

## STRESZCZENIE

Ostatnie badania wskazują na kluczową rolę mitochondriów, a w szczególności mitochondrialnych kanałów potasowych w procesach cytoprotekcji komórek poddanych niedotlenieniu. Wykazano, że aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>) oraz kanału potasowego regulowanego przez ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) chroni komórki sercowe przed cytotoksycznymi skutkami ischemii/reperfuzji. Mechanizm tego zjawiska nie jest jednak dokładnie poznany. Wydaje się, że jednym z kluczowych zagadnień dla zrozumienia mechanizmów cytoprotekcyjnych jest budowa molekularna oraz topologia kanałów potasowych rozumiana jako układ elementów struktury drugorzędowej w mitochondrialnej błonie wewnętrznej oraz orientacja przestrzenna domen podjednostek tworzących kanały. W niniejszej pracy podsumowano aktualny stan wiedzy dotyczący orientacji przestrzennej białek tworzących kanały mitoK<sub>ATP</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub>. Wskazany został również związek między potencjalną topologią mitochondrialnych kanałów potasowych z ich rolą w mechanizmach cytoprotekcyjnych.

## WPROWADZENIE

Mitochondria są organellami zaopatrującymi komórkę w energię niezbędną do przeprowadzenia podstawowych czynności życiowych. Oprócz przekształcenia energii w formę biologicznie użyteczną, w procesie fosforylacji oksydacyjnej, mitochondria biorą udział w tak istotnych procesach jak apoptoza czy beta oksydacja lipidów. Istotne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów jest ścisła regulacja transportu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Jedną z grup białek zaangażowanych w transport jonów, a co za tym idzie kluczową w regulacji pracy mitochondriów są kanały potasowe wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ich szczególna rola jest widoczna w stanach niedotlenienia różnych rodzajów tkanek. Obniżenie stężenia tlenu powoduje zahamowanie aktywności łańcucha oddechowego. Przekłada się to na obniżenie zdolności utrzymania potencjału w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, a następnie spadek syntezy ATP w mitochondriach. Powoduje to zachwianie równowagi jonowej i w konsekwencji śmierć komórki [1]. Zauważono, że poddanie tkanek krótkim fazom niedotlenienia a następnie reperfuzji (tzw. hartowanie niedotlenieniem) powoduje wzrost przeżywalności komórek. Podobny efekt można uzyskać za pomocą substancji farmakologicznych aktywujących kanały potasowe zlokalizowane w błonie wewnętrznej mitochondriów [2]. Mitochondrialne kanały potasowe utrzymują homeostazę jonową w mitochondriach, odpowiedzialne są za zmiany objętości wnętrza mitochondriów, a także biorą pośrednio udział w tworzeniu gradientu pH między macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki [3]. Z tych powodów mitochondrialne kanały potasowe są obiektem interesującym z punktu widzenia nauk podstawowych, a uzyskane wyniki mogą mieć zastosowanie w medycynie [4-6]. Pełne opisanie mechanizmów stojących za zjawiskiem cytoprotekcji indukowanym przez mitochondrialne kanały potasowe wymaga jednak zrozumienia ich regulacji, budowy oraz oddziaływania z innymi białkami [7]. Wydaje się, że jednym z podstawowych zagadnień jest także topologia kanału tzn. układu elementów struktury drugorzędowej kanałów w mitochondrialnej błonie wewnętrznej oraz orientacja przestrzenna elementów funkcyjnych (domen). Poznanie topologii kanału pozwala np. na określenie przedziału mitochondrialnego, w którym dochodzi do wiązania ligandów.

W niniejszej pracy przedstawione zostały hipotezy odnośnie topologii wybranych mitochondrialnych kanałów potasowych ze szczególnym uwzględnieniem kanałów mitoK<sub>ATP</sub> (ang. *mitochondrial ATP-regulated potassium channel*) oraz mitoBK<sub>Ca</sub> (ang. *mitochondrial large-conductance calcium-regulated potassium channel*).

Michał Laskowski

Bogusz Kulawiak✉

Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa

✉Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: b.kulawiak@nencki.gov.pl

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

**Słowa kluczowe:** mitochondrialne kanały potasowe, cytoprotekcja, topologia kanałów potasowych

**Wykaz skrótów:** 5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy; BLM – technika czarnych błon lipidowych; mitoBK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie; mitoK<sub>ATP</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP; mitoIK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany jonami wapnia o średnim przewodnictwie; mitoSK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany jonami wapnia o średnim przewodnictwie; mitoKv – mitochondrialny kanał zależny od potencjału błonowego; mitoTASK-3 – mitochondrialny dwuporowy kanał potasowy; mPTP – megakanał mitochondrialny; ROMK – kanał potasowy zewnętrznego rdzenia nerki; ROS – reaktywne formy tlenu; Slo2 – kanał o dużym przewodnictwie regulowany jonami sodu; TIM – translokaza błony wewnętrznej; TOM – translokaza błony zewnętrznej

**Podziękowanie:** Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki 2015/18/E/NZ1/00737. Praca powstała w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej MitoNet.pl.

## KANAŁY POTASOWE W WEWNĘTRZNEJ BŁONIE MITOCHONDRIALNEJ

Mitochondrialne kanały potasowe stanowią najliczniejszą grupę kanałów błony wewnętrznej mitochondriów, analogicznie do błony plazmatycznej. Do dzisiaj zidentyfikowano osiem kanałów potasowych w mitochondriach. Pierwszym opisanym był kanał  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . W następnych latach zidentyfikowano obecność kanałów regulowanych jonami wapnia:  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{mitoIK}_{\text{Ca}}$  (ang. *mitochondrial intermediate conductance calcium-regulated potassium channel*) oraz  $\text{mitoSK}_{\text{Ca}}$  (ang. *mitochondrial small conductance calcium-regulated potassium channel*). W wewnętrznej błonie mitochondriów obecne są ponadto kanały zależne od napięcia:  $\text{mitoKv}1.3$  oraz  $\text{mitoKv}7.4$  (ang. *mitochondrial voltage-dependent potassium channel*), kanał  $\text{Slo}2$  (ang. *large conductance sodium regulated potassium channel*) oraz kanał  $\text{mitoTASK-3}$  (ang. *mitochondrial TWIK-related acid sensitive potassium channel*). Obecność mitochondrialnych kanałów potasowych stwierdzono w mitochondriach wielu tkanek np. mózgu, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, śródbłonna czy skóry [8].

Co ciekawe, już pierwsze badania elektrofizjologiczne wskazały, że kanały potasowe z błon mitochondrialnych wykazują podobieństwo właściwości biofizycznych do swoich odpowiedników z błony plazmatycznej [9]. Aktywność kanałów potasowych jest regulowana przez szereg czynników m.in. zmiany potencjału błonowego, ligandy lub substancje farmakologiczne określane jako modulatory kanałów potasowych. Również substancje endogenne, takie jak nukleotydy czy jony, modulujące kanały z błony plazmatycznej w podobny sposób regulują aktywność kanałów mitochondrialnych. Wykazano także, że z reguły aktywność kanałów potasowych z wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz plazmatycznej regulowana jest przez takie same substancje farmakologiczne (zarówno aktywatory jak i inhibitory) [10]. Istnieją jednak pewne różnice, umożliwiające identyfikację farmakologiczną kanałów mitochondrialnych np. diazoksyd, aktywator kanału  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , wykazuje wielokrotnie większe powinowactwo do kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ , niż do  $\text{K}_{\text{ATP}}$  błony plazmatycznej [11]. Również 5-HD, powszechnie stosowany inhibitor kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  uważany jest za specyficzny dla mitochondrialnej formy kanału [7]. Wiele wskazuje na to, że również budowa kanałów mitochondrialnych jest podobna do budowy kanałów plazmatycznych. Kanały potasowe zbudowane są zwykle z kilku białkowych podjednostek, tworzących por kanału (ang. *pore forming subunits*) oraz regulatorowych (ang. *auxillary subunits*) wpływających na aktywność kanału.

## MITOCHONDRIA JAKO ŚRODOWISKO DLA KANAŁÓW POTASOWYCH

Warunki biofizyczne oraz otoczenie mitochondrialnych kanałów jonowych są diametralnie różne w porównaniu z środowiskiem w jakim funkcjonują kanały potasowe z błony plazmatycznej. Podstawową różnicę stanowią gradienty jonowe po obu stronach błony plazmatycznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Pomiędzy płynem pozakomórkowym a cytosolem jest znaczna różnica w stężeniach potasu, kolejno około 5 mM oraz 150 mM. Natomiast pomiędzy mitochondrialną przestrzenią międzybłonową oraz macierzą

mitochondrialną wydaje się, że różnica stężeń jest niewielka, w obu przypadkach stężenia jonów  $\text{K}^+$  wynoszą około 150 mM. Znaczne różnice występują w stężeniach jonów wapnia, będących aktywatorami niektórych kanałów potasowych obecnych w mitochondriach. Stężenie w płynie pozakomórkowym wynosi około 2 mM, w cytosolu oraz przestrzeni międzybłonowej oscyluje w zakresie około 0,0001-0,001 mM, natomiast w macierzy mitochondrialnej wynosi około 0,5 mM [12].

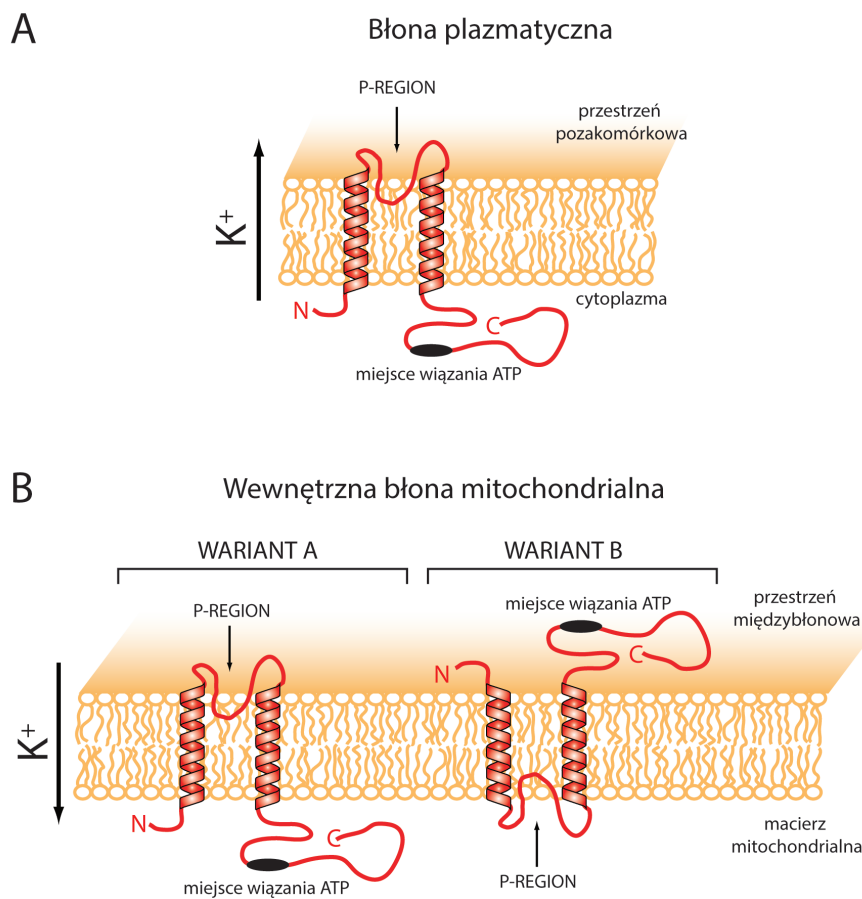
Wskutek aktywności łańcucha oddechowego, w macierzy mitochondrialnej stężenie jonów  $\text{H}^+$  jest blisko dziesięciokrotnie niższe niż w przestrzeni międzybłonowej w której pH jest w zakresie 7,2-7,4. W macierzy wartość pH jest zwykle bliska 8. Protonowy gradient elektrochemiczny wytwarza też znaczny potencjał elektryczny w poprzek błony mitochondrialnej. Wynosi on około 180-200 mV i jest ujemny po stronie macierzy. W konsekwencji, siłą napędową transportu jonów przez kanały potasowe z wewnętrznej błony mitochondrialnej jest głównie potencjał elektryczny powstały w wyniku pracy łańcucha oddechowego. Powoduje to napływ jonu potasu do wnętrza macierzy. W przypadku błony plazmatycznej kluczowa dla kierunku transportu jonów potasu jest różnica stężeń po obu stronach błony [13].

## TRANSPORT KANAŁÓW POTASOWYCH DO WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNYCH

Podobnie jak większość białek mitochondrialnych, podjednostki mitochondrialnych kanałów potasowych są kodowane przez genom jądrowy. W przypadku podjednostek tworzących kanały z błony plazmatycznej wydaje się, że mechanizm dzięki któremu lokalizują się one w błonie jest dość dobrze poznany. Białka tworzące podjednostki kanałów plazmatycznych podlegają translokacji kotranslacyjnej do błony siateczki śródplazmatycznej, a następnie z udziałem aparatu Golgiego zostają wbudowane w błonę plazmatyczną [14]. Mechanizm dzięki któremu podjednostki kanałów mitochondrialnych lokalizują się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej nie został do tej pory opisany. Jedną z głównych przyczyn był brak jednoznacznych danych dotyczących budowy podjednostkowej mitochondrialnych kanałów potasowych. W ostatnim czasie pojawiły się jednak doniesienia dotyczące kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  [15] oraz  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  [16], przybliżające budowę obu kanałów.

Mitochondria dysponują odpowiednimi mechanizmami w postaci kompleksów białkowych umożliwiającymi import białek do odpowiednich przedziałów mitochondrialnych. Dotychczasowe badania pozwoliły na stworzenie kilku modeli tłumaczących sposób w jaki białka mogą być wbudowywane do błony wewnętrznej mitochondriów. Organizacja domen transbłonowych, a w konsekwencji topologia białka może zależeć od ścieżki jego importu do błony. Do dzisiaj jednak drogi importu poszczególnych podjednostek tworzących kanały potasowe nie zostały eksperymentalnie potwierdzone.

Duża grupa białek błony wewnętrznej mitochondrium po przejściu przez translokazę błony zewnętrznej TOM (ang. *translocase of outer membrane*) trafia do translokazy błony wewnętrznej TIM23 (ang. *translocase of inner mem-*



**Rycina 1.** Topologia białka ROMK2 tworzącego kanał typu  $K_{ATP}$ . A) topologia białka w błonie plazmatycznej; B) modele topologii białka w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wariant A zaproponowany na podstawie budowy molekularnej i potencjalnej ścieżki importu podjednostki tworzącej por kanału. Wariant B zaproponowany na podstawie badań aktywności kanału za pomocą technik elektrofizjologicznych.

brane), gdzie następuje umiejscowienie białka w błonie. Konsekwencją przejścia przez tę ścieżkę jest lokalizacja N-końcowej części białka w macierzy mitochondrialnej. Taka ścieżka importu jest charakterystyczna dla białek posiadających mitochondrialną sekwencję sygnałową w N-końcowej części białka [17]. Inna grupa białek błony wewnętrznej, w szczególności należących do grupy transporterów metabolitów posiadających wiele domen transbłonowych może mieć sekwencje kierujące w różnych częściach białka. Kluczową translokazą, która pośredniczy we wbudowywaniu tych białek jest translokaza TIM22. W konsekwencji, białka wbudowujące się do błony wewnętrznej przy udziale tego kompleksu białkowego mogą posiadać N-końcową część po stronie przestrzeni międzybłonowej. Alternatywnym modelem importu białek jest tzw. sortowanie konserwatywne (ang. *conservative sorting*). Białka przechodzące taką ścieżką importu po przejściu przez translokazę TOM kierowane są do translokazy TIM23. W następnym etapie prekursor przechodzący przez macierz mitochondrialną rozpoznawany jest przez kolejną translokazę błony wewnętrznej Oxa1. Dzięki aktywności tego białka możliwe jest wbudowanie prekursora białkowego do błony wewnętrznej od strony macierzy mitochondrialnej. W efekcie N-końcowa część białka lokalizuje się również w części międzybłonowej mitochon-

drium [18]. Biorąc pod uwagę powyższe drogi importu wiedza o podstawowych właściwościach strukturalnych kanałów potasowych jak liczba domen transbłonowych poszczególnych podjednostek, może mieć istotne znaczenie dla określenia potencjalnej ścieżki importu a co za tym idzie prawdopodobnej topologii kanału w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych kanałów mitochondrialnych jest kanał  $mitoK_{ATP}$ . Ostatnie doniesienia wskazują na możliwą budowę podjednostkową tego kanału co może wskazywać na potencjalne ułożenie kanału w błonie mitochondrialnej.

### TOPOLOGIA KANAŁU $mitoK_{ATP}$

Kanał potasowy regulowany przez ATP został opisany w 1991 roku w wewnętrznej błonie mitochondriów wyizolowanych z wątroby szczura [19]. Następnie kanały o podobnych właściwościach zostały zidentyfikowane w mitochondriach izolowanych z różnych tkanek m.in. serca, mięśni szkieletowych oraz mózgu [8]. Kanał  $mitoK_{ATP}$  posiada dobrze udokumentowane właściwości elektrofizjologiczne oraz farmakologiczne [10]. Najnowsze doniesienia wskazują, że jednostka tworząca por kanału  $mitoK_{ATP}$  to białko ROMK2 (Kir 1.1b) kodowane przez jeden z wariantów różnicowego składowania mRNA produktu genu *KCNJ1*. Gen ten koduje podjednostki białkowe tworzące kanał potasowy z błony cytoplazmatycznej komórek nerkowych (ROMK, ang. *renal outer medullary potassium channel*) [15]. Kanał ROMK (Kir 1.1a) z błony plazmatycznej odkryty został w 1993 i posiada znaną strukturę na poziomie atomowym [20]. Cztery podjednostki białka ROMK złożone są wokół centralnie umieszczonego poru kanału. Łączniki znajdujące się pozakomórkowo mocują dwie domeny transbłonowe tworzące pętle P, największą część poru zawierającą zachowaną ewolucyjnie sekwencję filtra selektywności. Wewnątrzkomórkowe jony  $Mg^{2+}$  oraz poliaminy łączą się z kompleksem białkowym w bliskiej odległości do poru. Powoduje to rektyfikację kanału w przypadku depolaryzacji błony. Domeny transbłonowe zawierają elementy bramki kanału reagującego na dysocjację ATP oraz oddziaływanie z  $PIP_2$  (ang. *phosphatidylinositol biphosphate*). Na właściwości kanału ROMK wpływają również domeny kinazowe umieszczone po stronie cytoplazmatycznej [21]. Podjednostka tworząca por kanału ROMK zawiera dwie domeny transbłonowe wymuszając topologię, w której N- oraz C-koniec znajdują się po tej samej stronie błony. W przypadku kanału z błony plazmatycznej białko porowe posiada oba końce po stronie cytoplazmy (Ryc. 1, panel A). W przypadku podjednostek kanału mitochondrialnego brak rozstrzygających danych co do



topologii kanału w błonie. Izoforma ROMK2 w stosunku do podstawowej izoformy białka posiada skrócony N-końiec o długości 19 reszt aminokwasowych [22]. Wydaje się, że skrócenie to powoduje odsłonięcie sekwencji sygnałowej umożliwiającej rozpoznanie podjednostki kanału przez translokazy odpowiedzialne za import białek do mitochondriów. Białko ROMK2 z umieszczoną na C-końcu metką V5 w komórkach H9c2 jest lokalizowane w mitochondriach. Potwierdza to znakowanie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał specyficznych rozpoznających metkę oraz przeciwciał markera mitochondrium. Ponadto białko fuzyjne złożone z przewidywanej sekwencji sygnałowej izoformy ROMK2 oraz zielonego białka fluorescencyjnego podlega kolokalizacji z sondą fluorescencyjną znakującą mitochondria [15]. Obecność sekwencji sygnałowej sugeruje, że izoforma ROMK2 po przejściu przez translokazę TOM prawdopodobnie rozpoznawana jest przez translokazę TIM23, dzięki której białko umiejscawia się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Taka ścieżka importu podjednostki tworzącej por skutkowałaby lokalizacją obu końców podjednostki ROMK2 po stronie macierzy mitochondrialnej (Ryc. 1, panel B, Wariant A). Pełny mechanizm transportu oraz sortowania opisywanego białka nie został jednak opisany. Trzeba wspomnieć również o tym, że izoforma ROMK2 w warunkach fizjologicznych może lokalizować się również w błonie plazmatycznej, np. w komórkach nerkowych [21]. Może to oznaczać istnienie innych, nieznanych czynników umożliwiających kierowanie nowopowstałego białka do mitochondriów i późniejszą lokalizację w mitochondrialnej błonie wewnętrznej.

Topologia kanału mitoK<sub>ATP</sub> została także zaproponowana (Ryc. 1, panel B, Wariant B) na podstawie badań z użyciem elektrofizjologicznej metody BLM (ang. *black lipid membrane*) [23]. Technika ta pozwala na badanie przepływu jonów przez pojedyncze kanały rekonstruowane w sztucznych błonach lipidowych. Pozwala też na obserwację zmian aktywności kanału pod wpływem działania modulatorów (aktywatorów jak i inhibitorów) kanału. W opisywanych eksperymentach badany był oczyszczony preparat frakcji wewnętrznych błon mitochondrialnych serca szczura. Alkalinizacja roztworu (zmiana pH z 7,2 do 8,2) od strony prawdopodobnie odpowiadającej macierzy mitochondrialnej, powodowała wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanału oraz wzrost przewodnictwa kanału. Aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub> nie ulegała zmianie, gdy po stronie prawdopodobnie odpowiadającej przestrzeni międzybłonowej dokonywano podobnych zmian pH medium pomiarowego. Z drugiej strony, zakwaszenie roztworu (z pH 7,2 do 6,2) po obu stronach sztucznej błony lipidowej zmniejszało aktywność kanału (spadek prawdopodobieństwa otwarcia). Jednocześnie, aktywność kanału była hamowana pod wpływem mieszaniny ATP/Mg<sup>2+</sup> podanej do komory odpowiadającej przestrzeni międzybłonowej. Natomiast nie zaobserwowano zmiany aktywności kanału pod wpływem zarówno ATP jak i mieszaniny ATP/Mg<sup>2+</sup> po podaniu substancji do komory odpowiadającej macierzy mitochondrialnej. Powyższe doświadczenia wskazują zatem na topologię z C- oraz N-końcem skierowanym do przestrzeni międzybłonowej. Poprzednie badania kanałów typu K<sub>ATP</sub> z błony plazma-

tycznej wykazały bowiem, że miejsce odpowiedzialne za regulację aktywności kanału przez nukleotydy znajduje się za drugą domeną transbłonową, w C-końcowej części białka tworzącego por.

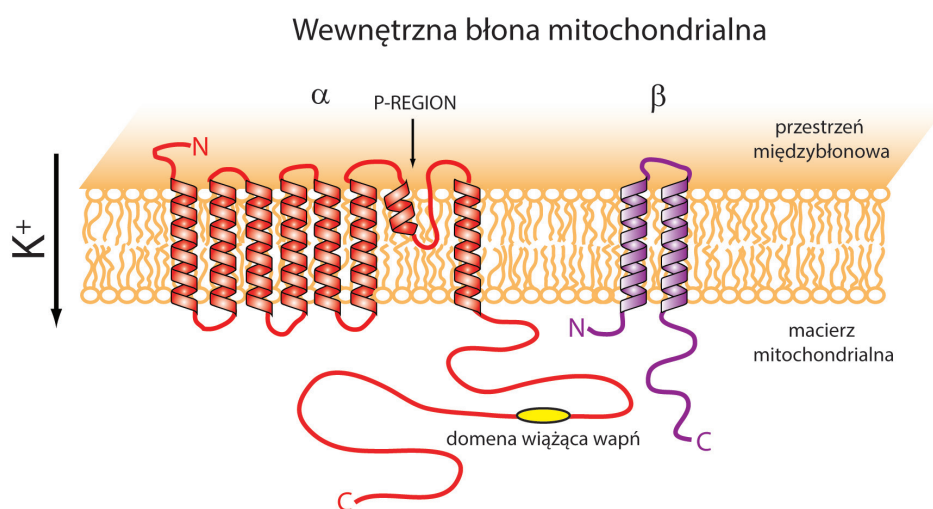
#### TOPOLOGIA KANAŁU mitoBK<sub>Ca</sub>

Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> zidentyfikowano po raz pierwszy w mitochondriach izolowanych z linii komórek glejaka ludzkiego LN229 [24]. Następnie wykazano obecność tego kanału w wewnętrznej błonie mitochondriów mięśnia sercowego, mózgu oraz komórkach śródbłonna [25]. Wiele wskazuje na to, że właściwości tego kanału są podobne do znanych kanałów BK<sub>Ca</sub> błony plazmatycznej. Kanał jest regulowany przez zmianę potencjału błonowego oraz zmiany stężenia jonów Ca<sup>2+</sup>. Aktywność hamowana jest przez charybdotoksynę, iberiotoksynę i paksylinę [10]. Również budowa kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wydaje się być podobna do budowy kanału plazmatycznego. Typowy kanał BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej zbudowany jest z czterech podjednostek  $\alpha$  tworzących transmembranowy por. Na właściwości kanału wpływa obecność podjednostek regulatorowych typu  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) oraz  $\gamma$  mogących wchodzić w skład kompleksu białkowego [26].

Zasadnicza trudność w identyfikacji mitochondrialnej formy kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest spowodowana dużą liczbą występujących izoform podjednostki  $\alpha$ , jak do tej pory zidentyfikowano kilkadziesiąt potencjalnych transkryptów tego genu (KCNMA1) kodującego tę podjednostkę. Uniemożliwiała to dokonanie dokładnej charakterystyki mitochondrialnej izoformy kanału. W ostatnim czasie dokonano jednak przełomowego odkrycia, mianowicie wskazano, że tzw. izoforma BK<sub>Ca</sub>-DEC podjednostki  $\alpha$  lokalizuje się w mitochondriach. Mitochondrialna izoforma BK<sub>Ca</sub>-DEC posiada zmienioną sekwencję C-końca białka, w postaci dodatkowych 50 reszt aminokwasowych [16].

Podjednostka  $\alpha$  zawiera 7 domen transbłonowych (S0-S6). Nieparzysta liczba domen transbłonowych wymusza topologię w której N- oraz C-końiec znajdują się po przeciwnych stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. Podjednostki  $\beta$  są integralnymi białkami błonowymi posiadającymi dwie domeny transmembranowe a ich obecność w mitochondriach wielu tkanek została potwierdzona eksperymentalnie. Z uwagi na obecność dwóch domen transbłonowych prawdopodobne jest, że po przejściu przez kompleks TOM translokazą błony wewnętrznej odpowiedzialną za wbudowanie tego białka do błony może być kompleks TIM23. W takim przypadku N- oraz C-końiec podjednostek  $\beta$  skierowany może być w kierunku macierzy mitochondrialnej [26].

Rozważając topologię kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (Ryc. 2) z punktu widzenia struktury i budowy podjednostkowej, należy wziąć pod uwagę fakt, że kanał ten funkcjonuje jako kompleks podjednostek  $\alpha$  oraz  $\beta$ . Kanał plazmatyczny typu BK<sub>Ca</sub> posiada topologię z N-końcem podjednostki  $\alpha$  eksponowanym do przestrzeni pozakomórkowej. Natomiast oba końce podjednostki  $\beta$  skierowane są do wnętrza komórki [25]. Wydaje się zatem, że jeśli podjednostki  $\beta$  wbudowują się do błony mitochondrialnej w typowy



Rycina 2. Model topologii podjednostek  $\alpha$  (tworzących por) oraz  $\beta$  (regulatorowych) kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

sposób, za pośrednictwem translokazy TIM23 z topologią wskazaną powyżej, to w celu stworzenia funkcjonalnego kompleksu podjednostka  $\alpha$  musiałaby posiadać N-koniec skierowany do przestrzeni międzybłonowej. To oznacza, że C-koniec podjednostki powinien lokować się w macierzy mitochondrialnej. Wydaje się, że taka topologia podjednostki  $\alpha$  byłaby możliwa gdyby udział w imporcie i sortowaniu do wewnętrznej błony mitochondrialnej tej podjednostki brała udział translokaza TIM22 bądź następowo wspomniane wcześniej sortowanie alternatywne. Wydaje się ponadto, że podjednostka  $\alpha$  nie posiada klasycznej, N-końcowej sekwencji kierującej.

Podobny model topologii kanału (Ryc. 2) można stworzyć na podstawie eksperymentów z zastosowaniem techniki patch-clamp wykorzystującej izolowane mitoplasty (pęcherzyk rozfałdowanej wewnętrznej błony mitochondrialnej) [24]. Dodane do naczynka pomiarowego, odpowiadającemu stronie macierzy mitochondrialnej, jony Ca<sup>2+</sup> powodują jego aktywację. Natomiast specyficzny inhibitor kanału, charybdotoksyna wywołuje zamknięcie kanału, po podaniu ze strony odpowiadającej przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Wskazuje to na rozmieszczenie miejsc wiązania tych dwóch ligandów po przeciwnych stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej [27]. W tym modelu miejsce wiązania jonów Ca<sup>2+</sup> w znajduje się po stronie macierzy mitochondrialnej. Co istotne, w przypadku kanałów typu BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej miejsce wiązania charybdotoksyny następuje od strony przestrzeni międzybłonowej. Zatem opisany model wydaje się być kompatybilny z modelem funkcjonowania kanału plazmatycznego. Model ten znajduje potwierdzenie w analogicznym eksperymencie wykonanym z użyciem techniki BLM, z wykorzystaniem iberiotoksyny oraz Ca<sup>2+</sup> charakteryzującym kanał mitoBK<sub>Ca</sub> z komórek *Dictyostelium discoideum* [28]. Jednakże pojawiły się również sugestie wskazujące na odwrotną topologię podjednostki  $\alpha$  tzn. z C-końcem białka skierowanym w stronę przestrzeni międzybłonowej [29]. Pomiar aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> techniką patch-clamp z zastoso-

waniem mitoplastów z linii komórkowej U-87 MG, wykazał że wiązanie iberiotoksyny będącej inhibitorem kanału może następować po dodaniu od strony odpowiadającej macierzy mitochondrialnej.

## ZWIĄZEK TOPOLOGII MITOCHONDRIALNYCH KANAŁÓW POTASOWYCH Z ICH ROLĄ W CYTOPROTEKCJI

Określenie topologii obu opisanych kanałów może być kluczowe dla zrozumienia funkcji jaką pełnią one w mitochondriach. Wykazano bowiem, że aktywacja zarówno kanału mitoK<sub>ATP</sub>, jak i mitoBK<sub>Ca</sub> przez substancje farmakologiczne, może chronić komórki mięśnia sercowego przed uszkodzeniem wynikającym z niedotlenienia/reperfuji

w podobnym stopniu, jak proces hartowania serca przez niedokrwienie [30]. Zastosowanie aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, NS1619, powoduje wzrost przeżywalności kardiomiocytów poddanych niedotlenieniu/reperfuji. Ochronny efekt aktywatora blokowany jest przez inhibitor kanału, paksylinę [31]. O zaangażowaniu kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w odpowiedzi na hipoksję świadczą również badania pokazujące, że w warunkach niedotlenienia kanał ten zwiększa swoją aktywność [32]. Również aktywacja mitoK<sub>ATP</sub> poprzez podanie specyficznego aktywatora kanału, diazoksydu, chroni neurony oraz komórki mięśnia sercowego przed skutkami niedotlenienia. Udział kanału mitoK<sub>ATP</sub> w tym mechanizmie potwierdza blokowanie tego efektu przez inhibitory kanału, glibenklamid oraz 5-HD (ang. *5-hydroxydecanoate*) [8].

W sytuacji niedotlenienia następuje zahamowanie aktywności oksydazy cytochromu c. Jest to czwarty kompleks łańcucha oddechowego odpowiedzialny za redukcję tlenu cząsteczkowego do wody. Brak aktywności tego enzymu powoduje zahamowanie działania całego łańcucha oddechowego czego konsekwencją jest spadek potencjału w poprzek mitochondrialnej błony wewnętrznej. W takich warunkach następuje zahamowanie syntezy ATP przez mitochondrialną syntazę ATP. Enzym ten może również hydrolizować ATP w celu generowania mitochondrialnego potencjału błonowego zużywając dostępny ATP. W konsekwencji następuje szybki spadek dostępnego ATP w komórce czego następstwem jest deregulacja gospodarki jonowej komórki i szybki wzrost stężenia jonów wapnia w cytosolu. W momencie reperfuji następuje przywrócenie pracy łańcucha oddechowego i odbudowanie mitochondrialnego potencjału błonowego. W tym momencie utrzymujące się nadmierne stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie może zadziałać jako czynnik indukujący uszkodzenie [1]. Mitochondria posiadające odbudowany potencjał w poprzek wewnętrznej błony mogą bowiem buforować pewną ilość jonów Ca<sup>2+</sup> wciąż obecnych w cytosolu. Napływ jonów wapniowych do wnętrza mitochondriów jest bardzo efektywny, co wynika z dużej różnicy potencjału [13]. Jednak pojemność mito-



chondriów dla jonów wapnia nie jest nieograniczona. Nadmierne stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w macierzy mitochondrialnej aktywuje otwarcie kanału mPTP (ang. *permeability transition pore*). Wywołuje to szereg konsekwencji m.in. uwolnienie do cytoplazmy cytochromu *c*, czynnika indukującego apoptozę typu AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), inhibitora białek antyapoptycznych Smac/DIABLO oraz endonukleazy G. Utracie integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej towarzyszą między innymi, zaburzenia homeostazy jonów wapniowych oraz depolaryzacja błony. Konsekwencją takiego uszkodzenia mitochondriów jest śmierć komórki [33,34].

Wiele wskazuje na to, że wzmożony napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej wskutek aktywacji kanałów potasowych depolaryzuje błonę mitochondrialną hamując niekontrolowany napływ jonów wapnia z cytoplazmy [35]. Umieszczenie domeny kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wiążącej jony wapnia pojawiające się w macierzy mitochondrialnej może działać jako czujnik zabezpieczający mitochondria przed przeładowaniem wapniem. Napływające jony wapnia aktywując kanał indukują niewielką depolaryzację powodując obniżenie napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . W przypadku kanału mitoK<sub>ATP</sub> w sytuacji spadku stężenia ATP kanał może pozostać w stanie umożliwiającym przepływ jonów potasu. W sytuacji przywrócenia pracy łańcucha oddechowego wskutek reperfuzji i szybkiego odbudowania potencjału kanał ten może umożliwić napływ jonów  $\text{K}^+$  i obniżyć napływ jonów wapnia do macierzy. Oczywiście w opisaney sytuacji należy wziąć pod uwagę szereg innych czynników i zdarzeń mających miejsce w opisywanej sytuacji. Między innymi w czasie reperfuzji może nastąpić gwałtowny wzrost syntezy reaktywnych form tlenu, zwłaszcza dzięki tzw. mechanizmowi odwróconego przepływu elektronów. Wzrost aktywności kanałów potasowych może obniżyć ten efekt, gdyż synteza RFT w takiej sytuacji zależna jest bezpośrednio od potencjału mitochondrialnego [36,37]. W konsekwencji może to ograniczyć niekorzystne działanie RFT w mitochondriach.

## PODSUMOWANIE

Niniejsza praca zaprezentowała aktualny stan wiedzy dotyczący topologii najlepiej poznanych kanałów potasowych z wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wiedza w tym zakresie jest mocno ograniczona, jednak dostępne informacje dotyczące budowy oraz funkcji obu kanałów pozwalają na sformułowanie hipotez mających pewne podstawy. W świetle opublikowanych w ostatnim czasie badań należy spodziewać się, że w nieodległej przyszłości topologia niektórych mitochondrialnych kanałów potasowych zostanie określona. Być może pozwoli to na lepsze zrozumienie mechanizmów stojących za zjawiskiem cytoprotekcji indukowanym przez mitochondrialne kanały potasowe oraz roli jaką pełnią w fizjologii nowotworów. Prawdopodobne jest, że uzyskana wiedza pozwoli na rozwój strategii terapeutycznych, w których centralnym punktem mogą być mitochondrialne kanały potasowe.

## PIŚMIENNICTWO

1. Borutaite V, Toleikis A, Brown GC (2013) In the eye of the storm: Mitochondrial damage during heart and brain ischaemia. *FEBS J* 280: 4999-5014

2. Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V (2015) Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Res Rev* 35: 520-553
3. O'Rourke B, Cortassa S, Aon M (2005) Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology* 20: 303-315
4. Leanza L, Biasutto L, Managò A, Gulbins E, Zoratti M, Szabo I (2013) Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol* doi:10.3389/fphys.2013.00227
5. Peixoto PM, Dejean LM, Kinnally KW (2012) The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration. *Mitochondrion* 12: 14-23
6. Leanza L, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I (2014) Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene* 33: 5569-5581
7. Laskowski M, Augustynek B, Kulawiak B, Koprowski P, Bednarczyk P, Jarmuszkiwicz W, Szewczyk A (2016) What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbabbio.2016.03.007
8. Szabo I, Zoratti M (2014) Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 94: 519-608
9. 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
10. Olszewska A, Szewczyk A (2013) Mitochondria as a pharmacological target: Magnum overview. *IUBMB Life* 65: 273-281
11. Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32: 677-695
12. Williams GS, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ (2013) Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 10479-10486
13. Nicholls D, Ferguson S (2013) *Bioenergetics* (4ed). Elsevier
14. Stroud RM, Walter P (1999) Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* 9: 754-759
15. 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 mitoKATP. *Circ Res* 111: 446-454
16. Singh H, Lu R, Bopassa JC, Meredith AL, Stefani E, Toro L (2013) MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 10836-10841
17. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644
18. Kulawiak B, Heopker J, Gebert M, Guiard B, Wiedemann N, Gebert N (2013) The mitochondrial import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* 1827: 612-626
19. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel in the mitochondrial inner membrane *Nature* 6332: 244-247
20. Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-1926
21. Welling PA, Ho K (2009) A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: 849-863
22. Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block H, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 268: 1132-1140
23. Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A (2008) New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. *J Bionerg Biomembr* 40: 325-335
24. Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochim Biophys Res Commun* 257: 549-554

25. Balderas E, Zhang J, Stefani E, Toro L (2015) Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol* doi:10.3389/fphys.2015.00104
26. Lee US, Cui J (2010) BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 33: 415-423
27. Sakai Y, Harvey M, Sokolowski B (2011) Identification and quantification of full-length BK channel variants in the developing mouse cochlea. *J Neurosci Res* 89: 1747-1760
28. Laskowski M, Kicinska A, Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W (2015) Mitochondrial large-conductance potassium channel from *Dictyostelium discoideum*. *Int J Biochem Cell Biol* 60: 167-175
29. Bednarczyk P, Wieckowski MR, Broszkiewicz M, Skowronek K, Siemen D, Szewczyk A (2013) Putative structural and functional coupling of the mitochondrial BK channel to the respiratory chain. *PLOS ONE* 68: 1-15
30. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Garland KD (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 284-295
31. 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
32. Gu XQ, Pamerter ME, Siemen D, Sun X, Haddad GG (2014) Mitochondrial but not plasmalemmal BK channels are hypoxia-sensitive in human glioma. *Glia* 62: 504-513
33. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 11: 5752-5757
34. Cheng Y, Debska-Vielhaber G, Siemen D (2010) Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore. *FEBS Lett* 584: 2005-2012
35. Watanabe M, Katsura KI, Ohsawa I, Mizukoshi G, Takahashi K, Asoh S, Ohta S, Katayama Y (2008) Involvement of mitoKATP channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance. *Brain Res* 1238: 199-207
36. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A i inni (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515: 431-435
37. Kulawiak B, Kudin AP, Szewczyk A, Kunz W (2008) BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp Neurol* 212: 543-547

## Topology of the mitochondrial potassium ion channels

Michał Laskowski, Bogusz Kulawiak✉

Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: b.kulawiak@nencki.gov.pl

**Key words:** mitochondrial potassium channels, cytoprotection, potassium channels topology

### ABSTRACT

In the inner mitochondrial membrane several potassium channels have been identified whose activation lead to cytoprotection during ischemic event. It was found that activation of mitochondrial large conductance calcium activated potassium channel (mitoBK<sub>Ca</sub>) and ATP regulated potassium channel (mitoK<sub>ATP</sub>) preserves brain and heart muscle cells against ischemia/reperfusion induced damage. However the detailed cytoprotection mechanism remains unclear. Similarly, the molecular structures and protein interactions of the mitochondrial potassium channels are still unknown. In this article, we summarize the current knowledge of the mitoK<sub>ATP</sub> and mitoBK<sub>Ca</sub> channels topology. Different aspects of this topic are discussed like import and assembly of the channel subunits and biophysical properties of mitochondrial compartments. Additionally, the consequences of different topology models on the cytoprotective function of the mitochondrial potassium channels were analyzed.