

# Czego nie wiemy o mitochondrialnych kanałach potasowych?

## STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono najciekawsze, a wciąż nierozstrzygnięte zagadnienia dotyczące pochodzenia, funkcji i farmakologii mitochondrialnych kanałów potasowych. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej opisano, jak do tej pory, osiem kanałów potasowych: kanał regulowany przez ATP, kanały aktywowane jonami wapnia o dużym, średnim i małym przewodnictwie, kanały regulowane napięciem KV1.3 oraz KV7.4, dwuporowy kanał potasowy TASK-3 oraz kanał SLO2. Pierwotną funkcją mitochondrialnych kanałów potasowych jest regulacja potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Dodatkowo, mitochondrialne kanały potasowe wpływają na oddychanie, regulację objętości mitochondriów oraz syntezę reaktywnych form tlenu. Mechanizmy leżące u podstaw tych procesów nie są jednak dostatecznie poznane. W niniejszej pracy autorzy nie poprzestają na przedstawieniu dostępczej wiedzy dotyczącej mitochondrialnych kanałów potasowych. Idąc dalej, stawiają oni szereg hipotez które mogą wyznaczyć kierunek przyszłych badań tych białek.

## WPROWADZENIE

Pierwszy kanał potasowy został zidentyfikowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek wątroby wykorzystując technikę patch-clamp na początku lat dziewięćdziesiątych [1]. Był to kanał potasowy (kanał  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) regulowany (hamowany) przez ATP i przeciwcukrzycowe sulfonamoczniki (glibenklamid). Wkrótce wykazano, że kanał  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  może być aktywowany przez szereg substancji, które nazwano aktywatorami kanałów potasowych (KCOs, ang. *potassium channel openers*). Następane 25 lat badań przyczyniło się do identyfikacji dalszych kanałów potasowych wewnętrznej błony mitochondrialnej. I tak, kolejno zidentyfikowano kanały potasowe aktywowane jonami wapniowymi m.in. kanał potasowy o dużym przewodnictwie  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ , kanały potasowe regulowane napięciem  $\text{mitoKv}1.3$  oraz  $\text{mitoKv}7.4$ . Ostatnio wykazano obecność kanału potasowego TASK-3 oraz SLO2 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wydaje się, że większość rodzajów kanałów potasowych z błony plazmatycznej obecna jest w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dla poznania całościowego opisu mitochondrialnych kanałów potasowych polecamy czytelnikowi pracę przeglądową [2].

Od samego początku powód obecności kanałów potasowych w mitochondriach nie był oczywisty. Klasyczny opis fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach zaproponowany przez Petera Mitchella zakładał, że obecność kanałów jonowych, które rozpraszają potencjał elektryczny mitochondriów jest zbędna. Jednak ostatnie lata przyniosły dziesiątki obserwacji potwierdzających obecność kanałów jonowych (selektywnych dla kationów i anionów) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Badania ostatnich lat były zogniskowane bardziej na poznawaniu funkcji mitochondrialnych kanałów potasowych, niż jedynie na próbie potwierdzenia ich obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

To co szczególnie zainteresowało wielu badaczy to wykazanie, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych w różnych typach komórek może prowadzić do zjawiska cytoprotekcji tzn. osłony komórek/tkanek przed uszkodzeniem w wyniku różnych czynników np. niedotlenienia. Mechanizm tego zjawiska tzn. jak zwiększony napływ jonów potasowych do mitochondriów powoduje cytoprotekcję jest nadal niejasny.

Bartłomiej Augustynek<sup>1</sup>

Antoni Wrzosek<sup>1</sup>

Piotr Koprowski<sup>1</sup>

Agnieszka Kielbasa<sup>1</sup>

Piotr Bednarczyk<sup>2</sup>

Agnieszka Łukasiak<sup>2</sup>

Krzysztof Dołowy<sup>2</sup>

Adam Szewczyk<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa  
<sup>2</sup>Zakład Biofizyki, SGGW, Warszawa

✉Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 22 07, faks: (22) 822 53 42, e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 27 maja 2016 r.  
Artykuł zaakceptowano 30 maja 2016 r.

**Słowa kluczowe:** mitochondria, mitochondrialne kanały potasowe, błony biologiczne, cytoprotekcja, śród błonek

**Wykaz skrótów:** 5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy; KCOs – aktywatory kanałów potasowych; ETC – łańcuch oddechowy;  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  – mitochondrialny kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie;  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP;  $\text{mitoKv}$  – mitochondrialny kanał zależny od napięcia;  $\text{mitoTASK-3}$  – mitochondrialny dwuporowy kanał potasowy; mPTP – megakanał mitochondrialny; NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; ox-LDL – utleniona forma lipoproteiny o niskiej gęstości; RET – wsteczny przepływ elektronów; ROMK – kanał potasowy zewnętrznego rdzenia nerki; ROS – reaktywne formy tlenu

**Podziękowania:** Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju MERIS PBS1/B8/1/2012, projektu finansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka koordynowanego przez konsorcjum JCET-UJ: POIG.01.01.02-00-069/09, projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: 2015/17/B/NZ1/02496. Praca powstała także w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej MitoNet.pl.

## DLACZEGO W MITOCHONDRiach OBECNE SĄ KANAŁY POTASOWE A NIE KANAŁY SODOWE?

Intensywne badania mitochondrialnych kanałów potasowych w ostatnich latach spowodowały, że pewne pytania stały się szczególnie istotne i ważne dla zrozumienia funkcji tych kanałów w różnych rodzajach komórek. W prezentowanej pracy skupiamy się na zdefiniowaniu pewnych fundamentalnych pytań i problemów tej dziedziny badań.

Idea tzw. „lustrzanego odbicia” tzn. obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanałów potasowych bardzo podobnych do tych w błonie plazmatycznej prowadzi do pytania dlaczego kanały selektywne dla jonów sodowych praktycznie nie są obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mimo, że kanały sodowe są powszechne w błonie plazmatycznej?

Substancje, które hamują (blokują) lub aktywują kanały potasowe w mitochondriach były wcześniej wykorzystywane w badaniach kanałów błony plazmatycznej. Dodatkowo substancje te często mają działania uboczne np. niektóre aktywatory kanałów potasowych mogą hamować mitochondrialny łańcuch oddechowy. Powoduje to, że wykorzystanie różnych narzędzi farmakologicznych w badaniach kanałów mitochondrialnych wymaga ogromnej staranności jeżeli chodzi o wybór substancji oraz zakresu wykorzystywanych jej stężeń.

Większość mechanizmów regulujących aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych jest podobna do tych, które dotyczą kanałów z błony plazmatycznej. Są jednak pewne zjawiska, które są unikatowe dla kanałów potasowych z wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ostatnimi czasy wykazano, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach glejaka jest związany z oksydazą cytochromową. Co więcej, stan zredukowania łańcucha oddechowego wpływa na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Czy związanie strukturalno-funkcjonalne systemu generującego potencjał w mitochondriach (łańcuch oddechowy) oraz systemu rozpraszającego potencjał mitochondrialny (kanał potasowy) może być istotnym mechanizmem regulującym bioenergetykę komórek? Poszukując unikatowych właściwości mitochondrialnych kanałów potasowych można też zadać pytanie czy skład lipidowy błon mitochondrialnych może warunkować istnienie specyficznych mechanizmów regulacji aktywności kanałów potasowych w mitochondriach?

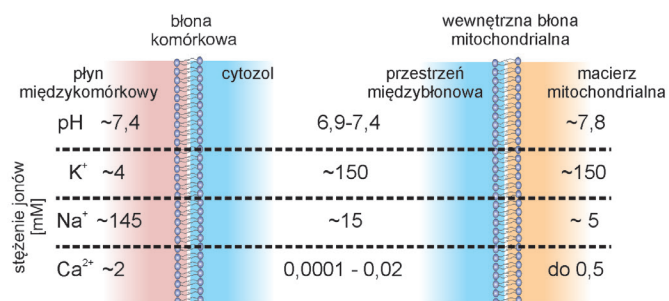
Często mitochondria postrzegane są w uproszczeniu jedynie jako „generatory energii”. W ostatnich latach okazało się jednak, że równie ważne dla fizjologii komórki mogą być również funkcje sygnałowe (regulacyjne) mitochondriów np. w komórkach śródbłonna. Czy niedawno odkryty kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach śródbłonna może brać udział w tego typu procesach?

W niniejszej pracy staramy się przedyskutować podstawowe fakty i hipotezy dotyczące mitochondrialnych kanałów potasowych: ich pochodzenia, farmakologii oraz własności funkcjonalnych. Wierzmy, że zadawanie ważnych pytań dotyczących mitochondrialnych kanałów potasowych ułatwi poszukiwanie trafnych i wartościowych odpowiedzi.

Aby odpowiedzieć na powyższe pytanie należy zastanowić się nad równowagą jonową komórki i pochodzeniem mitochondriów, a więc początkami życia. Stężenie jonów potasowych we wszystkich komórkach jest aż o rząd wielkości, wyższe niż w oceanach. Z kolei komórkowe stężenie jonów sodowych i wapniowych jest znacznie niższe niż to w wodzie morskiej. Żywe komórki zachowują w cytosolu wysokie stężenie K<sup>+</sup>, zaś niskie stężenie Ca<sup>2+</sup> i Na<sup>+</sup>, nawet w czasie wzrostu w bardzo rozcieńczonych roztworach tych jonów. Jest to możliwe m.in. dzięki temu, że błony komórkowe są selektywnie przepuszczalne dla jonów. Błony te są skomplikowanymi systemami będącymi efektem długiej ewolucji i wydaje się, iż pierwotne błony lipidowe były prostsze i przepuszczalne dla małych cząsteczek, w tym dla jonów. Nie oddzielały one ściśle protokomórek od środowiska zewnętrznego i pozwalały na wymianę z nim drobnych cząsteczek, bez koniecznej obecności w błonie wyspecjalizowanych białek transportujących [3]. Zgodnie z tym scenariuszem wysunięto hipotezę, że życie powstało w śródlądowym systemie geotermalnym, dla którego charakterystyczny jest wysoki współczynnik stężenia K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> i dlatego też dzisiejsze komórki zachowały właśnie taki stosunek stężeń obu jonów w cytoplazmie [4]. Kolonizacja oceanów bogatych w jony sodowe mogła nastąpić dopiero po wykształceniu błon komórkowych nieprzepuszczalnych dla jonów oraz pomp sodowych mogących zachować środowisko wewnątrzkomórkowe bogate w jony potasowe, takie do którego wcześniej przystosował się cały wewnątrzkomórkowy aparat enzymatyczny [5].

Eubakterie, w celu utrzymania balansu osmotycznego po przeniesieniu do środowiska o wysokiej osmolarności, przejściowo akumulują jony potasowe i syntetyzują glutaminian. Następnie syntetyzowane są związki organiczne takie jak np. N,N,N-trimetyloglicyna [6]. W tych samych warunkach archeony nieustannie utrzymują wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasowych [7]. Bakterie i archeony posiadają szereg transporterów i kanałów umożliwiających zachowanie wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia K<sup>+</sup> [8].

Kanały potasowe, występujące u wszystkich organizmów, są największą i najbardziej zróżnicowaną klasą kanałów jonowych, co może wskazywać na ich wczesną ewolucję. Kanały sodowe występują powszechnie u eukariontów, natomiast wśród prokariotów znajdowane są jedynie u niektórych bakterii morskich czy alkalofilów, gdzie pełnią wyspecjalizowane funkcje. U większości bakterii jony sodu transportowane są na zewnątrz komórki przez wymiennik Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Niektóre prokarioty posiadają dodatkowo wszystkie białka niezbędne dla funkcjonowania całego cyklu sodowego: pompy sodowe, Na<sup>+</sup>-zależne syntazy ATP, antyportery Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> i symportery Na<sup>+</sup>/substrat [9]. Ponieważ błony biologiczne nieprzepuszczające jonów sodowych są strukturalnie prostsze od tych nieprzepuszczających protonów uważa się, że bioenergetyka pierwszych organizmów bazowała na gradiencie Na<sup>+</sup> [5]. Przyпуска się, że kanały sodowe odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu pH w środowiskach o niskim pH lub w pobieraniu jonów sodowych



**Rycina 1.** Zakres stężeń najważniejszych jonów i wartości pH w płynie międzykomórkowym, cytozolu i macierzy mitochondrialnej komórki ssaka.

[10]. Prawdopodobnie kanały sodowe wyewoluowały z kanałów potasowych poprzez mutacje filtra selektywności, co stało się niezależnie w bakteriach i eukariontach, w związku z czym sodowe kanały bakteryjne nie są ewolucyjnymi przodkami eukariotycznych kanałów sodowych [11].

Archeony i bakterie, które dały początek organizmom eukariotycznym, miały następujące cechy: jony sodowe i protony były aktywnie wypompowywane z komórki, a ich dokomórkowy gradient wykorzystywany był do syntezy ATP, zaś jony potasowe akumulowane były w komórce umożliwiając osmotyczną regulację jej objętości [12]. Zgodnie z teorią endosymbiotyczną, dzisiejsze mitochondria pochodzą od  $\alpha$ -proteobakterii i podobnie do nich utrzymują wysokie stężenie jonów potasu w celu regulacji objętości, która jednak u bakterii i mitochondriów znacznie się różni. Bakterie, zwykle znajdujące się w środowiskach ubogich w jony potasowe, potrzebują do ich akumulacji wyspecjalizowanych pomp. W przeciwieństwie do bakterii, mitochondria znajdują się w środowisku o stabilnym i wysokim stężeniu K<sup>+</sup>, dlatego napływ tych jonów do macierzy mitochondrialnej następuje jedynie poprzez kanały potasowe, zgodnie z ujemną wartością potencjału elektrochemicznego ( $\Delta\Psi$ ) niezbędną dla fosforylacji oksydacyjnej [13]. Nadmiar K<sup>+</sup> usuwany jest z macierzy poprzez antyporter K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

Jony sodowe występują w cytoplazmie i macierzy mitochondrialnej w niskim stężeniu, a oddychające mitochondria kręgowców utrzymują skierowany do macierzy mitochondrialnej gradient tego jonu (Ryc. 1) [14]. Niekorzystny energetycznie wypływ Na<sup>+</sup> katalizowany jest przez wymiennik Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> [13]. Skierowany do wnętrza potencjał elektrochemiczny Na<sup>+</sup> wykorzystywany jest przez mitochondria do wypompowywania jonów Ca<sup>2+</sup> przez elektrogeny wymiennik Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> [15]. Stwierdzono, że podwyższone stężenie Na<sup>+</sup> w cytoplazmie kardiomiocytów, wywołane niedotlenieniem/reperfuzją, prowadzi do zwiększenia wypływu Ca<sup>2+</sup> z mitochondriów. Obniżenie mitochondrialnego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> powoduje zmniejszenie intensywności fosforylacji oksydacyjnej i wzrost utlenionej puli dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD<sup>+</sup>) [16]. Odwrotnie, podwyższone stężenie Ca<sup>2+</sup> w macierzy prowadzi do aktywacji megakanalu mitochondrialnego (mPTP, ang. *mitochondrial permeability transition pore*) i dysypacji  $\Delta\Psi$  [17]. Z tych też powodów ścisła regulacja stężenia mitochondrialnego Na<sup>+</sup> wydaje się być istotna. Mitochondria jednak, oprócz wymienników Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> i Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, nie zawierają innych transporterów Na<sup>+</sup>, w tym kanałów

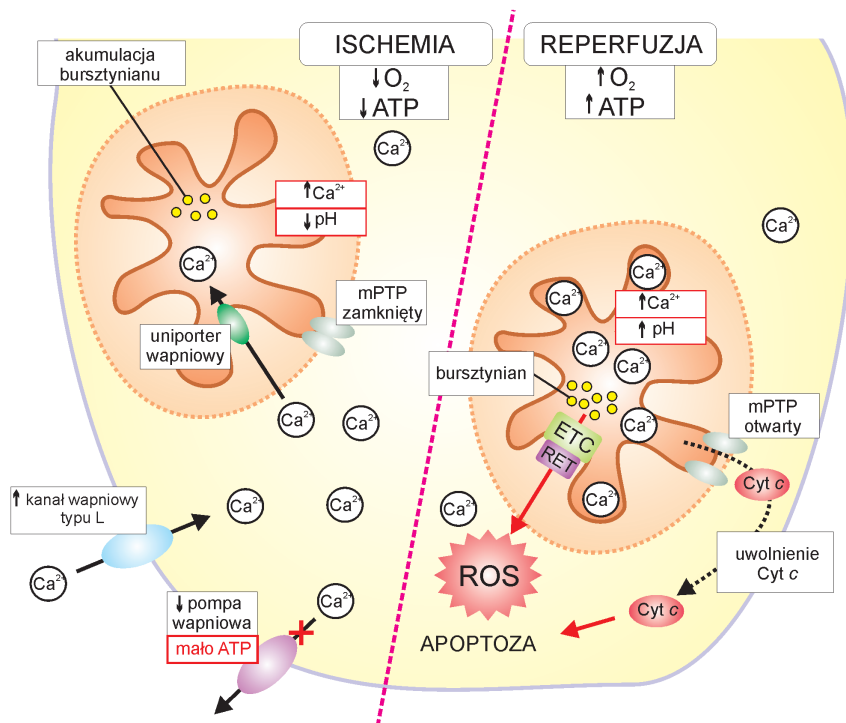
sodowych. Kontrastuje to z regulacją stężenia K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup>, których przepływ uwarunkowany jest obecnością specyficznych kanałów. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być przeszłość ewolucyjna tzn. względna rzadkość i mała różnorodność kanałów sodowych.

Proteomy mitochondriów zawierają ponad 1000 białek. W wyniku presji selekcyjnej spowodowanej wysokim poziomem reaktywnych form tlenu, większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez geny jądrowe. Wydaje się, że tylko niewielka frakcja (ok. 15%) białek mitochondrialnych, kodowana była w genomie endosymbionta który dał początek mitochondriom [18]. Nie wiadomo zatem, czy mitochondrialne izoformy kanałów potasowych są białkami endogennymi, czy zostały nabyte w czasie endosymbiozy. Jednakże przynajmniej trzy argumenty przemawiają za prastarym występowaniem kanałów potasowych w mitochondriach: i) mitochondrialne kanały potasowe zostały odkryte u wszystkich badanych organizmów, w tym tych „prymitywnych”; ii) mitochondria „zamieszkują” środowisko bogate w jony potasu, podobne do warunków proponowanych w modelu ewolucji protokomórek; iii) regulacja objętości mitochondriów może być ewolucyjnie związana z zależną od jonów potasu regulacją turgoru bakterii.

#### KANAŁY POTASOWE W PROCESACH CYTOPROTEKCJI - MECHANIZMY ORAZ KONTEKST EWOLUCYJNY

Zawał serca i niedokrwienny udar mózgu są głównymi przyczynami śmierci w krajach rozwiniętych. Są one spowodowane zamknięciem naczynia krwionośnego dostarczającego tlen do tkanki. Komórki pozbawione tlenu po pewnym czasie umierają. Komórki serca i mózgu są szczególnie wrażliwe na brak tlenu (ischemię). W 1986 roku dokonano zaskakującego odkrycia. Jeżeli długi okres ischemii zostanie poprzedzony krótkimi naprzemiennymi okresami ischemii i reperfuzji (przywrócenia dostaw tlenu) to uszkodzenie mięśnia sercowego jest zdecydowanie mniejsze [19]. Zjawisko to nazwano hartowaniem przez niedokrwienie. Komórki hartowane niedokrwieniem mają wyższe stężenie ATP niż te nie hartowane. Podobne zjawisko hartowania rosnącym stężeniem Ca<sup>2+</sup> zostało odkryte w 1996 roku [20-22]. Również komórki hartowane jonami wapniowymi mają wyższe stężenie ATP niż komórki niehartowane. Hartowanie można również osiągnąć stosując substancje aktywujące kanały potasowe: K<sub>ATP</sub> [23] i BK<sub>Ca</sub> [24]. Aktywatory kanałów potasowych (KCOs) chronią komórkę przed niedokrwieniem, a substancje blokujące te kanały znoszą ochronny wpływ aktywatorów. W przeciwieństwie do kanałów potasowych to inhibitory, nie aktywatory mitochondrialnych kanałów anionowych chronią komórki serca przed uszkodzeniem [25].

Wydaje się, że mitochondria są kluczowym elementem odpowiedzialnym za hartowanie niedokrwieniem. Mitochondria zużywają tlen, aktywnie transportują jony wapniowe, posiadają kanały potasowe i anionowe w wewnętrznej błonie, syntetyzują ATP i biorą udział w apoptozie. Istnieją różne hipotezy dotyczące roli mitochondriów w śmierci komórki podczas ischemii/reperfuzji. Według tych hipotez śmierć komórki może być spowodowana wieloma czynnikami: i) syntezą reaktywnych form tlenu;



**Rycina 2.** Postulowany mechanizm uszkodzenia komórki w następstwie zjawiska ischemii/reperfuzji. ETC – łańcuch oddechowy; Cyt c – cytochrom c; mPTP – magakanał mitochondrialny; RET – wsteczny przepływ elektronów; ROS – reaktywne formy tlenu.

ii) obniżoną zdolnością do syntezy ATP; iii) wzrostem stężenia jonów wapnia w cytoplazmie i macierzy mitochondrialnej; iv) zmianą objętości macierzy mitochondrialnej; v) otwarciem megakanału mitochondrialnego skutkującym uwolnieniem cytochromu c który może inicjować proces apoptozy.

Istnieje kilka niezależnych teorii próbujących wyjaśnić cytoprotekcyjne efekty aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych i choć są różne, niekoniecznie muszą się wykluczać.

Pierwsza z zaproponowanych hipotez łączy napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej z pęcznieniem tych organelli. Uważa się, że pęcznienie mitochondriów usprawnia oksydację kwasów tłuszczowych, fosforylację oksydacyjną i w konsekwencji zwiększa syntezę ATP.

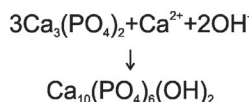
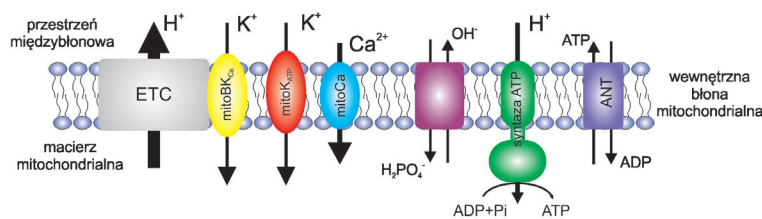
Kolejna hipoteza mówi o zmniejszeniu zjawiska akumulacji jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej po aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych [26]. Jony wapnia zakumulowane w macierzy mitochondrialnej w trakcie fazy ischemii zwiększają szansę na otwarcie megakanału mitochondrialnego i uwolnienia cytochromu c, co z kolei może zapoczątkować apoptozę. Dobroczynna rola napływu  $K^+$  może polegać na dyssypacji części mitochondrialnego potencjału błonowego. Mniejszy potencjał z kolei sprawia, że mniej jonów wapniowych zostanie zakumulowanych w macierzy mitochondrialnej (Ryc. 2).

Podobnie jak  $Ca^{2+}$ , reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) wydają się być kluczowymi gra-

czami biorącymi udział w uszkodzeniu tkanek w przypadku ischemii/reperfuzji. Ich rola nie jest jednak oczywista i powinna być postrzegana wielopłaszczyznowo. Okazuje się, że oprócz oczywistego, negatywnego wpływu na fizjologię mitochondriów są one niezbędne dla cytoprotekcyjnych właściwości aktywatorów kanałów potasowych (KCOs). Kluczowa jest tutaj kwestia ich ilości i momentu syntezy. Niewielkie zwiększenie syntezy ROS obserwowane po podaniu KCOs jest niezbędne dla zajścia procesów cytoprotekcyjnych. Podanie zmiataczy ROS na tym etapie eksperymentu znosi cytoprotekcyjne działanie KCOs [27]. Drugie oblicze ROS związane jest z nagłym wzrostem stężenia ROS obserwowanym w reperfuzji i przywróceniu dostaw tlenu do komórki. Ilość ROS powstających po reperfuzji jest znaczna i powoduje rozległe uszkodzenia w komórce które mogą doprowadzić do jej śmierci.

Za to zjawisko odpowiedzialny może być nadmiar bursztynianu nagromadzony w macierzy mitochondrialnej w trakcie ischemii. Przywrócenie dostaw tlenu umożliwia reaktywację łańcucha oddechowego. Duże ilości bursztynianu uruchamiają tzw. wsteczny przepływ elektronów (RET, ang. *reverse electron transfer*) z kompleksu II na I. Zjawisko to z kolei prowadzi do dramatycznego zwiększenia szybkości syntezy ROS i uszkodzenia komórki [28] (Ryc. 2).

Istnieje również inna teoria próbująca wyjaśnić procesy związane ze zjawiskiem ischemii/reperfuzji. Według klasycznej teorii chemiosmotycznej kompleksy białkowe łańcucha oddechowego wyrzucają protony z macierzy mitochondrialnej. Protony wracają do macierzy poprzez syntezę ATP co napędza syntezę ATP. Wyrzucenie 1 nanomola protonów na jeden mg białka mitochondrialnego prowadzi do powstania potencjału elektrochemicznego  $\Delta\Psi$  równego 200mV i  $\Delta pH=0,05$  jednostki [29]. Oznacza to, że jeżeli układ składałby się wyłącznie z łańcucha oddechowego i syntazy ATP  $\Delta pH$  byłoby bardzo niskie. Napływ kationów do macierzy kompensuje ładunek elektryczny wyrzucanych protonów i prowadzi do wzrostu  $\Delta pH$ , alkalizacji macierzy (Ryc. 3). Alkalizacja macierzy wraz z napływającymi do niej jonami wapniowymi (w obecności fosforanów nieorganicznych) powodują przekształcanie się apatytu  $Ca_3(PO_4)_2$  w hydroksyapatyt  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  który jest w macierzy głównym buforem nie tylko jonów wapniowych, ale również pH [30]. Kanały potasowe, zwłaszcza  $mitoK_{ATP}$  i  $mitoBK_{Ca}$ , pełnią ważne funkcje regulacyjne w tworzeniu hydroksyapatytu. Gdy stężenie ATP w cytoplazmie maleje otwiera się kanał  $mitoK_{ATP}$  i energia układu oddechowego przekształcana jest w alkalizację macierzy. Z kolei, gdy rośnie stężenie jonów wapniowych w macierzy otwiera się



**Rycina 3.** Mitochondrialne kanały kationowe (uniporter wapniowy, kanały potasowe) umożliwiają napływ  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{K}^+$  do macierzy mitochondrialnej. By zrekompensować ładunek łańcuch oddechowy wypompowuje protony z macierzy, co prowadzi do jej alkalizacji. Równocześnie napływ  $\text{Ca}^{2+}$  do alkalicznej macierzy powoduje przekształcenie apatytu w hydroksyapatyt. ETC – łańcuch oddechowy; ANT – translokaza ADP/ATP.

kanał  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  i powoduje, że nadmiar  $\text{Ca}^{2+}$  wraz z jonami hydroksylowymi jest wiązany w postaci hydroksyapatytu. Kanały potasowe w mitochondriach pełnią więc rolę regulacyjną w utrzymywaniu odpowiedniego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  i pH w macierzy mitochondrialnej.

Zarówno podanie aktywatorów kanałów potasowych jak i zwiększenie stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie prowadzą do zwiększenia ilości hydroksyapatytu w macierzy mitochondrialnej. Podobny skutek ma hartowanie naprzemiennymi okresami ischemii i reperfuzji. Podczas ischemii przestaje pracować łańcuch oddechowy i obniża się stężenie ATP w cytoplazmie. Następuje wyciek jonów wapniowych z jego wewnątrzkomórkowych magazynów i zwiększa się ich napływ ze środowiska zewnątrzkomórkowego, któremu nie przeciwdziałają pompy wapniowe z powodu braku ATP. Po przywróceniu dostępu tlenu mitochondria akumulują jony wapniowe z cytoplazmy i wiążą go w postaci hydroksyapatytu. Wszystkie czynniki hartujące mięsień sercowy prowadzą do podwyższenia stężenia hydroksyapatytu w macierzy mitochondrialnej.

Podczas ischemii łańcuch oddechowy przestaje pracować, ale rozpuszczanie hydroksyapatytu powoduje podwyższenie stężenia jonów wapniowych i utrzymanie wysokiej wartości pH w macierzy. Syntaza ATP dalej może produkować ATP kosztem  $\Delta\text{pH}$ . Elektroneutralność tego procesu jest zachowana dzięki wypływowi jonów wapniowych z macierzy przez uniporter wapniowy [30]. Im więcej zgromadzonego hydroksyapatytu tym dłużej mitochondria mogą produkować ATP pomimo ischemii i tym dłużej mogą przeżyć komórki poddane hartowaniu.

Zaprezentowane teorie próbujące wytłumaczyć cytoprotekcyjne efekty napływu jonów potasowych do macierzy mitochondrialnej nie muszą się wykluczać. W istocie, opisują one fragmentarycznie większy obraz którego pozanie wciąż wymaga dalszych badań.

Abstrahując od mechanizmu cytoprotekcyjnych właściwości KCOs, zdumiewająca jest powszechność tych procesów w domenie organizmów eukariotycznych. Procesy cytoprotekcji wywołanej przez napływ jonów potasowych do

mitochondriów opisano również u owadów [31] a nawet roślin [32]. Z racji, że mitochondrialne kanały potasowe opisywane są w coraz to nowych organizmach należących do różnych grup systematycznych eukariotów, domniemywać można, że procesy cytoprotekcyjne obserwowane po ich aktywacji mogą być powszechne. Hipoteza ta wymaga jednak gruntownego udokumentowania.

## FARMAKOLOGIA MITOCHONDRIALNYCH KANAŁÓW POTASOWYCH – BLASKI I CIENIE

Odkrycie cytoprotekcyjnych skutków aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych sprawiło, że białka te stały się obiecującym celem potencjalnych terapii farmakologicznych. Jak już wspomniano, niektóre związki zaliczane do KCOs, takie jak BMS180448 (faza kliniczna badań) skutecznie ograniczają rozmiar zniszczeń jakie pozostawiają po sobie zjawiska ischemii/reperfuzji w mięśniu sercowym czy ośrodkowym układzie nerwowym [33]. Stosowanie KCOs jest również niezbędne w badaniach podstawowych mających na celu identyfikację i charakterystykę kanałów zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej różnych typów komórek. Okazało się jednak, że zastosowanie KCOs zarówno w terapiach jak i w badaniach podstawowych wiąże się z kilkoma istotnymi problemami.

Pierwszym, oczywistym utrudnieniem jest uniwersalność działania większości KCOs, które przeważnie są równie skuteczne w aktywacji izoform danego kanału funkcjonujących w różnych lokalizacjach komórkowych. Taka sytuacja sprawia, że globalne (komórkowe) skutki podania aktywatora kanału potasowego nie mogą być kojarzone z aktywacją jego konkretnej izoformy.

Kolejną wadą KCOs jest ich wpływ na inne aspekty fizjologii komórki niezwiązane z aktywnością kanałów potasowych. Nawet wysoce selektywne KCOs mogą działać na inne białka w komórce zmieniając ich funkcję. Dlatego właściwości każdego aktywatora mitochondrialnych kanałów potasowych muszą być sprawdzone nie tylko w kontekście badanego białka kanałowego, ale również w szerszym kontekście funkcji mitochondriów oraz całej komórki.

Wspomniane wyżej problemy są szczególnie dobrze udokumentowane w przypadku modulatorów dwóch mitochondrialnych kanałów potasowych:  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  oraz  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ . Diazoksyd, aktywator kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  jest związkiem z jednej strony bardzo użytecznym, gdyż jego specyficzność względem mitochondrialnej izoformy kanału  $\text{K}_{\text{ATP}}$  jest wielokrotnie większa niż wobec kanonicznej wersji tego białka obecnej w błonie komórkowej [34]. Z drugiej jednak strony, okazało się, że związek ten hamuje aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (II kompleks łańcucha oddechowego), co powoduje niezależną od jonów potasu dyssypację części mitochondrialnego potencjału błonowego. Diazoksyd zmniejsza również aktywność niektórych adenozynotrifosfataz (ATPaz) komórkowych oraz syntazy ATP.

Kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) uważany był za specyficznego inhibitor kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . Niestety okazało się,

że związek ten może hamować również aktywność kanału  $K_{ATP}$  w błonie komórkowej miocytów w obecności ATP. Co interesujące, związek ten działał jedynie gdy podawano go od cytoplazmatycznej strony białka [35] i nie wykazywał on żadnego wpływu na kanały  $K_{ATP}$  nienaruszonych komórek. Trzeba również wspomnieć, że 5-HD okazał się być nieskuteczny w hamowaniu kanału  $mitoK_{ATP}$  w mózgu [36]. Specyficzność 5-HD względem  $mitoK_{ATP}$  została zakwestionowana ponownie, gdy odkryto, że związek ten jest metabolizowany przez syntazę acetylo-CoA i wchodzi w szlak beta oksydacji [37]. Co więcej, zarówno 5-HD jak i inny specyficzny inhibitor kanału  $mitoK_{ATP}$  glibenklamid oddziałuje z przenośnikiem ADP/ATP [38].

Kolejnym aktywatorem kanału  $mitoK_{ATP}$ , który jak się podejrzewa wykazuje działanie cytoprotekcyjne jest związek BMS191095. Niestety, obserwowane cytoprotekcyjne właściwości tego związku przynajmniej po części nie są zależne od obecności jonów potasu, a co za tym idzie opierają się na mechanizmach nie związanych z regulacją aktywności kanału  $mitoK_{ATP}$ .

Sytuacja przedstawia się podobnie w przypadku modulatorów kanału  $mitoBK_{Ca}$ . Syntetyczne aktywatory kanału  $BK_{Ca}$  takie jak NS1619 oraz NS11021 posiadają właściwości cytoprotekcyjne i większość doniesień literaturowych potwierdza tę hipotezę. Istnieje jednak jedno doniesienie opisujące neuroprotektoryjne działanie NS1619, które jest niezależne od kanału  $BK_{Ca}$  [39]. Co więcej, zarówno NS1619 jak i NS11021 poprzez swoje niespecyficzne oddziaływanie z dehydrogenazą NADH (I kompleks łańcucha oddechowego) zmniejszają zużycie tlenu przez mitochondria gładką. Jak się okazuje, aktywator NS1619, który uznawany jest powszechnie za specyficzny modulator kanału  $BK_{Ca}$ , może również wpływać na aktywność kanałów chlorkowych regulowanych jonami wapnia. Jakby tego było mało, okazało się, że NS1619 może uwalniać jony wapniowe z wewnątrzkomórkowych magazynów oraz hamować działanie pompy wapniowej w siateczce sarko/endoplazmatycznej (SERCA).

Kolejne kontrowersje dotyczące efektów aplikacji KCOs związane są z indukcją pęcznienia mitochondriów. Początkowo zaproponowano mechanizm według którego aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych wywołuje napływ jonów  $K^+$  do macierzy mitochondrialnej. Zgodnie z teorią chemiosmotyczną woda podąża za jonami, co wywołuje pęcznienie mitochondriów. Później okazało się jednak, że zjawisko to nie jest wrażliwe na stosowane inhibitory kanałów potasowych, a nawet nie zależy od obecności jonów potasu [40]. Z kolei inne badania nie odnalazły żadnej korelacji między podaniem KCOs a zmianą objętości mitochondriów. Obserwacje te pozwalają domniemywać, że oprócz samych kanałów istnieje w komórce wiele innych białek wrażliwych na KCOs.

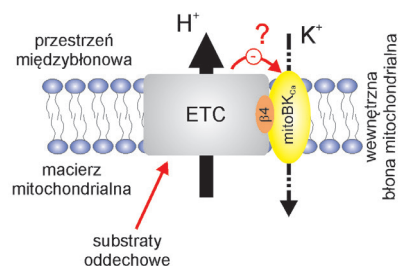
Problem specyficzności modulatorów kanałów potasowych nie ogranicza się do ich aktywatorów. Paksylina, znany i powszechnie stosowany inhibitor kanału  $BK_{Ca}$  okazała się chronić komórki nerwowe przed uszkodzeniami wywołanymi zwiększonym stężeniem glutaminy. Co ciekawe, podobny efekt uzyskano stosując paksylinol, analog paksyliny, który nie zmienia aktywności kanału.

Reasumując, modulatory mitochondrialnych kanałów potasowych są niezwykle użytecznym narzędziem stosowanym w badaniach podstawowych oraz obiecującymi lekami, które mogą okazać się skuteczne w terapii pewnych schorzeń. Należy jednak bezwzględnie pamiętać, że związki te wykazują szereg niespecyficznych efektów zarówno w kontekście fizjologii mitochondriów jak i całej komórki. Stosując je, należy zatem zachować należyta ostrożność i przeprowadzać odpowiednie eksperymenty kontrolne.

## JAK ŁAŃCUCH ODDECHOWY REGULUJE MITOCHONDRIALNE KANAŁY POTASOWE?

Jak wcześniej wspomniano, kanały potasowe są elementem mechanizmów, które mogą prowadzić do uszkodzenia, jak i ochrony komórki. Ich aktywność podlega regulacji poprzez zmiany pH, temperatury, ciśnienia, reaktywne formy tlenu, hormony czy ligandy takie jak ATP. Część badań wskazuje, iż w regulacji tej uczestniczy również środowisko lipidowe błon [41]. Od chwili odkrycia mitochondrialnych kanałów potasowych ich regulacja przez różne czynniki jest intensywnie badana [2]. Wykazano na przykład, że mitochondrialne kanały potasowe są regulowane przez łańcuch oddechowy (ETC, ang. *electron transport chain*) (Ryc. 4). Ścisła zależność układu generującego napięcie (ETC) oraz elementów rozpraszających (kanały potasowe) może mieć wpływ na elektrochemiczną homeostazę mitochondriów. Dlatego pojawia się fundamentalne pytanie: dlaczego łańcuch oddechowy bezpośrednio reguluje mitochondrialne kanały potasowe?

Zależność przepływu jonów przez mitochondrialne kanały potasowe od potencjału błonowego wydaje się być oczywista. Ponadto, istnieje kilka dowodów wskazujących na regulację aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych przez łańcuch oddechowy [42]. W badaniach kanału  $mitoBK_{Ca}$  komórek gwiazdki ludzkiego techniką patch-clamp wykazano, że substraty ETC (NADH, bursztynian i jabłczan/glutaminian) oraz donory elektronów (TMPD/askorbinian) hamują aktywność kanału  $mitoBK_{Ca}$  [42]. Efekt ten jest znoszony przez podanie specyficznych inhibitorów mitochondrialnego łańcucha oddechowego (rotenon, antimycyna A oraz KCN), co sugeruje, że aktywność kanału  $mitoBK_{Ca}$  może być regulowana przez oksydazę cytochromu *c*. Dlatego, przepuszcza się, że sygnał redoks przekazywany z ETC do kanału  $mitoBK_{Ca}$  jest za pośrednictwem oksydazy cytochromu *c*. Szczegóły dotyczące molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw tej obserwacji nie są jeszcze znane, ale istnieją obserwacje wskazujące na funkcjonalne i



Rycina 4. Schemat hipotetycznej regulacji kanału  $mitoBK_{Ca}$  przez łańcuch oddechowy (ETC).

strukturalne oddziaływanie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z łańcuchem oddechowym [43]. Co z kolei sugeruje, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> może być zaangażowany w metabolizm tlenu. Dlatego można domniemywać, że oddziaływanie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z oksydazą cytochromu c może odgrywać ważną rolę w warunkach patofizjologicznych: podczas zawału serca czy niedotlenienia mózgu [44].

Istnieje szereg publikacji opisujących regulację aktywności kanału BK<sub>Ca</sub> z błony komórkowej zmianami stanu redoks w komórce [45]. Wiemy również, że kanał BK<sub>Ca</sub> wraz z oksygenazą hemową oraz gazową cząsteczką sygnałową tlenkiem węgla (CO) mogą uczestniczyć w wyrafinowanym mechanizmie, który pozwala komórkom na wykrywanie zmian ich wewnętrznego stanu redoks. Analogiczne mechanizmy regulacji aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> hemina i CO opisane zostały w mitochondriach [46,47]. Mitochondria, wyspecjalizowane w przemianach tlenowych (fosforylacja oksydacyjna) są komórkowymi elektrowniami, gdzie zachodzą nieprzerwanie reakcje redoks, w wyniku których dochodzi do syntezy ATP. Dlatego wydaje się prawdopodobne, że stan redoks kanału jonowego (np. kanału mitoBK<sub>Ca</sub>) może odgrywać ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów. Zaobserwowano również, regulację redoks kanału mitoK<sub>ATP</sub> w kardiomiocytach [48]. Wykazano, że niedotlenienie zwiększa aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> i zmniejsza aktywność megakanalu mitochondrialnego (mPTP) [49]. To odkrycie może sugerować funkcjonalne sprzężenie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> i mPTP. W związku z tym, zmniejszenie aktywności kanału przez łańcuch oddechowy może powodować aktywację mPTP, co prowadzi do śmierci komórki. Niedawna identyfikacja transkryptów genów kodujących mitochondrialne izoformy kanałów K<sub>ATP</sub> [50] oraz BK<sub>Ca</sub> [51] otwiera drogę do scharakteryzowania ich roli w mitochondrialnych procesach redoks.

## MITOCHONDRIA W KOMÓRKACH ŚRÓDBŁONKA - JEŚLI NIE CENTRA ENERGETYCZNE TO CO?

Śródbłonek naczyń stanowi pojedynczą warstwę komórek wyścielającą od wewnątrz każde naczynie krwionośne. Przez bardzo długi czas uważano, że nie spełnia on żadnej istotnej funkcji fizjologicznej i jest jedynie warstwą półprzepuszczalnego „celofanu” izolującą krew od reszty komórek organizmu. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku okazało się, że komórki śródbłonka uczestniczą aktywnie w regulacji światła naczyń krwionośnych i w ten sposób regulują ciśnienie krwi w układzie krwionośnym. Okazało się również, że pomimo tego, iż śródbłonek wyściela wszystkie naczynia krwionośne, nie jest on układem jednorodnym i występują znaczne różnice funkcjonalne w zależności od miejsca jego występowania w układzie krwionośnym. Inną rolę pełni śródbłonek w mikronaczyniach a inną w tętnicach i żyłach. W latach 70. ubiegłego wieku okazało się, że śródbłonek wydziela substancję mającą właściwości rozkurczowe naczyń krwionośnych nazwaną czynnikiem pochodzenia śródbłonkowego rozkurczającym naczynia (EDRF, ang. *endothelial derived relaxing factor*). Izolowane naczynia krwionośne posiadające śródbłonek rozkurczały się pod wpływem acetylocholino natomiast te, które go pozbawiono nie wykazywały takiej właściwości [52,53]. EDRF zidentyfikowany został w końcu jako pro-

sta cząsteczka gazowa, tlenek azotu (NO) [54], za odkrycie której przyznano nagrodę Nobla. Śródbłonek okazał się być również aktywny w procesach auto- i endokrynych wpływających na stan zapalny oraz w procesach miażdżycowych [55]. W świetle nowych doniesień nie można było już traktować śródbłonka jako biernej bariery. Należało uznać jego rolę jako aktywnego składnika układu krwionośnego. Zrodziło się jednak pytanie o rolę mitochondriów w komórkach śródbłonka, które tak jak niemalże wszystkie komórki eukariontów je posiadają. Są one jednak w kwestii mitochondriów wyjątkowe gdyż opierają swój metabolizm na procesach glikolizy. Powstaje zatem pytanie, czy i jaką rolę pełnią mitochondria w śródbłonku?

Pomimo tego, że komórki śródbłonka wykorzystują energię uzyskaną w procesach mało wydajnej glikolizy wystarczy im ona do zabezpieczenia ich podstawowych funkcji. Okazało się jednak, że komórki śródbłonka pomimo niewielkiej liczby mitochondriów są w stanie wytwarzać znaczne ilości ATP w procesach fosforylacji oksydacyjnej [56]. Jest zatem wielce prawdopodobne, że jedną z funkcji mitochondriów w komórkach śródbłonka jest zapewnienie swoistej „rezerwy” energetycznej mogącej być wykorzystaną w szczególnych warunkach.

Jednym z przejawów niezaprzeczalnej aktywności mitochondriów w komórkach śródbłonka są powstające w nich reaktywne formy tlenu (ROS). Powstają one, jako produkt oddychania tlenowego napędzającego syntezę ATP. Reaktywne formy tlenu powstają w mitochondriach głównie w obrębie I i III kompleksu łańcucha oddechowego. Dodatkowym źródłem ROS w mitochondriach może być oksydaza NOX4 z rodziny oksydaz NADPH, aczkolwiek jej lokalizacja mitochondrialna nie jest jednoznacznie określona. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej znajduje się także oksydaza monoaminowa (MAO), która jest źródłem ROS z przemian katecholamin. Zmiana mitochondrialnego potencjału błonowego związana jest ze zmianami szybkości syntezy ROS. W regulacji homeostazy ROS w mitochondriach biorą udział białka rozprzegające (UCP, ang. *uncoupling proteins*) obecne również w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek śródbłonka [57]. Podwyższony poziom ROS związany z aktywnością mitochondriów ma bezpośredni wpływ na rozwój stanu zapalnego śródbłonka, proliferację komórek oraz ich apoptozę. Pod wpływem ROS aktywacji ulegają między innymi takie białka jak, czynnik transkrypcyjny NFκB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) czy kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*). Ponadto wysokie stężenia ROS powodują zmniejszenie puli NO. W wyniku spontanicznej reakcji anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) z NO powstaje anion ONOO<sup>-</sup>, eliminujący i limitujący dostępność NO dla procesów regulacji rozkurczu naczyń krwionośnych co może brać udział w patogenezie takich schorzeń jak nadciśnienie, cukrzyca, sepsa czy miażdżyca [58]. Kliniczne próby zapobiegania tym schorzeniom poprzez aplikowanie substancji obniżających poziom ROS nie przyniosły jednak spodziewanych efektów. Przyczyn tej porażki można doszukiwać się w fakcie, że ROS w małych stężeniach spełniają istotną rolę sygnałową dla aktywacji genomu jądrowego [59].

Mitochondria śródłonka odgrywają również istotną rolę w takich procesach jak starzenie, apoptoza, nekroza czy mitofagia. Proces apoptozy jest dobrze poznany w komórkach śródłonka a wywołują go takie czynniki jak: niedotlenienie, utleniona forma lipoproteiny o niskiej gęstości (ox-LDL), czy też uszkodzone DNA. Ox-LDL powoduje zmiany potencjału mitochondrialnego, czego konsekwencją jest uwolnienie cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów co uruchamia szlak apoptozy. Proces ten hamowany jest przez cyklosporynę A i wskazuje na istotną rolę mitochondriów w apoptozie indukowanej ox-LDL [60]. Z kolei apoptoza wywołwana przez hiperglikemię wskazuje na udział zarówno ROS pochodzenia mitochondrialnego jak i cytoplazmatycznego. Aktywacja peptydu C i AMPK $\alpha$  (ang. *AMP activated protein kinase a*) hamuje indukowaną przez wysokie stężenie glukozy syntezę ROS, podział mitochondriów, spadek potencjału i apoptozę komórek śródłonka [61]. W przypadku działania cytokiny prozapalnej TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor a*) dochodzi do aktywacji receptorów CD95, co w konsekwencji powoduje aktywację kaskady kaspaz i apoptozę komórek śródłonka [62].

Tak jak wszystkie komórki eukariotyczne, komórki śródłonka posiadają również błonowe kanały potasowe zróżnicowane pod względem funkcji i charakterystyki. Obejmują one kanały potasowe regulowane jonami wapniowymi ( $K_{Ca}$ ), kanały potasowe zależne od potencjału błonowego ( $K_v$ ), rektyfikujące kanały potasowe ( $K_{IR}$ ), kanały potasowe o domenach dwuporowych ( $K_{2P}$ ) oraz kanały potasowe regulowane ATP ( $K_{ATP}$ ) [63]. Kanały te w komórkach śródłonka zostały zidentyfikowane głównie w błonie plazmatycznej. Póki co nasza wiedza na temat mitochondrialnych kanałów potasowych w komórkach śródłonka jest ograniczona. Ale wiemy np., że aktywacja kanałów  $mitoK_{ATP}$  w komórkach śródłonka KCOs takimi jak BMS191095 i diazoksyd skutkuje depolaryzacją potencjału błonowego  $\Delta\Psi$  i rozkurczem naczyń zależnym od śródłonka [63]. Jednym z lepiej poznanych i opisanych kanałów potasowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej śródłonka jest kanał  $mitoBK_{Ca}$  [64]. Jak już wspomniano, aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych łączona jest z procesami cytoprotekcyjnymi. Zatem również w przypadku komórek śródłonka przypuszcza się, że mitochondrialne kanały potasowe mają swój udział w procesach ochronnych przed uszkodzeniem.

Rola  $Ca^{2+}$  w procesach regulacji aktywności bioenergetycznej mitochondriów jest bezsprzeczna i dotyczy to również komórek śródłonka [65]. Wzrost stężenie jonów wapniowych w cytoplazmie powoduje wzrost komórkowego zużycia tlenu co świadczy o wzroście aktywności mitochondriów. Jednym z modulatorów kanału  $BK_{Ca}$  jest wspomniany wcześniej związek CGS7184, który powoduje dodatkowo wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych w komórkach śródłonka. Związek ten jak wykazano działając na komórki śródłonka linii EA.hy 926 powoduje wzrost zużycia tlenu [66]. Przedstawione dane literaturowe wykazują, że mitochondria komórek śródłonka podlegają podobnej regulacji, jak

komórki w których proces syntezy ATP zachodzi na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Obecnie wydaje się, że mitochondrialne kanały potasowe w komórkach śródłonka odgrywają ważną, aczkolwiek nie do końca jeszcze poznana, rolę w fizjologii układu krwionośnego.

## PODSUMOWANIE

W tym roku mija 25 lat od pierwszej publikacji identyfikującej kanał potasowy regulowany przez ATP w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Początki tych badań to przede wszystkim próba potwierdzenia faktycznej obecności białek kanałowych w mitochondriach. Następnie próbowano wyjaśnić rację bytu kanałów potasowych w mitochondriach ponieważ ich „przydatność” w mitochondrialnej syntezie ATP jest znikoma. Udział tych białek w zjawisku cytoprotekcji stanowił mocny impuls dla zainteresowania się tą tematyką przez wiele grup badawczych na całym świecie.

Następny ważny etap badań mitochondrialnych kanałów potasowych to próba identyfikacji ich molekularnych składników. Dziś można przypisać aktywność białek kanałowych określonym białkom. Wydaje się, że będzie to stanowić ważny punkt wyjścia dla przyszłych badań.

Nadal jednak lista pytań dotycząca mitochondrialnych kanałów potasowych wydaje się być bardzo długa. Pytania te dotyczą fundamentalnych spraw takich jak farmakologia oraz mechanizmy regulacji aktywności tych białek. W niniejszej pracy przedstawiliśmy część ważnych problemów, które pozostają nieodkryte w tym obszarze badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive  $K^+$  channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247
2. Szabo I, Zoratti M (2014) Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 94: 519-608
3. Mansy SS, Schrum JP, Krishnamurthy M, Tobé S, Douglas A, Szostak JW (2009) NIH Public Access. *Mol Biol* 454: 122-125
4. Mulikidjanian Y, Bychkov Y, Dibrova DV, Galperin MY, Koonin EV (2012) PNAS Plus: Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 821-830
5. Mulikidjanian AY, Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV (2008) Evolutionary primacy of sodium bioenergetics. *Biol Direct* 3:13
6. Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, Van der Heide T, Smith LT (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 130: 437-460
7. Roessler M, Müller V (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences. *Environ Microbiol* 3: 743-754
8. Radchenko MV, Tanaka K, Waditee R, Oshimi S, Matsuzaki Y, Fukuhara M, Kobayashi H, Takabe T, Nakamura T (2006) Potassium/proton antiport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281: 19822-19829
9. Fedorova ND, Galperin MY, Ha CC (2001) Sodium ion cycle in bacterial pathogens : evidence from cross-genome comparisons. 65: 353-370
10. Koishi R, Xu H, Ren D, Navarro B, Spiller BW, Shi Q, Clapham DE (2004) A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. *J Biol Chem* 279: 9532-9538
11. Liebeskind BJ, Hillis DM, Zakon HH (2013) Independent acquisition of sodium selectivity in bacterial and animal sodium channels. *Curr Biol* 23: R948-949
12. Guy L, Saw JH, Ettema TJG (2014) The archaeal legacy of eukaryotes: a phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: 16-22



13. Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155
14. Jung DW, Apel LM, Brierley GP (1992) Transmembrane gradients of free Na<sup>+</sup> in isolated heart mitochondria estimated using a fluorescent probe. *Am J Physiol* 262: 1047-1055
15. Palty R, Hershfinkel M, Yagev O, Saar D, Barkalifa R, Khananshvili D, Peretz A, Grossman Y, Sekler I (2006) Single alpha-domain constructs of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, oligomerize to form a functional exchanger. *Biochemistry* 45: 11856-11866
16. Babsky A, Doliba N, Savchenko A, Wehrli S, Osbakken M (2001) Na<sup>+</sup> effects on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation in diabetic hearts. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 543-551
17. Halestrap AP (2010) A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38: 841-860
18. Szklarczyk R, Huynen MA (2010) Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics* 10: 4012-4024
19. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136
20. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH (1996) Cardiac preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 778-786
21. Meldrum DR, Cleveland JC, Mitchell MB, Sheridan BC, Gamboni-Robertson F, Harken AH, Banerjee A (1996) Protein kinase C mediates Ca<sup>2+</sup>-induced cardioadaptation to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 271: 718-726
22. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M (1996) Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury *via* protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 79: 137-146
23. Grover GJ, McCullough JR, Henry DE, Conder ML, Sleph PG (1989) Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 98-104
24. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B (2002) Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298: 1029-1033
25. Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y (2005) Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 16: 147-154
26. Liu Y, Sato T, Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97: 2463-3469
27. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Dizaoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88: 802-809
28. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa AS, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515: 431-435
29. Nicholls DG, Ferguson SJ (2013) *W: Bioenergetics 4*, Academic Press, Elsevier Amsterdam
30. Dolowy K (2015) Ion transport and (selected) ion channels in biological membranes in health and pathology. *W: Electrochemical Processes in Biological Systems*, Lewenstam A & Gordon L, red John Wiley & Sons 61-82
31. Slocinska M, Lubawy J, Jarmuszkiewicz W, Rosinski G (2013) Evidence for an ATP-sensitive potassium channel (KATP) in muscle and fat body mitochondria of insect. *J Insect Physiol* 59: 1125-1132
32. Casolo V, Braidot E, Chiandussi E, Vianello A, Macri F (2003) K<sup>+</sup> ATP channel opening prevents succinate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 118: 313-318
33. Lee J-H, Jung I-S, Lee S-H, Yang MK, Hwang JH, Lee HD, Cho YS, Song MJ, Yi KY, Yoo SE, Kwon SH, Kim B, Lee CS, Shin HS (2007) Cardioprotective effects of BMS-180448, a prototype mitoK(ATP) channel opener, and the role of salvage kinases, in the rat model of global ischemia and reperfusion heart injury. *Arch Pharm Res* 30: 634-640
34. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271: 8796-8799
35. Li X, Rapedius M, Baukrowitz T, Liu GX, Srivastava DK, Daut J, Hanley PJ (2010) 5-Hydroxydecanoate and coenzyme A are inhibitors of native sarcolemmal K(ATP) channels in inside-out patches. *Biochim Biophys Acta* 1800: 385-391
36. Choma K, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz WS, Dolowy K, Szewczyk A (2009) Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 41: 323-334
37. Hanley PJ, Dröse S, Brandt U, Lareau RA, Banerjee AL, Srivastava DK, Banaszak LJ, Barycki JJ, Van Veldhoven PP, Daut J (2005) 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *J Physiol* 562: 307-318
38. Ziemys A, Toleikis A, Kopustinskiene DM (2006) Molecular modelling of K(ATP) channel blockers-ADP/ATP carrier interactions. *Syst Biol (Stevenage)* 153: 390-393
39. Gáspár T, Katakam P, Snipes JA, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW (2008) Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J Neurochem* 105: 1115-1128
40. Aldakkak M, Stowe DF, Cheng Q, Kwok W-M, Camara AKS (2010) Mitochondrial matrix K<sup>+</sup> flux independent of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel opening. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: 530-541
41. Olszewska A, Bednarczyk P, Siemen D, Szewczyk A (2014) Modulation of the mitochondrial large-conductance calcium-regulated potassium channel by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1837: 1602-1610
42. Bednarczyk P, Wieckowski MR, Broszkiewicz M, Skowronek K, Siemen D, Szewczyk A (2013) Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BK<sub>Ca</sub> Channel to the Respiratory Chain. *PLoS One* 8: e68125
43. Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y (2005) Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: 1635-1642
44. Szewczyk A, Skalska J, Głab M, Kulawiak B, Malińska D, Koszela-Piotrowska I, Kunz WS (2006) Mitochondrial potassium channels: from pharmacology to function. *Biochim Biophys Acta* 1757: 715-720
45. Wang ZW, Nara M, Wang YX, Kotlikoff MI (1997) Redox regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 110: 35-44
46. Augustynek B, Kudin AP, Bednarczyk P, Szewczyk A, Kunz WS (2014) Hemin inhibits the large conductance potassium channel in brain mitochondria: a putative novel mechanism of neurodegeneration. *Exp Neurol* 257: 70-75
47. Kaczara P, Motterlini R, Rosen GM, Augustynek B, Bednarczyk P, Szewczyk A, Foresti R, Chlopicki S (2015) Carbon monoxide released by CORM-401 uncouples mitochondrial respiration and inhibits glycolysis in endothelial cells: a role for mitoBKCa channels. *Biochim Biophys Acta* 1847: 1297-1309
48. Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ, Brookes PS (2011) Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1309-1315
49. Cheng Y, Gu XQ, Bednarczyk P, Wiedemann FR, Haddad GG, Siemen D (2008) Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cel Physiol Biochem* 22: 127-136
50. Foster DB, Ho AS, Rucker J, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B (2012) Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res* 111: 446-454
51. Soltysinska E, Bentzen BH, Barthmes M, Hattel H, Thrush AB, Harper ME, Qvortrup K, Larsen FJ, Schiffer TA, Losa-Reyna J, Straubinger J, Kniess A, Thomsen MB, Brüggemann A, Fenske S, Biel M, Ruth P, Wahl-Schott C, Boushel RC, Olesen SP, Lukowski R (2014) KCNMA1

- encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 9:e103402
52. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
  53. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269
  54. Ignarro LJ (1990) Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477-483
  55. Curtis-Prior P (red) (2004) The Eicosanoids. doi: 10.1002/0470020628
  56. Koziel A, Woyda-Ploszczyca A, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W (2012) The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 464: 657-669
  57. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA (2013) Mitochondria and endothelial function. *Circ Res* 112: 1171-1188
  58. Tang X, Luo Y-X, Chen H-Z, Liu D-P (2014) Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front Physiol* 5: 175
  59. Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48:158-167
  60. Walter DH, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM, Dimmeler S (1998) Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 98: 1153-1157
  61. Bhatt MP, Lim Y-C, Kim Y-M, Ha K-S (2013) C-peptide activates AMPK $\alpha$  and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes. *Diabetes* 62: 3851-3862
  62. He J, Xiao Y, Casiano CA, Zhang L (2000) Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in coronary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 896-903
  63. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Koziel A, Sobieraj I, Nobik W, Łukasiak A, Skup A, Bednarczyk P, Drabarek B, Dymkowska D, Wrzosek A, Zablocki K (2015) Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep* 67: 704-710
  64. Bednarczyk P, Koziel A, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A (2013) Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: 1415-1427
  65. Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchon MR (2015) Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1350: 107-116
  66. Wrzosek A, Łukasiak A, Gwóźdź P, Malińska D, Kozłowski VI, Szewczyk A, Chłopicki S, Dołowy K (2009) Large-conductance K<sup>+</sup> channel opener CGS7184 as a regulator of endothelial cell function. *Eur J Pharmacol* 602: 105-111
  67. Kadlec AO, Beyer AM, Ait-Aissa K, Gutterman DD (2016) Mitochondrial signaling in the vascular endothelium: beyond reactive oxygen species. *Basic Res Cardiol* 111: 26

## What we don't know about mitochondrial potassium channels?

**Bartłomiej Augustynek<sup>1</sup>, Antoni Wrzosek<sup>1</sup>, Piotr Koprowski<sup>1</sup>, Agnieszka Kielbasa<sup>1</sup>, Piotr Bednarczyk<sup>2</sup>, Agnieszka Łukasiak<sup>2</sup>, Krzysztof Dołowy<sup>2</sup>, Adam Szewczyk<sup>1</sup>✉**

<sup>1</sup>Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences- SGGW, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

✉ e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl

**Key words:** mitochondria, mitochondrial potassium channels, biological membranes, cytoprotection, endothelium

### ABSTRACT

In the current work the authors present the most interesting, yet not fully understood issues regarding origin, function and pharmacology of the mitochondrial potassium channels. There are eight potassium channels known to contribute to the potassium permeability of the inner mitochondrial membrane: ATP-regulated channel, calcium-regulated channels of large, intermediate and small conductance, voltage-regulated Kv1.3 and Kv7.4 channels, two-pore-domain TASK-3 channel and SLO2 channel. The primary function of the mitochondrial potassium channels is regulation of the mitochondrial membrane potential. Additionally, mitochondrial potassium channels alter cellular respiration, regulation of the mitochondrial volume and ROS synthesis. However, mechanisms underlying these processes are not fully understood yet. In this work, the authors not only present available knowledge about this topic, but also put certain hypotheses that may set the direction for the future research on these proteins.