

Badania kanałów jonowych w mitochondriach

Dominus vitae necisque



ADAM SZEWCZYK
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, Warszawa
Komitet Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
a.szewczyk@nencki.gov.pl
Prof. dr hab. Adam Szewczyk jest wiceprzewodniczącym
Wydziału II PAN i dyrektorem IBD PAN, prowadzi
Pracownię Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych



KRZYSZTOF DOŁOWY
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa
Komitet Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
krzysztof_dolowy@sggw.pl
Prof. dr hab. Krzysztof Dołowy jest kierownikiem Katedry
Fizyki SGGW. Wspólnie napisali około 20 publikacji
o kanałach jonowych w mitochondriach

Mitochondria są dla komórek eukariotycznych niezwykle ważne. To one odgrywają pierwszoplanową rolę w ochronie komórek przed skutkami niedotlenienia. Czy poznanie mechanizmu działania mitochondriów pozwoli w przyszłości zapobiegać zawałom serca?

Mitochondrium – organellum komórkowe – tytułowy „pan życia i śmierci” wydaje się związany z tlenem, który pojawił się na Ziemi 1,5 miliarda lat temu. Tlen jest związkiem niesłychanie toksycznym. Przez prawie 2 miliardy lat istnienia życia na Ziemi tlen wytwarzany podczas procesu fotosyntezy natychmiast reagował ze związkami dwu-

wartościowego żelaza. Jednak 1,5 miliarda lat temu zapas dwuwartościowego żelaza w praocenach wyczerpał się. I tak niczym niezakłócone życie bakterii beztlenowych dobiegło końca. Musiały pogрузić się w głębinach oceanu, gdzie nie było tlenu.

Współpraca z pramitochondrium

Jednak nie wszystkie bakterie straciły na tej zmianie. Niektóre nauczyły się używać tlenu do spalania związków organicznych, syntetyzując przy okazji ogromne ilości ATP – związku odgrywającego bardzo ważną rolę w produkcji energii dla komórki. Nie jesteśmy pewni, jak dalej przebiegała ewolucja. Jest na ten temat kilka teorii. Jedna z nich mówi, że bakterie beztlenowe zaczęły kooperować z pierwszymi bakteriami tlenowymi będącymi pramitochondriami. Beztlenowce zapewniały glukozę, a pramitochondria zużywały toksyczny tlen i odpłacały beztlenowcom molekułami ATP. Kooperacja zamieniła się stopniowo w symbiozę, a mitochondria wylądowały wewnątrz beztlenowców, harmonijnie z nimi współpracując. Według innej hipotezy beztlenowe drapieżne praameby polowały na bakterie. Pramitochondria nie były jednak łatwym łupem. W rzeczywistości same były niebezpiecznymi drapieżnikami. Gdy praameby połykały pramitochondria, te sadowiły się wygodnie w środku i wytwarzały potężne dawki reaktywnych form tlenu (RFT) zabijających połykacza. Pramitochondrium zostawało w zwłokach prześladowcy, posilając się nim przez pewien czas. Tymczasem znalazły się praameby potrafiące rozkładać RFT. Być może współpraca między praamebą i pramitochondrium wytworzyła się dobrowolnie albo

Obraz z mikroskopu konfokalnego, który pozwala na jednoczesne oglądanie poszczególnych białek w komórkach. **A.** Zabarwiona na zielono część kanału jonowego. **B.** Zabarwione na czerwono białko z mitochondriów. **C.** Zabarwione na niebiesko jądro komórkowe. **D.** Złożenie trzech poprzednich obrazów – zabarwione na żółto miejsca, w których współwystępuje kolor zielony i czerwony. Wniosek: kanał jonowy znajduje się w mitochondriach





EAST NEWS/SCIENCE PHOTO LIBRARY

Mitochondrium jest ważnym organellem komórkowym, bez którego życie komórki byłoby trudne. Mitochondria i ich gospodarze są w stanie swojej równowagi. Komórki dostarczają mitochondriom cukrów i tłuszczów. W zamian mitochondria syntetyzują ATP

była wynikiem zawieszenia broni. Obecnie w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych występują liczne mitochondria, których jest od kilku do kilkudziesięciu tysięcy. Ich liczba zależy od zapotrzebowania energetycznego komórek.

W idealnej równowadze

Podczas ostatnich 1,5 miliarda lat ewolucji mitochondria utraciły swoją niezależność. Nie mogłyby już przeżyć poza organizmem żywiciela. W genomie mitochondrialnym pozostało zaledwie 37 genów. Sądzi się, że do samodzielnego życia potrzeba co najmniej 200 genów. Pozostałe peptydy konieczne do funkcjonowania mitochondrium są kodowane w genomie jądrowym komórki macierzystej. Ale mitochondria zachowały „złotą akcję”. Geny mitochondrialne kodują niewralgiczne peptydy konieczne do spalania substratów i wytwarzania ATP. Oznacza to, że zarówno mitochondria nie mogłyby żyć poza komórkami, jak i życie komórki bez mitochondriów byłoby trudne. Znajdują się w stanie swojej równowagi. Komórki dostarczają mito-

chondriom cukrów i tłuszczów. W zamian mitochondria syntetyzują ATP. Komórka wytwarza potrzebne mitochondriom białka, ale o tym, czy białka te będą działać, decyduje mitochondrium, syntetyzując ważne brakujące części kompleksów białkowych.

Dobra śmierć

Czasem jednak ta harmonia zostaje zakłócona. Mitochondria eksplodują reaktywnymi formami tlenu i zabijają komórkę, w której żyją. Dokładnie rzecz biorąc, zapoczątkowują szereg procesów molekularnych prowadzących do śmierci komórki – apoptozy. Proces apoptozy może być spowodowany również przez sygnał przychodzący z zewnątrz komórki. Wtedy także, jak się wydaje, w procesie tym uczestniczą mitochondria. Na poziomie całego organizmu (choćby kręgowca) apoptoza komórek jest ważnym i pożytecznym zjawiskiem. Jest wykorzystywana przez organizm na przykład w procesie embriogenezy, gdy likwidowana jest błona pławna pomiędzy palcami zarodka ludzkiego. Służy też usuwaniu komórek, które wy-

Badania kanałów jonowych w mitochondriach

mknęły się spod kontroli organizmu, np. w procesie nowotworzenia.

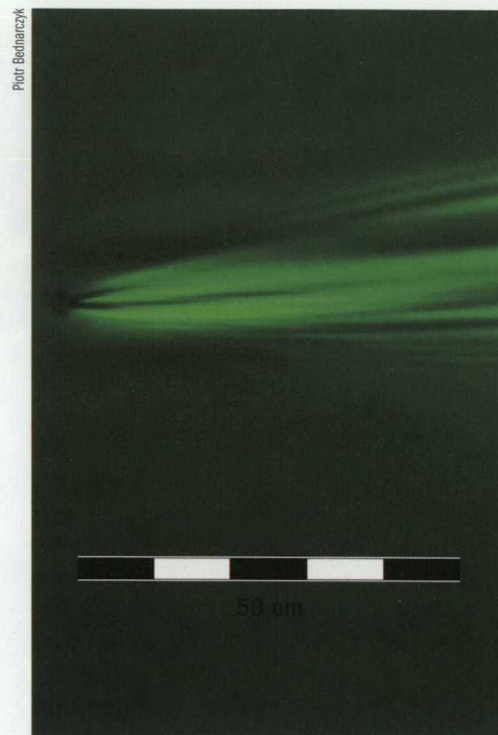
Hartowanie serca niedokrwieniem

Badania nad procesem wytwarzania ATP przez mitochondria zostały uhonorowane aż dwiema Nagrodami Nobla. W latach 60. pojawiły się doniesienia wiążące mitochondria z chorobami serca. Zawał serca to obumarcie komórek mięśniowych spowodowane długotrwałym niedotlenieniem, zwykle związanym z zablokowaniem naczynia krwionośnego dostarczającego bogatą w tlen krew do fragmentu mięśnia sercowego. Obserwacje wykazały, że jeżeli poddamy mięsień sercowy krótkim epizodom niedokrwienia, zanim zablokujemy dopływ krwi na dłużej, to ulega on znacznie mniejszemu uszkodzeniu. Proces ten nazwano hartowaniem niedokrwieniem. Kolejne badania wykazały, że podobny efekt można uzyskać, stosując pewne substancje chemiczne. Okazało się, że wszystkie te substancje mają przynajmniej jedną wspólną cechę - otwierają białka błonowe zwane kanałami jonowymi. Przez te kanały jony potasu przechodzą przez błonę komórkową. To ważne odkrycie skłoniło naukowców do postawienia kolejnych pytań. Natychmiast sprawdzono, jak działają na serce inne substancje chemiczne znane ze zdolności do zamykania (blokowania) tych samych kanałów. Tak jak przypuszczano, okazało się, że blokery kanałów znoszą efekt ochrony serca przed niedokrwieniem.

Werdykt: mitochondrium

Kanały jonowe znajdują się we wszystkich błonach w komórce, zarówno w błonie zewnętrznej (plazmatycznej), jak i we wszystkich wewnątrzkomórkowych organellach, m.in. w mitochondriach. Należało wytypować „podejrzanego”. Wydało się, że powinien on mieć coś wspólnego ze zużywaniem tlenu, z ATP koniecznym do pracy mięśni oraz ze śmiercią komórek. Wszystkie te poszlaki wskazywały na mitochondria. W latach 90. odkryto w nich dwa odpowiednie kanały: mitochondrialny kanał potasowy zamykany ATP - $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, i mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany wapniem - mitoBK , odpowiednio otwierane i zamykane przez związki chemiczne przebadane wcześniej na mięśniu sercowym.

Kolejne badania prowadzone również przez nasze zespoły wykazały, że kanały mi-



Zdjęcie z mikroskopu. Mikropipeta z przyssanym mitoplastem. Czarna „czapeczka” to resztki zewnętrznej błony mitochondrium

to K_{ATP} i mitoBK znajdują się w zdecydowanej większości badanych komórek w: mięśniu sercowym i szkieletowym, wątrobie, mózgu, nerkach, gładkim i innych. Wykryto też, że podobne kanały jonowe znajdują się również w mitochondriach ameb i roślin, co sugeruje, że kanały te pojawiły się na wczesnych etapach ewolucji.

Jest metoda

Jak się bada kanały jonowe? Najpierw należy sprawdzić, czy interesujące nas kanały naprawdę znajdują się w mitochondriach. Gdy to już udowodnimy, wydobywamy mitochondria z komórek. Komórki rozbijamy na małe pęcherzyki. Następnie pęcherzyki zawieszamy w odpowiednim roztworze i rozwirowujemy, wykorzystując fakt, że mitochondria, naładowane wapniem i białkami, są cięższe niż większość części komórki. Oczyszczone mitochondria umieszczamy w innym roztworze, tak aby napęczniały od napływającej do środka wody. Napływająca woda rozsadza zewnętrzną błonę, pozostawiając nietkniętą wewnętrzną błonę mitochondrialną. Dzieje się tak, ponieważ wewnętrzna błona jest bardzo pofałdowana i gdy mitochondrium pęcznieje, może rozprostować się i powiększyć objętość. Gdy już wydobydziemy mitochondria z komórki, sprawdzamy, czy jony

(czyli prąd elektryczny) przepływają przez kanały jonowe mitochondriów. W tym celu, wytapiając, wyciągamy ze szkła pipetę tak cienką, że zewnętrzny otwór jest wielkości niedużej bakterii. Pipetkę umieszczamy w mikromanipulatorze i pod mikroskopem przysysamy do mitochondrium. Powierzchnia błony pod przysaną pipetą jest bardzo mała. Znajduje się na niej bardzo mało kanałów jonowych. Czasem żaden. Rzadko dwa lub więcej. Gdy mamy szczęście, jest tylko jeden. To umożliwia sprawdzenie, czy jony płyną przez kanał i jak na ich przepływ działają różne substancje otwierające lub zamykające kanały jonowe.

Zadziwiająca molekula

Chociaż wykrywanie kanałów i badanie ich regulacji przez różne substancje jest naszym głównym zajęciem, to jest ono tylko środkiem do osiągnięcia celu, jakim jest zrozumienie mechanizmu ochrony komórek przed skutkami niedotlenienia. Aby zrozumieć, jak działają mitochondria, musimy prześledzić procesy przebiegające w błonach mitochondrialnych. Podczas utleniania cukrów i tłuszczów część energii magazynowana jest w protonach, które wychodzą ze środka mitochondrium i wyrzucane są na zewnątrz. Wyrzucanie dodatnio naładowanych protonów powoduje powstanie ujemnego potencjału wewnątrz mitochondrium. Dodatnio naładowane protony znajdujące się na zewnątrz mitochondrium wnikają z powrotem do wnętrza wciągane przez ujemny potencjał. To z kolei napędza syntazę ATP. Syntaza ATP jest zadziwiającą molekułą, która obraca się niczym wiertarka. Przy każdym obrocie „wiertarki” powstają 3 molekuly ATP. Cały układ znajduje się w stanie równowagi. Jeżeli w komórce brakuje ATP,

to syntaza ATP zaczyna się szybciej kręcić, zużywając potencjał elektryczny wytwarzany przez protony. Obniżenie potencjału z kolei przyspiesza spalanie cukrów i tłuszczów.

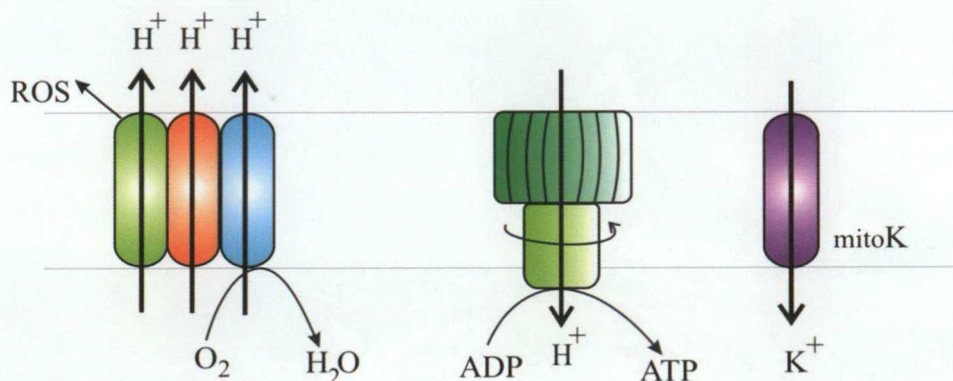
Więcej pytań

Jaka jest w tym rola kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ i mitoBK ? Jeżeli kanały otwierają się, to jony potasu wnikają do wnętrza mitochondriów, obniżając potencjał. Obniżenie potencjału przyspiesza spalanie, ale jednocześnie nie tworzy się ATP. Może więc chodzi o obniżenie potencjału elektrycznego? Zbyt wysoki potencjał elektryczny sprzyja wytwarzaniu reaktywnych form tlenu. Czyżby kanały $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ i mitoBK to zabezpieczenie komórki przed szaleństwami mitochondriów? Przemawiałoby za tym to, że w genomie mitochondrialnym nie ma genów kodujących kanały jonowe – to import z komórki. Dlaczego jednak otwarte kanały mitochondrialne są takie ważne, gdy zaczyna brakować tlenu? Przecież potencjał mitochondrialny i tak maleje. Niestety, mamy dalej więcej pytań niż odpowiedzi. Ale przecież tym jest nauka – poszukiwaniem odpowiedzi. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., Kunz W.S. (2009). Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life*, 61, 134-143.
- Kicińska A., Świda 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., Matkovic K., Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W. (2009). A large-conductance calcium-activated potassium channel in potato (*Solanum tuberosum*) tuber mitochondria. *Biochem. J.*, 424, 307-316.

Katarzyna Choma



Schematyczny rysunek głównych kompleksów białek w mitochondriach. Po lewej stronie trzy kompleksy łańcucha oddechowego, który podczas spalania cukrów i tłuszczów wyrzuca protony H^+ z mitochondriów. W środku białko produkujące ATP podczas powrotu protonów do wnętrza mitochondriów. Po prawej stronie badane przez nas białko kanałowe