

**ZAŁĄCZNIK nr 2**

# Autoreferat

**Dr Piotr Bednarczyk**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Katedra Fizyki, Zakład Biofizyki  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa

Warszawa, 2013

## 1. Imię i nazwisko

Piotr Bednarczyk

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2004 – doktorat: Właściwości elektrofizjologiczne i farmakologiczne mitochondrialnego kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  z mięśnia sercowego. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Promotor prof. dr hab. Krzysztof Dołowy  
*doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej*

1999 – magisterium: Efekt Starka w wybranych dwufenylopolienach. Wydział Matematyki i Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Promotor prof. dr hab. Stanisław Krawczyk  
*magister fizyki w zakresie biofizyki*

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2005 – teraz – adiunkt, Zakład Biofizyki, Katedra Fizyki  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

2004 – 2005 – asystent, Zakład Biofizyki, Katedra Fizyki  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

2000 – 2004 – doktorant, studia doktoranckie  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

1999 – 2000 – asystent, Zakład Biofizyki, Katedra Fizyki  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## 4. Wskazanie osiągnięcia<sup>1</sup> wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

### a) spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Tytuł osiągnięcia:

### Identyfikacja mitochondrialnych kanałów potasowych.

---

<sup>1</sup> w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie – Załącznik nr 5.

Prace przeglądowe<sup>2</sup>:

1. **Bednarczyk P<sup>#</sup>**. (2012) Charter 18. Potassium and Mitochondria. Y.V. Li and J.H. Hang (eds.), *Metal Ion in Stroke*, SPRINGER SERIES IN TRANSLATION STROKE RESEARCH, DOI 10.1007/978-1-4419-9663-3\_18 (ISBN 978-1-4419-9662-6), 373-389.
2. **Bednarczyk P<sup>#</sup>**. (2009) Potassium channels in brain mitochondria. *Acta Biochim Pol.* **56**: 385-392.
3. Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dołowy K, Szewczyk A, **Bednarczyk P<sup>#</sup>**. (2006) Rekonstrukcja mitochondrialnych kanałów jonowych do sztucznych błon lipidowych. NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII, T XV, (ISBN 83-232-1729-7), 100-116.

Prace doświadczalne:

4. **Bednarczyk P**, Wieckowski MR, Broszkiewicz M, Skowronek K, Siemen D, Szewczyk A. (2013a) Putative structural and functional coupling of the mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channel to the respiratory chain. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0068125
5. **Bednarczyk P**, Koziol A, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. (2013b) Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. **304**: H1415-H1427. DOI: 10.1152/ajpheart.00976.2012
6. **Bednarczyk P\*<sup>#</sup>**, Kowalczyk JE\*, Beręsewicz M, Dołowy K, Szewczyk A, Zabłocka B. (2010) Identification of a voltage-gated potassium channel in gerbil hippocampal mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. **397**: 614-620.
7. **Bednarczyk P**, Dołowy K, Szewczyk A. (2008a) New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. *J Bioenerg Biomembr*. **40**: 325-335.
8. Choma K\*, **Bednarczyk P\***, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz WS, Dołowy K, Szewczyk A. (2009) Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. **41**: 323-334.
9. Skalska J\*, **Bednarczyk P\***, Piwońska M, Kulawiak B, Wilczynski G, Dołowy K, Kunz WS, Kudin AP, Szewczyk A. (2009) Calcium ions regulate K<sup>+</sup> uptake into brain mitochondria: The evidence for a novel potassium channel. *International Journal of Molecular Sciences*. **10**: 1104-1120.
10. Kulawiak B, **Bednarczyk P<sup>#</sup>**. (2005) Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp*. **65**: 271-276.

<sup>2</sup> Załącznik nr 3 – szczegółowy opis udziału habilitanta, Załącznik nr 4 – punktacja MNiSW, IF oraz cytowania poszczególnych prac.

<sup>#</sup> autor korespondujący. Zaznaczono tylko w przypadku, gdy habilitant był autorem korespondującym.

\* autorzy jednorzędni.

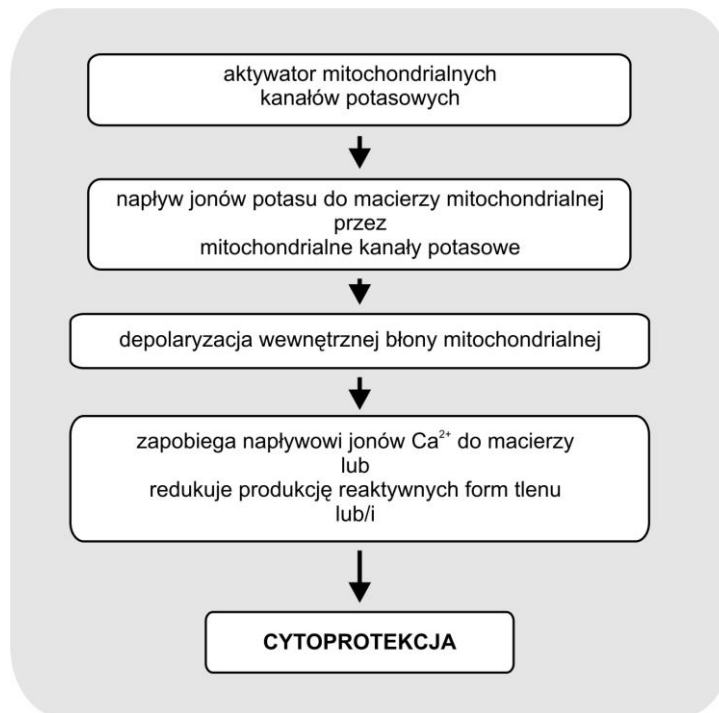
**b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania<sup>3</sup>**

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 umierają po pewnym czasie. 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 (braku tlenu) i reperfuzji (przywrócenia dostarczania tlenu) to mięsień sercowy nie ulega uszkodzeniu (Murry i wsp. 1986). Zjawisko to nazwano hartowaniem przez niedokrwienie. Komórki hartowane niedokrwieniem mają wyższe stężenie ATP niż te niehartowane. Hartowanie można również osiągnąć stosując substancje otwierające kanały potasowe, a substancje blokujące te kanały znoszą ochronny wpływ otwieraczy (Grover i wsp., 1989; Grover i wsp., 1990). Później odkryto kanały jonowe w wewnętrznej błonie mitochondriów, które, jak się sądzi, są otwierane i zamykane przez podobne aktywatory i blokery jak kanały jonowe błony plazmatycznej. Od tego czasu zaczęto podejrzewać, że to mitochondria odgrywają główną rolę w hartowaniu niedokrwieniem – zużywają tlen, produkują ATP, mają kanały jonowe.

Opublikowane badania wskazują, że kanały potasowe obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej pełnią istotną rolę w indukowaniu procesów zmniejszających uszkodzenie tkanek/komórek spowodowanych niedotlenieniem lub działaniem stresu oksydacyjnego (Facundo i wsp., 2006). Uważa się, że kluczową rolę w cytoprotekcji, odgrywa wzrost aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych (Rys. 1).

---

<sup>3</sup> w tej części zaznaczono: **pogrubieniem - prace wchodzące w skład osiągnięcia**, *kursywą - prace w których byłem współautorem będące dorobkiem habilitanta.*

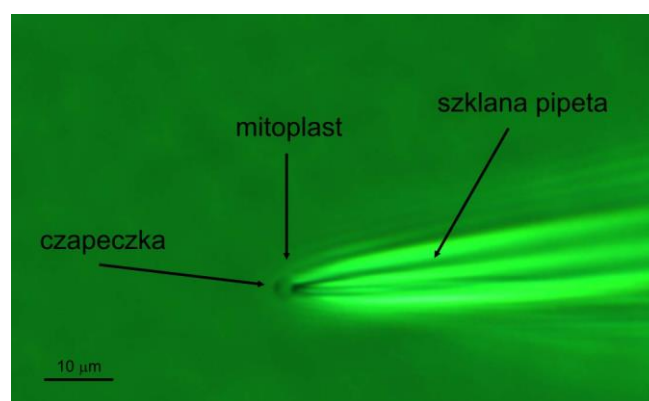


**Rys. 1.** Schemat możliwego mechanizmu protekcji z udziałem mitochondrialnych kanałów potasowych. Na podstawie schematów zawartych w pracach **Bednarczyk, 2009, Bednarczyk, 2012.**

Na przykład, mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) bierze udział w kardioprotekcji (Sato i wsp., 2000). Również istnieją dane wskazujące, że aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie, regulowanego przez wapń (mitoBK<sub>Ca</sub>) chroni komórki mózgu przed udarem (Douglas i wsp., 2006). Te informacje dają szansę na opracowanie strategii cytoprotekcji. Jednak właściwości kanałów potasowych obecnych w mitochondriach jak i możliwości ich oddziaływania są nadal słabo poznane. Poza tym substancje farmakologiczne, uważane za modulatory aktywności kanałów potasowych, mogą wpływać na inne systemy enzymatyczne w mitochondriach. Identyfikacja oraz określenie szczegółowych właściwości biofizycznych, farmakologicznych oraz możliwości ich regulacji może pozwolić zrozumieć rolę, jaką pełnią w komórce i wykorzystać te informacje w terapiach zmniejszających uszkodzenia.

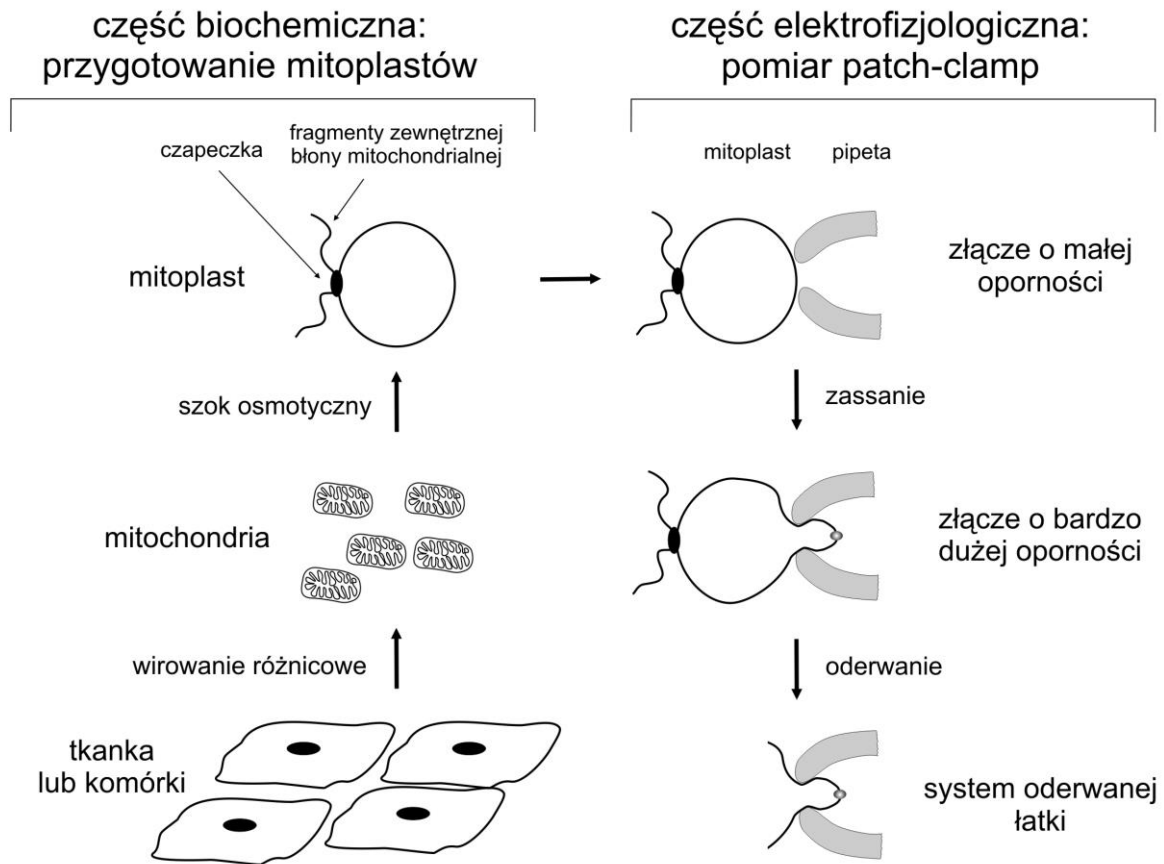
Celem moich badań stały się kanały potasowe z wewnętrznej błony mitochondrialnej. Staralem się znaleźć odpowiedź na pytanie, czy mitochondrialne kanały potasowe obecne są w mitochondriach z różnych gatunków i tkanek, jakie mają własności elektrochemiczne, oraz czy są czułe na te same aktywatory i blokery kanałów obecnych w błonie plazmatycznej komórki. Istotnym elementem było również wskazanie na możliwą regulację mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie (mitoBK<sub>Ca</sub>) przez IV kompleks łańcucha oddechowego.

Do badań aktywności mitochondrialnych kanałów jonowych wykorzystywałem głównie techniki elektrofizjologiczne (technikę patch-clamp oraz rekonstytucję cząstek submitochondrialnych do czarnych błon lipidowych – z *ang.* *black lipid membranes*, BLM). Obszerny opis techniki BLM znajduje się w rozdziale monografii (**Koszela-Piotrowska i wsp., Bednarczyk, 2006**). W skrócie, technika patch-clamp polegała na „chwyceniu” wcześniej wyizolowanego, pływającego mitoplastu (pęcherzyk rozfałdowanej wewnętrznej błony mitochondrialnej). Po otrzymaniu połączenia (gigaseal) mierzyłem prąd jonowy płynący przez złącze gigaomowe (Zdjęcie 1).



**Zdjęcie 1.** Na zdjęciu przedstawiono szklaną pipetę z mitoplastem. Zaczernienie na błonie mitoplastu nazwane zostało „czapeczką” – prawdopodobnie jest to miejsce gdzie pozostałości błony zewnętrznej kontaktują się z błoną wewnętrzną mitochondriów. Utrwalony obraz powstał z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (kontrast fazy, powiększenie 60x). Fot. Piotr Bednarczyk.

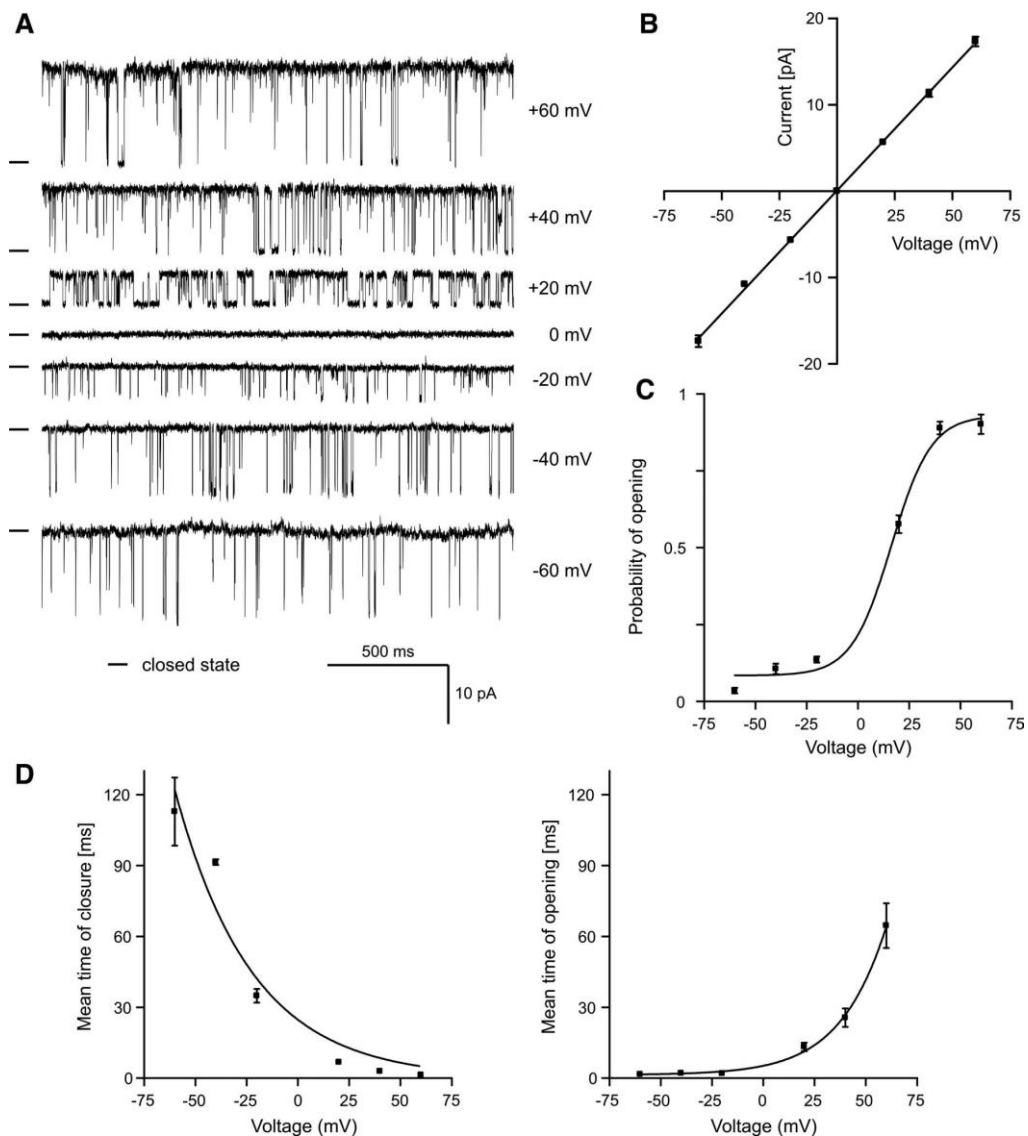
Na rysunku 2 przedstawiłem kolejne kroki otrzymywania rejestracji zmian przepływającego prądu jonowego przez kanały mitochondrialne.



**Rys. 2.** Procedura otrzymywania rejestracji zmian przepływającego prądu jonowego przez kanały mitochondrialne z wykorzystaniem techniki patch-clamp. Schemat na potrzeby autoreferatu został przygotowany przez Piotr Bednarczyka.

W przypadku badań mitochondrialnych kanałów potasowych ustalałem selektywności na podstawie pomiarów w gradiencie stężeń. Właściwości farmakologiczne, w większości przypadków, określałem w warunkach stężeń symetrycznych. Na rysunku 3A przedstawiłem przykładowe zapisy aktywności mitochondrialnego kanału o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>). Rysunek 3B przedstawia zależność prądowo-napięciową otrzymaną w stężeniach symetrycznych (150 mM KCl). Przykładową analizę prawdopodobieństw otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przedstawiłem na rysunku 3C. Na podstawie

pomiarów zmian przepływającego prądu jonowego przez kanał mitoBK<sub>Ca</sub> można również oszacować średnie czasy zamknięć i otwarć (Rys. 3D).

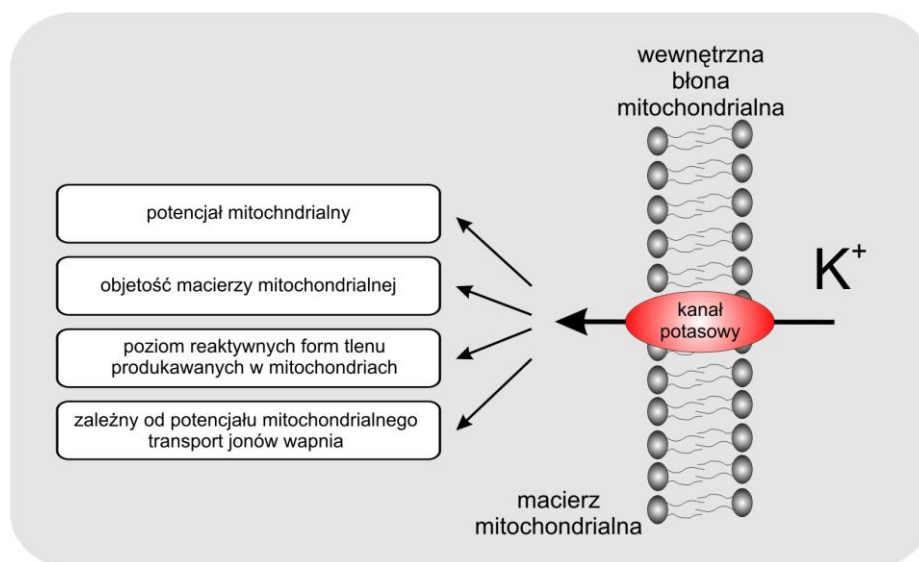


**Rys. 3.** (A) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w czasie przy potencjałach od +60 mV do -60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl. (B) Analiza prawdopodobieństw otwarć (D) średnie czasy zamknięć i otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych. – oznacza stan zamknięty. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz. Z pracy **Bednarczyk i wsp., 2013b**.

W przedstawionych pracach wchodzących w skład osiągnięcia zastosowałem również techniki biochemiczno/biofizyczne takie jak pomiar oddychania, rozpraszanie światła jak również narzędzia biologii molekularnej (Western blot, PCR, transfekcja, barwienia immunohistochemiczne).

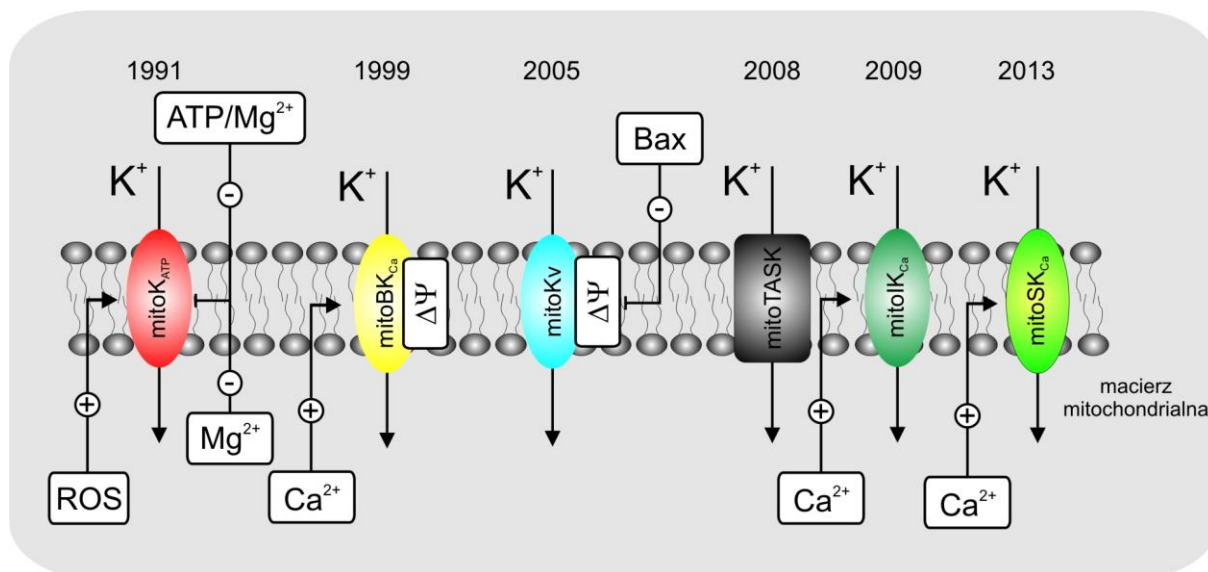


Mitochondria to organelle zaopatrujące komórkę w energię potrzebną do prowadzenia podstawowych procesów życiowych. Otoczone są podwójną błoną lipidową. Błona zewnętrzna mitochondriów jest przepuszczalna dla większości substancji, natomiast transport przez błonę wewnętrzną jest ściśle regulowany. Ważną rolę w regulacji prawidłowego funkcjonowania mitochondriów pełnią kanały jonowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie. Obszerne opracowania dotyczące transportu/przepływu jonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną znajduje się w *FEBS Letters Special Issue* (Volume 584, Issue 10, 2010). Na przykład, kanały potasowe regulują potencjał mitochondrialny, odpowiedzialne są za zmiany objętości macierzy mitochondrialnej, wpływają na poziom reaktywnych form tlenu oraz zależny od potencjału mitochondrialnego transport jonów wapnia (Rys. 4) (Bernardi, 1999).



**Rys. 4.** Schemat przedstawia skutki napływu jonów potasowych do wnętrza macierzy mitochondrialnej. Na podstawie schematu zawartego w pracy **Bednarczyk, 2012**.

Do tej pory, poznano strukturę i funkcję wielu kanałów jonowych obecnych w błonie plazmatycznej. Podobne do nich zlokalizowano również w wewnętrznej błonie mitochondriów (Rys. 5) (Szabò i wsp., 2012; **Bednarczyk, 2012**; *Szewczyk i wsp., 2010*; **Bednarczyk, 2009**). Jednak dane dotyczące wewnątrzkomórkowych kanałów jonowych są niepełne oraz czasami sprzeczne.



**Rys. 5.** Schemat przedstawia zidentyfikowane kanały potasowe w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Skrótów oznaczają odpowiednio: mitoK<sub>ATP</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, mitoBK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia, mitoK<sub>v</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany napięciem, mitoIK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy o średnim przewodnictwie regulowany jonami wapnia, mitoTASK – dwu porowy mitochondrialny kanał potasowy, mitoSK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy o małym przewodnictwie regulowany jonami wapnia. Dodatkowo zaznaczono ważniejsze endogenne modulatory kanałów oraz lata, w których kanały zostały zidentyfikowane po raz pierwszy. Na podstawie rysunku z pracy **Bednarczyk, 2012**.

### Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany przez wapń (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>)

Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> opisano po raz pierwszy w mitochondriach z linii komórek glejaka, LN229 (Siemen i wsp., 1999). Następnie zidentyfikowano obecność tego kanału w mitochondriach mięśnia sercowego (Xu i wsp. 2002) oraz mięśniach szkieletowych (Skalska i wsp., 2008). Opublikowane dane wskazują, że właściwości elektrofizjologiczne oraz farmakologiczne tego białka są podobne do znanego kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej. Prawdopodobieństwo otwarcia kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wzrasta wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia oraz spadkiem mitochondrialnego potencjału błonowego. Aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, podobnie jak w przypadku kanałów BK<sub>Ca</sub> występujących w błonie plazmatycznej, hamowana jest przez charybdotoksynę (ChTx), iberiotoksynę (IbTx) oraz paksylinę (Pax).

Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jako sensor jonów wapniowych może wpływać na regulację pracy łańcucha oddechowego. Napływ jonów wapnia do wnętrza macierzy mitochondriów może

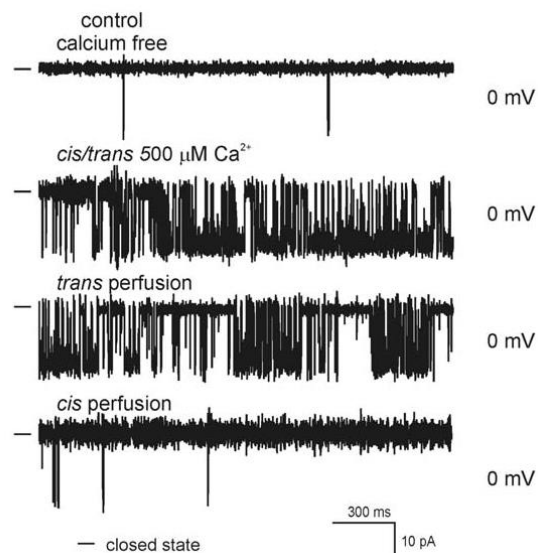
powodować aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, co prowadzi do napływu jonów potasu. Napływ jonów potasu powoduje obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego przyspieszając pracę łańcucha oddechowego, tym samym zwiększając wydajność procesu fosforylacji oksydacyjnej. Poza jonami wapnia, aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> może być regulowana przez kinazę białkową A (PKA). Aktywacja PKA przez analog cyklicznego AMP wykazała wzmożony efekt NS1619 na utlenianie flawoprotein mitochondrialnych (Sato i wsp., 2005). Podobny efekt był obserwowany dla  $\beta$ -estradolu, którego działanie było hamowane przez paksyllinę - inhibitor kanału BK<sub>Ca</sub> (Ohaya i wsp., 2005).

W roku 2005 opublikowałem pracę, która po raz pierwszy, wskazywała na obecność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach mózgu szczura (**Kulawiak i Bednarczyk, 2005**). Aktywności pojedynczych kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> mierzyłem po wbudowaniu submitochondrialnych cząstek izolowanych z mózgu szczura do czarnych błon lipidowych (BLM). Przeprowadzone doświadczenia wykazały obecność dwóch kanałów selektywnych dla potasu o przewodnictwie od 260 do 320 pS i od 70 do 90 pS w gradiencie stężeń 50/450 i 50/150 mM KCl, odpowiednio. Obserwowałem również aktywność kanału chlorkowego. Zmierzone przewodnictwo tego kanału wynosiło od 80 do 90 pS w gradiencie stężeń 50/450 mM KCl. Praca ta dotyczy wstępnych badań, które następnie rozwijałem w określonych modelach na początku tkankowych, później komórkowych.

Podczas pobytu w Magdeburgu (staż podoktorski) brałem udział w badaniach, które wskazują, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jest wrażliwy na poziom tlenu zawartego w roztworach doświadczalnych. Za pomocą techniki patch-clamp, wykazaliśmy, że niedotlenienie zwiększa aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, co w kontekście protekcji daje nowy dowód udziału tego kanału w tym zjawisku (*Cheng i wsp., 2008*).

Mitochondrialna odpowiedź na zmiany stężenia wapnia w cytozolu ma silny wpływ na metabolizm komórek nerwowych i ich przeżywalność. W kolejnej pracy (**Skalska,**

**Bednarczyk i wsp., 2009**) zaobserwowaliśmy, że wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  indukuje napływ jonów potasu do mitochondriów (na podstawie pomiaru potencjału mitochondrialnego oraz oddychania). Efekt  $\text{Ca}^{2+}$  był blokowany przez iberiotoksynę i charybdotoksynę, znane blokery kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez wapń (kanał  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ). Ponadto NS1619 – aktywator kanału  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  – wywoływał specyficzny napływ potasu do mitochondriów podobnie do tych wywołanych  $\text{Ca}^{2+}$ . Wyniki te potwierdzają obecność mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez wapń. Doświadczenia elektrofizjologiczne, które wykonałem z wykorzystaniem techniki czarnych błon lipidowych (BLM) potwierdziły obecność tego kanału w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mózgu. Przewodnictwo kanału wynosiło 265 pS w warunkach gradientu stężeń (50/450 mM KCl). Potencjał odwrócenia był równy 50 mV, co dowodzi, że kanał jest selektywny dla potasu. Wyniki doświadczenia, w którym zmieniałem stężenie jonów wapnia wskazują jednoznacznie, że kanał jest aktywowany przez jony wapnia od strony macierzy mitochondrialnej (Rys. 6).



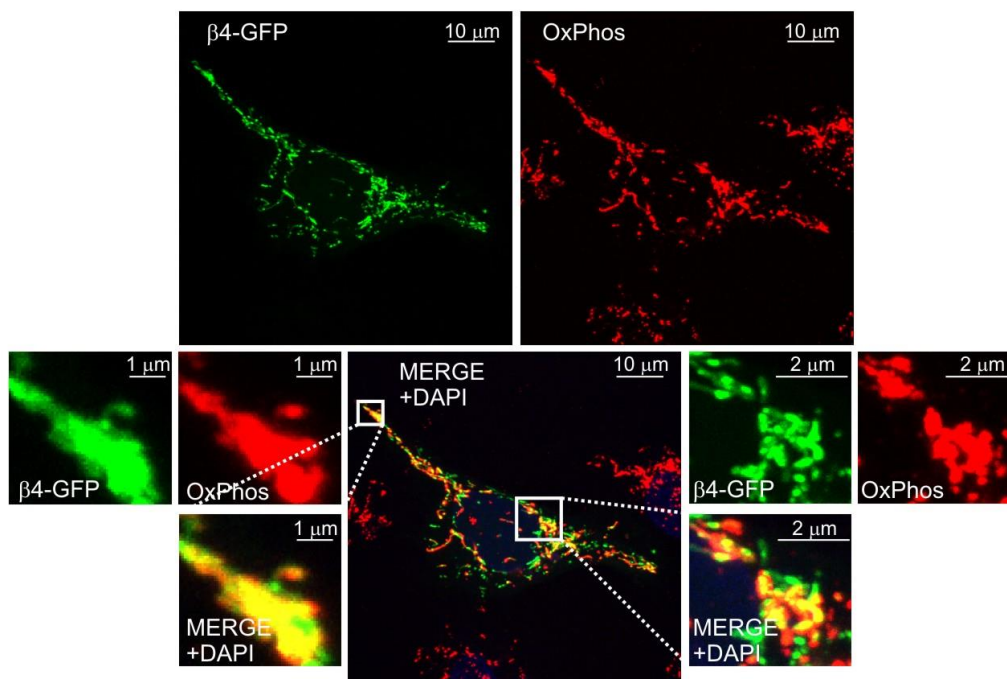
**Rys. 6.** Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał w czasie w układzie różnicy stężeń 50/450 mM KCl (*cis/trans*). Na rysunku kolejno przedstawiono rejestrację w warunkach niskiego stężenia wapnia (poniżej 1 μM), po podaniu 500 μM  $\text{Ca}^{2+}$  (*cis/trans*) a następnie po wymianie roztworu o wysokim wapniu na roztwór kontrolny, najpierw strona *trans* potem *cis* układu doświadczalnego. – oznacza stan zamknięty. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz. Na rysunku przedstawiono wynik z pracy **Skalska, Bednarczyk i wsp., 2009**.

Podobne właściwości obserwowano dla kanału typu  $BK_{Ca}$  obecnego w błonie plazmatycznej – obserwowano zmiany aktywności kanału tylko z jednej strony (cytozolowej). Zidentyfikowany kanał był aktywowany przez NS1619 – aktywator kanałów typu  $BK_{Ca}$ . Całkowite blokowanie aktywności kanału obserwowaliśmy po podaniu chrybdotoksyny – blokera kanałów  $BK_{Ca}$ . Wykazaliśmy również, z wykorzystaniem metody Western blot obecność podjednostki regulatorowej  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$  w mitochondriach mózgu. Analiza immunohistochemiczna potwierdziła występowanie podjednostki  $\beta 4$  w mitochondriach neuronalnych. Praca ta była pierwszą, której wyniki otrzymane z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej oraz technik biologii molekularnej potwierdzały obecność kanału  $mitoBK_{Ca}$  w mitochondriach mózgu.

Wyniki opublikowane w roku 2013 świadczą o odkryciu kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia ( $BK_{Ca}$ ) w mitochondriach ludzkich komórek śródbłonna EA.hy926 (**Bednarczyk i wsp., 2013b**). W tej pracy aktywność kanału  $mitoBK_{Ca}$  mierzyłem przez pomiaru prądu jonowego płynącego przez błonę mitoplastu (tj. wewnętrzną błonę mitochondrialną), techniką patch-clamp. Prądy selektywne dla potasu o dużym przewodnictwie (270 pS) rejestrowane były w symetrycznym izotonicznym roztworze (150 mM KCl). Aktywność kanałów, która była określona na podstawie prawdopodobieństw otwarć kanału, wzrastała z dodatkiem jonów wapnia oraz NS1619, aktywatora kanałów  $BK_{Ca}$ . Blokery takie jak paxillina oraz iberiotoksyna hamowały nieodwracalnie aktywność kanału  $mitoBK_{Ca}$ . W przypadku kanału  $BK_{Ca}$  z błony plazmatycznej obserwowano odwracalność efektu hamowania przez paksyllinę (Sanchez i McManus, 1996). Ta różnica wskazuje na inne powinowactwo tego związku do kanału  $mitoBK_{Ca}$  i w konsekwencji jest dowodem na występowanie innego wariantu kanału  $BK_{Ca}$  w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wykazaliśmy również, że substancje NS1619, NS11021 oraz jony wapnia obniżały potencjał błonowy oraz wpływały na zmianę szybkości oddychania mitochondriów izolowanych

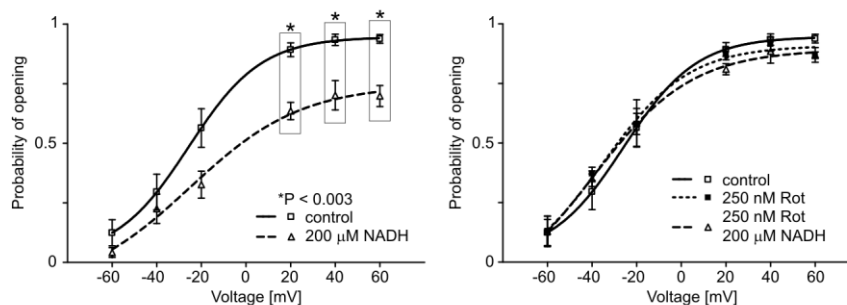
z komórek śródbłonka EA.hy926. Efekty te były blokowane przez iberiotoksynę oraz paxillinę. Analiza Western blot z wykorzystaniem frakcji mitochondrialnej komórek śródbłonka EA.hy926 wskazuje na obecność podjednostki  $\beta 2$  kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Podsumowując, po raz pierwszy wykazaliśmy, że wewnętrznej błonie mitochondrialnej w ludzkich komórkach śródbłonka EA.hy926 obecny jest kanał potasowy o dużym przewodnictwie zależny od wapnia o właściwościach podobnych do kanału BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej (**Bednarczyk i wsp., 2013b**).

W kolejnej pracy przedstawiłem badania dotyczące regulacji aktywności kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca<sup>2+</sup> (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>) obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek gwiazdziaka U-87 MG (astrocytoma) przez IV podjednostkę łańcucha oddechowego - oksydazę cytochromową (**Bednarczyk i wsp., 2013a**). Aktywność kanału mierzyłem stosując technikę patch-clamp. Obserwowałem aktywność kanału selektywnego dla potasu o średnim przewodnictwie 290 pS w symetrycznym układzie stężeń (150 mM KCl). Wykazałem również, że kanał jest aktywowany przez Ca<sup>2+</sup> oraz aktywator kanałów BK<sub>Ca</sub> - NS1619. Aktywność kanału jest hamowana przez paxillinę i iberiotoksynę, znane blokery kanałów BK<sub>Ca</sub>. Analiza Western blot, mikroskopia elektronowa, doświadczenia immunofluorescencyjne (Rys. 7) oraz PCR wykazują na obecność podjednostki regulatorowej  $\beta 4$  kanału BK<sub>Ca</sub> w wewnętrznej błonie mitochondriów ludzkich komórek gwiazdziaka. Wykazałem również, że substraty łańcucha oddechowego, takie jak, bursztynian, NADH i glutaminian/jabłczan zmniejszają prawdopodobieństwo otwarć kanału w zakresie napięć dodatnich.



**Rys. 7.** Barwienia komórek U-87 MG metodą immunohistochemii. Komórki U-87 MG transfekowane wektorem  $\beta 4$ -GFP (zielony) utrwalono a następnie wybarwiono przeciwciałem OXPHOS (czerwony) – marker elementów łańcucha oddechowego. Nałożenie dwóch sygnałów (żółty wskazuje na lokalizację podjednostki regulatorowej  $\beta 4$  kanału  $BK_{Ca}$  w mitochondriach ludzkich komórek gwiazdki (U-87 MG). Barwnik DAPI został użyty do wybarwienia jąder komórkowych (niebieski). Z pracy **Bednarczyk i wsp., 2013a**.

Efekt ten był znoszony przez rotenon (Rys. 8), antymycynę i cyjanek potasu, inhibitory łańcucha oddechowego. Dodatkowo, możliwą interakcję kanału mito $BK_{Ca}$ , z oksydazą cytochromu c wykazano stosując technikę natywnej elektroforezy. Po raz pierwszy, wyniki wskazują na możliwe strukturalne i funkcjonalne sprzężenie łańcucha oddechowego z mitochondrialnym kanałem mito $BK_{Ca}$  w ludzkich komórkach gwiazdki U-87 MG.



**Rys. 8.** Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału mito $BK_{Ca}$  obecnego w mitochondriach w ludzkich komórkach gwiazdki U-87 MG. Z lewej, przedstawiono prawdopodobieństwa otwarć kanału w warunkach kontrolnych oraz po podaniu NADH. Z prawej, przedstawiono prawdopodobieństwa otwarć kanału w warunkach

kontrolnych po podaniu rotenonu a następnie NADH. Wykorzystano fragment rysunku z pracy **Bednarczyk i wsp., 2013a**.

Dwa lata temu, dwa różne typy kanałów mitoBK<sub>Ca</sub> zidentyfikowano w błonach mitochondriów mózgu (Fahanik-Babaei i wsp., 2011), lecz obserwacje nie zostały potwierdzone przez inne grupy naukowców.

Budowa kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wydaje się być podobna do budowy kanału z błony plazmatycznej. Kanał BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej zbudowany jest z dwóch typów podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ . Każdy kanał BK<sub>Ca</sub> tworzą 4 podjednostki  $\alpha$  formujące transmembranowy por oraz 4 podjednostki  $\beta$  pełniące funkcje regulatorowe. Badania prowadzone w celu ustalenia wariantu transkrypcyjnego mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> podjednostki  $\alpha$  wykazała ekspresję heterologiczną BK-DEC sklonowanego z ślimaka (Kathiresan i wsp., 2009). Jak dotąd, nie ma prac potwierdzających to doniesienie. Stosując technikę Western blot, w mitochondrialnej frakcji mózgu stwierdzono występowanie podjednostki  $\alpha$  (Douglas i wsp., 2006) oraz  $\beta$ 4 (Piwońska i wsp., 2008; **Skalska, Bednarczyk i wsp., 2009**). Dodatkowo, analiza Western blot, mikroskopia elektronowa, doświadczenia immunofluorescencyjne oraz PCR wykazują na obecność podjednostki regulatorowej  $\beta$ 4 kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w wewnętrznej błonie mitochondriów ludzkich komórek gwiazdki (**Bednarczyk i wsp., 2013a**). Natomiast we frakcji mitochondrialnej komórek śródbłonna zlokalizowano podjednostkę regulatorową  $\beta$ 2 kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (**Bednarczyk i wsp., 2013b**).

### **Mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>)**

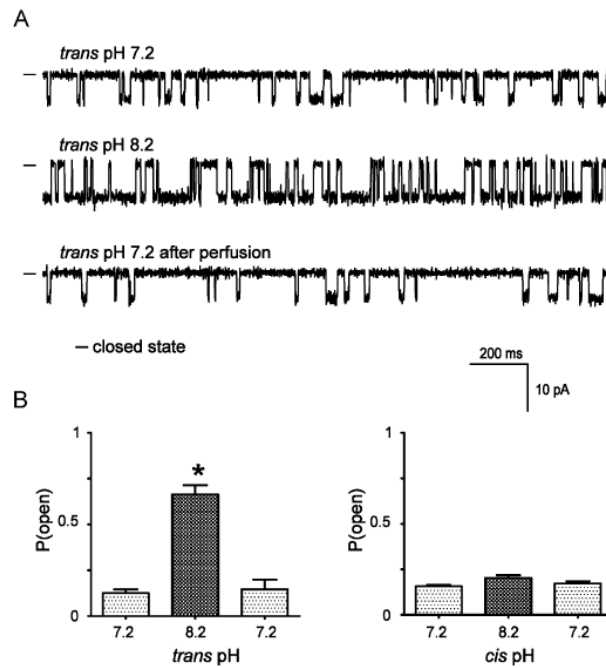
Mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>) po raz pierwszy został opisany w wewnętrznej błonie mitochondriów wątroby szczura (Inoue i wsp., 1991). Następnie białko o podobnych właściwościach opisano w mitochondriach pochodzących z serca (Paucek i wsp., 1992; *Bednarczyk i wsp., 2004*; *Bednarczyk i wsp.,*



2005; **Bednarczyk i wsp., 2008a**), limfocytów T (Dahlem i wsp., 2004), mięśni szkieletowych (Dębska i wsp., 2002) oraz mózgu (**Kulawiak i Bednarczyk, 2005; Choma, Bednarczyk i wsp., 2009**). W ostatnich latach wykazano również obecność kanału mitoK<sub>ATP</sub> w mitochondriach roślin (Matkovic i wsp., 2011) oraz organizmów jednokomórkowych (*Kicińska i wsp., 2007*).

Kanał mitoK<sub>ATP</sub> ma podobne właściwości do kanału K<sub>ATP</sub> z błony plazmatycznej. Oba białka aktywowane są przez substancje farmakologiczne (aktywatory kanałów potasowych) np. diazoksyd, nikorandil. Kanały te hamowane są przez pochodne sulfonomocznika (np. glibenklamid) oraz kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD). Ponadto wpływ na aktywność kanału mają nukleotydy: GTP/GDP aktywuje natomiast kompleks ATP/Mg<sup>2+</sup> hamuje aktywność kanału. Ponadto istnieją prace wskazujące, że kinaza białkowa C bierze udział w regulacji aktywności kanału mitoK<sub>ATP</sub>.

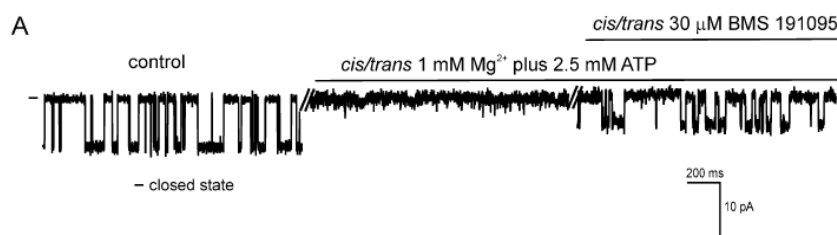
Wykorzystując technikę czarnych błon lipidowych (BLM), przeprowadziłem szczegółowe badania elektrofizjologicznych oraz farmakologicznych właściwości kanału potasowego regulowanego przez ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>). Oczyszczony preparat frakcji wewnętrznych błon mitochondrialnych serca był rekonstruowany do układu czarnych błon lipidowych, mierzyłem prąd jonowy płynący przez pojedyncze białko kanałowe. Przedstawione dane świadczą o możliwości regulacji mitochondrialnego kanału potasowego zależnego od ATP przez fosforylację oraz pH (**Bednarczyk i wsp., 2008a**). Alkaliczacja wnętrza macierzy mitochondrialnej powodowała wzrost prawdopodobieństw otwarć kanału oraz zmianę przewodnictwa kanału mitoK<sub>ATP</sub> z 110 pS do 145 pS, odpowiednio dla pH od 7,2 do 8,2. Zmiana ta była odwracalna (Rys. 9). Aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub> nie ulegała zmianie, gdy po stronie cytozolowej dokonywano zmian pH z 7,2 do 8,2.



**Rys. 9.** Efekt zmiany pH na aktywność kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . A) Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał w czasie w układzie różnicy stężeń 50/150 mM KCl (*cis/trans*) przy napięciu -30 mV. Na rysunku kolejno przedstawiono rejestrację w warunkach pH 7,2 po zmianie na pH 8,2 a następnie po wymianie na roztwór o pH 7,2 (tylko strona *trans* układu doświadczalnego). – oznacza stan zamknięty. Sygnał filtrowano z częstotliwością 500 Hz. B) Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  obecnego w mitochondriach serca. Z lewej, przedstawiono prawdopodobieństwa otwarć kanału po zmianie pH – strona *trans* oraz z prawej – strona *cis*. Na rysunku przedstawiono wynik z pracy **Bednarczyk i wsp., 2008a**.

Ponadto, zakwaszanie (z pH 7,2 do 6,2) po stronie macierzy mitochondrialnej lub przedziału cytozolowego zmniejszało prawdopodobieństwo otwartego kanału. Efekt ten był odwracany. Dodatkowo, przedstawione wyniki w pracy **Bednarczyk i wsp., 2008a** sugerują, że kanał  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  regulowany jest przez fosforylację. Aktywności kanału była hamowana przez kompleks  $\text{ATP/Mg}^{2+}$ , ale nie przez ATP lub  $\text{AMP-PNP/Mg}^{2+}$  (niehydrolizowany analog ATP). Ważnym odkryciem było również, opracowanie sposobu „reaktywacji” kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . Przeprowadzone eksperymenty sugerują, że kanał  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  ulega spontanicznej inaktywacji. Skutecznym sposobem na przywrócenie aktywności kanału to równoczesne dodanie kompleksu  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  do strony macierzy oraz cytozolowej, a następnie kolejne odperfundowanie stron. Wykonana w tej kolejności perfuzja powoduje reaktywację kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . W kontekście przeprowadzonych badań wnioskować można, że ATP oraz pH odgrywają ważną rolę w regulacji kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  w odniesieniu do zjawiska cytoprotekcji.

Aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez ATP zidentyfikowałem również w mitochondriach mózgu szczura (**Choma, Bednarczyk i wsp., 2009**). Oczyszczone cząstki submitochondrialne (pęcherzyki wewnętrznej błony mitochondrialnej) inkorporowałem do dwuwarstwy lipidowej a następnie badałem profil farmakologiczny. Oprócz kanału potasowego o dużym przewodnictwie, który został opisany wcześniej, otrzymaliśmy dane świadczące o obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanału potasowego regulowanego przez ATP. Aktywność tego kanału była hamowana przez kompleks ATP/Mg<sup>2+</sup> i aktywowana przez aktywator kanału mitoK<sub>ATP</sub>, BMS191095 (Rys. 10). Obecnie uważa się, że aktywator ten jest specyficzny tylko dla kanału mitoK<sub>ATP</sub>, a nie dla kanału K<sub>ATP</sub> z błony plazmatycznej.



**Rys. 10.** Efekt kompleksu ATP/Mg<sup>2+</sup> i BMS191095 na aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub>. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał w czasie w układzie różnicy stężeń 50/450 mM KCl w warunkach kontrolnych, po dodaniu 1 mM Mg<sup>2+</sup> plus 2,5 mM ATP (*cis/trans*) oraz po dodaniu 30 μM BMS191095 (*cis/trans*) w obecności 1 mM Mg<sup>2+</sup> plus 2,5 mM ATP (*cis/trans*). – oznacza stan zamknięty. Sygnał filtrowano z częstotliwością 500 Hz. Z pracy **Choma, Bednarczyk i wsp., 2009**.

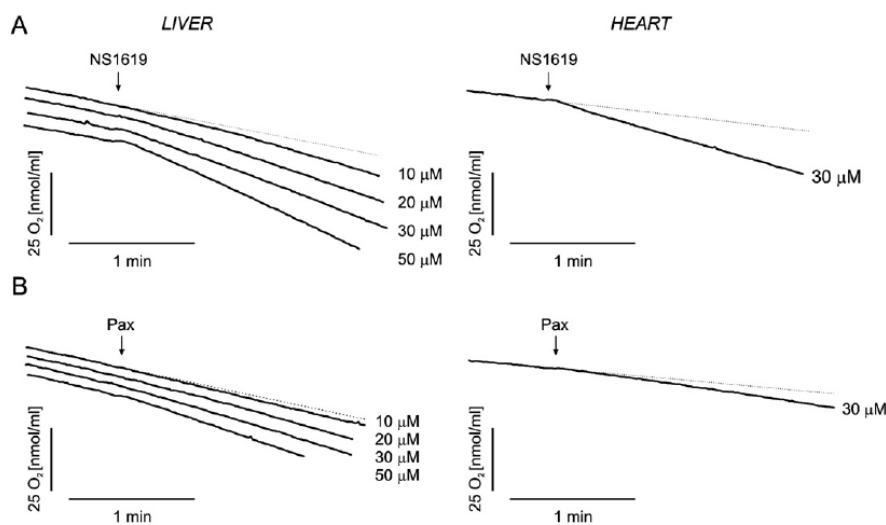
Na aktywność tego kanału nie miał wpływu kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) co wskazuje, że w mitochondriach mózgu szczura obecna jest inna izoforma białka kanałowego niż na przykład w mitochondriach serca wołu. Dodatkowo, HMR1098 inhibitor kanałów potasowych regulowanych przez ATP z błony plazmatycznej nie blokuje aktywności kanału mitoK<sub>ATP</sub>, co stanowi kolejny dowód obecności „innego” kanału w mitochondriach. Zastosowane inhibitory iberiotoksyna (bloker kanału typu BK<sub>Ca</sub>) oraz margatoksyna (bloker kanału typu Kv) nie powodowały zmian aktywności kanału, co potwierdza identyfikację kanału potasowego regulowanego przez ATP. Otrzymano również wyniki wskazujące na

modulację aktywności kanału przez jony magnezu (tylko od strony macierzy mitochondrialnej). Wykonane doświadczenia z wykorzystaniem techniki Western blot potwierdziły obecność w błonie wewnętrznej mitochondrialnej podjednostki Kir6.1 tworzącej por kanału potasowego regulowanego przez ATP. Opublikowane wyniki, po raz pierwszy, opisują profil elektro/farmakologiczny kanału potasowego regulowanego przez ATP mitochondriach z mózgu szczura.

Budowa kanału mitoK<sub>ATP</sub> nie jest do końca poznana. Wydaje się, że kanał ma budowę podjednostkową, podobną do kanału z błony plazmatycznej. Prawdopodobnie kanał mitoK<sub>ATP</sub> zbudowany jest z podjednostek Kir6.x (podjednostka tworząca por kanału) oraz części regulatorowej SUR (*ang. sulfonylurea receptor*). Do tej pory nie określono jednoznacznie, jakie izoformy podjednostek Kir i SUR wchodzi w skład tego kanału. Inne badania wskazują ponadto, że kanał mitoK<sub>ATP</sub> może tworzyć wielobiałkowy kompleks będąc funkcjonalnie związany z mitochondrialną dehydrogenazą bursztynianową (Ardehali i wsp., 2004).

Zaproponowano, że kanał potasowy regulowany przez ATP i kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia są regulatorami napływu K<sup>+</sup> mitochondriów, objętości macierzy mitochondrialnej oraz pośrednikami cytoprotekcji. Jednak specyficzność środków farmakologicznych stosowanych w badaniach tych kanałów oraz mechanizm protekcji są nadal niewyjaśnione czasami nawet kontrowersyjne. W roku 2007 odbyłem staż podoktorski na Uniwersytecie w Bristolu w laboratorium profesora Andrew Halestrapa. Otrzymane wyniki opublikowane zostały w pracy *Bednarczyk i wsp., 2008b*. Podczas stażu, badałem transport potasu do mitochondriów izolowanych z wątroby oraz serca szczura stosując metody biochemiczne (pomiar oddychania, rozpraszanie światła). Zastosowanie jonoforu potasu (walinomycyna) oraz wymiennika K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (nigerycyna) pozwoliło to na ustalenie maksymalnych zmian szybkości oddychania oraz objętości macierzy mitochondrialnej. W odniesieniu do otrzymanych danych nie obserwowałem zmian

rozpraszania światła w odpowiedzi na bloker 5-HD oraz aktywatory kanału mitoK<sub>ATP</sub>: diazoksyd i kromakalim. Jednak aktywator kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, NS1619 zmniejszał rozpraszanie światła oraz stymulował oddychanie, ale efekt ten był również widoczny w środowisku bez jonów potasu. W przeciwieństwie do przewidywań, bloker kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, paxyllina również zmniejszał rozpraszanie światła oraz bardzo słabo stymulował oddychanie (Rys. 11) (Bednarczyk i wsp., 2008b).



**Rys. 11.** NS1619 oraz paksyllina stymuluje oddychanie mitochondriów izolowanych z wątroby i serca szczura. Z pracy Bednarczyk i wsp., 2008b.

Otrzymane wyniki świadczą, że stosowane modulatory kanałów potasowych mogą działać nie specyficznie (szczególnie w wysokich stężeniach) bądź być może pośredniczą w alternatywnych mechanizmach protekcji. Praca ta w sposób szczególny zwróciła moją uwagę na możliwości stosowanych modulatorów kanałów potasowych. Wskazuje również, na potrzebę poszukiwania specyficznych związków modulujących aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych, co jest szczególnie utrudnione w przypadku, gdy nie dysponujemy pełną wiedzą na temat struktury i roli fizjologicznej tych kanałów. Szersze spojrzenie na temat nie specyficznych efektów wybranych modulatorów kanałów potasowych zostało przedstawione w pracy Szewczyk i wsp., 2010, której jestem współautorem.

### **Mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez napięcie (kanał mitoKv)**

Kanał Kv1.3 należący do rodziny białek regulowanych przez zmianę potencjału błonowego został opisany w błonach komórkowych wielu tkanek (Gutman i wsp., 2005). Obecność tego kanału opisano, między innymi, w limfocytach T, nerkach, nabłonku oraz centralnym układzie nerwowym.

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej limfocytów T kanał mitoKv1.3 odkryto stosując elektrofizjologiczną technikę patch-clamp (Szabò i wsp., 2005). Jest on selektywny dla jonów potasowych i wrażliwy na specyficzny inhibitor kanałów Kv: margatoksynę (MgTx). Pokazano, że kanały typu Kv1.3 obecne są zarówno w osoczu jak i błonach mitochondrialnych, pomimo braku mitochondrialnej sekwencji kierowania. Być może mitochondrialny Kv1.3 kanał stanowi ważny czynnik w transdukcji sygnału apoptozy (Szabò i wsp., 2005).

W ramach projektu finansowego przez Polską Sieć Mitochondrialną zidentyfikowałem kanał mitoKv1.3 w mitochondriach hipokampu chomika mongolskiego (gerbil) (**Bednarczyk i wsp., 2010**). W tej pracy aktywność kanałów obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek hipokampu mierzyłem techniką patch-clamp. W większości doświadczeń obserwowałem kanał selektywny dla jonów potasu o właściwościach napięciowo-zależnych. Średnie przewodnictwo wynosiło 109 pS. Aktywność kanału była hamowana nieodwracalnie przez margatoksynę, specyficzny inhibitor kanału Kv1.3. Kompleks ATP/Mg<sup>2+</sup> oraz zmiana stężeń jonów Ca<sup>2+</sup> nie mają wpływu na aktywność kanału. Dodatkowo agitoxina-2 (AgTx), która jest silnym inhibitorem kanałów potasowych regulowanych przez napięcie, nie miała wpływu na zmiany aktywności mitochondrialnego kanału typu Kv. Brak powinowactwa do agitoxiny-2 sugeruje, że w przeciwieństwie do kanału z błony plazmatycznej, mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez napięcie może mieć inną budowę molekularną. Dane uzyskane z wykorzystaniem techniki Western

blot oraz badania immunohistochemiczne na skrawkach mózgu potwierdziły ekspresję białka kanału Kv1.3 w mitochondriach. Otrzymane wyniki wskazują, że zidentyfikowany po raz pierwszy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej hipokampu chomika mongolskiego, obecny jest kanał potasowy regulowany przez napięcie (kanał mitoKv) o właściwościach podobnych do kanału Kv1.3 z błony plazmatycznej. Kanał ten może mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych.

Po kanałach mitoK<sub>ATP</sub> oraz mitoBK<sub>Ca</sub> mitochondrialny kanał Kv1.3 jest trzecim kanałem, któremu przypisuje się aktywny udział w transporcie jonów potasowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną oraz dobroczynny wpływ na komórki poddane działaniu czynników szkodliwych. Jednak budowa oraz rola fizjologiczna mitochondrialnego kanału Kv1.3 są ciągle słabo poznane.

### ***Mitochondrialny, dwu-porowy kanał potasowy (kanał mitoTASK-3)***

W roku 2008, opublikowano pracę wskazującą na obecność w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanału potasowego typu TASK-3. Kanał ten został zlokalizowany w mitochondriach ludzkich keratynocytów (linia komórkowa HaCaT) oraz w komórkach czerniaka złośliwego (melanoma, linia komórkowa WM35) (Rusznak i wsp., 2008). Kanał typu TASK-3 z błony plazmatycznej cechuje się obecnością dwóch porów w domenie transmembranowej. Ponadto kanał ten jest wrażliwy na zmiany zewnątrzkomórkowego pH (kanał zamyka się w obniżonym pH). Kanał TASK-3 bierze udział w wielu procesach metabolicznych m.in. w regulacji sekrecji aldosteronu, regulacji pobudzenia neuronów oraz w indukcji apoptozy w neuronach ziarnistych mózdzku. Badania elektrofizjologiczne potwierdziły obecność kanału zależnego od pH w mitochondriach hipokampu szczura (Kajma i Szewczyk, 2012). Opisany kanał jest selektywny dla potasu oraz wykazuje właściwości prostownicze. Podobny kanał zidentyfikowaliśmy w mitochondriach komórek keratynocytów.

Przypuszczamy, że kanał ten bierze udział w cytoprotekcji: wyciszenie genu odpowiedzialnego za ekspresję białka kanałowego powoduje podwyższenie śmiertelności komórek w modelu uszkodzenia komórek wykorzystującym promieniowanie UVB (*manuskrypt, którego jestem współautorem został wysłany do Journal of Investigative Dermatology*).

### **Inne mitochondrialne kanały potasowe**

#### ***Mitochondrialny kanał potasowy o średnim przewodnictwie regulowany przez wapń (kanał mitoIK<sub>Ca</sub>)***

Po raz pierwszy, 2009 roku, kanał o średnim przewodnictwie regulowany przez Ca<sup>2+</sup> (kanał mitoIK<sub>Ca</sub>) został zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondriów wyizolowanych z linii nowotworowej okrężnicy, HCT116 (De Marchi i wsp., 2009). Obecność tego kanału opisano również w innych typach komórek: w ludzkiej linii HeLa oraz w mysich fibroblastach (Sassi i wsp., 2010). Elektrofizjologiczne właściwości tego kanału są bardzo podobne do kanału K<sub>Ca</sub>3.1 z błony komórkowej. Kanał mitoIK<sub>Ca</sub> o przewodnictwie w zakresie od około 10 pS do 90 pS jest selektywny dla jonów potasu oraz prawdopodobieństwo otwarcia nie zależy od napięcia. Kanał jest nieaktywny w niskich stężeniach wapnia a inhibitory kanałów, takie jak klotrimazol oraz TRAM-34 blokują aktywność kanału mitoIK<sub>Ca</sub> w nanomolowych stężeniach. Również, obecność kanału w mitochondriach potwierdziły doświadczenia z wykorzystaniem fluorescencji oraz techniki Western blot. Jak do tej pory rola fizjologiczna kanału nie została poznana, jednak można się spodziewać, że obecność kanału przyczynia się do zmian przewodnictwa potasu wewnętrznej błony mitochondrialnej, co powoduje zmiany w objętości macierzy lub wpływa na regulację poziomu jonów wapnia.



***Mitochondrialny kanał potasowy o małym przewodnictwie regulowany przez wapń (kanał mitoSK<sub>Ca</sub>)***

W przeciwieństwie do kanałów o dużym przewodnictwie regulowanych przez Ca<sup>2+</sup> (kanał BK<sub>Ca</sub>), kanały o małym przewodnictwie regulowane przez Ca<sup>2+</sup> (kanał SK<sub>Ca</sub>) nie są zależne od potencjału i są wrażliwe tylko na jony wapnia związane z kalmoduliną. Kanały SK<sub>Ca</sub> pośredniczą w indukowanej przez agonistów hiperpolaryzacji komórek śródbłonka i odgrywają zasadniczą rolę w zależnym od śródbłonka działaniu substancji rozszerzających naczynia krwionośne (Nilius i Droogmans, 2001). Wykazano również, że obecne są w błonie komórkowej neuronów gdzie zapewniają kontrolę aktywności receptora NMDA. Najnowsze doniesienia wskazują, że kanał SK<sub>Ca</sub> został również zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej serca świnki morskiej (Stowe i wsp., 2013). Identyfikacja tego białka została potwierdzona z wykorzystaniem Western blot, immuno-histochemicznych barwień, mikroskopii konfokalnej, mikroskopii elektronowej, spektroskopii masowej oraz technik elektrofizjologicznej BLM. Ponad to wykazano, że aktywator DCEB kanału mitoSK<sub>Ca</sub> inicjuje kardioprotekcję (Stowe i wsp., 2013). Kanał SK<sub>Ca</sub> został również opisany w wewnętrznej błonie mitochondriów neuronalnych oraz wykazano, że aktywacja kanału mitoSK<sub>Ca</sub> może być neuroprotektoryjne w warunkach zaburzenia czynności mitochondriów (Dolga i wsp., 2013).

## Podsumowanie

Do tej pory zidentyfikowano w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kilka różnych kanałów potasowych. Powstało wiele hipotez wiążących mitochondrialne kanały potasowe ze śmiercią komórkową. Obserwowane efekty cytoprotekcyjne z udziałem tych kanałów pobudziły intensywne badania przede wszystkim farmakologii, ukierunkowane na regulację tych białek w czasie stresu komórkowego. Wydaje się, że badania te mogą w niedalekiej przyszłości zaowocować opracowaniem nowych terapii ograniczających obumieranie tkanek w takich sytuacjach jak niedotlenienie mięśnia sercowego czy też chorób neurodegeneracyjnych.

### Najważniejsze rezultaty/wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

- Kanały potasowe typu  $K_{ATP}$  oraz  $BK_{Ca}$  obecne są w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mózgu szczura (**Kulawiak i Bednarczyk, 2005**)
- Identyfikacja elektrofizjologiczna, farmakologia oraz immunodetekcja kanału mito $BK_{Ca}$  w mitochondriach mózgu szczura (**Skalska, Bednarczyk i wsp., 2009**)
- Lokalizacja, identyfikacja oraz opis właściwości elektro/farmakologicznych kanału mito $K_{ATP}$  w mitochondriach mózgu szczura (**Choma, Bednarczyk i wsp., 2009**)
- Szczegółowa analiza elektrofizjologiczna regulacji kanału mito $K_{ATP}$  przez fosforylację oraz pH – w modelu opartym na mitochondriach izolowanych z mięśnia sercowego wołu (**Bednarczyk i wsp., 2008a**)
- Identyfikacja oraz opis właściwości biofizycznych kanału mitoKv w mitochondriach hipokampu chomika mongolskiego (**Bednarczyk i wsp., 2010**)
- Odkrycie kanału mito $BK_{Ca}$  w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek endotelialnych (**Bednarczyk i wsp., 2013b**)
- Opis regulacji kanału mito $BK_{Ca}$  przez IV podjednostkę łańcucha oddechowego - oksydazę cytochromową – na podstawie badań prowadzonych na mitochondriach z ludzkich komórek gwiazdki U-87 MG (**Bednarczyk i wsp., 2013a**)

## Przebieg kariery zawodowej

Studia ukończyłem w roku 1999 na Wydziale Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Pracę magisterską wykonałem w Zakładzie Biofizyki, promotorem był prof. dr hab. Stanisław Krawczyk. W tym samym roku zostałem zatrudniony na etacie asystenta w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Katedra Fizyki, Zakład Biofizyki). Zajmowałem się badaniami prądów potasowych aktywowanych napięciem w komórkach mięśniowych (*Dworakowska i wsp., 2004*) oraz określeniem funkcji kanałów chlorkowych z rodziny ClC (*Dołowy i wsp., 2002*). W roku 2000 zostałem przeniesiony na studia doktoranckie. Rozpocząłem współpracę z prof. dr hab. Adamem Szewczykiem z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych. W trakcie studiów realizowałem zadania badawcze dotyczące określenia możliwości tworzenia kanału przez białko Gfp1 (*Flis i wsp., 2002*) oraz badałem właściwości modelu kanału jonowego tworzonego przez fragment M2 receptora glicynowego (*Bednarczyk i wsp., 2002*). Wiodącym projektem były badania właściwości elektrofizjologicznych mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez ATP obecnego w mitochondriach mięśnia sercowego (*Bednarczyk i wsp., 2004; Bednarczyk i wsp., 2005*). Badania te stanowiły dorobek doktoratu, który obroniłem w roku 2004 pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Dołowego. W roku 2005 zostałem zatrudniony jako adiunkt w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Katedra Fizyki, Zakład Biofizyki). W tym czasie zajmowałem się realizacją projektów:

*(tutaj zamieściłem ważniejsze projekty, które realizowałem poza tymi zgłoszonymi jako wchodzące w skład osiągnięcia)*

- Badania kanałów potasowych obecnych w mitochondriach *Acanthamoeba castellanii* (*Kicińska i wsp., 2007*)
- Badania wpływu pochodnych stilbenu na aktywność mitochondrialnych kanałów chlorkowych (*Koszela-Piotrowska i wsp., 2007*)

- Możliwości regulacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez zmiany poziomu tlenu (niedotlenienie) (*Cheng i wsp., 2008*)
- Identyfikacją kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mięśniach szkieletowych (*Skalska i wsp., 2008*)
- Badania kinetyki i bilansu transportu jonów przez warstwę spolaryzowanych komórek nabłonkowych
- Mitochondria jako miejsce ingerencji farmakologicznej w terapii insulinooporności i cukrzycy typu II
- Mitochondria jako potencjalne miejsce ingerencji farmakologicznej w zapobieganiu uszkodzeniom komórek śródbłónka naczyniowego w warunkach hiperglikemii i hiperlipidemii

W okresie po doktorskim odbyłem staże w:

- Department of Neurology, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Germany; 4 miesiące w 2008 – staż podoktorski. Zakończony pracą **Bednarczyk i wsp., 2013a**,
- Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Bristol, UK; 2 miesiące w 2007 – staż podoktorski. Zakończony pracą *Bednarczyk i wsp., 2008b*,
- Department of Neurology, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Germany; 3 miesiące w 2006 – staż podoktorski. Zakończony pracą *Cheng i wsp., 2008*.

Obecnie jestem zaangażowany w projekty: „Od mitochondriów do innowacyjnych kosmetyków o działaniu protekcyjnym”, „Nowe mitochondrialne biosensory do badania komórkowych mechanizmów ochronnych przed uszkodzeniem przez hipoksję” oraz „Program doskonalenia dydaktyki SGGW w dziedzinie pozyskiwania surowców roślinnych dla energetyki w kontekście celów Strategii Europa 2020”. Obszerny opis dorobku znajduje się w załączniku nr 4.

**Tabela 1.** Zestawienie wybranych osiągnięć wchodzących w skład dorobku.

<b>Liczba prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego</b>	<b>10</b>
<b>Liczba prac po doktoracie (razem ze stanowiącymi osiągnięcie naukowe)</b>	<b>27</b>
<b>Liczba prac przed doktoratem</b>	<b>6</b>
<b>Liczba odbytych konferencji po doktoracie</b>	<b>20</b>
<b>Liczba wystąpień po doktoracie (seminaria, referaty)</b>	<b>16</b>
<b>Odbyte kursy i szkolenia po doktoracie</b>	<b>11</b>
<b>Sumaryczny <i>impact factor</i> według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania</b>	<b>59,142</b>
<b>Liczba punktów MNiSW</b>	<b>541</b>
<b>Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science</b>	<b>258</b>
<b>Indeks Hirscha według bazy Web of Science</b>	<b>10</b>

*Pion Fedmicyz*

## Literatura

- Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 11880-11885.
- Bednarczyk P.** (2012) Charter 18. Potassium and Mitochondria. Y.V. Li and J.H. Han (eds.), *Metal Ion in Stroke*, SPRINGER SERIES IN TRANSLATION STROKE RESEARCH, DOI 10.1007/978-1-4419-9663-3\_18 (ISBN 978-1-4419-9662-6) pp. 373-389.
- Bednarczyk P.** (2009) Potassium channels in brain mitochondria. *Acta Biochim Pol*. **56**: 385-392.
- Bednarczyk P,** Barker GD, Halestrap AP. (2008b) Determination of the rate of K<sup>+</sup> movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. **1777**: 540-548.
- Bednarczyk P,** Dołowy K, Szewczyk A. (2008a) New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 325-335.
- Bednarczyk P,** Dołowy K, Szewczyk A. (2005) Matrix Mg<sup>2+</sup> regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett* **579**: 1625-1632.
- Bednarczyk P,** Kicińska A, Kominkova V, Ondrias K, Dołowy K, Szewczyk A. (2004) Quinine inhibits mitochondrial ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J Membr Biol* **199**: 63-72.
- Bednarczyk P,** Koziel A, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. (2013b) Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. **304**: H1415-H1427. DOI: 10.1152/ajpheart.00976.2012
- Bednarczyk P,** Kowalczyk JE, Beresewicz M, Dołowy K, Szewczyk A, Zabłocka B. (2010) Identification of a voltage-gated potassium channel in gerbil hippocampal mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. **397**: 614-620.
- Bednarczyk P,** Szewczyk A, Dołowy K. (2002) Transmembrane segment M2 of glycine receptor as a model system for the pore-forming structure of ion channels. *Acta Biochim Pol*. **49**: 869-876.
- Bednarczyk P,** Wieckowski MR, Broszkiewicz M, Skowronek K, Siemen D, Szewczyk A. (2013a) Putative structural and functional coupling of the mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channel to the respiratory chain. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0068125
- Bernardi P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. **79**: 1127-1155.
- 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. *Cell Physiol Biochem*. **22**: 127-136.

- Choma K, **Bednarczyk P**, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz WS, Dołowy K, Szewczyk A. (2009) Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* **41**: 323-334.
- Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Gonoï T, Wolf G, Siemen D. (2004) The human mitochondrial  $K_{ATP}$  channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. *Biochim Biophys Acta.* **1656**: 46-56.
- De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabò I, Zoratti M. (2009) Intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium.* **45**: 509-516.
- Dębska G, Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS. (2002) Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* **1556**: 97-105.
- Dolga AM, Netter MF, Perocchi F, Doti N, Meissner L, Tobaben S, Grohm J, Zischka H, Plesnila N, Decher N, Culmsee C. (2013) Mitochondrial small conductance SK2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem.* 2013 Feb 19. [Epub ahead of print]
- Dołowy K, **Bednarczyk P**, Hordejuk R, Dworakowska B, Nurowska E, Jarząbek W. (2002) Role and function of voltage-gated chloride channels of the CIC family and their defects leading to genetic diseases. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **56**: 307-313.
- Douglas RM, Lai JC, Bian S, Cummins L, Moczydlowski E, Haddad GG. (2006) The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience.* **139**: 1249-1261.
- Dworakowska B, Nurowska E, Kloch M, Hordejuk R, **Bednarczyk P**, Jarząbek W, Dołowy K. (2004) Prądy potasowe aktywowane napięciem w komórkach mięśniowych pochodzących od dawców w różnym wieku. W „*Techniki elektrofizjologiczne w badaniach zjawisk bioelektrycznych: od kanałów jonowych po sieci neuronalne*”. Str. 33-38.
- Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. (2006) Tissue protection mediated by mitochondrial  $K^+$  channels. *Biochim Biophys Acta.* **1762**: 202-212.
- Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Saghiri R. (2011) How many types of large conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channels exist in brain mitochondrial inner membrane: evidence for a new mitochondrial large conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel in brain mitochondria. *Neuroscience.* **199**: 125-132.
- Flis K, **Bednarczyk P**, Hordejuk R, Szewczyk A, Berest V, Dołowy K, Edelman A, Kurlandzka A. (2002) The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 1144-1150.
- Grover GJ, McCullough JR, Henry DE, Conder ML, Sleph PG. (1989) Anti-ischemic effect 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.

Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Sleph PG. (1990) The protective effects of cromakalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused rat hearts and anesthetized dogs. *Cardiovasc Drugs and Therapy*. **4**: 465–474.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. **57**: 473-508.

Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. (1991) ATP-sensitive  $K^+$  channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. **352**: 244–247.

Kathiresan T, Harvey M, Orchard S, Sakai Y, Sokolowski B. (2009) A protein interaction network for the large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in the mouse cochlea. *Mol Cell Proteomics*. **8**: 1972-1987.

Kajma A, Szewczyk A. (2012) A new pH-sensitive rectifying potassium channel in mitochondria from the embryonic rat hippocampus. *Biochim Biophys Acta*. 1817: 1867-1878.

Kicińska A, Swida A, **Bednarczyk P**, Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dołowy K, Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W. (2007) ATP-sensitive potassium channel in mitochondria of the eukaryotic microorganism, *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*. **282**: 17433-17441.

Koszela-Piotrowska I, Choma K, **Bednarczyk P**, Dołowy K, Szewczyk A, Kunz WS, Malekova L, Kominkova V, Ondrias K. (2007) Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell Mol Biol Lett*. **12**: 493-508.

Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dołowy K, Szewczyk A, **Bednarczyk P**. (2006) Rekonstrukcja mitochondrialnych kanałów jonowych do sztucznych błon lipidowych. NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII, T XV, (ISBN 83-232-1729-7), 100-116.

Kulawiak B, **Bednarczyk P**. (2005) Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp*. **65**: 271-276.

Matkovic K, Koszela-Piotrowska I, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. (2011) Ion conductance pathways in potato tuber (*Solanum tuberosum*) inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta*. **1807**: 275-285.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. **74**: 1124–1136.

Nilius B, Droogmans G. (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. **81**: 1415–1459.

Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y. (2005) Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **289**: H1635-H1642.



- Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent  $K^+$  channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* **267**: 26062-26069.
- Piwońska M, Wilczek E, Szewczyk A, Wilczynski GM. (2008) Differential distribution of  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel beta4 subunit in rat brain: Immunolocalization in neuronal mitochondria. *Neuroscience.* **153**: 446-460.
- Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, Telek A, Gönczi M, Szucs G, Csernoch L. (2008) Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human Wells. *Virchows Arch.* **452**: 415-426.
- Sanchez M, McManus OB. (1996) Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology.* **35**: 963-968.
- Sassi N, De Marchi U, Fioretti B, Biasutto L, Gulbins E, Franciolini F, Szabò I, Zoratti M. (2010) An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel mtKCa3.1. *Biochim Biophys Acta.* **1797**: 1260-1267.
- Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marbán E. (2000) Nicorandil, a potent cardioprotective agent, acts by opening mitochondrial ATP-dependent potassium channels. *J Am Coll Cardiol.* **35**: 514-518.
- Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. (2005) Mitochondrial  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cardiac myocytes. A mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* **111**: 207-212.
- Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F. (1999)  $Ca^{2+}$ -activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **257**: 549-554.
- Skalska J, **Bednarczyk P**, Piwońska M, Kulawiak B, Wilczynski G, Dołowy K, Kunz WS, Kudin AP, Szewczyk A. (2009) Calcium ions regulate  $K^+$  uptake into brain mitochondria: The evidence for a novel potassium channel. *International Journal of Molecular Sciences.* **10**: 1104-1120.
- Skalska J, Piwońska M, Wyroba E, Surmacz L, Wieczorek R, Koszela-Piotrowska I, Zielińska J, **Bednarczyk P**, Dołowy K, Wilczynski GM, Szewczyk A, Kunz WS. (2008) A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* **1777**: 651-659.
- Stowe DF, Gadicherla AK, Zhou Y, Aldakkak M, Cheng Q, Kwok WM, Jiang MT, Heisner JS, Yang M, Camara AK. (2013) Protection against cardiac injury by small  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta.* **1828**: 427-442.
- Szabò I, Leanza L, Gulbins E, Zoratti M. (2012) Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. *Pflugers Arch.* **463**: 231-246.

Szabò I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. (2005) A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem.* **280**: 12790-12798.

Szewczyk A, Kajma A, Malinska D, Wrzosek A, **Bednarczyk P**, Zabłocka B, Dołowy K. (2010) Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS Lett.* **584**: 2063-2069.

Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk J.E, Sidor A, O'Rourke B. (2002) Cytoprotective role of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* **298**: 1029-1033.

A handwritten signature in black ink, reading "Piotr Bednarczyk". The signature is written in a cursive, flowing style with a long horizontal stroke at the end.