

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_{Ca}. Aktywacja tego kanału zwiększa przeżywalność komórek w czasie niedokrwienia-reperfuzji komórek serca czy mózgu. Podstawowe właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanału mitoBK_{Ca} odpowiadają właściwościom kanałów BK_{Ca} z błony plazmatycznej. Kanał ten tworzą podjednostki α oraz regulatorowe podjednostki typu β .

W pierwszej części pracy zweryfikowano hipotezę mówiącą, że izoforma VEDEC podjednostki α może tworzyć kanał mitoBK_{Ca}. Isoforma ta, będąca produktem alternatywnego składowania produktu genu *KCNMA1*, kodującego błonowe kanały BK_{Ca}, 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 ± 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_{Ca}. Eksperymenty immunofluorescencyjne potwierdziły częściową kolokalizację kanału z mitochondriami.

Uzyskane dane potwierdziły, że izoforma VEDEC kanału BK_{Ca} 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_{Ca}. W związku z tym zastosowano biotynylację partnerów białkowych z wykorzystaniem ligazy TurboID sfuzowanej z podjednostką regulatorową $\beta 4$ kanału BK_{Ca}. Identyfikacja białek biotynylowanych z wykorzystaniem spektrometrii mas ujawniła grupę białek będących potencjalnymi partnerami kanałów typu BK_{Ca}. Jednym z białek oddziałujących z kanałem BK_{Ca} 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 α tworzącą por kanału.

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_{Ca}). Activation of this channel increases cell survival during ischemia/reperfusion of heart or brain cells. The basic biophysical and pharmacological properties of the mitoBK_{Ca} channel correspond to those of plasma membrane BK_{Ca} channels. This channel is composed of α subunits and regulatory β -type subunits.

In the first part of the thesis, the hypothesis that the VEDEC isoform of the α subunit forms the mitoBK_{Ca} 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_{Ca} 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 ± 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_{Ca} channels. Immunofluorescence staining confirmed partial colocalization of the channel with mitochondria.

The obtained data confirmed that the VEDEC isoform of the BK_{Ca} 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 β 4 regulatory subunit of the BK_{Ca} channel. Protein partners were biotinylated using TurboID ligase fused to the β 4 regulatory subunit of the BK_{Ca} channel. Identification of biotinylated proteins using mass spectrometry revealed potential partners of BK_{Ca} channels. One of the proteins interacting with the BK_{Ca} 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 β 4 subunit, but also with the VEDEC isoform of the α subunit.