kanału Kv1.3 (wielodomenowego białka transbłonowego, podobnego do kanału BK<sub>Ca</sub>) prawdopodobnie odbywa się za pośrednictwem TIM23 [261]. To niespodziewane odkrycie wskazuje na konieczność dalszych badań nad mechanizmami importu takich białek. Tajemnicą również pozostaje lokalizacja domen kierujących podjednostkę  $\alpha$  do mitochondriów. W przypadku kanałów Kv1.3 sekwencje umożliwiające rozpoznanie przez translokazy mitochondrialne oraz import do mitochondriów są rozproszone w różnych rejonach białka [261].

Kolejnym istotnym zagadnieniem jest sortowanie podjednostek mitochondrialnych kanałów potasowych między różnymi przedziałami komórkowymi. Kanały BK<sub>Ca</sub> są obecne w błonie plazmatycznej, jądrze i mitochondriach, co wymaga efektywnego systemu dystrybucji białek [140]. Jednym z czynników wpływających na lokalizację kanału w wybranych organellach może być splicing mRNA kodującego podjednostki  $\alpha$  kanału, w wyniku którego



powstają jej różne izoformy. Identyfikacja izoformy VEDEC i jej jednoznaczna lokalizacja w mitochondriach komórek serca mogą sugerować, że w kardiomiocytach istnieje specyficzny mechanizm kierowania izoformy VEDEC do mitochondriów [145]. Możliwą rolę w tym procesie odgrywają również białka opiekuńcze, takie jak HSP60, które oddziałują z podjednostką  $\alpha$  kanału BK<sub>Ca</sub>, potencjalnie zwiększając jej kierowanie do mitochondriów [215]. Interakcje między białkami opiekuńczymi a podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> zostały pokazane w wielu publikacjach [212, 214, 215]. Również badania potencjalnych oddziaływań podjednostki  $\beta_4$  z partnerami białkowymi wykonanymi w tej pracy wskazują na oddziaływania z białkami opiekuńczymi. Identyfikacja tych potencjalnych oddziaływań może być wskazówką do przyszłych badań identyfikujących mechanizmy sortowania wybranych izoform kanałów potasowych do mitochondriów. Wydaje się to istotne zwłaszcza z tego powodu, że sortowanie to powinno mieć miejsce już w cytoplazmie. Wynika to z faktu, że główne mechanizmy kierowania białek do mitochondriów oparte są o transfer gotowych białek z cytozolu do mitochondriów [17]. Alternatywnie, istnieje możliwość kotranslacyjnej insercji nowopowstającego białka do zewnętrznej błony mitochondrialnej, jednak przykładów białek w taki sposób kierowanych do mitochondriów jest niewiele i głównie dotyczą białek błony zewnętrznej [262]. Mało prawdopodobna wydaje się także ścieżka importu podjednostek za pośrednictwem innych błon komórkowych, w szczególności siateczki śródplazmatycznej. Taki mechanizm jest opisany, ale bardzo rzadko spotykany [262].

Innym interesującym aspektem jest wpływ preferencji kodonów na sortowanie kanałów potasowych wirusów między mitochondriami a innymi przedziałami komórkowymi. Optymalizacja kodonów zwiększała kierowanie tych kanałów do mitochondriów, co obserwowano w różnych liniach komórkowych, sugerując istnienie ogólnego mechanizmu [263]. Badania te wydają się szczególnie istotne w kontekście obecności różnych kanałów potasowych w mitochondriach różnych tkanek. Wydaje się, zatem, że identyfikacja mechanizmów kierowania kanałów potasowych powinny być jednym z głównych kierunków badawczych w tym obszarze w przyszłości.

Kolejnym wartym podkreślenia kontekstem opisywanych w tej pracy badań jest to, że komórki HEK293T mogą stanowić obiecujący model doświadczalny do badań nad ekspresją i pomiarami elektrofizjologicznymi mitochondrialnych kanałów potasowych. Komórki HEK293 są powszechnie stosowanym modelem w badaniach kanałów BK<sub>Ca</sub> w błonie plazmatycznej. Niektóre wcześniejsze prace sugerowały brak ekspresji podjednostki tworzącej por dla BK<sub>Ca</sub> w tych komórkach [236]. Z drugiej strony wykazano ekspresję BK<sub>Ca</sub> w komórkach

HEK293, a pomiary patch-clamp zasugerowały obecność minimalnych prądów odpowiadających aktywności BK<sub>Ca</sub> w błonie plazmatycznej [157, 258]. W naszych komórkach nie zaobserwowaliśmy żadnej znanej aktywności elektrofizjologicznej mitochondrialnych kanałów potasowych w mitoplastach wyizolowanych z dzikiego typu komórek HEK293T. Do tej pory wszystkie badania aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych opierały się na pomiarach kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> ekspresjonowanych natywnie. Takie badania są niezwykle cenne, jednak mają kilka ograniczeń. Jednym z nich jest fakt, że aktywność kanałów ekspresjonowanych natywnie bywa nieregularna i trudna do przewidzenia. Ponadto takie układy nie dają możliwości manipulacji genetycznych pozwalających na lepsze zrozumienie regulacji aktywności badanych kanałów. W związku z tym uważamy, że komórki HEK293T mogą być odpowiednim modelem do przyszłych badań nad zagadnieniami związanymi z aktywnością i regulacją mitochondrialnych kanałów potasowych.

## 7.2 Identyfikacja białek oddziałujących z podjednostką $\beta 4$ kanału BK<sub>Ca</sub>

Druga część pracy dotyczyła identyfikacji potencjalnych interakcji podjednostek tworzących kanał BK<sub>Ca</sub>/mitoBK<sub>Ca</sub>. Zgodnie z przedstawionymi danymi ta część badań była możliwa do wykonania jedynie w odniesieniu do podjednostki regulatorowej  $\beta 4$  kanału. Uzyskane dane jednoznacznie wskazują na to, że podjednostka  $\beta 4$  lokalizuje się w wielu przedziałach komórkowych, w tym w błonie plazmatycznej, siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach. Wprawdzie pierwotnym celem było opisanie nowych interakcji w mitochondriach, jednak uzyskano interesujące dane wskazujące na nowe interakcje podjednostki  $\beta 4$  z białkami w różnych organellach komórkowych.

Środowisko, w którym funkcjonują mitochondrialne kanały potasowe, różni się od tego w błonie plazmatycznej. To unikatowe środowisko obejmuje specyficzny zestaw białek w mitochondriach, z których niektóre bezpośrednio oddziałują z białkami kanałowymi [99, 212, 215]. Wiele z tych białek bierze udział w reakcjach redoks [215]. Ponadto mitochondria, jako miejsce syntezy reaktywnych form tlenu, różnią się pod tym względem od błony plazmatycznej. Dodatkowo, mitochondrialne kanały potasowe są regulowane przez czynniki takie jak ATP i Ca<sup>2+</sup>, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie mitochondrialnym [59, 99].

Poprzednie prace zasugerowały interakcje strukturalno-funkcjonalne mitochondrialnych kanałów potasowych z białkami łańcucha oddechowego. Może to świadczyć o tym, że w mitochondriach występują unikatowe mechanizmy regulacji mitochondrialnych kanałów

potasowych [150]. Najlepszym przykładem może być aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z ludzkiej linii komórkowej astrocytoma (glioblastoma) U-87 MG [150]. Wykazano, że substraty łańcucha oddechowego, takie jak NADH, bursztynian oraz glutaminian/jabłczan, obniżają aktywność tego kanału. Efekt ten był blokowany przez rotenon, antymycynę oraz cyjanek potasu, które są inhibitorami łańcucha oddechowego. Przy użyciu elektroforezy Blue Native zademonstrowano potencjalną interakcję podjednostki  $\beta 4$  kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z oksydazą cytochromową [150]. Również poprzednie prace wykorzystujące metody wysokoprzepustowe, takie jak spektrometria mas sugerowały interakcje kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z łańcuchem oddechowym. Jedna z pierwszych analiz oddziaływań kanału BK<sub>Ca</sub> wykazała, że co najmniej 20% potencjalnych białek oddziałujących z kanałami BK<sub>Ca</sub> jest zlokalizowanych w mitochondriach [212]. Kolejne analizy w komórkach serca oraz mózgu również wskazywały na potencjalną interakcję kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z łańcuchem oddechowym [214, 215].

Poprzednie badania nie uwzględniały podejścia metodologicznego jak zastosowane w tej pracy. W niniejszej pracy zastosowano dodatkowe kontrole w postaci konstruktów swobodnie i przypadkowo biotynylujących białka znajdujące w macierzy i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Wydaje się, że w znaczący sposób ograniczyło to liczbę wykrytych białek, które były biotynylowane. Ponadto, nie obserwowano koimmunoprecypitacji wybranych podjednostek łańcucha oddechowego z podjednostką  $\beta 4$ . Ta podjednostka była wskazywana poprzednio jako oddziałująca z oksydazą cytochromu c w komórkach U-87 MG [150]. Trzeba jednak zaznaczyć, że późniejsza analiza kompleksów białkowych tworzonych przez kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach tych komórek nie potwierdziła jednoznacznie tej interakcji [147]. W doświadczeniach opisywanych w tej pracy obserwowano biotynylację jedynie pojedynczych białek związanych ze składaniem łańcucha oddechowego, a także kilku jego podjednostek. Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują zatem, że interakcja ta może być niestabilna i przejściowa. Niewykluczone, że modyfikacja koimmunoprecypitacji np. poprzez zastosowanie związków sieciujących (tzw. cross-linkerów) pozwoliłoby na ustabilizowanie i wykrycie takich interakcji. Możliwe też, że interakcja i regulacja aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez łańcuch oddechowy może odbywać się za pośrednictwem innych przekaźników takich jak np. reaktywne formy tlenu. Z drugiej strony niedawne badania sugerują, że inny kanał mitochondrialny Kv1.3 oddziałuje fizycznie z kompleksem I łańcucha oddechowego mitochondriów [264]. Niewątpliwie temat oddziaływania kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> z łańcuchem oddechowym wymaga dalszych ukierunkowanych badań.

W kontekście zidentyfikowanych potencjalnych oddziaływań warto zwrócić uwagę na biotynylację białek kompleksu MICOS [24]. Wprawdzie nie odnotowano jednoznacznie bezpośredniej interakcji z białkami tego kompleksu, ale biotynylacja tych białek sugeruje, że podjednostka  $\beta 4$  może lokalizować się w pobliżu zagięć grzebieni mitochondrialnych. Warto zwrócić uwagę, że duża część kompleksów łańcucha oddechowego lokalizuje się w błonach grzebieni mitochondrialnych, co ma związek z wydajnością procesu fosforylacji oksydacyjnej [5]. Bliska obecność łańcucha oddechowego oraz kompleksu MICOS może wskazywać na lokalizację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w tej części wewnętrznej błony mitochondrialnej. Rodzi to pytanie o rolę tego kanału. Możliwe, że aktywność kanału zlokalizowanego w tak specyficznym miejscu może mieć związek z regulacją objętości macierzy mitochondrialnej. Napływ jonów potasu indukuje bowiem pęcznienie macierzy mitochondrialnej [120].

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy wskazują, że podjednostka  $\beta 4$  może oddziaływać z wieloma białkami pochodzącymi z różnych przedziałów komórkowych o czym świadczą białka zidentyfikowane po biotynylacji. Wyniki te odzwierciedlają szeroką lokalizację podjednostki  $\beta 4$  w komórce, obejmującą zarówno błony, jak i przedziały wewnątrzkomórkowe, takie jak mitochondria czy siateczka śródplazmatyczna. Obserwowane interakcje wskazują na potencjalne zaangażowanie  $\beta 4$  w różnorodne procesy biologiczne, w tym regulację transportu jonów, metabolizmu energetycznego oraz sygnalizacji komórkowej. Interesującą grupą białek biotynylowaną przez podjednostkę  $\beta 4$  były białka związane z metabolizmem lipidów, co stanowi wyraźne wskazanie na przyszły kierunek badań. Jest to szczególnie interesujące, że interakcje kanałów BK<sub>Ca</sub> z innymi białkami wydają się kluczowe dla regulacji ich aktywności [265]. Wcześniej wykazano, że kanał BK<sub>Ca</sub> zlokalizowany w błonie plazmatycznej oddziałuje z hemoksygenazą-2 [175]. W tym samym badaniu zaobserwowano, że aktywność kanału w błonie plazmatycznej zmniejsza się podczas hipoksji, a hemoksygenaza-2 odgrywa kluczową rolę w takim zachowaniu kanału. Ta obserwacja jest sprzeczna z badaniami wskazującymi, że aktywność mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> wzrasta przy niskiej dostępności tlenu [183, 253]. W naszych doświadczeniach białko  $\beta 4$  biotynylowało hemoksygenazę-2 jednak w doświadczeniach z wykorzystaniem koimmunoprecypitacji podjednostki  $\beta 4$ -FLAG nie obserwowano tego białka w elucji. Interakcja również nie była jednoznaczna jeśli podjednostka  $\beta 4$  była koekspresjonowana z podjednostką  $\alpha$  kanału. Biotynylacja przeprowadzona była w komórkach, w których podjednostka  $\alpha$  występuje na bardzo niskim poziomie. Te dane wyraźnie pokazują,

że właściwości kanału silnie zależą od lokalizacji i prawdopodobnie od interakcji z innymi białkami.

Zaobserwowane interakcje biotynylowanych białek związanych z podjednostką  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> mogą świadczyć o oddziaływaniu całego kompleksu kanału BK<sub>Ca</sub> z różnymi strukturami komórkowymi. Jednocześnie otrzymane wyniki mogą sugerować, że podjednostka  $\beta 4$  może pełnić również niezależną rolę, niezwiązaną bezpośrednio z aktywnością kanału. Wyniki te wskazują na potencjalne funkcje regulatorowe lub sygnalizacyjne  $\beta 4$ , które mogą wykraczać poza jej klasyczne zadanie jako podjednostki modulatorowej. Takie zachowanie podkreśla złożoność mechanizmów, w których  $\beta 4$  może uczestniczyć oraz wymaga dalszych badań w celu zrozumienia jej roli w różnych kontekstach komórkowych.

Jednym z biotynylowanych białek było białko TMX1, którego oddziaływanie z podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> zostało potwierdzone poprzez koimmunoprecypitację. TMX1 to białko błonowe siateczki śródplazmatycznej (ER) zawierające unikalną domenę TRX-like, która odpowiada za jego aktywność jako reduktazy dwusiarczkowej [266, 267]. Charakterystyczna sekwencja aktywnego miejsca CPAC z obecnością proliny wpływa na stabilność wiązań dwusiarczkowych, preferując ich formę zredukowaną. TMX1 posiada także motyw diargininowy (RQR), który odpowiada za jego retencję w ER, a także miejsca palmitoilacji i fosforylacji w części cytoplazmatycznej, co reguluje lokalizację subkomórkową i interakcje z innymi białkami [268-270].

Białko TMX1 występuje w szczególności w domenach MAM (ang. *mitochondrial associated membranes*), gdzie bierze udział w kontroli ruchów jonów wapnia między ER a mitochondriami [268]. Poprzez interakcję z pompą SERCA2b TMX1 reguluje transport Ca<sup>2+</sup> do ER w sposób zależny od stanu redoks. Redukcja poziomu TMX1 powoduje zwiększony napływ wapnia do ER i zakłócenia w jego transporcie do mitochondriów, co może prowadzić do dysfunkcji metabolicznej komórki [271, 272]. TMX1 prawdopodobnie ma także wpływ na fałdowanie białek poprzez formowanie i redukcję mostków dwusiarczkowych [273]. Interakcja pomiędzy podjednostkami kanału BK<sub>Ca</sub> a białkiem TMX1 sugeruje potencjalne powiązania między funkcją kanału BK<sub>Ca</sub> a procesami redoks w komórce. Po pierwsze, TMX1 potencjalnie może modulować aktywność kanału BK<sub>Ca</sub> poprzez mechanizmy zależne od redoks. Kanały typu BK<sub>Ca</sub> są regulowane przez stan redoks, a potencjalnymi miejscami regulacji są cysteiny i metioniny [169, 274]. Domena tioredoksynowa TMX1 potencjalnie mogłaby oddziaływać z resztami cysteinowymi w podjednostkach kanału BK<sub>Ca</sub>, zmieniając jego stan redoks. Taka interakcja mogłaby wpływać na właściwości bramkowania kanału,

szczególnie w warunkach stresu oksydacyjnego. Dzięki temu kanał BK<sub>Ca</sub> mógłby dynamicznie reagować na zmiany w środowisku redoks, co wpływałoby na procesy takie jak sygnalizacja wapniowa i regulacja potencjału błonowego. Po drugie, interakcja z TMX1 może wskazywać na funkcjonalne powiązanie kanału BK<sub>Ca</sub> z regulacją ruchu jonów wapnia między ER a mitochondriami, w szczególności w obrębie domen MAM. Siateczka śródplazmatyczna jest głównym miejscem magazynowania jonów wapnia w komórce [275]. Interakcja z TMX1 mogłaby, więc łączyć sygnalizację między ER a mitochondriami, wskazując na rolę kanału BK<sub>Ca</sub> w homeostazie wapniowej i równowadze redoks.

Białko TMX1 odgrywa również złożoną rolę w procesach nowotworowych [272, 276, 277]. Obniżenie jego ekspresji zakłóca transport wapnia, spowalnia oddychanie mitochondrialne i zwiększa oporność komórek na stres oksydacyjny, co sprzyja agresywnemu wzrostowi nowotworów. W niektórych przypadkach wysoka ekspresja TMX1 koreluje jednak z zaawansowanym stadium choroby i gorszym rokowaniem [278, 279]. Co ważne, ostatnio uzyskane w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych niepublikowane dane pokazują, że kanał BK<sub>Ca</sub> oddziałuje z białkiem TMX1 również w komórkach glioblastomy U-87 MG. Wydaje się zatem, że oddziaływanie to jest uniwersalne i występuje w różnych typach komórek. Co istotne, kanały typu BK<sub>Ca</sub> pełnią istotną rolę w fizjologii niektórych nowotworów, np. glejaków [147]. W związku z tym interakcje między białkiem TMX1 a kanałami typu BK<sub>Ca</sub> może mieć szczególną rolę w komórkach nowotworowych.

Dodatkowo, wskazana interakcja między białkiem TMX1 a kanałem BK<sub>Ca</sub> może sugerować, że białko TMX1 może wspomagać fałdowanie i dojrzewanie podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> lub wpływać na ich sortowanie do określonych przedziałów komórkowych, takich jak błona ER [155]. Zapewniałoby to prawidłową lokalizację kanału BK<sub>Ca</sub> tam, gdzie jego funkcje są niezbędne. Z drugiej strony nie można wykluczyć, że obserwowane oddziaływanie jest związane z nadekspresją podjednostek  $\beta_4$  oraz  $\alpha$ . Jednak na podkreślenie zasługuje fakt, że analiza interakcji kanału ROMK2 wykonana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych nie wykazała biotynylacji białka TMX1 przez kanał ROMK2 [241]. Sugeruje to, specyficzność interakcji kanału BK<sub>Ca</sub> z białkiem TMX1.

Na koniec, biotynylacja białek znajdujących się z pobliżu podjednostki  $\beta_4$  kanału BK<sub>Ca</sub>, wykazała, także potencjalne interakcje z innymi białkami typu TMX. Może to świadczyć o szerszej interakcji kanału BK<sub>Ca</sub> z tego typu białkami. Zrozumienie roli tych oddziaływań w różnych kontekstach komórkowych wymaga dalszych badań.

Podsumowując, interakcja kanału BK<sub>Ca</sub> z TMX1 wskazuje na potencjalny mechanizm regulacji zależnej od redoks oraz rolę w komunikacji między organellami, szczególnie między ER a mitochondriami. Relacja ta może być kluczowa dla utrzymania homeostazy komórkowej w warunkach stresu. Biorąc pod uwagę obecność kanałów typu BK<sub>Ca</sub> zarówno w siateczce śródplazmatycznej jak i w mitochondriach wydaje się to szczególnie interesujące. Ponadto, białko TMX1 jest obiecującym celem terapeutycznym w kontekście chorób związanych z zaburzeniami homeostazy wapnia, stresem ER i nowotworami [268]. Konieczne są dalsze badania w celu lepszego zrozumienia wpływu tej interakcji na procesy fizjologiczne i patologiczne.

## 8 Podsumowanie i wnioski

Na podstawie danych uzyskanych w trakcie przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy można wyciągnąć następujące wnioski:

- I. Izoforma VEDEC może tworzyć funkcjonalny kanał typu mitoBK<sub>Ca</sub>
  - Zarejestrowano obecność kanału w mitochondriach komórek HEK293T po przejściowej transfekcji plazmidem zawierającym gen kodujący izoformę VEDEC kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.
  - Zaobserwowany kanał odpowiadał charakterystyce kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego jonami wapnia. Kanał wykazywał zależność od przyłożonego napięcia oraz aktywację przez jony wapnia.
  - Obserwowany kanał ulegał regulacji przez modulatory kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Kanał był aktywowany NS11021, inhibitowany paksyliną oraz heminą.
  - Izoforma VEDEC kanału BK<sub>Ca</sub> lokalizowała się częściowo we frakcji mitochondrialnej.
  - Dowiedziono, że komórki HEK293T stanowią nowy model badawczy możliwy do wykorzystania w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych.
- II. Podjednostka  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> oddziałuje z licznymi białkami w wielu organellach komórkowych
  - Nie potwierdzono jednoznacznie interakcji podjednostki  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> z podjednostkami łańcucha oddechowego.
  - Zidentyfikowano nowe białka potencjalnie wchodzące w interakcje z podjednostką  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> zlokalizowane w różnych organellach komórkowych.
  - Białko TMX1 tworzy kompleksy z podjednostką regulatorową ( $\beta 4$ ).
  - Wykazano, że białko TMX1 może wchodzić w interakcję również z podjednostką ( $\alpha$ -VEDEC) kanału BK<sub>Ca</sub> co sugeruje interakcję całego kanału z tym białkiem.



## 9 Bibliografia

1. Nicholls, D.G. and S.J. Ferguson, *Bioenergetics (Fourth Edition)*, in *Bioenergetics (Fourth Edition)*, D.G. Nicholls and S.J. Ferguson, Editors. 2013, Academic Press: Boston. p. 1-419.
2. Schenkel, L.C. and M. Bakovic, *Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes*. International Journal of Cell Biology, 2014. **2014**: p. 1-13.
3. Triolo, M., et al., *Evaluating mitochondrial length, volume, and cristae ultrastructure in rare mouse adult stem cell populations*. STAR Protoc, 2023. **4**(1): p. 102107.
4. Quintana-Cabrera, R. and L. Scorrano, *Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics*. Molecular Cell, 2023. **83**(6): p. 857-876.
5. Mukherjee, I., M. Ghosh, and M. Meinecke, *MICOS and the mitochondrial inner membrane morphology – when things get out of shape*. FEBS Letters, 2021. **595**(8): p. 1159-1183.
6. Romanello, V. and M. Sandri, *Implications of mitochondrial fusion and fission in skeletal muscle mass and health*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2023. **143**: p. 46-53.
7. O'Rourke, B., *Mitochondrial Ion Channels*. Annual Review of Physiology, 2007. **69**(1): p. 19-49.
8. Zabłocka, B., D.C. Górecki, and K. Zabłocki, *Disrupted Calcium Homeostasis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Common Mechanism behind Diverse Consequences*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(20).
9. Mishra, P. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(10): p. 634-646.
10. Yan, et al., *Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination*. Cells, 2019. **8**(4): p. 379.
11. Roy, A., et al., *Mitochondrial DNA replication and repair defects: Clinical phenotypes and therapeutic interventions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2022. **1863**(5): p. 148554.
12. Friedman, J.R. and J. Nunnari, *Mitochondrial form and function*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 335-343.
13. Martin, W. and M. Müller, *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 37-41.
14. Andersson, S.G.E., et al., *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 133-140.
15. Kurland, C.G. and S.G.E. Andersson, *Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000. **64**(4): p. 786-820.
16. Kreimendahl, S. and J. Rassow, *The Mitochondrial Outer Membrane Protein Tom70-Mediator in Protein Traffic, Membrane Contact Sites and Innate Immunity*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(19): p. 7262.
17. Schmidt, O., N. Pfanner, and C. Meisinger, *Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(9): p. 655-667.

18. Zhao, F. and M.-H. Zou, *Role of the Mitochondrial Protein Import Machinery and Protein Processing in Heart Disease*. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021. **8**.
19. Gentle, I., et al., *The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria*. *The Journal of Cell Biology*, 2004. **164**(1): p. 19-24.
20. Hill, K., et al., *Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins*. *Nature*, 1998. **395**(6701): p. 516-521.
21. Roise, D. and M. Maduke, *Import of a mitochondrial presequence into *P. denitrificans*. Insight into the evolution of protein transport*. *FEBS Lett*, 1994. **337**(1): p. 9-13.
22. Wiedemann, N. and N. Pfanner, *Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly*. *Annual Review of Biochemistry*, 2017. **86**(1): p. 685-714.
23. Papa, S., *Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1996. **1276**(2): p. 87-105.
24. Pfanner, N., B. Warscheid, and N. Wiedemann, *Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019. **20**(5): p. 267-284.
25. Haskins, N., et al., *Mitochondrial Enzymes of the Urea Cycle Cluster at the Inner Mitochondrial Membrane*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 542950.
26. Piel, R.B., 3rd, H.A. Dailey, Jr., and A.E. Medlock, *The mitochondrial heme metabolon: Insights into the complex(ity) of heme synthesis and distribution*. *Mol Genet Metab*, 2019. **128**(3): p. 198-203.
27. Li, Q. and T. Hoppe, *Role of amino acid metabolism in mitochondrial homeostasis*. *Front Cell Dev Biol*, 2023. **11**: p. 1127618.
28. Lee, S.R. and J. Han, *Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. **2017**: p. 1-15.
29. Picard, M. and O.S. Shirihai, *Mitochondrial signal transduction*. *Cell Metab*, 2022. **34**(11): p. 1620-1653.
30. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry (Loose-Leaf)*. 2007: Macmillan.
31. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchen, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012. **26**(6): p. 711-723.
32. Porcelli, A.M., et al., *pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **326**(4): p. 799-804.
33. Wiederkehr, A., *Matrix alkalisation unleashes  $\beta$ -cell mitochondria*. *Islets*, 2009. **1**(2): p. 154-156.
34. Jonckheere, A.I., J.A.M. Smeitink, and R.J.T. Rodenburg, *Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2012. **35**(2): p. 211-225.
35. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. *Nature*, 1961. **191**: p. 144-8.
36. Ray, P.D., B.-W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. *Cellular Signalling*, 2012. **24**(5): p. 981-990.
37. Brand, M.D., *Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016. **100**: p. 14-31.
38. Votyakova, T.V. and I.J. Reynolds,  *$\Delta\Psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria*. *Journal of Neurochemistry*, 2001. **79**(2): p. 266-277.

39. Miwa, S., et al., *Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(8): p. 938-948.
40. Chouchani, E.T., et al., *Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 431-435.
41. Peruzzotti-Jametti, L., et al., *Mitochondrial complex I activity in microglia sustains neuroinflammation*. Nature, 2024. **628**(8006): p. 195-203.
42. Dröse, S., P.J. Hanley, and U. Brandt, *Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009. **1790**(6): p. 558-565.
43. Webster, K.A., *Mitochondrial Death Channels*. Am Sci, 2009. **97**(5): p. 384-391.
44. Bernardi, P., M. Carraro, and G. Lippe, *The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions*. The FEBS Journal, 2022. **289**(22): p. 7051-7074.
45. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases*. Antioxidants & Redox Signaling, 2011. **15**(6): p. 1583-1606.
46. Ramanathan, K., et al., *Protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced microsomal dysfunctions*. Hum Exp Toxicol, 2003. **22**(3): p. 129-36.
47. Zandi, P. and E. Schnug, *Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective*. Biology (Basel), 2022. **11**(2).
48. Bertholet, A.M., et al., *H<sup>+</sup> transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier*. Nature, 2019. **571**(7766): p. 515-520.
49. Jarmuszkiewicz, W., *Uncoupling proteins in mitochondria of plants and some microorganisms*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(1): p. 145-55.
50. Woyda-Ploszczyca, A.M. and W. Jarmuszkiewicz, *The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2017. **1858**(1): p. 21-33.
51. Bertholet, A.M. and Y. Kirichok, *Mitochondrial H<sup>+</sup> Leak and Thermogenesis*. Annual Review of Physiology, 2022. **84**(1): p. 381-407.
52. Brown, G.C. and M.D. Brand, *On the nature of the mitochondrial proton leak*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1991. **1059**(1): p. 55-62.
53. Go, Y.-M. and D.P. Jones, *Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **50**(4): p. 495-509.
54. Lassègue, B. and K.K. Griendling, *NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(4): p. 653-661.
55. Scott, et al., *Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1060-1072.
56. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. The EMBO Journal, 2007. **26**(7): p. 1749-1760.
57. Norell, P.N., et al., *Biogenesis of omegasomes and autophagosomes in mammalian autophagy*. Biochem Soc Trans, 2024. **52**(5): p. 2145-2155.
58. Baev, A.Y., et al., *Interaction of Mitochondrial Calcium and ROS in Neurodegeneration*. Cells, 2022. **11**(4): p. 706.
59. Szabo, I. and M. Zoratti, *Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More*. Physiological Reviews, 2014. **94**(2): p. 519-608.
60. Yáñez, M., J. Gil-Longo, and M. Campos-Toimil, *Calcium Binding Proteins*. 2012, Springer Netherlands. p. 461-482.

61. Alam, M.R., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake 1 (MICU1) and mitochondrial ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic  $\beta$ -cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(41): p. 34445-54.
62. Li, Y., et al., *LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (Review)*. Molecular Medicine Reports, 2019.
63. Waldeck-Weiermair, M., et al., *Uncoupling protein 3 adjusts mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake to high and low Ca<sup>2+</sup> signals*. Cell Calcium, 2010. **48**(5): p. 288-301.
64. Javadov, S., X. Chapa-Dubocq, and V. Makarov, *Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling*. Mitochondrion, 2018. **38**: p. 58-70.
65. Jiang, B., et al., *Molecular Mechanism for H<sub>2</sub>S-Induced Activation of KATP Channels*. Antioxidants & Redox Signaling, 2009. **12**(10): p. 1167-1178.
66. Gunter, K.K. and T.E. Gunter, *Transport of calcium by mitochondria*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1994. **26**(5): p. 471-485.
67. Beutner, G., et al., *Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21482-8.
68. Beutner, G., et al., *Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2005. **1717**(1): p. 1-10.
69. Denton, R.M., *Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2009. **1787**(11): p. 1309-1316.
70. Bernardi, P., *Mechanisms for Ca<sup>2+</sup>-dependent permeability transition in mitochondria*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(6): p. 2743-2744.
71. Hüser, J. and L.A. Blatter, *Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore*. Biochem J, 1999. **343 Pt 2**(Pt 2): p. 311-7.
72. Cárdenas, C., et al., *Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP<sub>3</sub> Receptor Ca<sup>2+</sup> Transfer to Mitochondria*. Cell, 2010. **142**(2): p. 270-283.
73. Poston, C.N., S.C. Krishnan, and C.R. Bazemore-Walker, *In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM)*. J Proteomics, 2013. **79**: p. 219-30.
74. Ponnalagu, D., et al., *CLIC4 localizes to mitochondrial-associated membranes and mediates cardioprotection*. Science Advances, 2022. **8**(42).
75. Gao, P., Z. Yan, and Z. Zhu, *Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 604240.
76. Beavis, A.D. and H. Davatol-Hag, *The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1996. **28**(2): p. 207-214.
77. Edwards, J.C. and C.R. Kahl, *Chloride channels of intracellular membranes*. FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 2102-11.
78. Ponnalagu, D., et al., *Molecular identity of cardiac mitochondrial chloride intracellular channel proteins*. Mitochondrion, 2016. **27**: p. 6-14.
79. Kolisek, M., *Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg<sup>2+</sup> influx system in mitochondria*. The EMBO Journal, 2003. **22**(6): p. 1235-1244.
80. Li, P., et al., *Closed and open structures of the eukaryotic magnesium channel Mrs2 reveal the auto-ligand-gating regulation mechanism*. Nat Struct Mol Biol, 2024.
81. Pilchova, I., et al., *The Involvement of Mg<sup>2+</sup> in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017. **2017**: p. 1-8.

82. Palty, R., et al., *NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 436-41.
83. Javadov, S., et al., *Expression of mitochondrial fusion–fission proteins during post-infarction remodeling: the effect of NHE-1 inhibition*. Basic Research in Cardiology, 2011. **106**(1): p. 99-109.
84. Savic Azoulay, I., et al., *ASIC1a channels regulate mitochondrial ion signaling and energy homeostasis in neurons*. J Neurochem, 2020. **153**(2): p. 203-215.
85. Wang, Y.Z., et al., *Intracellular ASIC1a regulates mitochondrial permeability transition-dependent neuronal death*. Cell Death Differ, 2013. **20**(10): p. 1359-69.
86. Sansom, M.S., *Ion channels: a first view of K<sup>+</sup> channels in atomic glory*. Curr Biol, 1998. **8**(13): p. R450-2.
87. Keifer, D.W. and W.J. Lucas, *Potassium Channels in Chara corallina: CONTROL AND INTERACTION WITH THE ELECTROGENIC H PUMP*. Plant Physiol, 1982. **69**(4): p. 781-8.
88. Fischer, W.B. and M.S.P. Sansom, *Viral ion channels: structure and function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2002. **1561**(1): p. 27-45.
89. Checchetto, V., et al., *Physiology of intracellular potassium channels: A unifying role as mediators of counterion fluxes?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2016. **1857**(8): p. 1258-1266.
90. Inoue, I., et al., *ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane*. Nature, 1991. **352**(6332): p. 244-247.
91. Kulawiak, B. and A. Szewczyk, *Current Challenges of Mitochondrial Potassium Channel Research*. Frontiers in Physiology, 2022. **13**.
92. Foster, D.B., et al., *Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK<sub>(ATP)</sub>*. Circ Res, 2012. **111**(4): p. 446-54.
93. Paggio, A., et al., *Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria*. Nature, 2019. **572**(7771): p. 609-613.
94. Juhaszova, M., et al., *ATP Synthase K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>-Fluxes Drive ATP Synthesis and Enable Mitochondrial K<sup>+</sup>-“Uniporter” Function: I. Characterization of Ion Fluxes*. Function, 2022. **3**(2).
95. Siemen, D., et al., *Ca<sup>2+</sup>-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(2): p. 549-54.
96. Dolga, A.M., et al., *Mitochondrial Small Conductance SK2 Channels Prevent Glutamate-induced Oxytosis and Mitochondrial Dysfunction\**. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(15): p. 10792-10804.
97. De Marchi, U., et al., *Intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells*. Cell Calcium, 2009. **45**(5): p. 509-16.
98. Krabbendam, I.E., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and their role in cell life and death pathways*. Cell Calcium, 2018. **69**: p. 101-111.
99. Rotko, D., et al., *Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2020. **125**: p. 105792.
100. Stowe, D.F., et al., *Protection against cardiac injury by small Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2013. **1828**(2): p. 427-442.
101. Szabò, I., et al., *A Novel Potassium Channel in Lymphocyte Mitochondria\**. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(13): p. 12790-12798.

102. Barros, F., et al., *New Structures and Gating of Voltage-Dependent Potassium (Kv) Channels and Their Relatives: A Multi-Domain and Dynamic Question*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(2): p. 248.
103. Bachmann, M., et al., *Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**.
104. Szabo, I. and A. Szewczyk, *Mitochondrial Ion Channels*. Annu Rev Biophys, 2023. **52**: p. 229-254.
105. Wojtovich, A.P., et al., *SLO-2 is cytoprotective and contributes to mitochondrial potassium transport*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28287.
106. Kulawiak, B., P. Bednarczyk, and A. Szewczyk, *Multidimensional Regulation of Cardiac Mitochondrial Potassium Channels*. Cells, 2021. **10**(6).
107. Rusznák, Z., et al., *Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells*. Virchows Archiv, 2008. **452**(4): p. 415-426.
108. Wrzosek, A., et al., *Alternative Targets for Modulators of Mitochondrial Potassium Channels*. Molecules, 2022. **27**(1): p. 299.
109. Toczyłowska-Maminska, R., et al., *Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(3): p. 764-772.
110. Wrzosek, A., et al., *Mitochondrial Potassium Channels as Druggable Targets*. Biomolecules, 2020. **10**(8): p. 1200.
111. Leon-Aparicio, D., et al., *Novel Potassium Channels in Kidney Mitochondria: The Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Gated HCN Channels*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(20).
112. Costa, A.D., et al., *The direct physiological effects of mitoK<sub>ATP</sub> opening on heart mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H406-15.
113. Kowaltowski, A.J., et al., *Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H649-57.
114. Skalska, J., et al., *Calcium Ions Regulate K<sup>+</sup> Uptake into Brain Mitochondria: The Evidence for a Novel Potassium Channel*. International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(3): p. 1104-1120.
115. Skalska, J., et al., *A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2008. **1777**(7): p. 651-659.
116. Augustynek, B., et al., *Mitochondrial BK Channel Openers CGS7181 and CGS7184 Exhibit Cytotoxic Properties*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(2): p. 353.
117. Keerti, M. and L. Min, *Mitochondrial Channels and Their Role in Cardioprotection*, in *Ion Transporters*, T. Zuzana Sevcikova, Editor. 2021, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.
118. Pereira, O. and A.J. Kowaltowski, *Mitochondrial K<sup>+</sup> Transport: Modulation and Functional Consequences*. Molecules, 2021. **26**(10).
119. Garlid, K.D., *Cation transport in mitochondria — The potassium cycle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1996. **1275**(1): p. 123-126.
120. Korge, P., H.M. Honda, and J.N. Weiss, *K<sup>+</sup>-dependent regulation of matrix volume improves mitochondrial function under conditions mimicking ischemia-reperfusion*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2005. **289**(1): p. H66-H77.
121. Liu, Y., et al., *Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **874**: p. 27-37.
122. Garlid, K.D., et al., *The mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel as a receptor for potassium channel openers*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8796-9.

123. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection.* *Circ Res*, 1997. **81**(6): p. 1072-82.
124. Remillard, C.V. and J.X.J. Yuan, *Activation of K<sup>+</sup> channels: an essential pathway in programmed cell death.* *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004. **286**(1): p. L49-L67.
125. Honrath, B., et al., *Small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in the plasma membrane, mitochondria and the ER: Pharmacology and implications in neuronal diseases.* *Neurochem Int*, 2017. **109**: p. 13-23.
126. Bednarczyk, P., et al., *Identification of a voltage-gated potassium channel in gerbil hippocampal mitochondria.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **397**(3): p. 614-620.
127. Leanza, L., et al., *Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells.* *EMBO Molecular Medicine*, 2012. **4**(7): p. 577-593.
128. Szabo, I., et al., *Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(39): p. 14861-6.
129. Szabò, I., et al., *Single-point mutations of a lysine residue change function of Bax and Bcl-xL expressed in Bax- and Bak-less mouse embryonic fibroblasts: novel insights into the molecular mechanisms of Bax-induced apoptosis.* *Cell Death & Differentiation*, 2011. **18**(3): p. 427-438.
130. Peruzzo, R., et al., *Regulation of Proliferation by a Mitochondrial Potassium Channel in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells.* *Frontiers in Oncology*, 2017. **7**.
131. Xu, W., et al., *Cytoprotective Role of Ca<sup>2+</sup>- Activated K<sup>+</sup> Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane.* *Science*, 2002. **298**(5595): p. 1029.
132. Douglas, R.M., et al., *The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain.* *Neuroscience*, 2006. **139**(4): p. 1249-1261.
133. Głuchowska, A., et al., *Lack of activity of the mitochondrial large-conductance calcium-regulated potassium channels in senescent vascular smooth muscle cells.* *Mech Ageing Dev*, 2023. **215**: p. 111871.
134. Bednarczyk, P., et al., *Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells.* *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2013. **304**(11): p. H1415-H1427.
135. Sek, A., et al., *Identification of the Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Regulated Potassium Channel in Mitochondria of Human Bronchial Epithelial Cells.* *Molecules*, 2021. **26**(11): p. 3233.
136. Kicinska, A., et al., *A large-conductance calcium-regulated K<sup>+</sup> channel in human dermal fibroblast mitochondria.* *Biochemical Journal*, 2016. **473**(23): p. 4457-4471.
137. Koszela-Piotrowska, I., et al., *A large-conductance calcium-activated potassium channel in potato (*Solanum tuberosum*) tuber mitochondria.* *Biochem J*, 2009. **424**(2): p. 307-16.
138. Laskowski, M., et al., *Mitochondrial large-conductance potassium channel from *Dictyostelium discoideum*.* *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015. **60**: p. 167-175.
139. Cao, Q., et al., *BK Channels Alleviate Lysosomal Storage Diseases by Providing Positive Feedback Regulation of Lysosomal Ca<sup>2+</sup> Release.* *Dev Cell*, 2015. **33**(4): p. 427-41.
140. Singh, H., E. Stefani, and L. Toro, *Intracellular BK(Ca) (iBK(Ca)) channels.* *J Physiol*, 2012. **590**(23): p. 5937-47.

141. Li, B. and T.M. Gao, *Functional Role of Mitochondrial and Nuclear BK Channels*. Int Rev Neurobiol, 2016. **128**: p. 163-91.
142. Sanghvi, S.K., et al., *BKCa channels in exosomes regulate their cargo and function*. Biophysical Journal, 2022. **121**(3).
143. Li, Q. and J. Yan, *Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits*. 2016, Elsevier. p. 51-90.
144. Gonzalez-Perez, V. and C.J. Lingle, *Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits*. Annu Rev Physiol, 2019. **81**: p. 113-137.
145. Singh, H., et al., *mitoBKCa is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(26): p. 10836-10841.
146. Soltysinska, E., et al., *KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103402.
147. Kulawiak, B., et al., *Loss of the large conductance calcium-activated potassium channel causes an increase in mitochondrial reactive oxygen species in glioblastoma cells*. Pflugers Arch, 2023. **475**(9): p. 1045-1060.
148. Balderas, E., et al., *Mitochondrial BKCa channel*. Frontiers in Physiology, 2015. **6**(104).
149. Sakai, Y., M. Harvey, and B. Sokolowski, *Identification and quantification of full-length BK channel variants in the developing mouse cochlea*. Journal of Neuroscience Research, 2011. **89**(11): p. 1747-1760.
150. Bednarczyk, P., et al., *Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BKCa Channel to the Respiratory Chain*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e68125.
151. Peng, Z., et al., *Intrinsic Disorder in the BK Channel and Its Interactome*. PLoS ONE, 2014. **9**(4): p. e94331.
152. Lu, R., et al., *MaxiK channel partners: physiological impact*. The Journal of Physiology, 2006. **570**(1): p. 65-72.
153. Miranda-Rottmann, S., A.S. Kozlov, and A.J. Hudspeth, *Highly specific alternative splicing of transcripts encoding BK channels in the chicken's cochlea is a minor determinant of the tonotopic gradient*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(14): p. 3646-60.
154. Sokolowski, B., et al., *Conserved BK channel-protein interactions reveal signals relevant to cell death and survival*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28532.
155. Ma, D., et al., *Differential trafficking of carboxyl isoforms of Ca<sup>2+</sup>-gated (Slo1) potassium channels*. FEBS Lett, 2007. **581**(5): p. 1000-8.
156. Kim, J.M., et al., *Expression of BK-type calcium-activated potassium channel splice variants during chick cochlear development*. J Comp Neurol, 2010. **518**(13): p. 2554-69.
157. Du, X., et al., *Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar ataxia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(11): p. 6023-6034.
158. Szteyn, K. and H. Singh, *BKCa Channels as Targets for Cardioprotection*. Antioxidants, 2020. **9**(8): p. 760.
159. Maqoud, F., et al., *Molecular structure and function of big calcium-activated potassium channels in skeletal muscle: pharmacological perspectives*. Physiol Genomics, 2017. **49**(6): p. 306-317.
160. Walewska, A., et al., *Mechanosensitivity of mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channels*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2018. **1859**(9): p. 797-805.



161. Cordero Padilla, K., et al., *BK ZERO isoform HEK293 stably transfected cell lines differing 3'UTRs to assess miR-9 regulation*. PLOS ONE, 2024. **19**(3): p. e0298966.
162. Ohya, S., et al., *Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac mitochondria*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2005. **289**(4): p. H1635-H1642.
163. Piwonska, M., et al., *Differential distribution of Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel  $\beta$ 4 subunit in rat brain: Immunolocalization in neuronal mitochondria*. Neuroscience, 2008. **153**(2): p. 446-460.
164. Testai, L., et al., *The Citrus Flavanone Naringenin Produces Cardioprotective Effects in Hearts from 1 Year Old Rat, through Activation of mitoBK Channels*. Frontiers in Pharmacology, 2017. **8**.
165. Balderas, E., et al., *MitoBK Ca channel is functionally associated with its regulatory  $\beta$ 1 subunit in cardiac mitochondria*. The Journal of Physiology, 2019. **597**(15): p. 3817-3832.
166. Fretwell, L. and J.M. Dickenson, *Role of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels in adenosine A1 receptor-mediated pharmacological preconditioning in H9c2 cells*. European Journal of Pharmacology, 2009. **618**(1): p. 37-44.
167. Tang, X.D., et al., *Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 531-535.
168. Augustynek, B., et al., *Hemin inhibits the large conductance potassium channel in brain mitochondria: a putative novel mechanism of neurodegeneration*. Exp Neurol, 2014. **257**: p. 70-5.
169. Walewska, A., et al., *Targeting Mitochondrial Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel by Hydrogen Sulfide via Heme-Binding Site*. J Pharmacol Exp Ther, 2022. **381**(2): p. 137-150.
170. Rotko, D., et al., *Heme is required for carbon monoxide activation of mitochondrial BKCa channel*. European Journal of Pharmacology, 2020. **881**: p. 173191.
171. Atlante, A. and D. Valenti, *Mitochondria Have Made a Long Evolutionary Path from Ancient Bacteria Immigrants within Eukaryotic Cells to Essential Cellular Hosts and Key Players in Human Health and Disease*. Current Issues in Molecular Biology, 2023. **45**(5): p. 4451-4479.
172. Jaggar, J.H., et al., *Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. 805-12.
173. Brazier, S.P., et al., *Cysteine Residues in the C-terminal Tail of the Human BKCa Subunit Are Important for Channel Sensitivity to Carbon Monoxide*. 2009, Springer Netherlands. p. 49-56.
174. Hermann, A., G. Sitdikova, and T. Weiger, *Oxidative Stress and Maxi Calcium-Activated Potassium (BK) Channels*. Biomolecules, 2015. **5**(3): p. 1870-1911.
175. Williams, S.E., et al., *Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2093-7.
176. Kaczara, P., et al., *Carbon monoxide released by CORM-401 uncouples mitochondrial respiration and inhibits glycolysis in endothelial cells: A role for mitoBKCa channels*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1847**(10): p. 1297-309.
177. Gessner, G., et al., *CO-independent modification of K(+) channels by tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM-2)*. Eur J Pharmacol, 2017. **815**: p. 33-41.
178. Telezhkin, V., et al., *Hydrogen Sulfide Inhibits Human BKCa Channels*. 2009, Springer Netherlands. p. 65-72.
179. Liu, Y., et al., *Hydrogen sulfide preconditioning or neutrophil depletion attenuates ischemia-reperfusion-induced mitochondrial dysfunction in rat small intestine*.

- American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2012. **302**(1): p. G44-G54.
180. Valverde, M.A., *Acute Activation of Maxi-K Channels (hSlo) by Estradiol Binding to the &nbsp;Subunit*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1929-1931.
  181. Miller, C., et al., *Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 316-318.
  182. Kang, J., J.R. Huguenard, and D.A. Prince, *Development of BK channels in neocortical pyramidal neurons*. Journal of Neurophysiology, 1996. **76**(1): p. 188-198.
  183. Gu, X.Q., et al., *Mitochondrial but not plasmalemmal BK channels are hypoxia-sensitive in human glioma*. Glia, 2014. **62**(4): p. 504-513.
  184. Panyi, G., et al., *K<sup>+</sup> channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(18): p. 2199-220.
  185. Galvez, A., et al., *Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus**. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(19): p. 11083-11090.
  186. Fahanik-babaei, J., et al., *Electro-pharmacological profile of a mitochondrial inner membrane big-potassium channel from rat brain*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2011. **1808**(1): p. 454-460.
  187. Bergeron, Z. and J.-P. Bingham, *Scorpion Toxins Specific for Potassium (K<sup>+</sup>) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering*. Toxins, 2012. **4**(11): p. 1082-1119.
  188. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. Journal of General Physiology, 2014. **144**(5): p. 415-440.
  189. Bilmen, J.G., et al., *Inhibition of SERCA Ca<sup>2+</sup> pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)*. European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(15): p. 3678-3687.
  190. Bilmen, J.G., L.L. Wootton, and F. Michelangeli, *The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase by paxilline*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002. **406**(1): p. 55-64.
  191. Bednarczyk, P., G.D. Barker, and A.P. Halestrap, *Determination of the rate of K<sup>+</sup> movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2008. **1777**(6): p. 540-548.
  192. Kulawiak, B. and A. Szewczyk, *Glutamate-induced cell death in HT22 mouse hippocampal cells is attenuated by paxilline, a BK channel inhibitor*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 169-72.
  193. Olesen, S.-P., et al., *Selective activation of Ca<sup>2+</sup> -dependent K<sup>+</sup> channels by novel benzimidazolone*. European Journal of Pharmacology, 1994. **251**(1): p. 53-59.
  194. Debska, G., et al., *Large-conductance K<sup>+</sup> channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells*. Biochemical Pharmacology, 2003. **65**(11): p. 1827-1834.
  195. Kicinska, A. and A. Szewczyk, *Large-Conductance Potassium Cation Channel Opener NS1619 Inhibits Cardiac Mitochondria Respiratory Chain*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2004. **14**(1-2): p. 59-61.
  196. Cancherini, D.V., B.B. Queliconi, and A.J. Kowaltowski, *Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>channel activity in isolated heart mitochondria*. Cardiovascular Research, 2007. **73**(4): p. 720-728.
  197. Łukasiak, A., et al., *SERCA, complex I of the respiratory chain and ATP-synthase inhibition are involved in pleiotropic effects of NS1619 on endothelial cells*. European Journal of Pharmacology, 2016. **786**: p. 137-147.

198. Park, W.S., et al., *The mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat ventricular myocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **362**(1): p. 31-36.
199. Gribkoff, V.K., et al., *The substituted benzimidazolone NS004 is an opener of the cystic fibrosis chloride channel*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(15): p. 10983-10986.
200. Bentzen, B.H., et al., *The Small Molecule NS11021 Is a Potent and Specific Activator of Ca<sup>2+</sup>-Activated Big-Conductance K<sup>+</sup> Channels*. Molecular Pharmacology, 2007. **72**(4): p. 1033-1044.
201. Rockman, M.E., A.G. Vouga, and B.S. Rothberg, *Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021*. Journal of General Physiology, 2020. **152**(6).
202. Kulawiak, B., et al., *BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria*. Exp Neurol, 2008. **212**(2): p. 543-7.
203. Debska-Vielhaber, G., et al., *Large-conductance K<sup>+</sup> channel openers induce death of human glioma cells*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60**(4): p. 27-36.
204. Wrzosek, A., et al., *The potassium channel opener CGS7184 activates Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum*. European Journal of Pharmacology, 2012. **690**(1): p. 60-67.
205. Liu, Y.-C., Y.-K. Lo, and S.-N. Wu, *Stimulatory effects of chlorzoxazone, a centrally acting muscle relaxant, on large conductance calcium-activated potassium channels in pituitary GH3 cells*. Brain Research, 2003. **959**(1): p. 86-97.
206. Hernández-Aquino, E. and P. Muriel, *Chapter 46 - Naringenin and the Liver*, in *Liver Pathophysiology*, P. Muriel, Editor. 2017, Academic Press: Boston. p. 633-651.
207. Kampa, R.P., et al., *Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts*. Experimental Dermatology, 2019. **28**(5): p. 543-550.
208. Hsu, H.-T., et al., *Ability of naringenin, a bioflavonoid, to activate M-type potassium current in motor neuron-like cells and to increase BKCa-channel activity in HEK293T cells transfected with  $\alpha$ -hSlo subunit*. BMC Neuroscience, 2014. **15**(1).
209. Aldakkak, M., et al., *Mitochondrial matrix K<sup>+</sup> flux independent of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel opening*. American journal of physiology. Cell physiology, 2010. **298**(3): p. C530-C541.
210. Wulff, H. and B.S. Zhorov, *K<sup>+</sup>Channel Modulators for the Treatment of Neurological Disorders and Autoimmune Diseases*. Chemical Reviews, 2008. **108**(5): p. 1744-1773.
211. Bednarczyk, P., et al., *Quinine inhibits mitochondrial ATP-regulated potassium channel from bovine heart*. J Membr Biol, 2004. **199**(2): p. 63-72.
212. Kathiresan, T., et al., *A protein interaction network for the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the mouse cochlea*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2009. **8**(8): p. 1972-1987.
213. Zhang, J., et al., *BK Channel Subproteome Includes Novel Mitochondrial Partners: ADP/ATP Carrier and TOM 22 Import Receptor*. Biophysical Journal, 2016. **110**(3, Supplement 1): p. 279a.
214. Zhang, J., et al., *The mitochondrial BKCa channel cardiac interactome reveals BKCa association with the mitochondrial import receptor subunit Tom22, and the adenine nucleotide translocator*. Mitochondrion, 2017. **33**: p. 84-101.
215. Singh, H., et al., *MaxiK channel interactome reveals its interaction with GABA transporter 3 and heat shock protein 60 in the mammalian brain*. Neuroscience, 2016. **317**: p. 76-107.

216. Bautista, L., et al., *Hypoxia inducible factor-2alpha stabilization and maxi-K<sup>+</sup> channel beta1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: role in preconditioning*. *Circ Res*, 2009. **104**(12): p. 1364-72.
217. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H434-40.
218. Borchert, G.H., C. Yang, and F. Kolar, *Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(2): p. H507-13.
219. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A*. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 198-203.
220. Bentzen, B.H., et al., *Activation of big conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury*. *Pflugers Arch*, 2009. **457**(5): p. 979-88.
221. Cheng, Y., et al., *Hypoxia Increases Activity of the BK-Channel in the Inner Mitochondrial Membrane and Reduces Activity of the Permeability Transition Pore*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2008. **22**(1-4): p. 127-136.
222. Trombetta-Lima, M., I.E. Krabbendam, and A.M. Dolga, *Calcium-activated potassium channels: implications for aging and age-related neurodegeneration*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2020. **123**: p. 105748.
223. Jafari, A., et al., *Brain mitochondrial ATP-insensitive large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel properties are altered in a rat model of amyloid- $\beta$  neurotoxicity*. *Experimental Neurology*, 2015. **269**: p. 8-16.
224. Malinska, D., S.R. Mirandola, and W.S. Kunz, *Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(10): p. 2043-8.
225. Frankenreiter, S., et al., *cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels*. *Circulation*, 2017. **136**(24): p. 2337-2355.
226. Behmenburg, F., et al., *Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0144737.
227. Frankenreiter, S., et al., *Cardioprotection by ischemic postconditioning and cyclic guanosine monophosphate-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(6): p. 822-829.
228. Redel, A., et al., *Impact of Ischemia and Reperfusion Times on Myocardial Infarct Size in Mice In Vivo*. *Experimental Biology and Medicine*, 2008. **233**(1): p. 84-93.
229. Fukasawa, M., et al., *6-[4-(1-Cyclohexyl-1 H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1 H)quinolinone (Cilostazol), a Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor, Reduces Infarct Size via Activation of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Rabbit Hearts*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008. **326**(1): p. 100-104.
230. Gaspar, T., et al., *Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels*. *J Neurochem*, 2008. **105**(4): p. 1115-28.
231. Da Pozzo, E., et al., *The Citrus Flavanone Naringenin Protects Myocardial Cells against Age-Associated Damage*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 9536148.
232. Bischof, H., et al., *mitoBKCa is functionally expressed in murine and human breast cancer cells and potentially contributes to metabolic reprogramming*. 2024, eLife Sciences Publications, Ltd.
233. Tait, S.W., et al., *Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria*. *Dev Cell*, 2010. **18**(5): p. 802-13.

234. Zhao, Q., et al., *A mitochondrial specific stress response in mammalian cells*. *Embo j*, 2002. **21**(17): p. 4411-9.
235. Ponce, A., et al., *The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions*. *Physiological Reports*, 2018. **6**(8): p. e13663.
236. Ahring, P.K., et al., *Stable expression of the human large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits in HEK293 cells*. *FEBS Letters*, 1997. **415**(1): p. 67-70.
237. van den Ent, F. and J. Löwe, *RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006. **67**(1): p. 67-74.
238. Kudin, A.P., et al., *Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(6): p. 4127-4135.
239. Branon, T.C., et al., *Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID*. *Nature biotechnology*, 2018. **36**(9): p. 880-887.
240. Roux, K.J., D.I. Kim, and B. Burke, *BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions*. *Current Protocols in Protein Science*, 2013. **74**(1).
241. Krajewska, M., et al., *Interaction of ROMK2 channel with lipid kinases DGKE and AGK: Potential channel activation by localized anionic lipid synthesis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2024. **1869**(2): p. 159443.
242. Murata, D., et al., *Slc25a3-dependent copper transport controls flickering-induced Opa1 processing for mitochondrial safeguard*. *Developmental Cell*, 2024. **59**(19): p. 2578-2592.e7.
243. Kwak, C., et al., *Contact-ID, a tool for profiling organelle contact sites, reveals regulatory proteins of mitochondrial-associated membrane formation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020. **117**(22): p. 12109-12120.
244. Hu, Y., et al., *Expression and Distribution of Heme Oxygenase-2 mRNA and Protein in Rat Kidney*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998. **46**(2): p. 249-256.
245. Ma, N., et al., *Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina*. *Journal of Neurocytology*, 2004. **33**(4): p. 407-415.
246. Chen, S., et al., *Heme Oxygenases: Cellular Multifunctional and Protective Molecules against UV-Induced Oxidative Stress*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 1-17.
247. Zhang, N., et al., *Expression, purification and characterization of TMC01 for structural studies*. *Protein Expression and Purification*, 2021. **179**: p. 105803.
248. Wang, Q.-C., et al., *TMC01 Is an ER Ca<sup>2+</sup> Load-Activated Ca<sup>2+</sup> Channel*. *Cell*, 2016. **165**(6): p. 1454-1466.
249. Yoo, H.C., et al., *A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells*. *Cell Metabolism*, 2020. **31**(2): p. 267-283.e12.
250. Laskowski, M., et al., *What do we not know about mitochondrial potassium channels?* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2016. **1857**(8): p. 1247-1257.
251. Garlid, K.D. and P. Paucek, *Mitochondrial potassium transport: the K<sup>(+)</sup> cycle*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1606**(1-3): p. 23-41.
252. Jarmuszkiewicz, W. and A. Szewczyk, *Energy-dissipating hub in muscle mitochondria: Potassium channels and uncoupling proteins*. *Arch Biochem Biophys*, 2019. **664**: p. 102-109.
253. Gu, X.Q., et al., *Hypoxia increases BK channel activity in the inner mitochondrial membrane*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **358**(1): p. 311-6.

254. Cheng, Y., E. Gulbins, and D. Siemen, *Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **27**(3-4): p. 191-200.
255. Strøbæk, D., et al., *Modulation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> Channel, hslø, by the Substituted Diphenylurea NS 1608, Paxilline and Internal Ca<sup>2+</sup>*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 903-914.
256. Borchert, G.H., M. Hlaváčková, and F. Kolář, *Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013. **238**(2): p. 233-41.
257. Walewska, A., A. Szewczyk, and P. Koprowski, *External Hemin as an Inhibitor of Mitochondrial Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Activity*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(21): p. 13391.
258. Gribkoff, V.K., et al., *Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels*. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**(1): p. 206-17.
259. Maliszewska-Olejniczak, K., et al., *Deficiency of the BK(Ca) potassium channel displayed significant implications for the physiology of the human bronchial epithelium*. *Mitochondrion*, 2024. **76**: p. 101880.
260. Laskowski, M., et al., *Single-Channel Properties of the ROMK-Pore-Forming Subunit of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(21).
261. Capera, J., et al., *The Mitochondrial Routing of the Kv1.3 Channel*. *Frontiers in Oncology*, 2022. **12**.
262. Becker, T., J. Song, and N. Pfanner, *Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria*. *Trends in Cell Biology*, 2019. **29**(7): p. 534-548.
263. Engel, A.J., et al., *Codon Bias Can Determine Sorting of a Potassium Channel Protein*. *Cells*, 2021. **10**(5).
264. Peruzzo, R., et al., *Insight into the mechanism of cytotoxicity of membrane-permeant psoralenic Kv1.3 channel inhibitors by chemical dissection of a novel member of the family*. *Redox Biology*, 2020. **37**: p. 101705.
265. Kim, H. and K.H. Oh, *Protein Network Interacting with BK Channels*. *Int Rev Neurobiol*, 2016. **128**: p. 127-61.
266. Matsuo, Y., et al., *Redox Regulation by Thioredoxin and its Related Molecules*. *Drug News Perspect*, 2002. **15**(9): p. 575-580.
267. Frand, A.R., J.W. Cuozzo, and C.A. Kaiser, *Pathways for protein disulphide bond formation*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(5): p. 203-10.
268. Matsuo, Y., *Introducing Thioredoxin-Related Transmembrane Proteins: Emerging Roles of Human TMX and Clinical Implications*. *Antioxid Redox Signal*, 2022. **36**(13-15): p. 984-1000.
269. Lynes, E.M., et al., *Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane*. *Embo j*, 2012. **31**(2): p. 457-70.
270. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 635-48.
271. Krols, M., G. Bultynck, and S. Janssens, *ER-Mitochondria contact sites: A new regulator of cellular calcium flux comes into play*. *J Cell Biol*, 2016. **214**(4): p. 367-70.
272. Raturi, A., et al., *TMX1 determines cancer cell metabolism as a thiol-based modulator of ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> flux*. *J Cell Biol*, 2016. **214**(4): p. 433-44.
273. Guerra, C., et al., *The reductase TMX1 contributes to ERAD by preferentially acting on membrane-associated folding-defective polypeptides*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **503**(2): p. 938-943.
274. Lewandowska, J., et al., *Redox Regulation of Mitochondrial Potassium Channels Activity*. *Antioxidants*, 2024. **13**(4): p. 434.

275. Zabłocki, K. and J. Bandorowicz-Pikuła, [*Calcium homeostasis in the animal cell--an outline*]. Postepy Biochem, 2012. **58**(4): p. 387-92.
276. Nymark, P., et al., *Gene expression profiles in asbestos-exposed epithelial and mesothelial lung cell lines*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 62.
277. Lagadec, C., et al., *Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34545.
278. Müller, M.R. and A. Rao, *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
279. Zhang, X., et al., *Redox signals at the ER-mitochondria interface control melanoma progression*. Embo j, 2019. **38**(15): p. e100871.

## Wykaz publikacji Doktorantki

1. **Galecka, S.**<sup>1</sup>, Kulawiak, B., Bednarczyk, P., Singh, H., & Szewczyk, A. (2021). Single channel properties of mitochondrial large conductance potassium channel formed by BK-VEDEC splice variant. *Scientific Reports*, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-90465-3
2. Bednarczyk, P., Kampa, R. P., **Galecka, S.**, Sęk, A., Walewska, A., & Koprowski, P. (2021). Patch-Clamp Recording of the Activity of in the Inner Mitochondrial. In *Mitochondrial Medicine* (pp. 235-248)
3. Wrzosek, A., **Galecka, S.**, Żochowska, M., Olszewska, A., & Kulawiak, B. (2022). Alternative Targets for Modulators of Mitochondrial Potassium Channels. *Molecules*, 27(1), 299.
4. Szewczyk, A., Bednarczyk, P., Jędraszko, J., Kampa, R. P., Koprowski, P., Krajewska, M., **Kucman, S.**<sup>2</sup>, Kulawiak, B., Laskowski, M., Rotko, D., Sęk, A., Walewska, A., Żochowska, M., Wrzosek, A. (2018). Mitochondrialne kanały potasowe: podsumowanie. *Postępy Biochemii*, 64(3), 196-212. doi:10.18388/pb.2018\_132

## Publikacja w przygotowaniu

1. **Galecka, S.**, Kulawiak, B. (w przygotowaniu). Coupling of potassium and calcium ion transport in mitochondria.

<sup>1</sup> Praca badawcza obejmująca tematykę pracy doktorskiej

<sup>2</sup> Kucman – nazwisko panińskie



## 10 Załączniki

**Tabela Z1 Lista białek unikatowych dla próbki β4-TurboID względem próbek kontrolnych w badaniach całokomórkowych.**

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score i liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce		
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3
Q9H3P7	Golgi resident protein GCP60	441.0 (8)	153.0 (4)	-
Q9HCU5	Prolactin regulatory element-binding protein	733.0 (8)	117.0 (2)	-
P62491, Q15907	Ras-related protein Rab-11A, Ras-related protein Rab-11B	464.0 (7)	268.0 (4)	-
Q9BZF1	Oxysterol-binding protein-related protein 8	388.0 (7)	139.0 (2)	188.0 (3)
P35613	Basigin	358.0 (6)	105.0 (2)	103.0 (2)
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	275.0 (6)	110.0 (2)	-
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	197.0 (5)	166.0 (4)	-
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	514.0 (5)	424.0 (3)	-
Q8TCJ2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	249.0 (5)	173.0 (3)	-
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	281.0 (5)	110.0 (3)	-
O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	541.0 (5)	100.0 (2)	-
Q9ULC3	Ras-related protein Rab-23	268.0 (5)	90.0 (2)	-
Q86W47	Calcium-activated potassium channel subunit beta-4	1823.0 (4)	1661.0 (4)	620.0 (3)
Q9H3N1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	281.0 (4)	251.0 (4)	216.0 (3)
Q8NFK8	Torsin-1A-interacting protein 2	273.0 (4)	219.0 (4)	-
P30519	Heme oxygenase 2	188.0 (4)	207.0 (4)	-
O75915	PRA1 family protein 3	833.0 (4)	592.0 (2)	176.0 (3)
P05556	Integrin beta-1	233.0 (4)	107.0 (2)	93.0 (2)
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	406.0 (4)	75.0 (2)	-
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	217.0 (4)	143.0 (2)	-
Q9Y6N7	Roundabout homolog 1	202.0 (4)	86.0 (2)	-
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	203.0 (3)	164.0 (3)	-
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a	288.0 (3)	85.0 (2)	112.0 (2)
Q9Y6B6	GTP-binding protein SAR1b	271.0 (3)	119.0 (2)	-
P20340, Q9NRW1	Ras-related protein Rab-6A,Ras-related protein Rab-6B	156.0 (3)	73.0 (2)	-
O95208	Epsin-2	142.0 (2)	125.0 (3)	-
Q9NPA0	ER membrane protein complex subunit 7	82.0 (2)	94.0 (2)	160.0 (2)
P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	271.0 (2)	185.0 (2)	-
Q02952	A-kinase anchor protein 12	88.0 (2)	203.0 (2)	-
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	161.0 (2)	92.0 (2)	-
P43307	Translocon-associated protein subunit alpha	136.0 (2)	104.0 (2)	-
Q9Y5V3	Melanoma-associated antigen D1	90.0 (2)	149.0 (2)	-
Q9H2H9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	86.0 (2)	150.0 (2)	-
Q9HDC5	Junctophilin-1	91.0 (2)	125.0 (2)	-
P62330	ADP-ribosylation factor 6	114.0 (2)	87.0 (2)	-
Q96A33	PAT complex subunit CCDC47	101.0 (2)	90.0 (2)	-
Q9H8Y8	Golgi reassembly-stacking protein 2	81.0 (2)	104.0 (2)	-
Q14160	Protein scribble homolog	79.0 (2)	86.0 (2)	-
O94906	Pre-mRNA-processing factor 6	-	88.0 (2)	103.0 (2)
CATD_HUMAN, P07339	>sp CATD_HUMAN ,Cathepsin D	-	-	196.0 (3)
Q8N5G2	Macoilin	-	-	134.0 (2)
P05089	Arginase-1	-	180.0 (4)	-
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155	-	128.0 (3)	-
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21	-	184.0 (2)	-
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein	-	136.0 (2)	-
Q9Y394	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	-	134.0 (2)	-
P63027	Vesicle-associated membrane protein 2	-	130.0 (2)	-
P05109	Protein S100-A8	-	120.0 (2)	-
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	-	112.0 (2)	-
Q96QA5	Gasdermin-A	-	103.0 (2)	-
Q9NRG9	Aladin	-	95.0 (2)	-
P29508	Serpin B3	-	93.0 (2)	-
Q9P003	Protein cornichon homolog 4	-	84.0 (2)	-
Q08554	Desmocollin-1	-	84.0 (2)	-
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	-	75.0 (2)	-
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	-	73.0 (2)	-
Q95716	Ras-related protein Rab-3D	322.0 (6)	-	-
P20336	Ras-related protein Rab-3A	264.0 (5)	-	-
Q92692	Nectin-2	214.0 (5)	-	-
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor	249.0 (4)	-	-
P11233	Ras-related protein Ral-A	215.0 (4)	-	-
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	213.0 (4)	-	-
Q9H2J7	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	204.0 (4)	-	-
P43121	Cell surface glycoprotein MUC18	193.0 (4)	-	-
Q96G23	Ceramide synthase 2	190.0 (4)	-	-
Q8WUX9	Charged multivesicular body protein 7	241.0 (3)	-	-
Q9Y385	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	239.0 (3)	-	-
Q15629	Translocating chain-associated membrane protein 1	228.0 (3)	-	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score i liczba zidentyfikowanych peptydów w danej próbce		
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3
O14681	Etoposide-induced protein 2.4 homolog	170.0 (3)	-	-
Q99442	Translocation protein SEC62	159.0 (3)	-	-
Q15768	Ephrin-B3	155.0 (3)	-	-
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1	153.0 (3)	-	-
Q9NWX8	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	153.0 (3)	-	-
O00767	Stearoyl-CoA desaturase	138.0 (3)	-	-
P55011	Solute carrier family 12 member 2	125.0 (3)	-	-
Q96566	Chloride channel CLIC-like protein 1	109.0 (3)	-	-
O95721	Synaptosomal-associated protein 29	106.0 (3)	-	-
P11441	Ubiquitin-like protein 4A	97.0 (3)	-	-
Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	348.0 (2)	-	-
O43169	Cytochrome b5 type B	209.0 (2)	-	-
P14209	CD99 antigen	197.0 (2)	-	-
Q92859	Neogenin	177.0 (2)	-	-
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	149.0 (2)	-	-
Q9Y2H6	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A	149.0 (2)	-	-
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG	146.0 (2)	-	-
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	145.0 (2)	-	-
O95297	Myelin protein zero-like protein 1	141.0 (2)	-	-
P04439	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain	137.0 (2)	-	-
Q6IAA8	Ragulator complex protein LAMTOR1	130.0 (2)	-	-
Q8NHF5	Nucleoporin NUP35	128.0 (2)	-	-
Q9UM00	Calcium load-activated calcium channel	116.0 (2)	-	-
Q92572	AP-3 complex subunit sigma-1	113.0 (2)	-	-
P98172	Ephrin-B1	112.0 (2)	-	-
Q8WU79	Stromal membrane-associated protein 2	107.0 (2)	-	-
Q12955	Ankyrin-3	106.0 (2)	-	-
Q86X29	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	101.0 (2)	-	-
Q07960	Rho GTPase-activating protein 1	98.0 (2)	-	-
Q53GG5	PDZ and LIM domain protein 3	95.0 (2)	-	-
Q8IYB5	Stromal membrane-associated protein 1	92.0 (2)	-	-
Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2	91.0 (2)	-	-
P49757	Protein numb homolog	91.0 (2)	-	-
O43752	Syntaxin-6	90.0 (2)	-	-
O96005	Cleft lip and palate transmembrane protein 1	89.0 (2)	-	-
Q9Y679	Lipid droplet-regulating VLDL assembly factor AUP1	89.0 (2)	-	-
Q9UEY8	Gamma-adducin	89.0 (2)	-	-
Q86SK9	Stearoyl-CoA desaturase 5	89.0 (2)	-	-
P00533	Epidermal growth factor receptor	87.0 (2)	-	-
P84157	Matrix-remodeling-associated protein 7	86.0 (2)	-	-
O15504	Nucleoporin NUP42	85.0 (2)	-	-
Q8N128	Protein FAM177A1	85.0 (2)	-	-
Q9Y6M7	Sodium bicarbonate cotransporter 3	84.0 (2)	-	-
O95819	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	83.0 (2)	-	-
Q9Y320	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	81.0 (2)	-	-
Q13190	Syntaxin-5	81.0 (2)	-	-
P78368, Q9Y6M4	Casein kinase I isoform gamma-2,Casein kinase I isoform gamma-3	80.0 (2)	-	-
P46531	Neurogenic locus notch homolog protein 1	79.0 (2)	-	-
O00400	Acetyl-coenzyme A transporter 1	77.0 (2)	-	-
Q12981	Vesicle transport protein SEC20	74.0 (2)	-	-
CYC_HUMAN, P99999	>sp CYC_HUMAN ,Cytochrome c	73.0 (2)	-	-
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	73.0 (2)	-	-
Q9C0B5	Palmitoyltransferase ZDHHC5	71.0 (2)	-	-

**Tabela Z2 Lista białek unikatowych dla próbki  $\beta$ 4-TurboID względem próbek kontrolnych we frakcjach wzbogaconych w mitochondria.**

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
Q86W47	Calcium-activated potassium channel subunit beta-4	769.0 (5)	1932.0 (6)	1846.0 (6)	813.0 (6)
P20700	Lamin-B1	176.0 (3)	1124.0 (18)	571.0 (11)	931.0 (15)
Q96A33	Coiled-coil domain-containing protein 47	-	282.0 (5)	313.0 (6)	-
Q9NQC3	Reticulon-4	-	170.0 (2)	400.0 (3)	-
P21333	Filamin-A	-	349.0 (6)	349.0 (7)	-
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	-	154.0 (3)	346.0 (3)	-
Q14254	Flotillin-2	55.0 (1)	325.0 (7)	549.0 (10)	-
Q9HCU5	Prolactin regulatory element-binding protein	-	215.0 (3)	282.0 (4)	-
Q9NWX2	Dnaj homolog subfamily B member 12	-	152.0 (3)	316.0 (6)	-
Q12981	Vesicle transport protein SEC20	-	186.0 (3)	266.0 (4)	-
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	63.0 (1)	344.0 (5)	431.0 (7)	56.0 (1)
P27824	Calnexin	62.0 (1)	404.0 (7)	374.0 (7)	-
O75915	PRA1 family protein 3	-	200.0 (2)	223.0 (3)	-
Q95573	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3	58.0 (1)	422.0 (7)	357.0 (7)	106.0 (2)
Q9P035	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	-	198.0 (3)	198.0 (3)	-
Q9Y2H6	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A	-	197.0 (5)	198.0 (5)	-
Q02952	A-kinase anchor protein 12	73.0 (1)	388.0 (9)	391.0 (8)	-
Q9UM00	Calcium load-activated calcium channel	-	250.0 (4)	367.0 (4)	61.0 (1)
Q95793	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	-	221.0 (4)	148.0 (3)	-
P46459	Vesicle-fusing ATPase	-	149.0 (3)	203.0 (4)	-
Q70UQ0	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	-	193.0 (4)	154.0 (4)	-
Q8NBQ5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	-	166.0 (3)	180.0 (3)	-
Q96I24	Far upstream element-binding protein 3	-	274.0 (7)	134.0 (3)	97.0 (2)
Q95716	Ras-related protein Rab-3D	-	233.0 (5)	311.0 (5)	-
P43307	Translocon-associated protein subunit alpha	-	145.0 (3)	188.0 (3)	-
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	73.0 (1)	400.0 (8)	109.0 (2)	-
Q99653	Calcineurin B homologous protein 1	-	87.0 (2)	226.0 (5)	-
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214	-	177.0 (3)	135.0 (3)	-
P51572	B-cell receptor-associated protein 31	196.0 (3)	242.0 (3)	414.0 (7)	65.0 (1)
P04637	Cellular tumor antigen p53	-	152.0 (3)	-	-
Q6NUQ1	RAD50-interacting protein 1	-	151.0 (4)	-	-
P37198	Nuclear pore glycoprotein p62	-	151.0 (3)	-	-
Q96HY6	DDRKG domain-containing protein 1	70.0 (1)	174.0 (3)	292.0 (3)	62.0 (1)
Q9Y4P3	Transducin beta-like protein 2	-	176.0 (4)	203.0 (3)	64.0 (1)
O15269	Serine palmitoyltransferase 1	-	125.0 (2)	166.0 (3)	-
Q8NFB7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	-	263.0 (4)	259.0 (5)	76.0 (1)
Q8NFB8	Torsin-1A-interacting protein 2	-	126.0 (2)	160.0 (2)	-
Q99442	Translocation protein SEC62	-	132.0 (2)	151.0 (3)	-
Q03252	Lamin-B2	-	140.0 (3)	-	-
Q9C0E8	Endoplasmic reticulum junction formation protein lunapark	-	160.0 (2)	118.0 (3)	-
Q92575	UBX domain-containing protein 4	-	126.0 (1)	234.0 (3)	-
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11	57.0 (1)	147.0 (3)	223.0 (3)	185.0 (2)
O76024	Wolframin	-	136.0 (3)	-	-
Q13586	Stromal interaction molecule 1	-	119.0 (1)	214.0 (5)	67.0 (1)
Q71RC2	La-related protein 4	-	146.0 (2)	120.0 (2)	-
Q15382	GTP-binding protein Rheb	-	167.0 (4)	97.0 (2)	-
P27544	Ceramide synthase 1	-	128.0 (1)	135.0 (1)	-
Q9NRW7	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	-	131.0 (2)	-	-
O76094	Signal recognition particle subunit SRP72	-	122.0 (2)	138.0 (3)	-
Q15629	Translocating chain-associated membrane protein 1	-	239.0 (3)	156.0 (2)	61.0 (1)
Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D2	-	-	126.0 (2)	-
P12277	Creatine kinase B-type	-	111.0 (2)	100.0 (1)	55.0 (1)
Q96KC8	Dnaj homolog subfamily C member 1	60.0 (1)	97.0 (2)	217.0 (5)	-
Q9UNY4	Transcription termination factor 2	-	169.0 (3)	80.0 (2)	-
Q55WX8	Protein odr-4 homolog	-	228.0 (4)	84.0 (2)	61.0 (1)
P37802	Transgelin-2	-	156.0 (2)	90.0 (2)	-
Q96NT0	Coiled-coil domain-containing protein 115	-	123.0 (3)	121.0 (2)	-
Q72417	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	-	121.0 (2)	-	-
Q86XL3	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	-	151.0 (3)	152.0 (3)	60.0 (1)
Q15904	V-type proton ATPase subunit S1	-	149.0 (3)	92.0 (2)	-
P20337, Q96E17	Ras-related protein Rab-3B,Ras-related protein Rab-3C	-	157.0 (3)	192.0 (3)	-
P20336	Ras-related protein Rab-3A	-	157.0 (3)	192.0 (3)	-
Q92572	AP-3 complex subunit sigma-1	-	120.0 (2)	115.0 (2)	-
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	-	116.0 (3)	-	-
Q15043	Metal cation symporter ZIP14	-	105.0 (1)	125.0 (1)	-
Q9Y6A9	Signal peptidase complex subunit 1	-	115.0 (1)	-	-
Q9Y2J2	Band 4.1-like protein 3	-	86.0 (2)	144.0 (4)	-
Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1	-	176.0 (2)	53.0 (1)	-
Q96J17	Protein disulfide-isomerase TMX3	-	102.0 (2)	127.0 (2)	-
Q6NUM9	All-trans-retinol 13,14-reductase	-	-	114.0 (2)	-
Q96G23	Ceramide synthase 2	-	100.0 (2)	124.0 (2)	-
Q6ZMG9	Ceramide synthase 6	-	140.0 (2)	83.0 (2)	-
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	-	53.0 (1)	173.0 (3)	56.0 (1)
Q55W79	Centrosomal protein of 170 kDa	-	123.0 (2)	97.0 (2)	-
Q9HD20	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	53.0 (1)	198.0 (5)	96.0 (2)	148.0 (3)
Q9H1E5	Thioredoxin-related transmembrane protein 4	-	124.0 (2)	94.0 (2)	-
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	54.0 (1)	138.0 (3)	177.0 (3)	64.0 (1)
Q9NTJ5	Phosphatidylinositol-3-phosphatase SAC1	-	-	-	108.0 (2)
P53350	Serine/threonine-protein kinase PLK1	-	108.0 (2)	-	-
O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2	71.0 (1)	210.0 (4)	185.0 (4)	71.0 (1)
Q16799	Reticulon-1	-	75.0 (1)	140.0 (2)	-
Q8WW12	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	-	-	107.0 (2)	-
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	56.0 (1)	116.0 (3)	148.0 (3)	-
Q15738	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	-	74.0 (1)	178.0 (4)	66.0 (1)
Q15334	Lethal(2) giant larvae protein homolog 1	-	81.0 (2)	129.0 (2)	-
Q00341	Vigilin	56.0 (1)	98.0 (2)	218.0 (4)	-
Q9Y2G8	Dnaj homolog subfamily C member 16	-	-	104.0 (2)	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	-	151.0 (3)	55.0 (1)	-
Q92692	Nectin-2	-	54.0 (1)	150.0 (3)	-
P98088	Mucin-5AC	-	101.0 (2)	-	-
P61619, Q9H9S3	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1,Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2	63.0 (1)	118.0 (3)	-	122.0 (2)
Q9Y371	Endophilin-B1	-	101.0 (2)	-	-
O75534	Cold shock domain-containing protein E1	-	142.0 (3)	143.0 (3)	63.0 (1)
P29317	Ephrin type-A receptor 2	-	103.0 (2)	98.0 (2)	-
P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	-	-	100.0 (2)	-
O95721	Synaptosomal-associated protein 29	83.0 (1)	164.0 (4)	53.0 (1)	-
Q6NUQ4	Transmembrane protein 214	-	138.0 (3)	121.0 (2)	77.0 (1)
Q16625	Occludin	-	93.0 (1)	105.0 (2)	-
Q8WUX9	Charged multivesicular body protein 7	-	84.0 (1)	114.0 (2)	-
Q13492	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	-	97.0 (2)	100.0 (1)	-
Q7KZ17	Serine/threonine-protein kinase MARK2	-	97.0 (2)	99.0 (2)	-
P27448	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	-	-	98.0 (2)	-
P35221	Catenin alpha-1	-	98.0 (1)	-	-
Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	-	176.0 (4)	53.0 (1)	112.0 (2)
O43169	Cytochrome b5 type B	-	97.0 (2)	-	-
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	-	97.0 (2)	-	-
Q9NVT9	Armadillo repeat-containing protein 1	-	97.0 (2)	-	-
P13591	Neural cell adhesion molecule 1	-	-	96.0 (2)	-
Q6P9B6	MTOR-associated protein MEAK7	-	-	96.0 (1)	-
Q92545	Transmembrane protein 131	-	99.0 (2)	92.0 (2)	-
Q9Y385	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	51.0 (1)	110.0 (2)	125.0 (2)	-
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	-	140.0 (3)	49.0 (1)	-
Q96GP6	Scavenger receptor class F member 2	-	-	94.0 (2)	-
Q9UBC2	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	-	97.0 (2)	90.0 (2)	-
P55196	Afadin	-	44.0 (1)	142.0 (3)	-
O75695	Protein XRP2	-	93.0 (2)	-	-
Q9Y5Y0	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	-	-	93.0 (2)	-
Q9BQ04, Q9BWF3	RNA-binding protein 4B, RNA-binding protein 4	-	92.0 (2)	-	-
Q8TCG1	Protein CIP2A	-	92.0 (2)	-	-
Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	-	91.0 (2)	-	-
P49257	Protein ERGIC-53	-	54.0 (1)	128.0 (3)	-
Q8IY17	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 6	-	77.0 (1)	104.0 (1)	-
Q8IV08	5'-3' exonuclease PLD3	-	-	90.0 (2)	-
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor	-	-	90.0 (2)	-
Q9BXT1	Nucleoporin NDC1	-	174.0 (3)	64.0 (1)	60.0 (1)
O14983, P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1,Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	52.0 (1)	135.0 (3)	99.0 (2)	70.0 (1)
Q07960	Rho GTPase-activating protein 1	-	114.0 (2)	64.0 (1)	-
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	-	89.0 (2)	-	-
Q9NUU7, Q9UMR2	ATP-dependent RNA helicase DDX19A,ATP-dependent RNA helicase DDX19B	-	89.0 (2)	-	-
Q8N4V1	ER membrane protein complex subunit 5	55.0 (1)	138.0 (3)	103.0 (2)	59.0 (1)
Q9H0W5	Coiled-coil domain-containing protein 8	-	60.0 (1)	117.0 (2)	-
O96005	Cleft lip and palate transmembrane protein 1	-	98.0 (2)	79.0 (1)	-
Q9H3P7	Golgi resident protein GCP60	-	-	88.0 (1)	-
Q6UXV4	MICOS complex subunit MIC27	-	53.0 (1)	122.0 (2)	-
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	-	106.0 (2)	-	81.0 (1)
Q13308	Inactive tyrosine-protein kinase 7	-	111.0 (2)	63.0 (1)	-
Q8TCJ2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	-	152.0 (2)	53.0 (1)	-
P51159	Ras-related protein Rab-27A	74.0 (1)	105.0 (1)	81.0 (1)	-
Q14118	Dystroglycan	-	86.0 (1)	-	-
Q9ULV4	Coronin-1C	-	-	86.0 (2)	-
Q9H4G4	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	-	-	86.0 (1)	-
Q06265	Exosome complex component RRP45	-	70.0 (1)	102.0 (2)	-
O14681	Etoposide-induced protein 2.4 homolog	-	95.0 (2)	99.0 (2)	-
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	-	120.0 (2)	50.0 (1)	-
Q9Y673	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	-	85.0 (1)	-	-
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	-	85.0 (2)	-	-
P05067	Amyloid-beta precursor protein	-	114.0 (2)	110.0 (2)	58.0 (1)
P55265	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	-	108.0 (2)	-	60.0 (1)
Q8WXX5	Dnaj homolog subfamily C member 9	-	84.0 (2)	-	-
Q53EU6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	-	50.0 (1)	118.0 (1)	-
Q96AA3	Protein RFT1 homolog	-	84.0 (1)	-	-
Q9Y490	Talin-1	-	99.0 (2)	95.0 (2)	57.0 (1)
P69849, Q15155,	Nodal modulator 3,Nodal modulator 1,Nodal modulator 2	-	101.0 (1)	66.0 (1)	-
Q5JPE7		-	-	-	-
O00186	Syntaxin-binding protein 3	-	98.0 (2)	69.0 (1)	-
P14209	CD99 antigen	-	83.0 (2)	84.0 (1)	-
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155	-	64.0 (1)	-	102.0 (2)
Q9UG63	ATP-binding cassette sub-family F member 2	-	82.0 (2)	95.0 (2)	72.0 (1)
P27348	14-3-3 protein theta	-	92.0 (1)	101.0 (1)	-
Q96CS3	FAS-associated factor 2	-	141.0 (3)	50.0 (1)	-
Q5T8D3	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	-	44.0 (1)	120.0 (2)	-
Q06481	Amyloid-like protein 2	-	-	82.0 (2)	-
Q6UWP7	Lysocardiolipin acyltransferase 1	-	51.0 (1)	113.0 (2)	-
Q9Y265	RuvB-like 1	-	82.0 (1)	-	-
Q9BT22	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	-	-	82.0 (2)	-
P35241	Radixin	-	49.0 (1)	114.0 (2)	-
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	105.0 (1)	53.0 (1)	-	-
Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	-	81.0 (2)	-	-
Q724H7	HAUS augmin-like complex subunit 6	-	81.0 (1)	-	-
Q15645	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	-	-	-	81.0 (1)
Q13277	Syntaxin-3	-	103.0 (2)	58.0 (1)	-
Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	-	95.0 (2)	-	65.0 (1)
Q658P3	Metalloreductase STEAP3	-	72.0 (1)	88.0 (1)	-
Q8N6H7	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	-	80.0 (1)	-	-
Q9BY77	Polymerase delta-interacting protein 3	-	80.0 (1)	-	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
A11070	2-hydroxyacyl-CoA lyase 2	-	105.0 (1)	70.0 (1)	63.0 (1)
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	-	-	-	79.0 (1)
Q9Y6N7	Roundabout homolog 1	-	-	79.0 (2)	-
Q9H089	Large subunit GTPase 1 homolog	-	105.0 (2)	52.0 (1)	-
O60282, P33176, Q12840	Kinesin heavy chain isoform 5C,Kinesin-1 heavy chain,Kinesin heavy chain isoform 5A	-	56.0 (1)	140.0 (2)	56.0 (1)
O95772	STAR3 N-terminal-like protein	57.0 (1)	91.0 (2)	86.0 (2)	-
Q9H2U1	ATP-dependent DNA/RNA helicase DHX36	-	78.0 (1)	-	-
P48651	Phosphatidylserine synthase 1	-	92.0 (1)	85.0 (1)	-
Q16850	Lanosterol 14-alpha demethylase	-	77.0 (1)	-	-
P11233, P11234	Ras-related protein Ral-A,Ras-related protein Ral-B	-	51.0 (1)	133.0 (3)	-
Q96GQ5	RUS family member 1	-	87.0 (2)	66.0 (1)	-
Q969Q5	Ras-related protein Rab-24	-	61.0 (1)	91.0 (2)	-
P35670	Copper-transporting ATPase 2	-	-	76.0 (1)	-
O60493	Sorting nexin-3	-	94.0 (2)	58.0 (1)	-
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	-	90.0 (1)	62.0 (1)	-
O00165	HCLS1-associated protein X-1	-	56.0 (1)	96.0 (1)	-
Q14737	Programmed cell death protein 5	-	57.0 (1)	95.0 (2)	-
Q9HAU0	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	-	76.0 (1)	-	-
Q86Y82	Syntaxin-12	-	61.0 (1)	90.0 (2)	-
O94874	E3 UFM1-protein ligase 1	-	54.0 (1)	96.0 (2)	-
Q9UNK0	Syntaxin-8	-	54.0 (1)	96.0 (2)	-
Q96EL3	39S ribosomal protein L53, mitochondrial	-	56.0 (1)	93.0 (1)	-
P52655	Transcription initiation factor IIA subunit 1	-	74.0 (1)	-	-
Q86UL3	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4	-	57.0 (1)	90.0 (2)	-
E9PAV3, Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form,Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	-	73.0 (1)	-	-
P01889, P10321	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain,HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	-	47.0 (1)	98.0 (2)	-
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	-	65.0 (1)	-	-
P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1	-	72.0 (1)	-	-
Q96HR9	Receptor expression-enhancing protein 6	-	-	72.0 (1)	-
O95487	Protein transport protein Sec24B	-	45.0 (1)	99.0 (2)	-
Q9P077	Proton-transporting V-type ATPase complex assembly regulator TMEM9	-	58.0 (1)	85.0 (2)	-
Q9UNL2	Translocon-associated protein subunit gamma	-	85.0 (1)	58.0 (1)	-
Q9H2J7	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	-	88.0 (2)	55.0 (1)	-
Q14061	Cytochrome c oxidase copper chaperone	-	-	71.0 (1)	-
Q9HBM0	Vezatin	-	57.0 (1)	85.0 (2)	-
Q15006	ER membrane protein complex subunit 2	-	-	71.0 (1)	-
Q14247	Src substrate cortactin	-	51.0 (1)	90.0 (2)	-
Q14320	Protein FAM50A	-	92.0 (1)	49.0 (1)	-
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	-	-	-	131.0 (2)
Q9Y6I9	Testis-expressed protein 264	-	102.0 (2)	52.0 (1)	56.0 (1)
Q6ZW77	Lysophospholipid acyltransferase 2	-	52.0 (1)	87.0 (2)	-
Q6IAN0	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	-	69.0 (1)	-	-
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	-	69.0 (1)	-	-
Q6NXT6	Transmembrane anterior posterior transformation protein 1 homolog	-	69.0 (1)	-	-
Q9H330	Transmembrane protein 245	-	69.0 (1)	-	-
Q5BJH7	Protein YIF1B	-	78.0 (1)	60.0 (1)	-
Q96A49	Synapse-associated protein 1	-	49.0 (1)	88.0 (1)	-
P04049, P10398, P15056	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase,Serine/threonine-protein kinase A-Raf,Serine/threonine-protein kinase B-raf	-	67.0 (1)	-	70.0 (1)
P11171	Protein 4.1	-	45.0 (1)	92.0 (2)	-
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	-	48.0 (1)	87.0 (1)	70.0 (1)
Q7L5N7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	62.0 (1)	104.0 (2)	57.0 (1)	57.0 (1)
Q9UBH6	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	-	68.0 (1)	-	-
Q92797	Symplekin	-	68.0 (1)	-	-
P18124	60S ribosomal protein L7	-	79.0 (2)	-	-
Q86Y56	Dynein assembly factor 5, axonemal	-	67.0 (1)	-	-
Q15440	Multidrug resistance-associated protein 5	-	67.0 (1)	-	-
Q9NSV4	Protein diaphanous homolog 3	-	-	-	67.0 (1)
P49768	Presenilin-1	-	-	67.0 (1)	-
P30041	Peroxisomal protein PEX6	-	-	67.0 (1)	-
O15504	Nucleoporin NUP42	-	99.0 (2)	47.0 (1)	54.0 (1)
Q8WU76	Sec1 family domain-containing protein 2	-	48.0 (1)	85.0 (1)	-
Q8NFH5	Nucleoporin NUP35	-	73.0 (1)	69.0 (1)	61.0 (1)
P30050	60S ribosomal protein L12	-	92.0 (2)	54.0 (1)	-
Q14694	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	-	75.0 (1)	57.0 (1)	-
P13861, P31323	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit,cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	-	66.0 (1)	66.0 (1)	-
Q9H4A5	Golgi phosphoprotein 3-like	-	-	66.0 (1)	-
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	-	-	66.0 (1)	-
Q05655	Protein kinase C delta type	-	66.0 (1)	65.0 (1)	-
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	-	52.0 (1)	73.0 (1)	71.0 (1)
P23528	Cofilin-1	-	80.0 (2)	50.0 (1)	-
Q5TCZ1	SH3 and PX domain-containing protein 2A	-	65.0 (1)	-	-
Q9UL26	Ras-related protein Rab-22A	-	-	65.0 (1)	-
Q9C0B5	Palmitoyltransferase ZDHHC5	-	65.0 (1)	-	-
Q8N6M3	Acyl-coenzyme A diphosphatase FITM2	-	61.0 (1)	68.0 (1)	-
O60762	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	-	64.0 (1)	-	-
O95819, Q8N4C8, Q9UKE5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4,Misshapen-like kinase 1,TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	-	77.0 (2)	51.0 (1)	-
P11441	Ubiquitin-like protein 4A	-	-	64.0 (1)	-
P60174	Triosephosphate isomerase	-	-	64.0 (1)	-
Q9BTV4	Transmembrane protein 43	-	64.0 (1)	-	-
Q9BV44	THUMP domain-containing protein 3	-	64.0 (1)	-	-
Q9NTJ3	Structural maintenance of chromosomes protein 4	-	64.0 (1)	-	-
Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	-	81.0 (1)	47.0 (1)	-
Q9UEE9	Craniofacial development protein 1	-	68.0 (1)	71.0 (1)	-
P24534	Elongation factor 1-beta	-	63.0 (1)	-	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
Q8TB61	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1	-	62.0 (1)	64.0 (1)	-
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-	52.0 (1)	-	-
O00148, Q13838	ATP-dependent RNA helicase DDX39A,Spliceosome RNA helicase DDX39B	-	-	-	63.0 (1)
Q96JB5	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	-	76.0 (2)	-	-
Q9Y4D1	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	-	62.0 (1)	-	-
Q53GQ0	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	-	61.0 (1)	63.0 (1)	-
Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	-	56.0 (1)	65.0 (1)	-
Q9NRC1	Suppressor of tumorigenicity 7 protein	-	-	62.0 (1)	-
Q96P70	Importin-9	-	-	-	62.0 (1)
P07814	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	-	62.0 (1)	-	-
Q98V81	ER membrane protein complex subunit 6	-	-	62.0 (1)	-
Q9P2W9	Syntaxin-18	-	54.0 (1)	72.0 (1)	-
Q8WXH0	Nesprin-2	-	-	-	61.0 (1)
Q9P2J5	Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic	-	-	-	61.0 (1)
O43752	Syntaxin-6	-	-	61.0 (1)	-
Q9BQE4	Selenoprotein S	-	61.0 (1)	-	-
Q7RTP6	[F-actin]-monooxygenase MICAL3	-	-	61.0 (1)	-
P48634	Protein PRRC2A	-	76.0 (2)	46.0 (1)	-
Q6P1A2	Lysophospholipid acyltransferase 5	-	61.0 (1)	-	-
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8	-	-	61.0 (1)	-
Q49B96	Cytochrome c oxidase assembly protein COX19	-	-	60.0 (1)	-
Q15643	Thyroid receptor-interacting protein 11	-	60.0 (1)	-	-
Q8WY22	BR13-binding protein	-	54.0 (1)	66.0 (1)	-
P46013	Proliferation marker protein Ki-67	-	58.0 (1)	-	-
A6NKT7, PODJDO,	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 3,RANBP2-like and GRIP domain-containing protein	-	-	-	-
PODJD1, P49792,	1,RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 2,E3 SUMO-protein ligase RanBP2,RanBP2-like and	-	67.0 (1)	-	-
Q7Z3I3	GRIP domain-containing protein 4	-	-	-	-
P48444	Coatomer subunit delta	-	55.0 (1)	64.0 (1)	-
GSTP1_HUMAN,	>sp GSTP1_HUMAN ,Glutathione S-transferase P	-	68.0 (1)	51.0 (1)	-
P09211		-	-	-	-
O75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	-	55.0 (1)	64.0 (1)	-
Q7L9B9	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain-containing protein 1	-	59.0 (1)	-	-
Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4	-	59.0 (1)	-	-
Q8WUM0	Nuclear pore complex protein Nup133	-	58.0 (1)	-	60.0 (1)
A4FU01	Myotubularin-related protein 11	-	59.0 (1)	-	-
Q14145	Kelch-like ECH-associated protein 1	-	59.0 (1)	-	-
P19367	Hexokinase-1	-	-	59.0 (1)	-
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	-	59.0 (1)	-	-
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	-	-	59.0 (1)	-
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	-	-	59.0 (1)	-
Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	-	-	59.0 (1)	-
P40616	ADP-ribosylation factor-like protein 1	64.0 (1)	-	53.0 (1)	-
Q86V85	Integral membrane protein GPR180	-	52.0 (1)	65.0 (1)	-
P51151, Q9NP90	Ras-related protein Rab-9A,Ras-related protein Rab-9B	-	52.0 (1)	65.0 (1)	-
Q8WXF7	Atlastin-1	-	-	58.0 (1)	-
P53367	Arfaptin-1	-	58.0 (1)	-	-
Q8TAA9	Vang-like protein 1	-	-	58.0 (1)	-
Q9H5V9	UPF0428 protein CXorf56	-	67.0 (1)	-	-
Q96SK2	Transmembrane protein 209	-	58.0 (1)	-	58.0 (1)
Q9Y230	RuvB-like 2	-	58.0 (1)	-	-
Q9ULX3	RNA-binding protein NOB1	-	58.0 (1)	-	-
A8CG34, Q96HA1	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C,Nuclear envelope pore membrane protein POM 121	-	58.0 (1)	57.0 (1)	-
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205	-	44.0 (1)	-	70.0 (1)
Q8IY63, Q9Y2J4	Angiotensin-like protein 1,Angiotensin-like protein 2	-	-	-	57.0 (1)
C9JLW8	Mapk-regulated corepressor-interacting protein 1	-	57.0 (1)	57.0 (1)	-
Q04323	UBX domain-containing protein 1	-	57.0 (1)	-	-
Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	-	-	57.0 (1)	-
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E	-	57.0 (1)	57.0 (1)	-
P30825, P52569	High affinity cationic amino acid transporter 1,Cationic amino acid transporter 2	-	52.0 (1)	68.0 (1)	-
P51957	Serine/threonine-protein kinase Nek4	-	57.0 (1)	-	-
P78368, Q9Y6M4	Casein kinase I isoform gamma-2,Casein kinase I isoform gamma-3	-	52.0 (1)	62.0 (1)	-
P35637, Q92804	RNA-binding protein FUS,TATA-binding protein-associated factor 2N	-	57.0 (1)	-	-
Q9BX40	Protein LSM14 homolog B	-	57.0 (1)	-	-
Q6UX01, Q8WVP7	Protein LMBR1L,Limb region 1 protein homolog	-	-	57.0 (1)	-
Q8N5M9	Protein jagunal homolog 1	-	57.0 (1)	-	-
P53365	Arfaptin-2	-	47.0 (1)	57.0 (1)	65.0 (1)
Q6P2E9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	48.0 (1)	63.0 (1)	47.0 (1)	-
Q92859	Neogenin	-	-	56.0 (1)	-
Q15021, Q60307,	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4,Microtubule-associated serine/threonine-	-	-	-	-
P51812, Q15418,	protein kinase 3,Ribosomal protein S6 kinase alpha-3,Ribosomal protein S6 kinase alpha-	-	-	-	-
Q6PQ8, Q96GX5,	1,Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2,Serine/threonine-protein kinase	-	56.0 (1)	-	-
Q9UK32, Q9Y2H9	greatwall,Ribosomal protein S6 kinase alpha-6,Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1	-	-	-	-
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	-	56.0 (1)	-	-
Q9NSP4	Centromere protein M	-	56.0 (1)	-	-
Q15349, Q86UE8,	Ribosomal protein S6 kinase alpha-2,Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2,Serine/threonine-	-	56.0 (1)	-	-
Q9UKI8	protein kinase tousled-like 1	-	-	-	-
P61224, P62834	Ras-related protein Rap-1b,Ras-related protein Rap-1A	-	-	56.0 (1)	-
Q8IXQ4	GPALPP motifs-containing protein 1	-	56.0 (1)	-	-
Q15042	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	-	-	56.0 (1)	-
P62753	40S ribosomal protein S6	-	48.0 (1)	-	-
Q8NHH9	Atlastin-2	-	60.0 (1)	51.0 (1)	-
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	-	56.0 (1)	55.0 (1)	-
Q8NHP6	Motile sperm domain-containing protein 2	-	57.0 (1)	54.0 (1)	-
P08865	40S ribosomal protein SA	-	47.0 (1)	64.0 (1)	-
O95399	Urotensin-2	-	48.0 (1)	63.0 (1)	-
Q9HDC5	Junctophilin-1	-	63.0 (1)	48.0 (1)	-
Q555J5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	-	-	54.0 (1)	-
O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein	-	-	55.0 (1)	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
Q9Y224	RNA transcription, translation and transport factor protein	-	-	55.0 (1)	-
Q98XT8	RING finger protein 17	-	55.0 (1)	-	-
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	-	55.0 (1)	-	-
Q99570	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	-	-	-	55.0 (1)
B2RPK0, P09429	Putative high mobility group protein B1-like 1,High mobility group protein B1	-	50.0 (1)	49.0 (1)	-
Q9Y211	Nischarin	-	-	-	54.0 (1)
P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase	-	50.0 (1)	63.0 (1)	-
Q13505	Metaxin-1	-	54.0 (1)	-	-
Q94832	Unconventional myosin-Id	-	54.0 (1)	54.0 (1)	-
Q9NV66	S-adenosyl-L-methionine-dependent tRNA 4-demethylwyosine synthase TYW1	-	54.0 (1)	-	-
Q6DD88	Atlastin-3	-	53.0 (1)	-	-
Q9BU76	Multiple myeloma tumor-associated protein 2	-	-	53.0 (1)	-
Q8WVC6	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein	-	53.0 (1)	-	-
Q12846	Syntaxin-4	-	57.0 (1)	49.0 (1)	-
A1X283	SH3 and PX domain-containing protein 2B	-	53.0 (1)	-	-
Q9UHR5	SAP30-binding protein	-	53.0 (1)	-	-
Q96JQ2	Calmin	-	-	53.0 (1)	-
P85298	Rho GTPase-activating protein 8	-	-	53.0 (1)	-
P78347	General transcription factor II-I	-	53.0 (1)	-	-
Q9Y639	Neuroplastin	-	53.0 (1)	52.0 (1)	-
Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2	-	46.0 (1)	59.0 (1)	-
P49757	Protein numb homolog	-	45.0 (1)	60.0 (1)	-
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	-	52.0 (1)	-	-
P63010, Q10567	AP-2 complex subunit beta,AP-1 complex subunit beta-1	-	-	52.0 (1)	-
Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	-	54.0 (1)	50.0 (1)	-
P50851	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	-	-	52.0 (1)	-
Q9UEU0	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B	-	52.0 (1)	-	-
P17706	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	-	54.0 (1)	50.0 (1)	-
Q96J84	Kin of IRRE-like protein 1	-	50.0 (1)	54.0 (1)	-
Q98VT8	Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1	-	52.0 (1)	-	-
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	-	59.0 (1)	45.0 (1)	-
Q94806, Q9BZL6	Serine/threonine-protein kinase D3,Serine/threonine-protein kinase D2	-	-	52.0 (1)	-
Q14444	Caprin-1	-	52.0 (1)	-	-
Q3YEC7	Rab-like protein 6	-	-	52.0 (1)	-
P06702	Protein S100-A9	-	-	52.0 (1)	-
Q9UNK9	Protein angel homolog 1	-	52.0 (1)	-	-
Q07954	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1	-	52.0 (1)	-	-
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	-	52.0 (1)	-	-
Q99808	Equilibrative nucleoside transporter 1	-	52.0 (1)	-	-
P63173	60S ribosomal protein L38	-	-	52.0 (1)	-
Q95297	Myelin protein zero-like protein 1	-	46.0 (1)	57.0 (1)	-
Q9NW15	Anoctamin-10	-	45.0 (1)	58.0 (1)	-
Q9Y320	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	-	56.0 (1)	47.0 (1)	-
Q9HB71	Calcyclin-binding protein	-	45.0 (1)	58.0 (1)	-
Q9HB90, Q9NQL2	Ras-related GTP-binding protein C,Ras-related GTP-binding protein D	-	54.0 (1)	49.0 (1)	-
Q6FI81	Anamorsin	-	51.0 (1)	-	-
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	-	48.0 (1)	54.0 (1)	-
P84157	Matrix-remodeling-associated protein 7	-	50.0 (1)	52.0 (1)	-
Q9NW82	WD repeat-containing protein 70	-	51.0 (1)	-	-
Q9UH86	LIM domain and actin-binding protein 1	-	-	51.0 (1)	-
P43378	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	-	53.0 (1)	49.0 (1)	-
P62854, Q5JNZ5	40S ribosomal protein S26,Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	-	-	51.0 (1)	-
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	-	51.0 (1)	-	-
Q93045	Stathmin-2	-	-	51.0 (1)	-
P16949	Stathmin	-	-	51.0 (1)	-
P25398	40S ribosomal protein S12	-	51.0 (1)	-	-
Q9UL54	Serine/threonine-protein kinase TAO2	-	-	51.0 (1)	-
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	-	51.0 (1)	-	-
Q9Y520	Protein PRRC2C	-	51.0 (1)	-	-
P49327	Fatty acid synthase	54.0 (1)	48.0 (1)	-	-
P62258	14-3-3 protein epsilon	-	51.0 (1)	-	-
O14523	Phospholipid transfer protein C2CD2L	-	-	51.0 (1)	-
Q08752	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	-	44.0 (1)	58.0 (1)	-
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	-	-	51.0 (1)	-
Q9Y314	Nitric oxide synthase-interacting protein	-	50.0 (1)	-	-
Q8IZH2	5'-3' exoribonuclease 1	-	50.0 (1)	-	-
Q6PKG0	La-related protein 1	-	50.0 (1)	-	-
O14641	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-2	-	50.0 (1)	-	-
Q8IZV5	Retinol dehydrogenase 10	-	49.0 (1)	51.0 (1)	-
Q9H6H4	Receptor expression-enhancing protein 4	-	50.0 (1)	-	-
Q96GS4	BLOC-1-related complex subunit 6	-	-	50.0 (1)	-
O75955	Flotillin-1	-	50.0 (1)	50.0 (1)	-
Q9HCS7	Pre-mRNA-splicing factor SYF1	-	50.0 (1)	-	-
Q8TEW0	Partitioning defective 3 homolog	-	50.0 (1)	-	-
P29558, Q6XE24	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1, RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 3	-	48.0 (1)	51.0 (1)	-
O95163	Elongator complex protein 1	-	49.0 (1)	-	-
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein	-	49.0 (1)	-	-
A2RRP1	Neuroblastoma-amplified sequence	-	-	49.0 (1)	-
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	-	-	49.0 (1)	-
Q8NEW0	Zinc transporter 7	-	49.0 (1)	-	-
Q96H55	Unconventional myosin-XIX	-	49.0 (1)	-	-
Q07866	Kinesin light chain 1	-	49.0 (1)	-	-
Q96J01	THO complex subunit 3	-	49.0 (1)	-	-
O43815	Striatin	-	-	49.0 (1)	-
Q8NHG7	Small VCP/p97-interacting protein	-	49.0 (1)	-	-
Q148N4	Sarcolemmal membrane-associated protein	-	-	49.0 (1)	-
O95197	Reticulon-3	-	-	49.0 (1)	-
Q9NW68	BSD domain-containing protein 1	-	44.0 (1)	54.0 (1)	-
O43504	Regulator complex protein LAMTOR5	-	-	49.0 (1)	-

ID białka (UNIPROT)	Nazwa białka	Score oraz liczba zidentyfikowanych peptydów w próbce			
		Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	-	49.0 (1)	-	-
Q9HB21	Pleckstrin homology domain-containing family A member 1	-	49.0 (1)	-	-
Q9NWX8	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	-	49.0 (1)	-	-
P00533	Epidermal growth factor receptor	-	-	49.0 (1)	-
Q5W0Z9	Palmitoyltransferase ZDHHC20	-	49.0 (1)	-	-
Q8N5M4	Tetratricopeptide repeat protein 9C	-	51.0 (1)	46.0 (1)	-
Q7Z2K8	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	-	49.0 (1)	48.0 (1)	-
Q7L9L4, Q9H8S9	MOB kinase activator 1B,MOB kinase activator 1A	-	48.0 (1)	-	-
Q7Z3D4	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 3	-	-	48.0 (1)	-
Q5BJD5	Transmembrane protein 41B	-	-	48.0 (1)	-
PODP23, PODP24, PODP25, P27482	Calmodulin-1,Calmodulin-2,Calmodulin-3,Calmodulin-like protein 3	-	48.0 (1)	-	-
P25098, P35626	Beta-adrenergic receptor kinase 1,Beta-adrenergic receptor kinase 2	-	48.0 (1)	-	-
P51116	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	-	48.0 (1)	-	-
O15371	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	-	-	48.0 (1)	-
P62072	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10	-	49.0 (1)	46.0 (1)	-
A6NHQ2, P22087	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar-like protein 1,rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	-	37.0 (1)	40.0 (1)	65.0 (1)
P52429	Diacylglycerol kinase epsilon	-	-	47.0 (1)	-
P42771, P42772	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A,Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B	-	47.0 (1)	-	-
Q9Y2X9	Zinc finger protein 281	-	47.0 (1)	-	-
Q13619, Q13620	Cullin-4A,Cullin-4B	-	-	47.0 (1)	-
Q8NCS4	Transmembrane protein 35B	-	-	47.0 (1)	-
P53990	IST1 homolog	-	47.0 (1)	-	-
P56962	Syntaxin-17	-	47.0 (1)	-	-
P61009	Signal peptidase complex subunit 3	-	48.0 (1)	46.0 (1)	-
Q14C86	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	-	47.0 (1)	-	-
Q08379	Golgin subfamily A member 2	-	42.0 (1)	-	52.0 (1)
O60725	Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	-	47.0 (1)	-	-
CYB5_HUMAN, P00167	>sp CYB5_HUMAN ,Cytochrome b5	-	47.0 (1)	-	-
P35579, P35749	Myosin-9,Myosin-11	-	46.0 (1)	47.0 (1)	-
O75607	Nucleoplasmin-3	-	-	46.0 (1)	-
P84098	60S ribosomal protein L19	-	46.0 (1)	-	-
Q5BKT4, Q5I7T1	Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase,Putative Dol-P-Glc:Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-glucosyltransferase	-	-	46.0 (1)	-
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	-	46.0 (1)	46.0 (1)	-
Q9Y289	Sodium-dependent multivitamin transporter	-	46.0 (1)	-	-
P51798	H(+)/Cl(-) exchange transporter 7	-	46.0 (1)	46.0 (1)	-
Q9H3U1	Protein unc-45 homolog A	-	46.0 (1)	-	-
Q9NQG1	Protein MANBAL	-	-	46.0 (1)	-
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	-	-	46.0 (1)	-
P10155	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	-	45.0 (1)	-	-
Q14728	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10	-	43.0 (1)	47.0 (1)	-
P38435	Vitamin K-dependent gamma-carboxylase	-	45.0 (1)	-	-
P26640	Valine-tRNA ligase	-	45.0 (1)	-	-
Q8NBJ7	Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	-	45.0 (1)	-	-
Q96125	Splicing factor 45	-	45.0 (1)	-	-
O15121	Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	-	45.0 (1)	-	-
Q9BXB4	Oxysterol-binding protein-related protein 11	-	-	-	44.0 (1)
Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	-	44.0 (1)	-	-
Q969Q4	ADP-ribosylation factor-like protein 11	-	44.0 (1)	-	-
Q14534	Squalene monooxygenase	-	44.0 (1)	-	-
O14735	CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase	-	44.0 (1)	-	-
Q6ZS86	Putative glycerol kinase 5	-	44.0 (1)	-	-
Q9UHQ4	B-cell receptor-associated protein 29	-	44.0 (1)	-	-
O43768, P56211	Alpha-endosulfine,cAMP-regulated phosphoprotein 19	-	-	42.0 (1)	-
Q9P246	Stromal interaction molecule 2	-	-	42.0 (1)	-
Q16181, Q6ZU15	Septin-7,Septin-14	-	-	41.0 (1)	-
Q14141, Q92599, Q9NVA2	Septin-6,Septin-8,Septin-11	-	-	41.0 (1)	-
Q7L1Q6, Q9Y6E2	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1,Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	-	41.0 (1)	-	-
P43243	Matrin-3	-	36.0 (1)	-	-
Q8N9N7	Leucine-rich repeat-containing protein 57	-	-	36.0 (1)	-
Q00765	Receptor expression-enhancing protein 5	-	35.0 (1)	30.0 (1)	-