

Milena Krajewska

**Oddziaływania kanału potasowego ROMK2
z białkami mitochondrialnymi**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych
Kanałów Jonowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
dr hab. Piotr Koprowski

Warszawa, 2021

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisana Milena Krajewska wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt. „Oddziaływanie kanału potasowego ROMK2 z białkami mitochondrialnymi” przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku.

Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

- 1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (*Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych*, kolekcja: *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe*) znajdującym się pod adresem: <https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription/121>
- 2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności zeskanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia

Podpis.....

*Praca współfinansowana
z grantu Narodowego Centrum Nauki (2015/19/B/NZ1/02794).*

Pragnę serdecznie podziękować:

*Promotorowi, dr hab. Piotrowi Koprowskiemu
za poświęcony czas, przekazaną wiedzę,
okazaną pomoc i opiekę merytoryczną.*

*Prof. dr hab. Adamowi Szewczykowi
za cenną wiedzę, inspirujące dyskusje,
wsparcie oraz okazaną życzliwość.*

*Pracownikom i Doktorantom
Pracowni Wewnętrzkomórkowej Kanałów Jonowych
za pomoc, życzliwość, współpracę i wspólnie spędzony czas.*

Szczególne podziękowania składam:

*Mojej rodzinie, a szczególnie rodzicom i rodzeństwu,
za nieustanne wsparcie oraz niegasnącą wiarę we mnie.*

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW.....	12
1. STRESZCZENIE	17
2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)	18
3. WSTĘP	19
3.1. KANAŁY POTASOWE.....	19
3.2. KANAŁY POTASOWE Z RODZINY K_{IR}	22
3.2.1. Farmakologia kanałów K_{ir}	25
3.3. KANAŁ $K_{IR1.1}$	26
3.3.1. Ekspresja tkankowa i fizjologiczna rola ROMK ($K_{ir1.1}$).....	27
3.3.2. Właściwości elektrofizjologiczne $K_{ir1.1}$	28
3.3.3. Farmakologia kanału ROMK	29
3.3.4. Bezpośrednie oddziaływania $K_{ir1.1}$ z białkami i kompleksy białkowe $K_{ir1.1}$	30
3.3.5. Izoformy kanału ROMK.....	30
3.4. MITOCHONDRIALNY KANAŁ POTASOWY REGULOWANY PRZEZ ATP ($MITOK_{ATP}$)	31
3.4.1. Właściwości elektrofizjologiczne i farmakologia $mitoK_{ATP}$	31
3.4.2. Rola fizjologiczna $mitoK_{ATP}$	33
3.4.3. Hipotezy o molekularnej tożsamości $mitoK_{ATP}$	35
3.4.3.1. Kompleks kanałów $K_{ir6.x}$	36
3.4.3.2. Kompleks dehydrogenazy bursztynianowej.....	37
3.4.3.3. Izoforma ROMK2 – lokalizacja mitochondrialna i wpływ na mitochondria	37
3.4.3.4. Białko MITOK (CCDC51) – właściwości, farmakologia i wpływ na mitochondria.....	38
4. ZAŁOŻENIA I CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	39
5. MATERIAŁY I METODY.....	40
5.1. KLONOWANIE MOLEKULARNE.....	40
5.1.1. Wektory genetyczne wykorzystywane w badaniach	40
5.1.1.1. <i>pET-28a(+)</i>	40

5.1.1.2. <i>pcDNA3.1(+)</i>	41
5.1.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy	42
5.1.3. Trawienie restrykcyjne	43
5.1.4. Reakcja ligacji	44
5.1.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym.....	44
5.1.6. Oczyszczanie DNA	45
5.1.6.1. Oczyszczanie produktu PCR z mieszaniny reakcyjnej.....	45
5.1.6.2. Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego	45
5.1.7. Wektory wykorzystywane do ekspresji białek w bakteriach oraz w komórkach ssaczych.....	46
5.1.7.1. Wektory wykorzystywane do ekspresji białka ROMK1/2 w bakteriach	48
5.1.7.1.1. Wektory: <i>pKirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i> oraz <i>pROMK1bac-6xHis</i> ..	49
5.1.7.1.2. Wektory: <i>pSUMO-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i> oraz <i>pSUMO-ROMK1bac-6xHis</i>	49
5.1.7.1.3. Wektory: <i>pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i> oraz <i>pMISTIC-ROMK1bac-6xHis</i>	50
5.1.7.1.4. Wektory: <i>pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i> oraz <i>pOmpF-ROMK1bac-6xHis</i>	50
5.1.7.1.5. Wektor <i>pROMK2bac-6xHis</i>	50
5.1.7.2. Wektory wykorzystywane do eksperymentów typu TurboID.....	51
5.1.7.2.1. Wektor <i>pROMK2-TurboID</i>	51
5.1.7.2.2. Wektor <i>pSMAC-TurboID</i>	51
5.1.7.2.3. Wektor <i>pOTC-TurboID</i>	51
5.1.7.3. Wektory wykorzystywane do eksperymentów typu Co-IP	52
5.1.7.3.1. Wektor <i>pROMK2-V5</i>	52
5.1.7.3.2. Wektor <i>pPRDX1</i>	52
5.1.7.3.3. Wektor <i>pGPATCH8</i>	52
5.1.7.3.4. Wektor <i>pTP53</i>	52
5.1.7.3.5. Wektor <i>pIMPDH2</i>	52
5.1.7.3.6. Wektor <i>pAGK</i>	53
5.1.7.3.7. Wektor <i>pPARP1</i>	53
5.1.8. Transformacja genetyczna.....	53
5.1.9. Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych	54
5.2. HODOWLE BAKTERYJNE.....	55

5.2.1. Prowadzenie hodowli	55
5.2.2. Szczepy bakterii <i>Escherichia coli</i> wykorzystywane w prowadzonych badaniach.....	55
5.2.2.1. <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ¹	55
5.2.2.2. <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pLysS	56
5.2.2.3. CopyCutter™ EPI400™	56
5.2.2.4. NEB® Stable	57
5.2.3. Produkcja białka ROMK1/ROMK2 w komórkach bakteryjnych	57
5.2.3.1. Sprawdzenie poziomu produkcji białka ROMK1 oraz ROMK2 w <i>E. coli</i> ...	57
5.2.3.2. Produkcja białka ROMK1 oraz ROMK2 w <i>E. coli</i>	58
5.2.4. Izolacja błon <i>E. coli</i>	58
5.3. HODOWLA KOMÓRKOWA KOMÓREK SSACZYCH.....	59
5.3.1. Linia komórkowa.....	59
5.3.2. Prowadzenie hodowli	59
5.3.3. Transfekcja komórek HEK293T	59
5.3.3.1. Transfekcja komórek w eksperymentach typu TurboID	59
5.3.3.2. Transfekcja komórek w eksperymentach typu Co-IP.....	60
5.3.4. Biotynylacja białek w eksperymentach typu TurboID	61
5.3.5. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria.....	61
5.3.5.1. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria z zastosowaniem digitoniny .	62
5.3.5.2. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria z zastosowaniem buforu sacharozowego.....	62
5.4. IZOLACJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK.....	63
5.4.1. Oczyszczanie biotynylowanych białek.....	66
5.4.2. Koimmunoprecypitacja	68
5.4.2.1. Koimmunoprecypitacja białek solubilizowanych w detergencie	68
5.4.2.2. Koimmunoprecypitacja białek solubilizowanych za pomocą polimerów	70
5.4.3. Oczyszczanie białek produkowanych w błonach bakterii <i>E. coli</i>	71
5.4.3.1. Solubilizacja białek z błon bakteryjnych.....	71
5.4.3.1.1. Solubilizacja z wykorzystaniem detergentów	71
5.4.3.1.2. Solubilizacja z wykorzystaniem kopolimerów	72
5.4.3.2. Oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis z pomocą chromatografii metalopowinowactwa	72
5.4.3.3. Dysocjacja agregatów białka ROMK2	73

5.5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA W PRÓBKACH.....	73
5.5.1. Metoda z zastosowaniem kwasu bicynchoninowego	73
5.5.2. Metoda Bradforda.....	74
5.5.3. Pomiar stężenia białka ze znacznikiem 6xHis.....	74
5.6. ANALIZA SKŁADU PRÓBEK	75
5.6.1. Metoda Western Blot.....	75
5.6.1.1. Przygotowanie próbek	75
5.6.1.2. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.....	75
5.6.1.3. Elektrotransfer	76
5.6.1.4. Immunocytochemia	76
5.6.2. Mikroskopia immunofluorescencyjna z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego	77
5.6.3. Spektrometria mas	79
5.7. POMIARY AKTYWNOŚCI KANAŁOWEJ BIAŁKA ROMK2-6xHis.....	80
5.7.1. Przygotowanie proteoliposomów	80
5.7.1.1. Optymalizacja warunków przygotowywania proteoliposomów	80
5.7.1.2. Rekonstytucja białka ROMK2-6xHis w proteoliposomach	80
5.7.2. Przygotowanie nanodysków do doświadczeń metodą sztucznych błon lipidowych	81
5.7.3. Metoda sztucznych błon lipidowych	81
5.7.4. Pomiar aktywności białka kanałowego ROMK2-6xHis w obecności modulatorów	83
5.8. ANALIZA DANYCH.....	85
5.8.1. Analiza wyników spektrometrii mas	85
5.8.2. Analiza rejestracji elektrofizjologicznych.....	85
5.8.3. Analiza statystyczna	88
5.9. DODATKOWE MATERIAŁY	88
5.9.1. Bufory wykorzystywane w przedstawionych eksperymentach.....	88
6. WYNIKI	90
6.1. IDENTYFIKACJA BIAŁEK ODDZIAŁUJĄCYCH Z BIAŁKIEM KANAŁOWYM ROMK2 Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI TURBO-ID	90
6.1.1. Optymalizacja warunków transfekcji i biotynylacji komórek.....	91

6.1.2. Wybór metody izolacji frakcji wzbogaconej w mitochondria	94
6.1.2.1. Określenie czystości frakcji wzbogaconej w mitochondria izolowanej z wykorzystaniem digitoniny	96
6.1.3. Oczyszczanie białek biotynylowanych.....	98
6.1.4. Analiza wyników uzyskanych za pomocą spektrometrii mas	100
6.2. ODDZIAŁYWANIA BIAŁKA ROMK2	106
6.2.1. Optymalizacja warunków transfekcji	107
6.2.2. Badanie oddziaływań potencjalnych białek oddziałujących z białkiem ROMK2-V5 za pomocą metody koimmunoprecypitacji	108
6.2.3. Potwierdzenie oddziaływań pomiędzy białkiem ROMK2, a AGK za pomocą immunoprecypitacji natywnych nanodysków	112
6.2.4. Subkomórkowa lokalizacja ROMK2-V5 - obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej.....	114
6.3. HETEROLOGICZNA EKSPRESJA ROMK2 W BAKTERIACH <i>E. COLI</i>	117
6.3.1. Konstrukty do ekspresji białek ROMK1 oraz ROMK2	117
6.3.2. Ekstrakcja białek ROMK z błon bakteryjnych za pomocą detergentów.....	120
6.3.3. Ekstrakcja i oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis z błon bakteryjnych solubilizowanych DDM.....	122
6.3.3.1. Rekonstrukcja białka ROMK2-6xHis do liposomów.....	123
6.3.4. Solubilizacja błon <i>E. coli</i> i oczyszczanie białek ROMK1/2-6xHis z błon bakteryjnych w obecności kopolimerów DIBMA oraz SMA	125
6.3.5. Dysocjacja agregatów białka ROMK2-6xHis do niższych form oligomerycznych	129
6.3.6. Optymalizacja warunków dializy polimerowych nanodysków.....	130
6.4. BADANIA FUNKCJONALNE BIAŁKA ROMK2-6xHis PRODUKOWANEGO W BAKTERIACH.....	132
6.4.1. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego do PLB z proteoliposomów	132
6.4.2. Wpływ polimerów SMA i DIBMA na stabilność planarnych błon lipidowych uformowanych z azolektyny.....	133
6.4.3. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego z polimerowych nanodysków.....	135
6.4.4. Charakterystyka aktywności białka ROMK2-6xHis	137
6.4.4.1. Wpływ jonów magnezu na aktywność białka ROMK2-6xHis	137

6.4.4.2. VU591 hamuje aktywność kanału ROMK2-6xHis	138
6.4.4.3. Wpływ kompleksu ATP/Mg ²⁺ na aktywność kanału ROMK2-6xHis	138
6.4.4.4. Wpływ diazoksydu na aktywność kanału ROMK2-x6His.....	139
6.4.4.5. Polarność efektów diazoksydu i ATP/Mg ²⁺ na aktywność kanału ROMK2-6xHis	141
6.4.4.6. Wpływ 5-HD na aktywność kanału ROMK2-6xHis.....	144
6.4.4.7. Wpływ glibenklamidu na aktywność kanału ROMK2-6xHis.....	145
6.5. BADANIE WPŁYWU PRODUKTÓW AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ BIAŁKA AGK NA AKTYWNOŚĆ KANAŁU ROMK2-6xHis	146
6.5.1. Wpływ kwasu lizofosfatydowego na aktywność kanału ROMK2-6xHis.....	146
6.5.2. Wpływ kwasu fosfatydowego na aktywność kanału ROMK2-6xHis.....	147
7. DYSKUSJA	148
8. PODSUMOWANIE.....	164
9. BIBLIOGRAFIA	165
10. LISTA PUBLIKACJI	202

SPIS SKRÓTÓW

$\Delta\Psi$ – potencjał elektrochemiczny (ang. *electrochemical potential*)

3-NPA – kwas 3-nitropropionowy (ang. *3-nitropropionic acid*)

4-AP – 4-aminopirydyna (ang. *4-aminopyridine*)

5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy (ang. *5-hydroxydecanoic acid*)

6xHis – znacznik polihistydynowy (ang. *polyhistidine-tag*)

ABS – przedporodowy zespół Barttera (ang. *antenatal Bartter syndrome*)

ADP – adenozy-5'-difosforan (ang. *adenosine 5'-diphosphate*)

AGK – kinaza acyloglicerolowa (ang. *acylglycerol kinase*)

ANT – translokaza nukleotydów adeninowych (ang. *adenine nucleotide translocase*)

APS – nadsiarczan amonu (ang. *ammonium persulfate*)

ATP – adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine 5'-triphosphate*)

ATP -aza – adenozyntrifosfataza (ang. *adenosine triphosphatase, ATP-ase*)

BCA – kwas bicynochoninowy (ang. *bicinchoninic acid*)

BCECF – sonda fluorescencyjna: 2',7'-bis-(2-karboksyetylo)-5-(i-6)-karboksyluoresceina (ang. *2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyluorescein*)

bioAMP – biotynylo-5-adenozynomonofosforan (ang. *biotinyl-5'-adenylate*)

BioID – metoda biotynylacji białek sąsiadujących (ang. *proximity-dependent biotin identification*)

BK_{Ca} – kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany napięciem i jonami wapnia (ang. *big conductance calcium-activated potassium channels*)

BLM – czarne błony lipidowe (ang. *black lipid membranes*)

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

CFTR – białko tworzące kanał chlorkowy w błonie komórkowej (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

CMC – krytyczne stężenie micelizacji (ang. *critical micelle concentration*)

CMV – promotor cytomegalowirusa (ang. *cytomegalovirus promotor*)

Co-IP – koimmunoprecypitacja (ang. *co-immunoprecipitation*)

CV – objętość złoża (ang. *column volumes*)

DAG – diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)

DDM – n-dodecylo- β -D-maltozyd (ang. *n-dodecylo-beta-D-maltozyd*)

DGKE – kinaza epsilon diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerol kinase epsilon*)

DIBMA – poli[diisobutylen-*alt*-(kwas maleinowy)] (ang. *poly[diisobutylene-*alt*-(maleic acid)]*)

DIBMALPs – natywne/polimerowe nanodyski/cząsteczki lipidowe (ang. *DIBMA lipid particles*)

DMEM – pożywka hodowlana (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

dNTP – trifosforan deoksynukleotydów (ang. *deoxyribonucleotide triphosphate*)

DTT – 1,4-diotreitol (ang. *1,4-dithiothreitol*)

E. coli – *Escherichia coli*, pałeczka okrężnicy

EDTA – kwas etylenogliko-bis(β-aminoetyloeter)-N,N,N,N'-tetraoctowy (ang. *2,2',2'',2'''-(ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid*)

EGTA – kwas etylenodiamino-N,N,N',N'-tetraoctowy (ang. *3,12-bis(carboxymethyl)-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecane-1,14-dioic acid*)

E_K – potencjału równowagi potasu (ang. *potassium balance potential*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ENaC – nabłonkowy kanał sodowy (ang. *epithelial sodium channel*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

GIRK – potasowy kanał prostowniczy sprzężony z białkiem G (ang. *G protein gated inward rectifying potassium channel*)

GPCR – receptor sprzężony z białkami G (ang. *G protein-coupled receptor*)

GPATCH8 – białko kodowane przez gen GPATCH8 (ang. *G-patch domain containing 8*)

H9c2 – linia komórkowa szczurzych kardiomioblastów (ang. *rat cardiomyoblast cell line*)

HEK293T – ludzka linia komórkowa, która pochodzi z embrionalnych komórek nerki (ang. *human embryonic kidney*)

HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy (ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

IK_{Ca} – kanały potasowe regulowane jonami wapnia o średnim przewodnictwie (ang. *intermediate conductance calcium-activated potassium channels*)

IMAC – chromatografia powinowactwa wobec jonów metali - metalopowinowactwo (ang. *ion metal affinity chromatography*)

IMPDH2 – dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu 2 (ang. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2*)

IP – immunoprecypitacja (ang. *immunoprecipitation*)

IPTG – izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd (ang. *isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside*)

K_{2P} – dwuporowe kanały potasowe (ang. *tandem pore domain potassium channels*)

K_{ATP} – kanał potasowy blokowany przez ATP (ang. *ATP inhibited potassium channel*)

K_{Ca} – kanał potasowy aktywowany jonami wapnia (ang. *calcium-activated potassium channels*)

K_{ir} – dokomórkowy prostowniczy kanał potasowy (ang. *inwardly rectifying potassium channel*)

K_v – kanał potasowy regulowany napięciem (ang. *voltage-gated potassium channel*)

lac – operon laktozowy (ang. *lac operon*)

LB – pożywka LB (ang. *lysogeny broth*)

LPA – kwas lizofosfatydowy (ang. *lysophosphatidic acid*)

mABC1 – mitochondrialne białko mające kasetę wiążącą ATP (*mitochondrial ATP binding cassette*)

MAMs – miejsce kontaktu pomiędzy siateczką śródplazmatyczną, a mitochondrium (ang. *mitochondrial associated membranes*)

mitoK_{ATP} – mitochondrialny kanał potasowy blokowany przez ATP (ang. *mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels*)

MDCK – modelowa linia komórek ssaków wykorzystywana w badaniach biomedycznych (ang. *Madin Darby Canine kidney cells*)

MPP – proteaza mitochondrialna (ang. *mitochondrial processing peptidase*)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. *messenger ribonucleic acid*)

MS – spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)

Myo – miozyna (ang. *myosin*)

NBD – domeny wiążące nukleotydy (ang. *nucleotide-binding domains*)

NHERF2 – kofaktor regulujący wymiennik sodowo-wodorowy (ang. *sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor*)

NKCC2 – kotransporter Na-K-2Cl (ang. *Na-K-2Cl cotransporter*)

NMWC0 - odcięcie nominalnej masy cząsteczkowej (ang. *nominal molecular weight cutoff*)

NP-40 – nonylofenoksypolietoksyetanol (ang. *nonylphenoxy polyethoxy ethanol*)

OD – gęstość optyczna (ang. *optical density*)

OG – oktylo- β -D-glukopiranozyd (ang. *n-octyl-beta-D-glucopyranoside*)

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)

OTC – transkarbamylaza ornityny (ang. *ornithine transcarbamylase*)

p53 – komórkowy antygen nowotworowy (ang. *cellular tumor antigen p53*)

PA – kwas fosfatydowy (ang. *phosphatidic acid*)

PARP1 – Polimeraza poli[ADP-rybozy] (ang. *poly[ADP-ribose] polymerase 1*)

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffer solution*)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PEG – glikol polietylenowy (ang. *polyethylene glycol*)

PEI – polietylenoimina (ang. *polyethylenimine*)

PFA – paraformaldehyd (ang. *paraformaldehyde*)

PIP₂ – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PKA – kinazy białkowe A (ang. *protein kinase A*)

PKC – kinazy białkowe C (ang. *protein kinase C*)

PLB – sztuczne błony lipidowe (ang. *planar lipid bilayer*)

PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

POPG – 1-Palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-(fosfo-rac-(1-glicerol)) (ang. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol))*)

PRDX1 – peroksyredoksyna-1 (ang. *peroxiredoxin 1*)

PVDF – difluorek poliwinylidenu (ang. *polyvinylidene difluoride*)

RCK – domena regulująca przepływ jonów K⁺ (ang. *regulators of K⁺ conductance domain*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

ROMK – (ang. *renal outer medullary K⁺ channel*)

RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SDH – dehydrogenaza bursztynianowa (ang. *succinate dehydrogenase*)

SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SID – domena samoodziałująca (ang. *self-interacting domain*)

SK_{Ca} – kanał potasowy regulowany jonami wapnia o małym przewodnictwie (ang. *small conductance calcium-activated potassium channels*)

SMA – poli[styren-co-(kwas maleinowy)] (ang. *poly[styrene-co-(maleic acid)]*)

SMAC – mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy (ang. *second mitochondria-derived activator of caspase*)

SMA-EA – (ang. *SMA-ethanolamine*)

SMALPs – natywne/polimerowe nanodyski/cząsteczki lipidowe (ang. *SMA lipid particles*)

SMA-QA – (ang. *styrene maleimide quaternary ammonium*)

SOC – kompletna pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii (ang. *super optimal catabolite repression*)

SPR – cząsteczka rozpoznająca sygnał (ang. *signal recognition particle*)

SUR – receptor sulfonilomocznika (ang. *sulfonilurea receptor*)

TAL – grube ramię wstępujące pętli Henlego (ang. *thick ascending limb*)

TBE – bufor Tris/boran/EDTA (ang. *Tris/borate/EDTA*)

TBS – sól fizjologiczna buforowana TRIS-em (ang. *TRIS-buffered saline*)

TEA – trietyloamina (ang. *triethylamine*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
(ang. *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*)

TFE – 2,2,2-trifluoroetanolu (ang. *2,2,2-trifluoroethanol*)

TIM – translokaza błony wewnętrznej (ang. *translocase of the inner membrane*)

TMD – domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*)

TOM – translokaza błony zewnętrznej (ang. *translocase of the outer membrane*)

Tris – 2-amino-2-hydroksymetylo-propan-1,3-diol (ang. *2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol*)

Triton X-100 – t-oktylofenoksy-polietyloetanol (ang. *t-octylphenoxypolyethoxyethanol*)

TurboID – kolejna z generacji metody biotynylacji białek sąsiadujących – metody BioID

Tween-20 – monolaurynian sorbitanu glikolu polietylenowego (ang. *polyethylene glycol sorbitan monolaurate*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet*)

VSD – domena czuła na napięcie (ang. *voltage-sensing domain*)

VU591 – 2,2'-oksybis(metyleno)bis(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol)
(ang. *2,2'-(oxydimethanediyl)bis(5-nitro-1H-benzimidazole)*)

WB – technika Western Blot

związek A – 5-(2-(4-(2-(4-(1H-tetrazol-1-ilo)fenylo)acetylo)piperazyn-1-ylo)etylo)izobenzofuran-1(3H-on)] (ang. *5-(2-(4-(2-(4-(1H-tetrazol-1-yl) phenyl) acetyl) piperazin-1-yl) ethyl) isobenzofuran-1 (3H)-one*)]

1. STRESZCZENIE

Niedotlenienie/reperfuzja serca oraz mózgu prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek i jest najczęstszą przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Wydaje się, że kanały mitochondrialne biorą udział w cytoprotekcji w czasie reperfuzy. Jednym z nich jest mitochondrialny kanał potasowy hamowany przez ATP (mitoK_{ATP}). Zaproponowano, że ROMK2 może być podjednostką mitoK_{ATP}. ROMK2 jest izoformą białka ROMK1 tworzącego kanały potasowe w błonie komórkowej. Kanały te oddziałują z wieloma białkami uczestniczącymi w regulacji ich aktywności i transporcie w komórce. Dotychczas niezidentyfikowane zostały żadne białka oddziałujące z ROMK2 w mitochondriach.

Głównym celem badań prezentowanych w tej rozprawie doktorskiej była identyfikacja białek wchodzących w skład najbliższego otoczenia kanału ROMK2. W tym celu wykorzystano metodę metody biotynylacji białek sąsiadujących. Wśród biotynylowanych białek znaleziono białka cytoplazmatyczne biorące m.in. udział w endocytozie, transporcie pęcherzykowym, stresie oksydacyjnym, syntezie nukleotydów, czy metabolizmie lipidów. Zidentyfikowano ponadto białka kompleksów translokaz uczestniczących w imporcie białek przez zewnętrzną i wewnętrzną błonę mitochondriów. Wśród podjednostek tych translokaz znaleziono kinazę acyloglicerolową (AGK), która oprócz importu polipolimerowych białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej uczestniczy w syntezie lipidów: kwasu lizofosfatydowego (LPA) oraz kwasu fosfatydowego (PA). Poprzez koimmunoprecypitację udowodniono istnienie kompleksu zawierającego ROMK2 i AGK.

Kolejnym celem były badania nad farmakologiczną modulacją aktywności kanału ROMK2. W celu realizacji tych badań białko ROMK2-6xHis produkowano w bakterii *Escherichia coli*; błony bakteryjne solubilizowano przy pomocy amfipatycznych kopolimerów, a białko kanałowe oczyszczono poprzez chromatografię metalopowinowactwa. Badania aktywności elektrycznej ROMK2-6xHis prowadzono stosując technikę planarnych dwuwarstw lipidowych. Sprawdzone wpływ znanych modulatorów kanału mitoK_{ATP} na aktywność białka ROMK2. Aktywność kanałowa ROMK2 stymulowana była przez aktywator mitoK_{ATP} diazoksyd i blokowana przez znane jego inhibitory, tj. ATP/Mg²⁺, 5-HD oraz glibenklamid. Wyniki te są zgodne z hipotezą, że białko ROMK2 może być podstawową jednostką budującą mitoK_{ATP}. Badania te dodatkowo wykazały, że wpływ tych modulatorów był bezpośredni, a nie związany z obecnością białek akcesoryjnych. W końcu wykazano funkcjonalną interakcję pomiędzy ROMK2, a AGK, gdyż produkty enzymatycznej aktywności białka AGK, tj. LPA i PA regulowały aktywność kanału ROMK2.

2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)

Hypoxia/reperfusion of the heart and brain tissues leads to cell injury and necrosis and is the most common cause of death in developed countries. Mitochondrial channels are implicated in cytoprotection during reperfusion. One of them is the mitochondrial potassium channel inhibited by ATP (mitoK_{ATP}). It was proposed that the ROMK2 protein may be a pore-forming subunit of the mitoK_{ATP} channel. ROMK2 is an isoform of the ROMK1 protein that forms rectifying potassium channels in the plasma membrane. These channels interact with many proteins involved in the regulation of their activity, or in their trafficking. However, protein partners of the ROMK2 channel have not been identified so far.

The main aim of the research presented in this doctoral dissertation was the identification of proteins that are part of the mitochondrial proxisome of the ROMK2 channel. For this purpose, proximity biotinylation was used. Among the biotinylated proteins, cytoplasmic proteins have been identified that participate among others in endocytosis, vesicular transport, oxidative stress, nucleotide synthesis, or lipid metabolism. In addition, subunits of inner and outer mitochondrial membrane translocases have been identified. These complexes allow the import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. Among them, acylglycerol kinase (AGK) was found, which is involved in the transport of polytopic proteins into the inner mitochondrial membrane. AGK is a dual-function protein and participates also in the synthesis of lipids: lysophosphatidic acid (LPA) and phosphatidic acid (PA). The occurrence of a complex containing ROMK2 and AGK was supported by co-immunoprecipitation.

Another goal was to investigate the pharmacological modulation of ROMK2 channel activity. To carry out these studies the ROMK2-6xHis protein was produced in bacteria *Escherichia coli*; bacterial membranes were solubilized with amphipathic copolymers, and the channel protein was purified by immobilized metal affinity chromatography. To study the electrical activity of ROMK2-6xHis the planar lipid bilayer technique was used. The impact of known mitoK_{ATP} channel modulators on the activity of the ROMK2 protein was tested. The ROMK2 channel was activated by the mitoK_{ATP} activator – diazoxide and blocked by mitoK_{ATP} inhibitors, i.e. ATP/Mg²⁺, 5-HD, and glibenclamide. These results confirmed that the ROMK2 protein may be a pore-forming subunit of mitoK_{ATP}. Additionally, it was shown that the influence of these modulators was not related to the presence of accessory proteins of ROMK channels. Finally, a functional interaction between ROMK2 and AGK was demonstrated. The activity of the ROMK2 channel was regulated by the products of the enzymatic activity of the AGK protein, i.e. LPA and PA.

3. WSTĘP

3.1. KANAŁY POTASOWE

Kanały jonowe umożliwiają przepływ jonów przez błony biologiczne określając w ten sposób homeostazę jonową. W błonach komórkowych znajduje się wiele różnych typów kanałów jonowych, zarówno nioselektywnych, jak i selektywnych wobec określonych kationów lub anionów (Alexander i wsp.; 2011, Petkov, 2009). Szeroką grupę wśród nich stanowią kanały potasowe znajdujące się praktycznie we wszystkich komórkach, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych (Kuang i wsp., 2015; Dreyer i wsp. 2011; Miller, 2000), gdzie pełnią bardzo różne funkcje. Wynika to z dużej różnorodności kanałów potasowych (González i wsp., 2012).

Wykrycie w 1998 roku przez Roderick'a MacKinnon'a prokariotycznego kanału potasowego KcsA z *Streptomyces lividans* pozwoliło na ustalenie jego struktury (Doyle i wsp., 1998). Kanał KcsA jest homotetramerem, w którym każda podjednostka zbudowana jest z dwóch helis transbłonowych połączonych tzw. pętlą P (TM1-P-TM2) (MacKinnon, 1991; Ketchum i wsp., 1995). Określono, że por kanału umiejscowiony w środku tetrameru składa się z filtra selektywności oraz hydrofobowej bramki (Aryal i wsp., 2015). Filtr selektywności utworzony jest przez pętle P każdej z podjednostek zawierającej identyczną dla wszystkich kanałów potasowych sekwencję -TVGYG-, która tworzy specyficzne miejsce wiązania dla 4 jonów potasu (Renart i wsp., 2019). Bramka kanału KcsA utworzona jest przez dystalne części czterech helis transbłonowych TM2, które krzyżując się zamykają por kanału (Doyle i wsp., 1998). Kanał KcsA jest białkiem o topologii domen tworzących por wspólnej dla wszystkich znanych kanałów potasowych (Heginbotham i wsp., 1994; MacKinnon i wsp., 1998). Uważa się zatem, że KcsA jest prototypowym, najstarszym ewolucyjnie kanałem potasowym (Doyle i wsp., 1998). W czasie ewolucji sekwencja tworząca por kanału (TM1-P-TM2) ulegała fuzji z szeregiem domen regulatorowych odpowiadających za wrażliwość kanałów potasowych na różne bodźce (Moulton i wsp., 2003, Tikhonov i wsp., 2018). Ze względu na budowę domenową i podstawowe właściwości wyróżniono cztery różne grupy kanałów potasowych.

Pierwszą grupę stanowią kanały potasowe regulowane napięciem – K_v (ang. *voltage-gated potassium channel*). Kanały K_v stanowią największą grupę w komórkach ssaczy (Yu i wsp., 2005) i mogą być zarówno homo-, jak i heterotetramerami podjednostek porowych α . Każda podjednostka α zbudowana jest z sześciu helikalnych segmentów transbłonowych (S1-S6). Pierwotna podjednostka TM1-P-TM2 odpowiada segmentom S5-P-S6. Helisy S1-S4 tworzą natomiast domenę czuła na napięcie

(VSD, ang. *voltage-sensing domain*), w której amfipatyczna helisa S4 zawiera dodatkowo naładowane reszty argininy odpowiadające ze zależność kanału od napięcia (Århem, 2004). Na podstawie ewolucji genów kodujących kanały K_v pogrupowano w 12 podrodzin (K_v1 - K_v12) kodujących ponad 40 różnych białek (Gutman i wsp., 2005). Dodatkowo centralne podjednostki α mogą asocjować z peryferyjnymi podjednostkami β wpływającymi na własności i/lub lokalizację kanału (Bachmann i wsp., 2020).

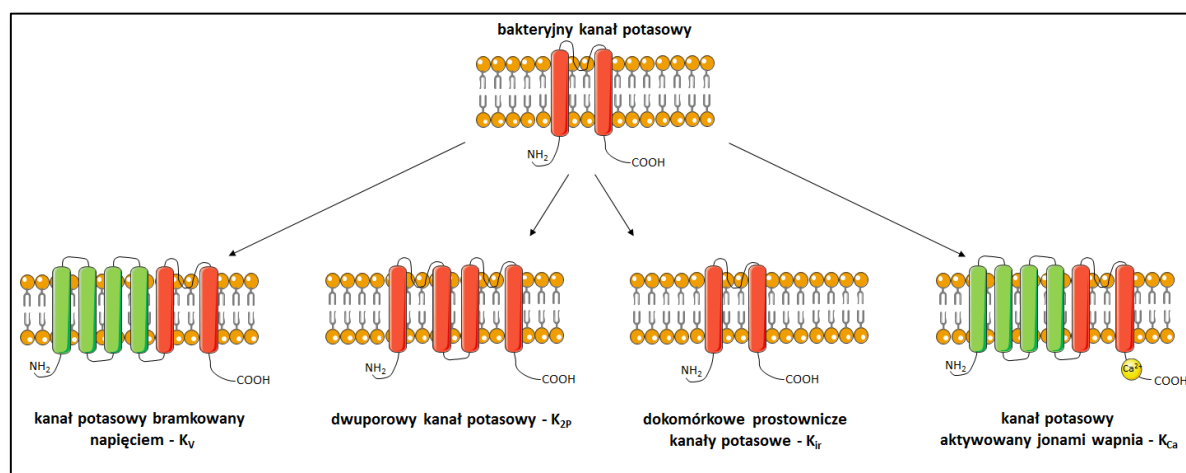
Drugą grupę stanowią kanały potasowe aktywowane jonami wapnia - K_{Ca} (ang. *calcium-activated potassium channels*), które tworzą niejednorodną rodzinę kanałów jonowych o zmiennych właściwościach. Kanały K_{Ca} są tetrametrami podjednostek α , a każda z nich zbudowana jest z sześciu lub siedmiu domen transbłonowych. Analiza filogenetyczna ujawnia, że kanały K_{Ca} należą do dwóch dobrze zdefiniowanych grup wśród których wyróżniamy tzw. kanały SK (ang. *small conductance*) oraz podrodzinę kanałów *Slo* (Wei i wsp., 2005). Pierwsza podgrupa obejmuje tzw. kanały SK: $K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$, $K_{Ca2.3}$ (Köhler i wsp., 1996) oraz kanał IK (ang. *intermediate conductance*) - $K_{Ca3.1}$ (Ishii i wsp., 1997). Kanały te zbudowane są z sześciu helis transbłonowych (S1-S6), a C- oraz N-koniec znajduje się wewnątrz komórki (Hirschberg i wsp., 1999). Mimo obecności helis S1-S4 kanały IK są niewrażliwe na napięcie, bramkowane są natomiast przez submikromolowe stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , które nie są wiązane bezpośrednio do podjednostki kanału, a do kalmoduliny zasocjowanej do jej C-końca (Xia i wsp., 1998; Fanger i wsp., 1999).

Druga podgrupa to kanały typu *Slo*, która obejmuje: $K_{Ca1.1}$ (*Slo* lub *Slo1*), $K_{Ca4.1}$ (*Slack* lub *Slo2.2*), $K_{Ca4.2}$ (*Slick* lub *Slo2.1*) i $K_{Ca5.1}$ (*Slo3*) (Wei i wsp., 2005). Topologia podjednostki α kanału $K_{Ca1.1}$ różni się od grupy SK/IK obecnością dodatkowej helisy transbłonowej S0 kierującej N-koniec na zewnętrzną stronę błony komórkowej (Latorre i wsp., 2017). Dodatkowo kanały *Slo* mogą tworzyć kompleksy z podjednostkami pomocniczymi β odpowiedzialnymi m.in. za ich własności biofizyczne, a także profil farmakologiczny (Behrens i wsp., 2000, Xia i wsp., 2000; Gonzalez-Perez i wsp., 2019). W przypadku kanału $K_{Ca1.1}$ uważa się, że w wiązaniu wapnia pośredniczą co najmniej trzy miejsca wiązania kationów dwuwartościowych znajdujące się w cytoplazmatycznej domenie karboksylowej każdej podjednostki kanałowej. Dwa niezależne miejsca wiązania Ca^{2+} o wysokim powinowactwie są tworzone przez ujemnie naładowany fragment na dystalnym C-końcu (Schreiber i wsp., 1997) oraz w obrębie pierwszej domeny RCK (domena regulująca przepływ jonów K^+ , ang. *regulators of K^+ conductance domain*) kodowanej w proksymalnej części C-końca (Bao i wsp., 2002). Trzecie miejsce wiązania dwuwartościowego kationu, jednakże o niskim powinowactwie, znajduje się również

w pierwszej domenie RCK, co przyczynia się do aktywacji kanału przez wysokie stężenia (>1 mM) jonów: Mg^{2+} oraz Ca^{2+} (Shi i wsp., 2002). Kanały te aktywowane są również przez zmiany potencjału błonowego, a nie tylko przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Kanały potasowe aktywowane jonami wapnia, które dodatkowo są również regulowane napięciem, podzielono dodatkowo na trzy klasy opierając się na ich przewodności jednostkowej: o małym przewodnictwie (SK_{Ca} , ang. *small conductance calcium-activated potassium channels*), o średnim przewodnictwie (IK_{Ca} , ang. *intermediate conductance calcium-activated potassium channels*) oraz o dużym przewodnictwie (BK_{Ca} , ang. *big conductance calcium-activated potassium channels*). Kanały te różnią się między sobą nie tylko przewodnictwem (SK_{Ca} : 4 -14 pS; IK_{Ca} : 32 - 39 pS; BK_{Ca} : 200 - 300 pS), ale również występowaniem tkankowym i profilami farmakologicznymi (Kshatri i wsp., 2018). Kanały $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$ oraz $K_{Ca5.1}$ zostały uwzględnione w tej nomenklaturze, ponieważ strukturalnie, jednak nie funkcjonalnie, są spokrewnione z kanałem $K_{Ca1.1}$ (Wei i wsp., 2005). Kanały $K_{Ca4.2}$ oraz $K_{Ca4.1}$ są aktywowane przez wewnątrzkomórkowe jony Na^+ i Cl^- (Yuan i wsp., 2003), a kanał $K_{Ca5.1}$ jest aktywowany przez wewnętrzną alkalizację (OH^-) (Schreiber i wsp., 1998). Pomimo tego, iż są one strukturalnie spokrewnione z kanałem $K_{Ca1.1}$, to są niewrażliwe na jony wapnia, dlatego też poprawnie nie powinny być opisywane jako kanały „aktywowane wapniem” na podstawie kryteriów funkcjonalnych.

Trzecią grupę stanowią tzw. dwuporowe kanały potasowe - K_{2P} (ang. *tandem pore domain potassium channels*). W przeciwieństwie do pozostałych kanałów potasowych, kanały K_{2P} są dimerami (Lesage i wsp., 1997). Podjednostka kanału K_{2P} charakteryzuje się obecnością dużej zewnątrzkomórkowej pętli zidentyfikowanej już we wczesnych badaniach jako tzw. domena samoodziałująca (SID, ang. *self-interacting domain*), która jest istotna w asocjacji podjednostek K_{2P} do funkcjonalnych dimerów (Miller i wsp., 2012). Pojedyncza podjednostka K_{2P} zbudowana jest z czterech segmentów transbłonowych i dwóch pętli P tworzących filtr selektywności dla jonów potasu (Buckingham i wsp., 2005). Kanały K_{2P} mogą być regulowane przez wiele różnych czynników, tj. pH, czy też temperatura (Enyedi i wsp., 2010). Ponadto niektóre kanały K_{2P} charakteryzują się również niewielką zależnością prawdopodobieństwa otwarć od napięcia (Enyedi i wsp., 2010). Dodatkowo są one wrażliwe na klasyczne blokery kanałów potasowych, np. czwartorzędowe związki aminowe, jednakże dla większości kanałów typu K_{2P} nadal nie ma zidentyfikowanych silnych i wysoce selektywnych modulatorów aktywności (Decher i wsp., 2021). Na podstawie podobieństwa sekwencji oraz podobieństwa strukturalnego kanały K_{2P} podzielono na 6 podrodzin – TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK i TRESK (Enyedi i wsp., 2010).

Ostatnią, czwartą grupę stanowią dokomórkowe prostownicze kanały potasowe - K_{ir} (ang. *inwardly rectifying potassium channel*). Kanały te mogą być homo- lub też heterotetramerami. Każda z podjednostek zbudowana jest tylko z dwóch domen transbłonowych połączonych pętlą P. Budowa ta jest identyczna jak prototypowego kanału KcsA. Kanały K_{ir} charakteryzują się nieliniową zależnością prądowo- napięciową. Występuje tu tzw. mechanizm dokomórkowej rektyfikacji, to znaczy że bezwzględna wartość dokomórkowego prądu K^+ płynącego przy potencjałach niższych od potencjału równowagi potasu (E_K) jest większa od bezwzględnej wartości odkomórkowego prądu K^+ płynącego przy potencjałach wyższych niż E_K . Rektyfikacja ta spowodowana jest poprzez zależne od napięcia blokowanie poru kanału przez dwuwartościowe jony wewnątrzkomórkowe Mg^{2+} oraz poliaminy, takie jak spermina i putrescyna. Ponadto na rektyfikację wpływ ma również zewnętrzne, jak i wewnętrzne stężenie jonów potasu. Przewodnictwo kanałów K_{ir} nieliniowo wzrasta wraz ze wzrostem pozakomórkowego stężenia jonów potasu (Hibino i wsp., 2010a; Weaver i wsp., 2021). Dokładniej kanały potasowe z rodziny K_{ir} zostały opisane w kolejnym rozdziale.



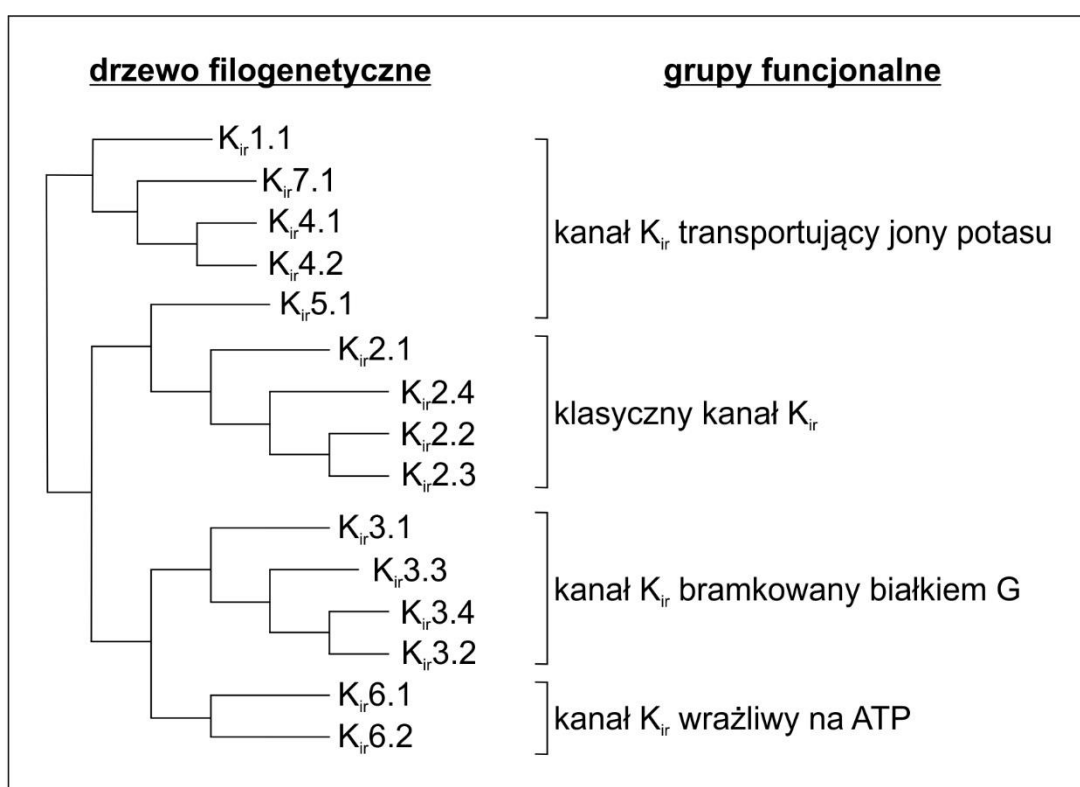
Rycina 1. Schematyczne przedstawienie topologii poszczególnych typów kanałów potasowych wywodzących się z hipotetycznego ortologa - bakteryjnego kanału potasowego KcsA.

3.2. KANAŁY POTASOWE Z RODZINY K_{ir}

Białka z rodziny K_{ir} wykazują wiele podobnych właściwości funkcjonalnych i charakteryzują się zbliżoną budową, jednakże dzięki wyspecjalizowanym cechom biorą udział w wielu różnych procesach fizjologicznych, takich jak: utrzymanie prawidłowego tętna, czy też napięcia naczyniowego, jak również w sygnalizacji neuronalnej oraz wydzielaniu hormonów. O fizjologicznej istotności kanałów K_{ir} świadczą badania wykazujące, że mutacje

kanałów K_{ir} powodują choroby, w tym m. in.: dziedziczne zaburzenia rytmu serca, hipoglikemię hiperinsulinomiczną, czy też cukrzycę noworodkową (Welling i wsp., 2009; Weaver i wsp., 2021).

U ssaków kanały K_{ir} są kodowane przez 16 różnych genów pogrupowanych w 7 podrodzin, od $K_{ir}1.x$ do $K_{ir}7.1$, wśród których dodatkowo zidentyfikowano alternatywne izoformy (González i wsp., 2012). Kanały K_{ir} można też zaklasyfikować do czterech grupy funkcjonalnych (Rycina 2) (Hibino i wsp., 2010a).



Rycina 2. Klasyfikacja dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (K_{ir}) i ich drzewo filogenetyczne. Kanały K_{ir} składają się z 15 podtypów, które można podzielić na siedem rodzin oraz cztery grupy ze względu na pełnione funkcje.

Pierwszą grupę stanowią klasyczne kanały K_{ir} , do których zaliczamy kanały $K_{ir}2.x$. Kanał $K_{ir}2.1$ był pierwszym zidentyfikowanym kanałem z tej grupy i właśnie na jego podstawie określona została struktura kanałów K_{ir} (Kubo i wsp., 1993). Kanały $K_{ir}2.x$ charakteryzują się silną rektyfikacją (Stanfield i wsp., 1994). Początkowo uważano, że kanały $K_{ir}2.x$ składają się wyłącznie z kompleksów homomerycznych (Tinker i wsp., 1996), jednakże późniejsze badania wykazały, że podjednostki $K_{ir}2.x$ mogą funkcjonować jako heterotetramery zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Eksperymenty elektrofizjologiczne *in vivo*

wykazały, że każdy z $K_{ir}2.1$, $K_{ir}2.2$ oraz $K_{ir}2.3$ może tworzyć kompleks z dowolną inną podjednostką i utworzony wówczas heterotetramer wykazuje inne właściwości niż homomer (Preisig-Müller i wsp., 2002, Hibino i wsp., 2010a).

Następną grupę stanowią kanały $K_{ir}3.x$, których aktywność jest regulowana przez interakcje z białkami G (GPCR, ang. *G protein-coupled receptor*). To właśnie dzięki tej interakcji kanały $K_{ir}3.x$ uzyskały swoją bardziej powszechną nazwę GIRK (ang. *G protein gated inward rectifying potassium channel*). Tworzone są one przez kombinacje czterech podjednostek od $K_{ir}3.1$ do $K_{ir}3.4$ (GIRK1-GIRK4) i mogą formować zarówno heterotetramery (GIRK1/2, GIRK1/3, GIRK1/4, GIRK2/3, GIRK2/4), jak również homotetramery GIRK2 oraz GIRK4. Podjednostki $K_{ir}3.1$ (GIRK1) oraz $K_{ir}3.3$ (GIRK3) nie są w stanie samodzielnie tworzyć niezależnych funkcjonalnych kanałów. Mogą one natomiast tworzyć integralną podjednostkę heterotetramerów $K_{ir}3.1/K_{ir}3.3$ oraz $K_{ir}3.2/K_{ir}3.3$, dzięki czemu kanały te uzyskują odmienne właściwości funkcjonalne. Pozwala to na zróżnicowaną sygnalizację, w której pośredniczą kanały GIRK w różnych rejonach mózgu i typach komórek (Tipps i wsp., 2015; Dascal i wsp., 2015).

Wyróżniono również grupę kanałów K_{ir} wrażliwych na ATP, które tworzone są przez $K_{ir}6.x$. Cztery podjednostki $K_{ir}6.x$ ($K_{ir}6.1$ lub $K_{ir}6.2$), tworzące por kanału jonowego, wchodzi w interakcje z czterema podjednostkami peryferyjnymi SUR1, SUR2A lub SUR2B (receptor sulfonilomocznika, ang. *sulfonilurea receptor*) formując funkcjonalny oktamery (Inagaki i wsp., 1995). $K_{ir}6.x$ tworzy por kanału, a podjednostki SUR regulują jego aktywność (Babenko i wsp., 1998). Podjednostki SUR zawierają 17 helis transbłonowych zgrupowanych w trzy domeny transbłonowe (TMD0, TMD1, TMD2). Każda podjednostka SUR posiada dwie domeny wiążące nukleotydy (NBD, ang. *nucleotide-binding domains*). Jedna z nich znajduje się pomiędzy domenami TMD1 oraz TMD2 (NBD1), a druga zlokalizowana jest na C-końcu domeny TMD2 (NBD2). Podjednostki SUR1 i SUR2 różnią się między sobą sekwencją, natomiast podjednostki SUR2A oraz SUR2B różnią się między sobą tylko 42 aminokwasami na C-końcu (Scorziello, 2009). Różnorodność kanałów SUR/ $K_{ir}6.x$ wynika z połączenia różnych podtypów SUR i $K_{ir}6.x$. Kanały zawierające podjednostki $K_{ir}6.1$ różnią się od kanałów z podjednostką $K_{ir}6.2$ głównie mniejszym przewodnictwem jednostkowym. Kompleksy kanałowe zawierające SUR1 lub SUR2 różnią się wrażliwością na sulfonilomoczniki, podczas gdy kanały zawierające SUR2A różnią się od kanałów SUR2B wrażliwością na diazoksyd (Babenko i wsp., 1998). Regulacja oktametrycznego kompleksu $K_{ir}6.x/SURx$ przez nukleotydy adeninowe jest skomplikowana. Mianowicie ATP/ Mg^{2+} oraz ADP aktywują kanał poprzez interakcję z podjednostkami SUR, podczas gdy wiązanie ATP

z podjednostką $K_{ir}6.x$ ma efekt hamujący (Nichols i wsp., 1996; Inagaki i wsp., 1995; Babenko i wsp., 1998).

Kolejną grupę stanowią kanały K_{ir} biorące udział w tzw. „recyklingu” jonów potasu związanym z działaniem pompy sodowo-potasowej, do których należą $K_{ir}1.1$, $K_{ir}4.x$, $K_{ir}5.x$ oraz $K_{ir}7.1$ (Hibino i wsp., 2010a).

Kanał $K_{ir}7.1$ został zidentyfikowany w komórkach nabłonka i różni się od pozostałych przedstawicieli rodziny K_{ir} nie tylko pod względem sekwencji, ale również właściwości funkcjonalnych, m.in. jego przewodnictwo jest praktycznie niezależne od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu (Döring i wsp., 1998). Jest on jednym z ostatnio odkrytych kanałów rodziny K_{ir} , dlatego też nie został jeszcze dobrze poznany. Jego niska wrażliwość na jony baru i bardzo małe przewodnictwo jednostkowe (50 fS) utrudnia jego scharakteryzowanie (Krapivinsky i wsp., 1998).

Podjednostki $K_{ir}4.x$ mogą tworzyć homotetramery lub heterotetramery wraz z $K_{ir}5.1$ (Hibino i wsp., 2004). Homotetramery $K_{ir}4.1$ charakteryzują się pośrednią rektyfikacją, która zamienia się w silną rektyfikację w kanałach heterotetramerycznych zawierających podjednostki $K_{ir}5.1$ (Pessia i wsp., 2001; Tanemoto i wsp., 2000; Marmolejo-Murillo i wsp., 2021). Białko $K_{ir}5.1$ nie jest w stanie samodzielnie tworzyć funkcjonalnych kanałów i odgrywa tylko rolę modulującą w połączeniu z $K_{ir}4.1$ lub $K_{ir}4.2$ (Pessia i wsp., 2001).

Kanał $K_{ir}1.1$ został opisany dokładniej w punkcie 3.3.

3.2.1. Farmakologia kanałów K_{ir}

Przewodnictwo wszystkich kanałów K_{ir} , z wyjątkiem $K_{ir}7.1$ (Döring i wsp., 1998, Krapivinsky i wsp., 1998), wzrasta wraz ze wzrostem pozakomórkowego stężenia jonów potasu (Lopatin and Nichols, 1996, Périer i wsp., 1994), jednak do utrzymania prawidłowego działania większości kanałów K_{ir} niezbędna jest obecność fosfoinozytydów błonowych, a w szczególności 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2 , ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (Hilgemann i wsp., 1996; Hilgemann i wsp., 2001). PIP_2 wiąże się bezpośrednio do zwróconej do błony komórkowej powierzchni kanału w bogatym w lizyny i argininy miejscu wiązania, które jest wysoce homologiczne wśród wszystkich kanałów K_{ir} (Stansfeld i wsp., 2009; Soom i wsp., 2001).

Kanały K_{ir} blokowane są przez wewnątrzkomórkowe jony Mg^{2+} (Lu i wsp., 1994) oraz poliaminy (spermina, spermidyna, putrescyna i kadaweryna) (Lopatin i wsp., 1994; Baronas i wsp. 2014). Przy potencjałach depolaryzujących przedostają się one w wyniku elektrodyfuzji z cytoplazmy do poru kanału i wiążą się w pobliżu filtra selektywności blokując przepływ

jonów potasu, co skutkuje dokomórkową rektyfikacją (Kurata i wsp., 2006). Z powodu subtelnych różnic w chemii miejsca wiązania powinowactwo do Mg^{2+} i poliamin, jak również stopień dokomórkowej rektyfikacji różnią się znacznie wśród różnych członków rodziny kanałów K_{ir} (Wible i wsp., 1994).

Wewnątrzkomórkowe i/lub zewnątrzkomórkowe zmiany pH mogą regulować kanały K_{ir} , głównie $K_{ir1.1}$, $K_{ir2.3}$ oraz kanały zawierające podjednostkę $K_{ir4.1}$. Kanały te są aktywowane przez wewnątrzkomórkową i zewnątrzkomórkową alkalizację (Qu i wsp., 2000; Zhu i wsp., 1999; Hughes i wsp., 2000). Kanały zawierające podjednostkę $K_{ir3.2}$ lub $K_{ir3.4}$ mogą być również aktywowane przez wewnątrzkomórkowe jony sodu (Ho i wsp., 1999).

Innym mechanizmem regulacji niektórych kanałów K_{ir} jest fosforylacja przez kinazy białkowe typu A (PKA) oraz C (PKC) (Henry i wsp., 1996; Karle i wsp., 2002). Kanały $K_{ir2.3}$ są hamowane poprzez aktywację PKC, natomiast kanały $K_{ir2.2}$ są hamowane poprzez aktywację kinaz Src w sposób niezależny od PKC (Zitron i wsp., 2008).

Najczęściej stosowanymi blokerami większości kanałów potasowych, w tym również kanałów K_{ir} , są jony Cs^+ oraz Ba^{2+} , które działają w sposób zależny od napięcia (Isomoto i wsp., 1997; Oliver i wsp., 1998). W stężeniach mikromolowych jony baru są specyficzne dla kanałów K_{ir} , jednakże wrażliwość zależna jest od typu kanału K_{ir} (Franchini i wsp., 2004).

Niektóre klasyczne inhibitory kanałów potasowych, tj. trietyloamina (TEA) lub 4-aminopirydyna (4-AP) mają niewielki wpływ na aktywność kanałów K_{ir} (Hibino i wsp., 2010b).

Znanych jest szereg syntetycznych drobnocząsteczkowych blokerów dla poszczególnych grup kanałów, np. dla kanałów $K_{ir2.x}$ – pentamidyna (De Boer i wsp., 2010) oraz ML133 (Wang i wsp., 2011a), a dla kanału $K_{ir4.1}$ – fluoksetyna (Ohno i wsp., 2007) i nortryptylina (Su i wsp., 2007).

3.3. KANAŁ $K_{ir1.1}$

W 1993 roku Ho i Hebert (Ho i wsp., 1993) odkryli w komórkach nabłonka kanalików nerek kanał $K_{ir1.1}$ znany również pod nazwą ROMK (ang. *renal outer medullary K^+ channel*), który kodowany jest przez gen *KCNJ1*. Kanał ten był pierwszym sklonowanym i funkcjonalnie scharakteryzowanym białkiem z rodziny K_{ir} (Ho i wsp., 1993).

Kanał $K_{ir1.1}$ jest homotetramerem o klasycznej topologii TM1-P-TM2. Domeny transbłonowe zakończone są zlokalizowanymi w cytoplazmie krótkim N- i długim C-końcem, w obrębie którego znajduje się miejsce wiązania ATP. Dodatkowo w części transbłonowej

znajduje się miejsce odpowiedzialne za wiązanie PIP₂. Po stronie cytoplazmatycznej znajdują się również sekwencje rozpoznawane przez odpowiednie kinazy (Welling i wsp., 2009).

3.3.1. Ekspresja tkankowa i fizjologiczna rola ROMK (K_{ir}1.1)

Gen KCNJ1, kodujący kanał ROMK, podlega ekspresji w wielu różnych tkankach, jednak zdecydowanie najwięcej jego transkryptu znajduje się w nerce (Kubo i wsp., 1993). W szczególności ulega on ekspresji w błonie światła grubego ramienia wstępującego pętli Henlego (TAL, ang. *thick ascending limb*), kanalikule łączącym i kanalikule zbiorczym nefronu, gdzie pośredniczy w wydzieleniu potasu do moczu (Hebert i wsp., 2005; Welling i wsp., 2009). Jednakże badania RT-PCR wykazały również jego obecność w mięśniach szkieletowych, trzustce, śledzionie, mózgu, sercu oraz w wątrobie (Kubo i wsp., 1993).

Kanał ROMK bierze nie tylko udział w utrzymaniu potencjału błonowego, ale również w regulacji stężenia jonów K⁺, Na⁺ oraz Cl⁻. W TAL kanał ROMK powoduje zwrotny napływ jonów potasu, który wymagany jest przez kotransporter Na-K-2Cl (NKCC2) do transportu NaCl, jednocześnie przyczyniając się do parakomórkowego transportu jonów sodu i reabsorpcji jonów wapnia. Natomiast w kanalikule łączącym i przewodzie zbiorczym kory nerkowej kanał ROMK jest elektrycznie sprzężony ze ścieżką reabsorpcji sodu, w której pośredniczy nabłonkowy kanał sodowy (ENaC, ang. *epithelial sodium channel*). Reabsorpcja sodu depolaryzuje potencjał błony, a tym samym zwiększa elektrochemiczną siłę napędową dla wydzielenia jonów potasu przez kanał ROMK (Hebert i wsp., 2005, Wang i wsp., 2009).

Mutacje ROMK skutkujące utratą funkcji powodują typ II zespołu Barttera - przedporodowy zespół Barttera (ABS, ang. *antenatal Bartter syndrome*), co potwierdza zależność reabsorpcji NaCl od regulacji stężenia jonów potasu za pośrednictwem kanału ROMK (Károlyi i wsp., 1997; Simon i wsp., 1996). Nosiciele autosomalnych recesywnych mutacji w genie KCNJ1 wykazują również inne zespoły chorobowe, tj.: hiperkalciuria, zasadowica metaboliczna (nieoddechowa), czy też hipokaliemia (Peters i wsp., 2002).

Z drugiej strony, nosiciele mutacji powodujących utratę funkcji ROMK mają obniżone ciśnienie krwi i zmniejszone ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego przed 60 rokiem życia (Ji i wsp., 2008). Wykazano również uczestnictwo kanałów ROMK w wydzieleniu kwasu żołądkowego poprzez oddziaływanie z podjednostką β ATP-azy H⁺/K⁺. U myszy z niedoborem kanałów ROMK morfologia i ultrastruktura błony śluzowej żołądka była prawidłowa, jednakże nie obserwowano wydzielenia kwasu żołądkowego (Vucic i wsp., 2015).

Powyższe badania sugerują, że częściowe zmniejszenie funkcji ROMK może zapobiegać niektórym jednostkom chorobowym. Oczekuje się zatem, że inhibitory ROMK mogą reprezentować nową klasę leków moczopędnych w leczeniu nadciśnienia i niewydolności serca. Grupa badawcza Tang'a we współpracy z firmą Merck (Tang i wsp., 2016) opracowała związek MK-7245 wykazujący się dużą selektywnością wobec ROMK. Wykazywał on ponadto biodostępność po podaniu doustnym oraz obniżał skurczowe ciśnienie krwi u szczurów z samoistnym nadciśnieniem. Skuteczność MK-7145 w obniżaniu ciśnienia krwi była porównywalna do działania moczopędnego hydrochlorotiazidu (Tang i wsp., 2016). Potwierdza to fakt, iż farmakologiczne inhibitory kanału ROMK mogą stanowić nową klasę leków działających poprzez regulację aktywności tego kanału.

3.3.2. Właściwości elektrofizjologiczne $K_{ir}1.1$

Heterologiczna ekspresja białka ROMK w oocytach *Xenopus* pokazała, iż kanał ten charakteryzuje się przewodnictwem na poziomie około 35 pS, wysokim prawdopodobieństwem otwarcia i słabą dokomórkową rektyfikacją (Ho i wsp., 1993; Nichols i wsp., 1994).

Aktywność białka ROMK może być regulowana przez wiele różnych substancji, charakteryzujących się mniejszą lub większą specyficznością. Badania wykazały, że PIP_2 jest niezbędny do aktywacji kanału ROMK (Huang i wsp., 1998), a przeciwciała anti- PIP_2 hamują jego aktywność (Liou i wsp., 1999). Podobnie jak wiele innych kanałów, również ROMK jest wrażliwy na pH. Nadmiar jonów wodorowych ($pH < 6$) hamuje aktywność białka ROMK wywołując tym samym długotrwały stan zamknięty (Choe i wsp., 1997; McNicholas i wsp., 1998).

Białko $K_{ir}1.1$ nie jest klasycznym kanałem K_{ATP} , jednakże ze względu na bliskie podobieństwa do białek $K_{ir}6.x$ sprawdzono wpływ ATP na jego aktywność. Niektóre badania wykazały, że ATP nie wpływa bezpośrednio na aktywność białka ROMK, jednak gdy białko ROMK tworzyło kompleks z CFTR wówczas aktywność takiego kompleksu regulowana była przez ATP (Lu i wsp., 2006; Ruknudin i wsp., 1998). W kontraście do tych badań w innych doświadczeniach pokazano, że regulacja aktywności ROMK przez ATP jest skomplikowana i oprócz udziału tej cząsteczki w regulacji aktywności kanału poprzez fosforylację (patrz poniżej) ATP blokuje aktywność izoformy kanału ROMK2 przez bezpośrednie wiązanie się w obrębie hipotetycznego motywu Walkera (McNicholas i wsp., 1996; Vanoye i wsp., 2002). Pokazano również, że ATP i PIP_2 konkurują o wiązanie

do C-końcowej części białka ROMK (aminokwasy 183-391) (Dong i wsp., 2002; MacGregor i wsp., 2002).

Jak już wspomniano aktywność białka ROMK zależy od fosforylacji, w szczególności przez PKA (McNicholas i wsp., 1994; Xu i wsp., 1996), co związane jest z obecnością miejsc fosforylacji dla PKA w obrębie końców cytoplazmatycznych ROMK. Wykazano, że fosforylacji ulegają reszty seryn Ser219 i Ser313 na C-końcu oraz Ser44 na N-końcu (Xu i wsp., 1996). Wydaje się, iż to właśnie fosforylacja kontroluje proces bramkowania kanału $K_{ir}1.1$ poprzez wcześniej wspomniane czynniki modulujące: pH (Leipzig i wsp., 2000), ATP (Lu i wsp., 2006) oraz PIP_2 (Liou i wsp., 1999). Również kinaza białkowa C (PKC) reguluje aktywność ROMK i jej aktywacja prowadzi do zahamowania aktywności kanału (Zeng i wsp., 2003).

3.3.3. Farmakologia kanału ROMK

Pierwszym odkrytym inhibitorem kanału $K_{ir}1.1$ była tertiapina - peptydowa toksyna zawierająca 21 reszt aminokwasowych. Pierwotnie została ona wyizolowana z jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera*), jednakże obecnie dostępny jest również jej syntetyczny analog. Tertiapina jest silnym inhibitorem (stężenia efektywne 10-100 nM), jednakże nie jest w pełni selektywna, gdyż blokuje również aktywności kanału $K_{ir}3.x$ (Jin i wsp., 1998). Poprzez mutacje Met13Gln uzyskano tertiapinę Q wykazującą wyższe powinowactwo do ROMK (3 – 30 nM) (Felix i wsp., 2006).

Bhave i współpracownicy zidentyfikowali silny (efektywne stężenie 5 – 20 μ M) i selektywny inhibitor białka ROMK, którym jest małowcząsteczkowy, syntetyczny związek VU591 (2,2'-oksybis(metyleno)-bis-(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol)) (Bhave i wsp., 2011). Dokowanie cząsteczki VU591 do modelu struktury kanału ROMK sugerowało, że inhibicja jest wynikiem interakcji pomiędzy VU591, a resztami waliny 168 i asparaginy 171 zlokalizowanymi w porze kanału. Okazało się, że zgodnie z tym modelem mutacje Val168Leu i Asn171Asp silnie osłabiają blokowanie aktywności ROMK przez VU591 (Swale i wsp., 2015).

Innym inhibitorem kanału ROMK jest tzw. związek A, czyli [5-(2-(4-(2-(4-(1H-tetrazol-1-ilo)fenylo)acetylo)piperazyn-1-yl)etylo)izobenzofuran-1(3H)-on)]. Blokuje on kanał od strony cytoplazmatycznej (efektywne stężenie 100 nM – 1 μ M) (Garcia i wsp., 2014).

Kolejną grupę inhibitorów kanału ROMK stanowią pochodne 3-sulfamoylobenzamidu (ang. *sulfamoylbenzamides*). Wykazują one niezwykle hamowanie selektywne gatunkowo

i niewrażliwość na mutacje kanału ROMK, które znoszą aktywność hamującą innych drobnocząsteczkowych inhibitorów ROMK (Sammons i wsp., 2018).

3.3.4. Bezpośrednie oddziaływania $K_{ir}1.1$ z białkami i kompleksy białkowe $K_{ir}1.1$

Znanych jest zaledwie kilka białek oddziałujących z ROMK1 w błonie komórkowej. Interakcje te mają m.in. wpływ na regulację aktywności kanału.

ROMK1 tworzy kompleks z należącym do rodziny transporterów ABC bramkowanym ATP kanałem chlorkowym CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Ruknudin i wsp., 1998), którego mutacje odpowiedzialne są za mukowiscydozę (Mall i wsp., 2014). Interakcja ROMK-CFTR nie jest bezpośrednia i wymaga obecności białka adaptorowego NHERF2 (ang. *sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor*) (Yoo i wsp., 2004). Przeprowadzone badania sugerują, że obecność CFTR ma wpływ na wrażliwość kanału ROMK na ATP (Lu i wsp., 2006; Ruknudin i wsp., 1998).

Białko ROMK oddziałuje również z kotransporterem Na-K-2Cl. Kotransporter ten związany jest z readsorpcją NaCl, która jest istotna dla mechanizmu zagęszczania moczu w pętlach Henlego kanalików nerkowych. W tym przypadku wypływ jonów K^+ przez ROMK2 z komórek nabłonka do światła kanalików stymuluje kotransporter Na-K-2Cl do zwrotnego transportu jonów K^+ wraz z jonami Na^+ i Cl^- (Simon i wsp., 1996; Károlyi i wsp., 1997).

Endocytoza kanałów ROMK jest ważna w regulacji wydzielania jonów potasu (Zeng i wsp., 2002). Konfokalne obrazowanie fluorescencyjne pokazało, że endocytoza kanałów ROMK odbywa się poprzez pęcherzyki pokryte klatryną, co sugeruje interakcję pomiędzy tymi dwoma białkami potwierdzoną przez koimmunoprecypitację (Zeng i wsp., 2002).

3.3.5. Izofomy kanału ROMK

W rezultacie różnicowego składowania transkryptów genu KCNJ1 (znajdującego się na ludzkim chromosomie 11q24) powstają trzy izofomy kanału ROMK: ROMK1 ($K_{ir}1.1a$), ROMK2 ($K_{ir}1.1b$) oraz ROMK3 ($K_{ir}1.1c$), które różnią się między sobą sekwencjami aminokwasowymi na N-końcach. Najkrótszą jest izoforma ROMK2 ($K_{ir}1.1b$), natomiast ROMK1 ma dodatkową sekwencję 19 aminokwasów (MNASSRNVFDTLIRVLTES), podczas gdy izoforma ROMK3 ($K_{ir}1.1c$) ma dodatkowo 16 aminokwasów o sekwencji MPVYLCSEQIRVLTES (Boim i wsp., 1995).

Izofomy te wykazują zbliżone właściwości biofizyczne (Boim i wsp., 1995), jednakże ich funkcjonalne znaczenie zostało poznane jedynie w przypadku fizjologii nefronu.

Mianowicie izoformy te ulegają ekspresji w różnych częściach nefronu. Białka ROMK1 oraz ROMK3 biorą udział w transporcie K^+ w kanalikule krętym dystalnym, natomiast białko ROMK2 transportuje jony potasowe w pętli Henlego (Giebisch, 1998; Boim i wsp., 1995). Aktywność ROMK1, ale nie ROMK2 i ROMK3, hamowana jest przez kwas arachidonowy (Macica i wsp., 1998). Ponadto wydają się, że izoforma białka ROMK2 tworzy por mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) (Foster i wsp., 2012).

3.4. MITOCHONDRIALNY KANAŁ POTASOWY REGULOWANY PRZEZ ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$)

Aktywność niektórych kanałów potasowych obecnych w błonie plazmatycznej zidentyfikowano również w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Checchetto i wsp., 2021, Szabo i wsp., 2014; O'Rourke, 2007). Pierwszym odkrytym w 1991 roku mitochondrialnym kanałem potasowym był kanał regulowany przez ATP, tzw. $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Inoue i wsp., 1991). Został on odkryty z pomocą techniki *patch-clamp* w mitochondriach izolowanych z komórek wątroby szczura (Inoue i wsp., 1991).

W następnych latach obecność tego kanału potwierdzono również w komórkach serca (Paucek i wsp., 1992; Garlid i wsp., 1996), mózgu (Debska i wsp., 2001; Bajgar i wsp., 2001) oraz nerek (Cancherini i wsp., 2003), a także w mięśniach szkieletowych (Debska i wsp., 2002) i limfocytach T (Dahlem i wsp., 2004).

3.4.1. Właściwości elektrofizjologiczne i farmakologia $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$

Bezpośrednie badania właściwości biofizycznych i farmakologicznych kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ mogły zostać zrealizowane tylko przez zastosowanie technik *patch-clamp* (Bednarczyk i wsp., 2018, Dahlem i wsp., 2004) i sztucznych błon lipidowych (PLB, ang. *planar lipid bilayer*) (Fahanik-Babaei i wsp., 2012; Bednarczyk i wsp., 2004; Kicinska i wsp., 2007; Mironova i wsp., 1999) do izolowanych mitochondriów. Przewodnictwa jednostkowe kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ określone na podstawie eksperymentów elektrofizjologicznych znacząco się różnią. Pojawiają się jego wartości w zakresie od 10 pS (Inoue i wsp., 1991) do nawet 166 pS (Kicinska i wsp., 2007). W grupie Garlida zarejestrowano przewodnictwa $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ w zakresie 10–30 pS (Paucek i wsp., 1992; Mironova i wsp., 1999). Zang i współpracownicy pokazują przewodnictwo o wartości 56 pS (Zhang i wsp., 2001). Jednakże większość prac wskazuje, że kanały te mają przewodność około 100 pS (Bednarczyk i wsp., 2005; Bednarczyk i wsp., 2018; Bednarczyk i wsp., 2004;

Choma i wsp., 2009). Różnice w przewodnościach jednostkowych między mitochondrialnymi kanałami potasowymi wrażliwymi na ATP mogą być wynikiem różnych czynników. Po pierwsze mogą one wynikać z obecności różnych kompleksów białkowych wykazujących aktywność mitoK_{ATP} i ich ekspresji w różnych tkankach (Kravenska i wsp., 2021). Rozbieżności te mogą również wynikać z metodologii pomiaru i warunków doświadczalnych, takich jak na przykład stężenie K⁺, dlatego należy wziąć je pod uwagę przy porównywaniu właściwości kanału. Można je także wytłumaczyć poprzez kooperacyjne zachowanie tego kanału, ponieważ wykazano, iż kanał mitoK_{ATP} ma tendencje do występowania i funkcjonowania w klastrach (Zoratti i wsp., 2009; Mironova i wsp., 1997).

Udowodniono, że ponad 20 substancji reguluje aktywność kanału mitoK_{ATP} (O'Rourke, 2004). Większość z nich (np. pinacydyl, izofluran, chinina, cromakalim i sildenafil) reguluje również aktywność kanałów K_{ATP} znajdujących się w błonie komórkowej (O'Rourke, 2004).

Diazoksyd jest jednym z często stosowanych aktywatorów kanałów K_{ATP} (30–100 μM) (Garlid i wsp., 1996; Liu i wsp., 1999). Co ciekawe, jest on jedynym środkiem farmakologicznym zatwierdzonym do leczenia wtórnej hipoglikemii (Arenas Jiménez i wsp., 2018). Niektóre stany chorobowe, tj.: guz trzustki, nowotwory i nadwrażliwość na leucynę mogą powodować uwalnianie zbyt dużej ilości insuliny (Guettier i wsp., 2010; Home, 2013, Yang i wsp., 2010a). Zastosowanie diazoksydu pozwala zapobiec uwalnianiu zbyt dużej ilości insuliny, która obniża poziom cukru we krwi, dzięki czemu przywracany jest prawidłowy poziom glukozy w organizmie (Chen i wsp., 2021). Badając przepływy K⁺ przez częściowo oczyszczony i rekonstruowany kanał mitoK_{ATP} Garlid i wsp. stwierdzili, że diazoksyd charakteryzuje się większym powinowactwem względem mitoK_{ATP} niż K_{ATP} zlokalizowanym w błonie komórkowej (Garlid i wsp., 1996). Jednakże później wykazano, że diazoksyd może hamować aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (kompleks II łańcucha oddechowego), co prowadzi do rozproszenia części mitochondrialnego potencjału błonowego (Anastacio i wsp., 2013a; Anastacio i wsp., 2013b). Ponadto powoduje on również zmniejszenie aktywności niektórych adenozyntrifosfataz (ATPaz) komórkowych, a także syntazy ATP (Comelli i wsp., 2007). Właściwości farmakologiczne diazoksydu mogą więc wynikać z jego plejotropowego działania (Coetzee, 2013).

Kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) uważany był za specyficzny inhibitor kanału mitoK_{ATP} (stężenia efektywne 100-500 μM) (Liu i wsp., 1999). Jednakże okazało się, że jest on także inhibitorem aktywności kanału K_{ATP} znajdującego się w błonie komórkowej

w obecności niehamującego stężenia ATP (Li i wsp., 2010). Dodatkowo wykazano również, że nie hamuje on aktywności kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ z mózgu (Choma i wsp., 2009).

Następnym związkiem blokującym aktywność kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ jest glibenklamid (Paucek i wsp., 1992) (stężenia efektywne 20 nM – 100 μM). Glibenklamid jest lekiem przeciwcukrzycowym z grupy sulfonamoczników używanym w leczeniu cukrzycy typu 2. Mechanizm działania tego leku polega na hamowaniu wrażliwych na ATP kanałów potasowych z błony komórkowej, co prowadzi do depolaryzacji komórek oraz wydzielania insuliny (Luzi i wsp., 1997). Dobrze poznanym celem molekularnym dla tego związku są receptory sulfonamoczników - białka SUR1/2 (Proks i wsp., 2002; Hambrock i wsp., 2002b). Białka SUR1/2 tworzą kompleks z białkami $\text{K}_{\text{ir}}6.2$ i determinują wrażliwość takiego kompleksu kanału K_{ATP} na glibenklamid (Hambrock i wsp., 2002a). Opublikowano szereg prac, w których badano efekty glibenklamidu na oddychanie mitochondriów (Montoya-Pérez i wsp., 2010; O'Rourke, 2004; Akopova i wsp., 2010; Engbersen i wsp., 2005) asocjując efekty glibenklamidu z działaniem na $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Jednakże, przeprowadzono niewiele badań z użyciem technik elektrofizjologicznych, w których badano efekty glibenklamidu na aktywność pojedynczych kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Fahanik-Babaei i wsp., 2012; Bednarczyk i wsp., 2004; Bednarczyk i wsp., 2018). W eksperymentach elektrofizjologicznych $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ blokowany był przez glibenklamid w niskich (70 nM) (Fahanik-Babaei i wsp., 2012), jak i wysokich (50 μM) stężeniach (Bednarczyk i wsp., 2004).

3.4.2. Rola fizjologiczna $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$

Mitochondrialne kanały potasowe biorą udział w regulacji potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (Szewczyk i wsp., 2006). Mitochondria zlokalizowane są w środowisku charakteryzującym się stałym i wysokim stężeniem jonów K^+ (150 mM). Napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej odbywa się przez kanały potasowe zgodnie z ujemną wartością potencjału elektrochemicznego ($\Delta\Psi$). Nadmiar jonów K^+ usuwany jest z macierzy poprzez antyporter K^+/H^+ . Zależność pomiędzy napływem jonów potasu do macierzy mitochondrialnej, a ich wypływem przez wymienniki jonowe pozwala na regulację objętości mitochondriów, wpływając w ten sposób na aktywność łańcucha oddechowego i powodując wzrost utleniania kwasów tłuszczowych (Szabò i wsp., 2012). Aktywacja kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ zwiększa szybkość przenoszenia protonów do przestrzeni międzybłonowej przez łańcuch oddechowy. Wprowadzając sondę fluorescencyjną BCECF do matrycy pokazano bezpośrednio, że zwiększenie napływu K^+ za pomocą walinomycyny lub diazoksydu powoduje alkalizację macierzy mitochondrialnej (Costa i wsp., 2006).

Zwiększenie wydajności łańcucha oddechowego wpływa nie tylko na syntezę ATP, a także na produkcję reaktywnych form tlenu (RFT). Przeprowadzone badania wykazały, że otwarcie mitoK_{ATP} prowadzi do umiarkowanego wzrostu mitochondrialnej produkcji RFT w kardiomiocytach (Garlid, 2000; Tian i wsp., 2003), w komórkach mięśni naczyń gładkich (Krenz i wsp., 2002), a także w sercach poddanych perfuzji (Forbes i wsp., 2001; Obata and Yamanaka, 2000). Wzrost mitochondrialnych RFT dodatkowo służy jako wtórny przekaźnik do aktywacji kinaz w kardioprotekcyjnej ścieżce sygnalizacyjnej (Das i wsp., 1999). Zahamowanie przepływu jonów potasu prowadzi natomiast do hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, która może wywoływać zmiany w stanie redoks kompleksów łańcucha oddechowego powodując wyciek elektronów z kompleksów I oraz III i nadmiernej produkcji anionu ponadtlenkowego (Szewczyk i wsp., 2009).

W związku z powyższym mitochondrialnemu kanałowi K_{ATP} przypisano wiele ról w fizjologii komórki, obejmują one m.in: zapewnienie wydajnego transferu energii między mitochondriami, a ATP-azami komórkowymi (Dos Santos i wsp., 2002), zapobieganie przeładowaniu mitochondrium przez nadmiar jonów Ca²⁺ (Dos Santos i wsp., 2002; Holmuhamedov i wsp., 1999; Liu i wsp., 1998), a także udział w sygnalizacji komórkowej (Oldenburg i wsp., 2002; Pain i wsp., 2000). Kanał mitoK_{ATP} pełni rolę ochronną w apoptozie i bierze udział w ochronie przed wczesnymi stadiami apoptozy poprzez zachowanie integralności mitochondriów (Akao i wsp., 2001). Proponuje się również udział kanałów mitoK_{ATP} w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona (Peng i wsp., 2018).

Badania prowadzone przez ostatnie 20 lat sugerują, iż aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych prowadzi do zjawiska cytoprotekcji, czyli ochrony komórek, a także tkanek przed uszkodzeniem w wyniku niedotlenienia (Garlid, 2000; Facundo i wsp., 2006, O'Rourke, 2004; Eells i wsp., 2000). W 1986 roku pokazano, że jeśli dłuższy czas niedotlenienia poprzedzony zostanie hartowaniem - krótkimi czasami ischemii i reperfuzji, wówczas uszkodzenie mięśnia sercowego następuje w dużo mniejszym stopniu (Murry i wsp., 1986). Jest to powszechnie znane zjawisko hartowania przez niedokrwienie. Wiadomo jest iż hartowanie można uzyskać za pomocą substancji aktywujących kanały potasowe (Grover i wsp., 1989; Xu i wsp., 2002; Murata i wsp., 2001). Od wielu lat prowadzone są badania w celu zrozumienia mechanizmów tego zjawiska i istnieje kilka hipotez podejmujących próbę wyjaśnienia cytoprotekcyjnych efektów aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych. Jedną z nich wiąże napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej z pęcznieniem mitochondriów (Garlid i wsp., 2001). Skutkuje to stymulacją β-oksydacji

kwasów tłuszczowych oraz fosforylacji oksydacyjnej, a w konsekwencji powoduje zwiększenie syntezy ATP (Eells i wsp., 2000), a wiadomym jest że komórki hartowane niedokrwieniem charakteryzują się znacznie wyższym stężeniem ATP. Zjawisko cytoprotekcji może być również powodowane poprzez zmniejszenie akumulacji jonów wapnia w macierzy mitochondrialnej po aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych (Liu i wsp., 1998; Murata i wsp., 2001). Również RFT biorą udział w uszkodzaniu komórek w przypadku ischemii/reperfuzji, ale ich rola w cytoprotekcji powinna być rozpatrywana wielopłaszczyznowo. Z jednej strony wiadomo jest, iż RFT mają negatywny wpływ na fizjologię mitochondriów. Z drugiej strony, w ostatnich czasach pojawiły się informacje, że synteza RFT jest potrzebna dla cytoprotekcji wywołanej aktywatorami kanałów potasowych (Forbes i wsp., 2001).

Odkrycie cytoprotekcyjnych skutków zastosowania aktywatorów mitochondrialnych kanałów potasowych sprawiło, że białka te stały się obiecującym celem potencjalnych terapii farmakologicznych wykorzystywanych do leczenia chorób układu krążenia, a także chorób neurodegeneracyjnych. Powszechnie przyjmuje się, że wstępne kondycjonowanie za pomocą aktywatorów kanałów potasowych skutkuje cytoprotekcją poprzez aktywację kanałów mitochondrialnych (Facundo i wsp. 2006). Skorelowany został wpływ aktywatorów kanałów K_{ATP} z ochroną przed uszkodzeniem niedokrwinnym w nienaruszonym sercu (Garlid i wsp., 1997), a także w izolowanych miocytach (Liu i wsp., 1998). Aktywatory kanału mito K_{ATP} wywołują prekondycjonowanie cytoprotekcji, co pozwala na wywoływanie mniejszych uszkodzeń tkanek. Inhibitory kanału mito K_{ATP} odwracają ten efekt (Garlid i wsp., 1997; Iwai i wsp., 2000; Lee i wsp., 2007). Jeden z aktywatorów kanałów potasowych - BMS-180448 był testowany w badaniach klinicznych pod kątem właściwości cytoprotekcyjnych (Lee i wsp., 2007; D'Alonzo i wsp., 1996; Grover i wsp., 1996; D'Alonzo i wsp., 1995). Potwierdzono również neuroprotekcyjne działanie aktywatorów kanałów mito K_{ATP} w mózgu (Wang i wsp., 2011b) oraz rdzeniu kręgowym (Roseborough i wsp., 2006).

3.4.3. Hipotezy o molekularnej tożsamości mito K_{ATP}

Tożsamość molekularna kanału mito K_{ATP} była przedmiotem wielu badań. Pierwsza hipoteza postulowała, że kompleks kanału $K_{ir6.x}$ jest odpowiedzialny za aktywność mito K_{ATP} . Jednak usunięcie genów kodujących podjednostkę $K_{ir6.x}$ nie skutkowało brakiem aktywności kanału mito K_{ATP} (Miki i wsp., 2002; Wojtovich i wsp., 2013). Proponowano również, że kanał mito K_{ATP} zawiera kompleks dehydrogenazy bursztynianowej (Ardehali i wsp., 2004). Obecnie aktualne są dwie hipotezy co do białek tworzących mitochondrialny kanał K_{ATP} .

Według pierwszej z nich białkiem tym jest ROMK2 kodowane przez gen KCNJ1 (Foster i wsp., 2012). Inne badania dowodzą, iż kanał mitoK_{ATP} może być tworzony przez białko CCDC51 (Paggio i wsp., 2019).

3.4.3.1. Kompleks kanałów K_{ir}6.x

Pierwsza hipoteza proponowała, że kanał mitoK_{ATP} jest kompleksem K_{ir}6.x z podjednostkami SUR. Podjęto próby weryfikacji tej hipotezy poprzez metody immunologiczne, jednakże uzyskiwane wyniki znacznie się różniły. Lacza i współpracownicy (Lacza i wsp., 2003b) zastosowali immunoblotting oraz mikroskopię elektronową z wykorzystaniem złota (ang. *immunogold*) do wykazania, że K_{ir}6.1 oraz K_{ir}6.2 są zlokalizowane w mitochondriach serca, jednakże ani SUR1, ani SUR2 nie zostały wykryte w tych badaniach. Natomiast Jiang i wsp. (Jiang i wsp., 2006) wykryli w preparatach błon mitochondrialnych z serca człowieka jedynie białko K_{ir}6.2. Singh i wsp. (Singh i wsp., 2003) stwierdzili obecność białek K_{ir}6.1 i K_{ir}6.2 oraz SUR2A w mitochondriach pochodzących z miocytów szczurzych. Immunoblotting frakcji mitochondrialnych pochodzących z mięśni szkieletowych oraz wątroby szczura również wykazał obecność białka K_{ir}6.1 (Suzuki i wsp., 1997). Natomiast Kuniyasu i wsp. (Kuniyasu i wsp., 2003) nie wykryli ani K_{ir}6.1, ani K_{ir}6.2 w mitochondriach serca szczura. Wyniki tych badań dodatkowo różniły się wartościami masy identyfikowanych białek. W przypadku białka K_{ir}6.1 o masie teoretycznej 48 kDa obserwowano wartości masy: 42, 48 i 51 kDa (Lacza i wsp., 2003b; Singh i wsp., 2003; Suzuki i wsp., 1997; Lacza i wsp., 2003a), a dla białka K_{ir}6.2 o masie teoretycznej 42 kDa oznaczono białka o masie od 40 do 56 kDa (masa teoretyczna 42 kDa) (Jiang i wsp., 2006; Cuong i wsp., 2005). Analiza proteomiczna wykazała, że K_{ir}6.1 nie jest obecny oczyszczonych frakcji mitochondrialnej serca bydłęcego (Foster i wsp., 2008).

Ponadto poprzez koekspresję różnych kombinacji podjednostek SUR i K_{ir}6.x wykazano, że farmakologia kanału mitoK_{ATP} jest bardziej podobna do farmakologii kompleksu SUR1-K_{ir}6.1 niż SUR2B-K_{ir}6.1 (Liu i wsp., 2001).

Podsumowując, wiele grup badawczych zauważyło immunoreaktywność odpowiadającą podjednostkom K_{ir}6.x i/lub SUR w mitochondriach, jednakże przeprowadzone badania nie udowadniają jednoznacznie tożsamości kanału mitoK_{ATP} z kompleksem K_{ir}6.x/SUR.

3.4.3.2. Kompleks dehydrogenazy bursztynianowej

W 2004 roku Ardehali i współpracownicy (Ardehali i wsp., 2004) opublikowali pracę, w której postulowali że dehydrogenaza bursztynianowa (SDH, ang. *succinate dehydrogenase*) jest częścią kompleksu makromolekularnego odpowiedzialnego za aktywność mitoK_{ATP}. Dodatkowo w skład tego kompleksu miałyby wchodzić cztery białka mitochondrialne: białko mające kasetę wiążącą ATP (mABC1, ang. *mitochondrial ATP binding cassette*), nośnik fosforanu (ang. *phosphate carrier*), translokaza nukleotydów adeninowych (translokaza ANT, ang. *adenine nucleotide translocator*) i syntaza ATP. Oczyszczoną frakcją błon mitochondrialnych zawierającą te białka rekonstruowano w proteoliposomach, a następnie dwuwarstwach lipidowych i wykazywała ona charakterystykę kanałów mitoK_{ATP}. Aktywność ta blokowana była przez inhibitory kanału mitoK_{ATP}, tj. 5-HD, glibenklamid i ATP. Diazoksyd, aktywator kanału mitoK_{ATP}, powodował znaczny wzrost aktywności kanałowej. Co ciekawe, inhibitor SDH, kwas 3-nitropropionowy (3-NPA, ang. *3-nitropropionic acid*) zwiększał aktywność kanału mitoK_{ATP}, a efekt ten był znoszony przez 5-HD. Modulatory translokazy ANT (tj. atraktylozyd oraz kwas bongkrekowy) natomiast nie wpływały na obserwowaną aktywność. Wyniki te zatem mogą sugerować, że dehydrogenaza bursztynianowa w pewien sposób wpływa na aktywność kanału mitoK_{ATP} (Ardehali i wsp., 2004).

3.4.3.3. Izoforma ROMK2 – lokalizacja mitochondrialna i wpływ na mitochondria

W 2012 roku zaproponowano, że białko ROMK2 (K_{ir}1.1b) kodowane przez jeden z wariantów różnicowego składania mRNA produktu genu KCNJ1 może być podjednostką tworzącą por kanału mitoK_{ATP} (Foster i wsp., 2012). Używając techniki *patch-clamp* z wykorzystaniem mitoplastów izolowanych z komórek linii H9c2 nadprodukcujących białko ROMK2 zarejestrowano aktywności typowe dla mitoK_{ATP}. Na aktywności te wpływały wcześniej już wspomniane modulatory kanału mitoK_{ATP}, tj. ATP/Mg²⁺, diazoksyd, czy też 5-HD (Laskowski i wsp., 2019). Ponadto wykazano wrażliwość tych aktywności na glibenklamid (Laskowski i wsp., 2019). Istnieją jednakże sprzeczne doniesienia pokazujące, iż działanie glibenklamidu na aktywność ROMK może być zależne (Lu i wsp., 2006) lub też niezależne (Konstas i wsp., 2002) od obecności dodatkowej podjednostki SUR. Kolejnym dowodem popierającym hipotezę o mitochondrialnej lokalizacji kanału ROMK2 jest hamowanie akumulacji jonów talu (Tl⁺) w izolowanych mitochondriach komórek linii H9c2 traktowanych tertiapiną Q (Foster i wsp., 2012). Wcześniejsze badania wykazały bowiem, że plazmatyczny kanał tworzony przez białko ROMK1 jest hamowany właśnie

przez tertiapinę Q (Jin and Lu, 1998). Jednakże istnieją również badania pokazujące, iż nie jest ona selektywna wyłącznie dla kanału ROMK i hamuje również aktywność innych kanałów potasowych: GIRK (Jin i wsp., 1999) oraz BK_{Ca} (Kanjhan i wsp., 2005).

3.4.3.4. Białko MITOK (CCDC51) – właściwości, farmakologia i wpływ na mitochondria

W 2019 Paggio i wsp. wysnuli hipotezę oraz przedstawili dowody, iż białko CCDC51, może być białkiem tworzącym por kanału mitoK_{ATP}. W związku z tym zaproponowano jego nową nazwę - MITOK (Paggio i wsp., 2019).

Białko MITOK zbudowane jest z dwóch helis transbłonowych, z których jedna zakończona jest długim N-końcem, a druga bardzo krótkim C-końcem, znajdującym się po stronie macierzy mitochondrialnej. Białko MITOK nie posiada charakterystycznego dla typowych kanałów potasowych filtra selektywności zbudowanego z pętli P i w konsekwencji nie jest selektywny dla jonu potasu i umożliwia również przepływ jonów sodu. Jednakże ze względu na wewnątrzkomórkową lokalizację głównym jodem transportowanym przez MITOK jest potas. Zbadano aktywność nadprodukowanego w bakteriach oraz następnie oczyszczonego białka MITOK. Stwierdzono, że jego aktywność kanałowa nie odpowiada na klasyczne modulatory mitoK_{ATP}, tj. ATP, czy też 5-HD. Odkryto, że MITOK tworzy kompleks ze zlokalizowanym w mitochondriach białkiem ABCB8 należącym do rodziny transporterów ABC, które nazwano MITOSUR ze względu na ewolucyjne podobieństwo do białek SUR (również należących do rodziny transporterów ABC). Kompleks MITOK-MITOSUR tworzy kanał, którego aktywność jest aktywowana diazoksydem, a hamowana przez ATP, glibenklamid i 5-HD. Ponadto delecja MITOK skutkowałą zmianami w morfologii mitochondriów, a także brakiem prekondycjonowania farmakologicznego w testach niedotlenienia-reperfuzji. Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie, że kompleks pomiędzy MITOK (CCDC51) i MITOSUR jest tożsamy z mitoK_{ATP} (Paggio i wsp., 2019).

4. ZAŁOŻENIA I CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niedotlenienie serca oraz tkanek mózgu jest jedną z najczęstszych przyczyn śmierci we współczesnym świecie. Wiadomo, że prawidłowo funkcjonujące mitochondria odgrywają ważną rolę w metabolizmie energetycznym komórki oraz pełnią rolę m.in. w cytoprotekcji (kardio- i neuroprotekcji). Wykazano, że w procesach cytoprotekcji udział biorą mitochondrialne kanały potasowe, jednakże mechanizm ich uczestnictwa nie został poznany. Wykazano natomiast, że aktywacja kanału mitoK_{ATP} chroni komórki serca i mózgu przed uszkodzeniami wywołanymi przez niedotlenienie/reperfuzję. W ostatnich latach postawiono hipotezę, że białko ROMK2 może być podstawową jednostką budującą kanał mitoK_{ATP}. Izoforma ROMK1 tego białka tworzy kanały znajdujące się w błonie plazmatycznej, które oddziałują z kilkoma białkami akcesoryjnymi mającymi wpływ na regulację ich aktywności, a także na wrażliwość wobec ligandów. Jednakże, dotychczas nie odkryto żadnych białek wchodzących w interakcje z białkiem ROMK2 w mitochondriach.

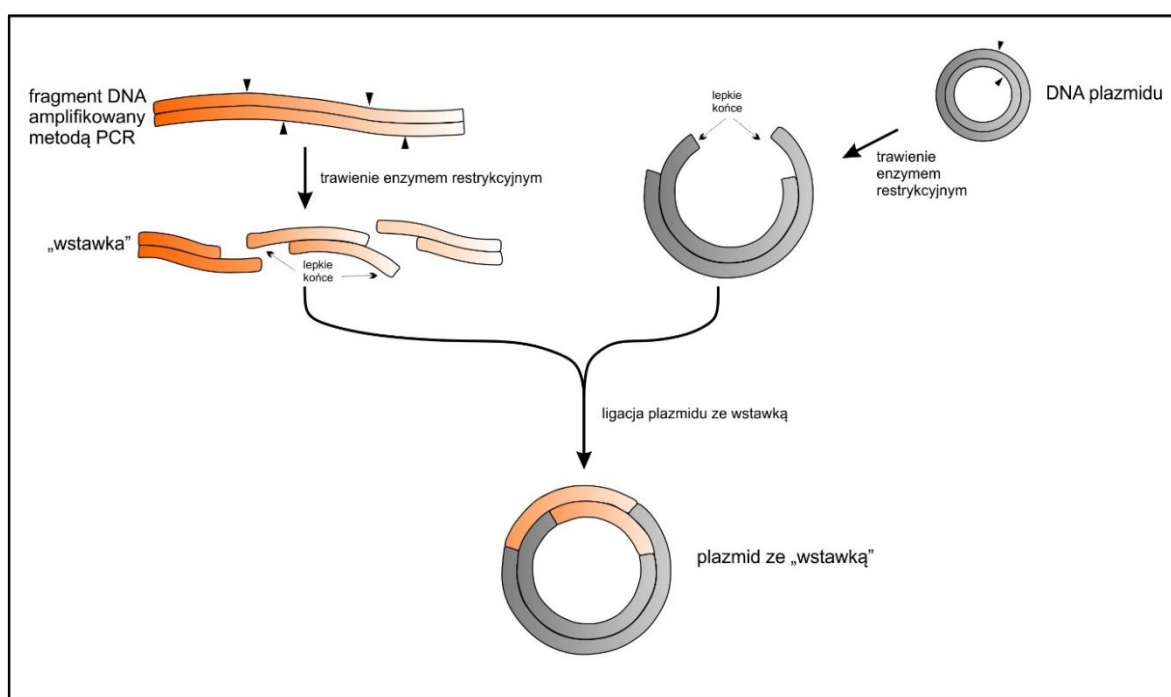
Głównym celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było zidentyfikowanie białek wchodzących w skład mitochondrialnego otoczenia białkowego kanału ROMK2. Zidentyfikowanie partnerów białka ROMK2 może pomóc w rozumieniu, w jakim stopniu kompleksy białkowe kanałów mitochondrialnych są odpowiednikami kompleksów znajdujących się w błonie komórkowej. Może to również pozwolić na określenie, jak kanały mitochondrialne związane są z innymi białkami mitochondrialnymi o zdefiniowanej funkcji np. kompleksami łańcucha oddechowego. Identyfikacja partnerów białkowych ROMK2 pozwoli ponadto na lepsze zrozumienie roli fizjologicznej kanału mitoK_{ATP}. W związku z powyższym, aby zrealizować ten cel założono użycie metody biotynylacji białek przyległych (Turbo-ID), która pozwala na wyznakowanie białek znajdujących się w pobliżu (<10 nm) badanego białka. W następnym etapie założono podjęcie prób izolacji kompleksów zawierających ROMK2 i białek wykrytych w eksperymentach TurboID przy pomocy koimmunoprecypitacji.

Kolejnym celem były badania nad farmakologiczną modulacją aktywności kanału ROMK2. Wcześniej przeprowadzono wiele badań nad farmakologiczną modulacją aktywności kanałów mitoK_{ATP}. Jednakże związki, które zidentyfikowano jako modulatory mitoK_{ATP} nie były testowane w badaniach elektrofizjologicznych nad kanałami ROMK lub też nie było wiadomo, czy wpływ tych modulatorów był bezpośredni, czy też związany z obecnością białek akcesoryjnych dla kanałów ROMK. W związku z tym założono heterologiczną ekspresję w komórkach baterijnych *E. coli* oraz pomiary aktywności oczyszczonego i rekonstruowanego do sztucznych błon lipidowych białka ROMK2.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. KLONOWANIE MOLEKULARNE

Główną strategią klonowania zastosowaną w niżej opisanych badaniach była ligacja fragmentów restrykcyjnych, w których wstawki uzyskiwano w reakcjach PCR, a specyficzne miejsca restrykcyjne wprowadzono w komercyjnie syntetyzowanych starterach.

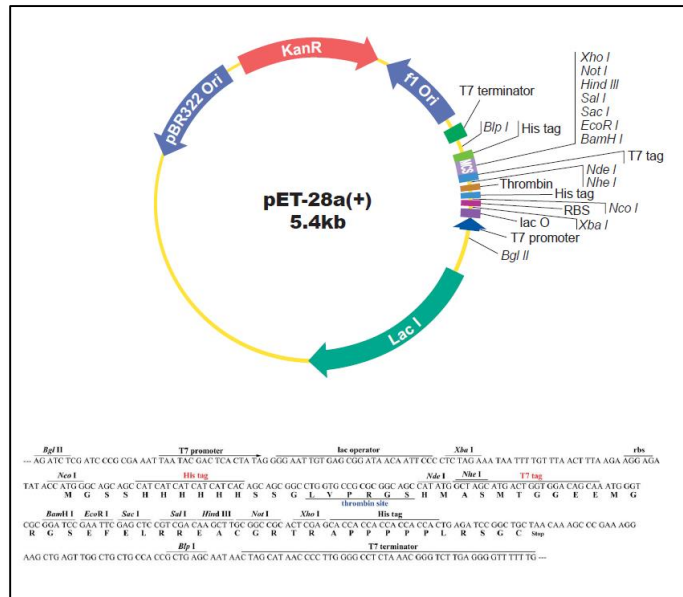


Rycina 3. Uproszczony schemat klonowania molekularnego

5.1.1. Wektory genetyczne wykorzystywane w badaniach

5.1.1.1. *pET-28a(+)*

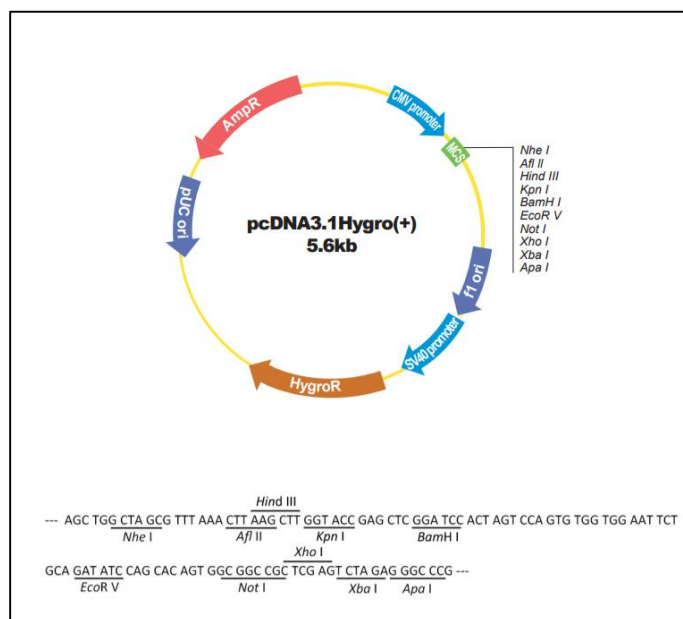
Wektor *pET-28a(+)* jest wektorem ekspresyjnym o wielkości 5369 par zasad wykorzystywanym do produkcji rekombinowanych białek w *E. coli*. Zawiera on promotor T7 oraz sąsiadującą sekwencję operatora *lac* pozwalającą na niski poziom nieindukowanej ekspresji. Wklonowane otwarte ramki odczytu (ORF-y) mogą zostać połączone z sekwencją kodującą etykietę 6xHis (C-koniec ekspymowanego białka). Wektor ten niesie gen oporności na kanamycynę (*KanR*) (Shilling i wsp., 2020).



Rycina 4. Mapa plazmidu pET-28a(+) z sekwencją polylinkera (źródło: <https://www.genscript.com/>)

5.1.1.2. pcDNA3.1(+)

Wektor *pcDNA3.1(+)* to wektor o długości 5428 par zasad pochodzący z *pcDNA3*. Zaprojektowany został do przejściowej ekspresji białek na wysokim poziomie w komórkach ssaczy dzięki obecności promotora CMV. Wektor ten niesie gen oporności na ampicylinę i początek replikacji pUC do selekcji i utrzymania plazmidu w *E. coli*.



Rycina 5. Mapa plazmidu pcDNA3.1/Hygro(+) z sekwencją polylinkera (źródło: <https://www.genscript.com/>)

5.1.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR - *ang. polymerase chain reaction*) została opracowana w 1983 roku przez Kary'ego Mullisa. Polega ona na powieleniu specyficznego fragmentu DNA z wykorzystaniem polimerazy DNA.

Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzono w celu przygotowania plazmidów do ekspresji białka ROMK2 zarówno w bakteriach *E. coli*, jak również w linii komórkowej HEK293T. Reakcje PCR prowadzono z wykorzystaniem par starterów komplementarnych do pożądaných sekwencji w matrycowym DNA z użyciem polimerazy *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) zgodnie z protokołem producenta.

Do przeprowadzenia reakcji użyto 5 μl każdego ze starterów (10 μM), 20 μl 5x *Phusion HF Buffer*, 0,1 μl (10 – 100 ng) matrycy DNA, 8 μl 10 mM dNTP (końcowe stężenie każdego dNTP wynosiło 200 μM) i uzupełniono dH_2O do 100 μl . W pierwszym etapie mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 98°C przez 30 sekund, a następnie podano 25-krotnie powtarzanemu cyklowi trzech etapów, tj. denaturacji w temperaturze 98°C przez 5 sekund, hybrydyzacji w temperaturze 55°C przez 15 sekund oraz 90 sekundowej elongacji w 72°C. Po upływie tych powtarzalnych cykli próbkę ogrzewano przez 5 min w 72°C w celu ostatecznego wydłużenia, a następnie reakcję ochłodzono do temperatury 4°C. W zależności od długości produktu PCR zmieniano czas etapu wydłużania w zakresie od 30 do 180 sekund.

Nazwa pary starterów	Starter górny – „forward”	Starter dolny – „reverse”
Startery A	5' –AAACCATGGGTATGTTCAAGCA CCTGCG - 3'	5' – AAACCTCGAGTTAGTGGTGATGGTGATGA TGCGAGCCACCGCCACCGCTACCGCGCGGCA GAGCATCTTGGTATCGTCGG -3'
Startery B	5'- TGG AATTCTGCAGATATGTTCAA ACATCTTCGGAAATGGG -3'	5' – TTGCTAGCCATTTTGGTGTCATCTGTTT CA -3'
Startery C	5'-CCAAAATGGCTAGCAAAGACAA TACTGTGCC -3'	5' – TTGCTAGCCATTTTGGTGTCATCTGTTT CA -3'
Startery D	5'-AGGAATTCTACCCGTATGATGTT CCGGA-3'	5'-GCCACTGTGCTGGATTTATGCGTAGTCTG GGACGTC-3'
Startery E	5'- GAGCTCGGATCCATGTTCAAAC ATCTTCGGAAATG -3'	5'-TCTAGACTCGAGTTATGCGTAGTCTGGGA-3'
Startery F	5'- ATGGGATCCATGGCGGCTCTGA AGAGTTGG -3'	5'- CAGAGGCACAGTATTGTCTTTCATAATAGG AACCGCACACAGGGTTAC- 3'
Startery G	5'-ATGGGATCCATGCTGTCTAATTT GAGAATCCTGCTC-3'	5'-GCTTCAGAGGCACAGTATTGTCTTTCTGGA CTGGCTTCCCATACC-3'
Startery H	5'-ACTGGTACCATGTTCAAACATCT TCGGAAATGG-3	5'-CGGCTCGAGTTACGTAGAATCGAGACCGAG GAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCCATTTTG TGTCATCTG-3'

Tabela 1. Zestawienie wszystkich starterów wykorzystywanych w badaniach

5.1.3. Trawienie restrykcyjne

Trawienie restrykcyjne polega na hydrolizie DNA na specyficzne fragmenty z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych. Trawienie enzymami restrykcyjnymi było główną strategią tworzenia konstruktów (klonowania) w tej pracy. Wstawki przygotowywano do wklonowania do danego wektora przez ich wytrawianie z wektorów donorowych lub namnażano w reakcjach PCR z użyciem starterów zawierających flankujące unikalne miejsca restrykcyjne, a następnie produkty PCR trawiono z użyciem odpowiednich enzymów restrykcyjnych. Trawienie enzymami restrykcyjnymi wykonywano również w celu potwierdzenia obecności właściwej wstawki w plazmidzie.

W celu przeprowadzenia reakcji trawienia przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z 0,5 - 4 µg DNA (oczyszczonego produktu PCR lub plazmidu), 2 µl 10x buforu do trawienia oraz 1 µl jednego lub każdego z enzymów restrykcyjnych (Thermo Scientific). Mieszaninę reakcyjną uzupełniono wodą do końcowej objętości 20 µl. W przypadkach tzw. enzymów *Fast Digest* (Thermo Scientific) reakcję prowadzono przez 10 - 30 minut w temperaturze 37°C. Rozdział produktów wykonywano w 1% żelu agarozowym zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 5.1.5.

5.1.4. Reakcja ligacji

Ligacja DNA jest reakcją, w której powstają wiązania fosfodiesterowe pomiędzy końcem hydroksylowym 3', a końcem fosforanowym 5' DNA. Do ich syntezy wymagana jest obecność katalizatora - ligazy DNA. W pracy używano ligazy bakteriofaga T4, która ma zdolność do łączenia zarówno tzw. "lepkich", jak również "tępych końców".

Do przeprowadzenia reakcji ligacji przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z: 3 µl wektora, 4 µl wstawki po oczyszczeniu, 1 µl buforu do ligacji, 1 µl ligazy T4 (Thermo Scientific) oraz 1 µl glikolu polietylenowego (PEG) dodanego w celu zwiększenia efektywnego stężenia enzymów. Dodatkowo do każdej reakcji ligacji przygotowano kontrolę negatywną – mieszaninę reakcyjną zawierającą wszystkie składniki z wyjątkiem wstawki. Reakcje ligacji prowadzono w termobloku stosując cykliczny protokół z inkubacjami po 10 min kolejno w temperaturach: 10°C, 15°C, 20°C i 2 min w 37°C. Cykle te powtarzano przez całą noc (tzw. "temperature-cycle ligation") (Lund i wsp., 1996).

5.1.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym

Elektroforeza w żelu agarozowym jest metodą służącą do rozdzielania kwasów nukleinowych w polu elektrycznym.

Próbki DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym. W celu przygotowania żelu agarozowego 1 g agarozy (Sigma Aldrich) zawieszono w 100 ml buforu TBE (Tris/Boran/EDTA - 89 mM Tris; 89 mM kwas borowy; 2 mM EDTA; pH 8,3). Agarozę rozpuszczono przez zagotowanie mieszaniny w kuchence mikrofalowej. Po delikatnym ochłodzeniu do płynnej agarozy dodano 4 µl *Midori Green* (Abo), który jest bezpieczną alternatywą dla kancerogennego bromku etydyny, aby możliwe było zwizualizowanie produktów PCR. Do próbek dodano 6x *Orange DNA Loading Dye* (Thermo Scientific). Równoległe obok próbek badanych elektroforezie poddano wzorzec masy (*GeneRuler 1kb Ladder*, Thermo Scientific). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze TBE przy stałym napięciu 100 V przez około 30 – 60 minut przy zastosowaniu aparatu BioRad. Po zakończeniu rozdzielania żele analizowano w świetle UV za pomocą transiluminatora High Performance 2UV™ Transilluminator (UVP) oraz transluminatora z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli G:BOX (Syngene).

5.1.6. Oczyszczanie DNA

5.1.6.1. Oczyszczanie produktu PCR z mieszaniny reakcyjnej

Produkt PCR oczyszczano bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej stosując PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx) według instrukcji producenta zamieszczonej w zestawie. Do jednej objętości roztworu DNA dodano 2 objętości buforu *Orange DX*, mieszano, a następnie całą objętość przeniesiono do mikrokolumny wiążącej, którą wcześniej aktywowano za pomocą 30 µl buforu aktywacyjnego *Buffer DX*. Mikrokolumnę wirowano w mikrowirówce przez 1 minutę przy 11 000 x g. Następnie na mikrokolumnę naniesiono 500 µl buforu płuczącego *Wash DX1* i wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Po usunięciu przesączu do mikrokolumny dodano 650 µl buforu płuczącego *Wash DX2*. Mikrokolumnę wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Przesącz ponownie usunięto, a mikrokolumnę wirowano przez 2 minuty przy 11 000 x g, aby usunąć resztki buforu płuczącego. Mikrokolumnę umieszczono w nowej probówce typu Eppendorf i dodano do niej 50 µl buforu *Elution*. Po 2 minutach inkubacji mikrokolumnę wirowano przez minutę przy 11 000 x g.

Produkty PCR oczyszczano również po rozdziale w żelu agarozowym przy pomocy zestawu Agarose-Out DNA Purification Kit (EURx) (punkt 5.1.6.2). Uzyskane DNA wykorzystano do dalszy etapów klonowania.

5.1.6.2. Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego

Po rozdzieleniu próbek w żelu agarozowym wycięto obszar zawierający linearną formę DNA o pożądanej masie, a następnie oczyszczono z wykorzystaniem zestawu Agarose-Out DNA Purification Kit (EURx). Całą procedurę oczyszczania prowadzono zgodnie z instrukcją zamieszczoną przez producenta. W pierwszym kroku do mikrokolumny dodano

30 µl *Buforu A* i pozostawiano ją w temperaturze pokojowej. Do wyciętego z żelu prążka agarozy z DNA dodano bufor *Orange A* (100 µl na 100 mg żelu) i inkubowano w bloku grzejmym w temperaturze 55°C do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Mieszaninę następnie przeniesiono do kolumnienki wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej i wirowano przez 1 minutę z prędkością 11 000 x g. Następnie do mikrokolumny dodano 500 µl buforu płuczącego *Wash A1* i ponownie wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Do mikrokolumny dodano następnie 650 µl buforu płuczącego *Wash AX2* i wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Ponownie wirowano mikrokolumnę przez 1 minutę z maksymalną prędkością, aby usunąć resztki buforu płuczącego. Do tego etapu wszystkie przesącze usuwano. Następnie mikrokolumnę przeniesiono do nowej próbówki

typu Eppendorf 1,5 – 2 ml i dodano 50 μ l buforu do elucji *Elution*. Mikrokolumnę pozostawiono na 1 minutę w temperaturze pokojowej, a następnie zwirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Uzyskane DNA wykorzystano do kolejnych etapów klonowania.

5.1.7. Wektory wykorzystywane do ekspresji białek w bakteriach oraz w komórkach ssaczych

W tabeli poniżej (*Tabela 2*) zebrano wszystkie wykorzystywane wektory i przypisano im nazwy używane w poniższej rozprawie oraz podano białka kodowane przez wklonowanie do nich otwarte ramki odczytu. Dokładny opis każdego z wektorów znajduje się w kolejnych podpunktach tego podrozdziału.

Wektor - skrócona nazwa	Wektor - pełna nazwa	Białko	Referencja
<i>pROMK1bac</i>	<i>pUC57-ROMK1bac</i>	ROMK1	Genescript Biotech
<i>pKirBac1.3-ROMK1bac</i>	<i>pUC57-KirBac1.3-ROMK1bac</i>	KirBac1.3-ROMK1	Genescript Biotech
<i>pKirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pET28a-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	KirBac1.3-ROMK1-6xHis	te badania
<i>pROMK1bac-6xHis</i>	<i>pET28a-ROMK1bac-6xHis</i>	ROMK1-6xHis	te badania
<i>pSUMO-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pTS1-SUMO-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	SUMO-KirBac1.3-ROMK1-STREP-6xHis	te badania
<i>pSUMO-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pTS1-SUMO-ROMK1bac-6xHis</i>	SUMO-ROMK1-STREP-6xHis	te badania
<i>pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pET28a-MISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis	te badania
<i>pMISTIC-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pET28a-MISTIC-ROMK1bac-6xHis</i>	MISTIC-ROMK1-6xHis	te badania
<i>pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis</i>	OmpF-KirBac1.3-ROMK1	te badania
<i>pOmpF-ROMK1bac-6xHis</i>	<i>pOmpF-ROMK1bac-6xHis</i>	OmpF-ROMK1	te badania
<i>pROMK2bac-6xHis</i>	<i>pET28a-ROMK2bac-6xHis</i>	ROMK2-6xHis	te badania
<i>pROMK2-TurboID</i>	<i>pcDNA3.1-ROMK2-TurboID-3xHA</i>	ROMK2-TurboID-3xHA	te badania
<i>pSMAC-TurboID</i>	<i>pcDNA3.1-SMAC-TurboID-3xHA</i>	SMAC-TurboID-3xHA	te badania
<i>pOTC-TurboID</i>	<i>pcDNA3.1-OTC-TurboID-3xHA</i>	OTC-TurboID-3xHA	te badania
<i>pROMK2-V5</i>	<i>pcDNA3.1-ROMK2-V5</i>	ROMK2-V5	te badania
<i>pPRDX1</i>	<i>pCMV6-Entry-PRDX1-Myc-FLAG</i>	PRDX1-Myc-FLAG	Origene (RC205072)
<i>pGPATCH8</i>	<i>pCMV6-Entry-GPATCH8-Myc-FLAG</i>	GPATCH8-Myc-FLAG	Origene (RC219640)
<i>pTP53</i>	<i>pCMV6-Entry-TP53-Myc-FLAG</i>	p53-Myc-FLAG	Origene (RC200003)
<i>pIMPDH2</i>	<i>pCMV6-Entry-IMPDH2-Myc-FLAG</i>	IMPDH2-Myc-FLAG	Origene (RC202977)
<i>pAGK</i>	<i>pCMV6-Entry-AGK-Myc-FLAG</i>	AGK-Myc-FLAG	Origene (RC201891)
<i>pPARP1</i>	<i>pCMV6-Entry-PARP1-Myc-FLAG</i>	PARP1-Myc-FLAG	Origene (RC202977)

Tabela 2. Zestawienie wszystkich wykorzystywanych wektorów z pełnymi nazwami wraz z przypisanymi im skróconymi nazwami oraz produkowanymi białkami

5.1.7.1. Wektory wykorzystywane do ekspresji białka ROMK1/2 w bakteriach

W celu ekspresji białka ROMK1/2 w *Escherichia coli* zsyntetyzowano przez firmę Genescript Biotech (www.genescript.com) zoptymalizowaną do ekspresji w bakteriach otwartą ramkę odczytu (ORF, ang. *Open Reading Frame*) dla białka ROMK1, którą nazwano *ROMK1bac* (poniżej):

```
ATGGGTGCTAGCGGATCCCGTAACGTGTTTGACACCCTGATTCGTGTTCTGACCGAGAG
CATGTTCAAGCACCTGCGTAAATGGGTGGTTACCCGTTTCTTTGGTCACAGCCGTCAGCG
TGCGCGTCTGGTTAGCAAGGATGGTCGTTGCAACATCGAGTTTGGCAACGTTGAAGCGC
AAAGCCGTTTCATTTTCTTTGTGGACATCTGGACCACCGTTCTGGATCTGAAGTGGCGTT
ACAAAATGACCATCTTTATTACCGCGTTCCTGGGTAGCTGGTCTTTTTTCGGCCTGCTGT
GGTACGCGGTGGCGTATATCCACAAAGACCTGCCGGAGTTTCACCCGAGCGCGAACCAC
ACCCCGTGCGTTGAAAACATTAACGGTCTGACCAGCGCGTTTCTGTTTCAGCCTGGAGAC
CCAGGTGACCATCGGTTATGGCTTCCGTTGCGTTACCGAACAGTGCGCGACCGCGATCTT
TCTGCTGATTTTTCCAAAGCATCCTGGGTGTGATCATTAAACAGCTTTATGTGCGGCGCGAT
TCTGGCGAAGATCAGCCGTCCGAAGAAACGTGCGAAGACCATTACCTTCAGCAAAAAC
GCGGTGATCAGCAAGCGTGGTGGCAAACCTGTGCCTGCTGATTCGTGTTGCGAACCTGCG
TAAAAGCCTGCTGATTGGTAGCCACATCTACGGCAAGCTGCTGAAAACCACCGTGACCC
CGGAGGGTGAAACCATCATTCTGGACCAGATCAACATTAACCTTCGTGGTTGATGCGGGC
AACGAGAACCTGTTTTTCATCAGCCCCTGACCATTTATCACGTTATCGACCACAACAGC
CCGTTTTTCCACATGGCGGGCGGAGACCCTGCTGCAGCAAGACTTTGAACTGGTGGTTTTTC
CTGGATGGCACCGTGGAAAGCACCAGCGCGACCTGCCAAGTTCGTACCAGCTACGTGCC
GGAGGAAGTTCTGTGGGGTTATCGTTTTGCGCCGATTGTGAGCAAGACCAAAGAGGGCA
AGTACCGTGTTGATTTTCAAACTTCAGCAAAACCGTTGAGGTGGAAACCCCGCACTGC
GCGATGTGCCTGTACAACGAAAAGGACGTGCGTGCGCGTATGAAACGTGGCTATGATAA
CCCGAACTTCATCCTGAGCGAGGTTAACGAAACCGACGATACCAAGATGCTCGAGTAA
```

Jednocześnie zsyntetyzowano przez firmę Genescript Biotech (www.genescript.com) zoptymalizowaną do ekspresji w bakteriach otwartą ramkę odczytu białka fuzyjnego KirBac1.3-ROMK1, w której domeny transbłonowe ROMK zastąpiono przez domeny błonowe bakteryjnego kanału KirBac1.3 analogicznie do wcześniej opublikowanej fuzji KirBac1.3-Kir3.1 (Nishida i wsp., 2007, Leal-Pinto i wsp., 2010):

```
ATGGGTGCTAGCGGATCCCGTAACGTGTTTGACACCCTGATCCGTGTTCTGACCGAGAG
CATGTTCAAGCACCTGCGTAAATGGGTGGTTACCCGTTTCTTTGGTCACAGCCGTCAGCG
TGCGCGTCTGGTTAGCAAGGATGGTCGTTGCAACATTGAGTTTGGCAACGTTGAAGCGC
AAAGCCGTTTCATCTTCTTTGTGGACATTTGGACCACCGTTCTGGATCTGAAGTGGCGTT
ACAAAATGACCATCTTCATTACCTTCTTTGTGAGCCTGGCGGTTCTGTTTCTGCTGCTGA
ACACCGCGTTCGCGACCCTGTATATGCTGGGTAGCGCGCCGATTGCGAACCAGTTTCCG
```


GCGGGCTTCGGTGGCGCGTTCTTTTTTCAGCGTGGAGACCCTGGCGACCGTTGGTTACGGC
GACATGCACCCGCAAACCGTGTATGCGCACTGGATCGCGACCCTGGAAATTTTTGTTGG
TATGAGCAGCATTGCGCTGGCGACCGGTGCGATCCTGGCGAAGATTAGCCGTCCGAAGA
AACGTGCGAAGACCATCACCTTCAGCAAAAACGCGGTGATTAGCAAGCGTGGTGGCAA
ACTGTGCCTGCTGATTCGTGTTGCGAACCTGCGTAAAAGCCTGCTGATCGGTAGCCACAT
TTACGGCAAGCTGCTGAAAACCACCGTGACCCCGGAGGGTGAAACCATCATTCTGGACC
AGATCAACATTAACCTTCGTGGTTGATGCGGGCAACGAGAACCTGTTTTTCATCAGCCCG
CTGACCATCTATCACGTTATTGACCACAACAGCCCGTTTTTCCACATGGCGGCGGAGACC
CTGCTGCAGCAAGACTTTGAACTGGTGGTTTTCTGGATGGCACCGTGGAAGCACCAG
CGCGACCTGCCAAGTTCGTACCAGCTACGTGCCGGAGGAAGTTCTGTGGGGTTATCGTT
TTGCGCCGATCGTGAGCAAGACCAAAGAGGGCAAGTACCGTGTTGATTTTCACAACTTC
AGCAAAACCGTTGAGGTGGAACCCCGCACTGCGCGATGTGCCTGTACAACGAAAAGG
ACGTGCGTGCGCGTATGAAACGTGGCTATGATAACCCGAACTTCATTCTGAGCGAGGTT
AACGAAACCGACGATACCAAAATGCTCGAGTAA

Wyżej wymienione otwarte ramki odczytu tj. *ROMK1bac* i *KirBac1.3-ROMK1bac* zostały wklonowane do wektora *pUC57* w miejsce *EcoRV* i flankowane były przez miejsca rozpoznawane przez restryktazy *NcoI*, *NheI* na końcu 5' oraz *XhoI*, *HindIII* na końcu 3', co ułatwiało ich późniejsze przeklonowanie do innych wektorów.

5.1.7.1.1. Wektory: *pKirBac1.3-ROMK1bac-6xHis* oraz *pROMK1bac-6xHis*

Sekwencje kodujące *KirBac1.3-ROMK1* i *ROMK1* wytrawiono z wektora *pUC57* enzymami restrykcyjnymi *NcoI* oraz *XhoI*. Produkt trawienia oczyszczono z żelu agarozowego wykorzystując *Agarose-Out DNA purification kit* (EURx) (podpunkt 5.1.6.2), a następnie przeklonowano do wektora *pET28a* (zlinearyzowanego wcześniej za pomocą *NcoI* oraz *XhoI*) w celu otrzymania wektorów niosących otwarte ramki odczytu kodujące białka fuzyjne *KirBac1.3-ROMK1-6xHis* oraz *ROMK1-6xHis*.

5.1.7.1.2. Wektory: *pSUMO-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis* oraz *pSUMO-ROMK1bac-6xHis*

W celu otrzymania wektorów niosących otwarte ramki odczytu kodujące N-końcowe fuzje białek *KirBac1.3-ROMK1-6xHis* oraz *ROMK1-6xHis* do białka *SUMO*, sekwencje kodujące *KirBac1.3-ROMK1bac* oraz *ROMK1bac* znajdujące się w wektorze *pUC57* wytrawiono za pomocą enzymów restrykcyjnych *NcoI* oraz *XhoI*, oczyszczono z żelu agarozowego (*Agarose-Out DNA purification kit*, EURx), a następnie przeklonowano do wektora *pTS1* zlinearyzowanego za pomocą enzymów restrykcyjnych *NcoI* i *XhoI*.

Wektor *pTS1* został udostępniony przez Yu-Zhu Zhang (Addgene plasmid #87797; <http://n2t.net/addgene:87797>; RRID:Addgene_87797) (Zhang and Fan, 2017).

5.1.7.1.3. Wektory: *pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis* oraz *pMISTIC-ROMK1bac-6xHis*

W celu otrzymania wektorów niosące otwarte ramki odczytu kodujące N-końcowe fuzje białek KirBac1.3-ROMK1 oraz ROMK1 do białka MISTIC, sekwencje kodujące *KirBac1.3-ROMK1bac* oraz *ROMK1bac* wytrawiono z wektora *pUC57* enzymami restrykcyjnymi NheI oraz XhoI, oczyszczono z żelu agarozowego (Agarose-Out DNA purification kit, EURx) i przeklonowano do wektora *pET28aMISTIC* zlinearyzowanego wcześniej za pomocą NheI i XhoI.

Wektor *pET28aMISTIC* został udostępniony przez Wolframa Antonina (Addgene plasmid #85999; <http://n2t.net/addgene:85999>; RRID:Addgene_85999) (Vollmer i wsp., 2012).

5.1.7.1.4. Wektory: *pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis* oraz *pOmpF-ROMK1bac-6xHis*

W celu otrzymania wektorów niosących otwarte ramki odczytu kodujące N-końcowe fuzje białek KirBac1.3-ROMK1 i ROMK1 do białka OmpF sekwencje kodujące *KirBac1.3-ROMK1bac* oraz *ROMK1bac* z wektora *pUC57* wytrawiono za pomocą enzymów restrykcyjnych NheI oraz XhoI, oczyszczono z żelu agarozowego (Agarose-Out DNA purification kit, EURx) i przeklonowano do wektora *pOmpF* zlinearyzowanego wcześniej za pomocą enzymów restrykcyjnych NheI i XhoI.

Wektor *pOmpF* został udostępniony przez Bryan'a Berger'a (Addgene plasmid #42606; <http://n2t.net/addgene:42606> ; RRID:Addgene_42606) (Su i wsp., 2013).

5.1.7.1.5. Wektor *pROMK2bac-6xHis*

W celu otrzymania plazmidu *pROMK2bac* wykorzystywanego do produkcji białka ROMK2-6xHis, wykonano PCR na matrycy *pUC57-ROMK1bac* z użyciem starterów A (Tabela 1). Produkt reakcji PCR strawiono za pomocą enzymów restrykcyjnych NcoI oraz XhoI, a w następnym kroku wklonowano do zlinearyzowanego wcześniej za pomocą enzymów NcoI i XhoI wektora *pET28a*.

5.1.7.2. Wektory wykorzystywane do eksperymentów typu TurboID

5.1.7.2.1. Wektor *pROMK2-TurboID*

Wektor *pROMK2-TurboID* niesie otwartą ramkę odczytu kodującą białko fuzyjne ROMK2-TurboID-3xHA. Aby utworzyć ten konstrukt wykonano równolegle 3 reakcje PCR: "GA1" z użyciem matrycy *pcDNA3.1-ROMK2-V5* i starterów B (*Tabela 1*), "GA2" z użyciem matrycy *3xHA-TurboID-NLS_pCDNA3* i starterów C (*Tabela 1*) oraz "GA3" z użyciem matrycy *3xHA-TurboID-NLS_pCDNA3* i starterów D (*Tabela 1*). Następnie produkty przeprowadzonych reakcji (GA1, GA2, GA3) oczyszczono z żelu agarozowego i użyto w reakcji PCR ze starterami E (*Tabela 1*). Produkt PCR strawiono za pomocą enzymów restrykcyjnych BamHI oraz XhoI, a następnie wklonowano do wektora *pcDNA3.1/Hygro(+)* zlinearyzowanego enzymami BamHI i XhoI.

Plazmid *3xHA-TurboID-NLS_pCDNA3* został udostępniony przez Alice Ting (Addgene plasmid #107171; <http://n2t.net/addgene:107171>; RRID:Addgene_107171) (Branon i wsp., 2018).

5.1.7.2.2. Wektor *pSMAC-TurboID*

Wektor *pSMAC-TurboID* niesie otwartą ramkę odczytu kodującą białko fuzyjne SMAC-TurboID-3xHA. Sekwencję kierującą SMAC namnożono w reakcji PCR z użyciem matrycy *pSmac-GFP* przy użyciu starterów F. Powstały produkt PCR, zawierający na końcu 5' miejsce dla restryktazy BamHI oraz na końcu 3' 24 nukleotydy komplementarne do sekwencji końca 5' TurboID wykorzystano jako górny "megaprimer" (Sarkar i wsp., 1990) w kolejnej reakcji, w której dolnym starterem był starter E dolny (*Tabela 1*), a matrycą *pcDNA3.1-ROMK2-TurboID*. Produkt PCR strawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz XhoI, a następnie wklonowano do wektora *pcDNA3.1/Hygro(+)* zlinearyzowanego enzymami BamHI i XhoI.

Matryca *pSmac-GFP* została przekazana przez Douglas'a Green'a (Addgene plasmid #40881; <http://n2t.net/addgene:40881>; RRID:Addgene_40881) (Tait i wsp., 2010).

5.1.7.2.3. Wektor *pOTC-TurboID*

Wektor *pOTC-TurboID* niesie otwartą ramkę odczytu kodującą białko fuzyjne OTC-TurboID-3xHA. Sekwencję kierującą OTC namnożono w reakcji PCR z użyciem matrycy OTC przy użyciu starterów G (*Tabela 1*). Tak powstały produkt PCR, zawierający miejsce dla restryktazy BamHI na końcu 5' oraz na końcu 3' 20 nukleotydów komplementarnych do końca 5' sekwencji TurboID, wykorzystano jako górny "megaprimer"

(Sarkar i wsp., 1990) w drugiej reakcji PCR, w której dolnym starterem był starter E dolny (Tabela 1), a matrycą *pcDNA3.1-ROMK2-TurboID*. Produkt PCR został strawiony BamHI oraz XhoI i wklonowany do wektora *pcDNA3.1/Hygro(+)* zlinearyzowanego enzymami BamHI oraz XhoI.

Wektor *pOTC* został udostępniony przez Nicholasa Hoogenraada (Addgene plasmid #71877; <http://n2t.net/addgene:71877>; RRID:Addgene_71877) (Zhao i wsp., 2002).

5.1.7.3. Wektory wykorzystywane do eksperymentów typu Co-IP

5.1.7.3.1. Wektor *pROMK2-V5*

Wektor *pROMK2-V5* otrzymano poprzez ligację strawionego enzymami KpnI oraz XhoI produktu PCR - ROMK2-V5 z zlinearyzowanym tymi samymi enzymami wektorem *pcDNA3.1/Hygro(+)*. ROMK2-V5 otrzymano w reakcji PCR na matrycy *CMV-ROMK2-eGFP* (Foster i wsp., 2012) z użyciem starterów H (Tabela 1).

5.1.7.3.2. Wektor *pPRDX1*

Wektor *pPRDX1* zawiera cDNA *PRDX1* w plazmidzie *pCMV6-Entry* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrola promotora CMV kodującą białko PRDX1-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC205072, numer akcesyjny NM_181697).

5.1.7.3.3. Wektor *pGPATCH8*

Wektor *pGPATCH8* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrola promotora CMV kodującą białko GPATCH8-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC219640, numer akcesyjny NM_001002909).

5.1.7.3.4. Wektor *pTP53*

Wektor *pTP53* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrola promotora CMV kodującą białko TP53-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC200003, numer akcesyjny NM_000546).

5.1.7.3.5. Wektor *pIMPDH2*

Wektor *pIMPDH2* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrola promotora CMV kodującą białko IMPDH2-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC202977, numer akcesyjny NM_000884).

5.1.7.3.6. Wektor *pAGK*

Wektor *pAGK* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrolą promotora CMV kodującą białko AGK-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC201891, numer akcesyjny NM_018238).

5.1.7.3.7. Wektor *pPARP1*

Wektor *pPARP1* niesie otwartą ramkę odczytu pod kontrolą promotora CMV kodującą białko PARP1-Myc-FLAG (Origene, numer kat. RC202977, numer akcesyjny NM_000884).

5.1.8. Transformacja genetyczna

Transformacja komórek bakteryjnych jest procesem aktywnego pobierania wolnego DNA ze środowiska.

W pierwszym etapie transformacji do bakterii kompetentnych *E. coli* dodawano DNA plazmidowe, a następnie bakterie inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po upływie tego czasu bakterie poddano szokowi termicznemu (1 minuta w 42°C), a następnie inkubowano 1 minutę na lodzie. Następnie do bakterii dodawano pożywkę SOC (2% trypton; 0,5% ekstrakt drożdżowy; 0,05% NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza) i mieszaninę inkubowano w 37°C przez około godzinę. Jako próbę negatywną komórki kompetentne traktowano jak wyżej, ale bez dodatku DNA plazmidowego.

Wszystkie konstrukty plazmidowe wykorzystywane do produkcji białek ROMK1/2 w bakteriach propagowano w szczepie *E. coli* XL1-Blue MRF' (punkt 5.2.2.1) lub NEB[®] Stable (NEB) (punkt 5.2.2.4) w obecności antybiotyku - kanamycyny o stężeniu 50 µg/ml. W celu ekspresji w bakteriach plazmid transformowano do szczepu *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (punkt 5.2.2.2) i hodowano z dodatkiem 50 µg/ml kanamycyny oraz 34 µg/ml chloramfenikolu.

Wektor *pcDNA3.1-ROMK2-V5* propagowano w szczepie *E. coli* NEB[®] Stable (NEB) (punkt 5.2.2.4).

Wektory niosące otwartą ramkę odczytu kodujące potencjalne białka oddziałujące z białkiem ROMK2, tj. AGK-Myc-FLAG (RC201891, Origene), p53-Myc-FLAG (RC200003, Origene), GPATCH8-Myc-FLAG (RC219640, Origene), PRDX1-Myc-FLAG (RC205072, Origene), IMPDH2-Myc-FLAG (RC202977, Origene) oraz PARP1-Myc-FLAG (RC202977, Origene) propagowano w szczepie *E. coli* CopyCutter[™] EPI400[™] (Lucigen) (punkt 5.2.2.3). W pierwszym etapie przygotowano hodowlę nocną (5 ml LB z antybiotykiem), którą zaszczepiono za pomocą 10 µl reakcji transformacji, a następnie wytrząsano ją przez noc w temperaturze 37°C. Proces indukcji prowadzono w 250 ml płynnej

hodowli LB. Nocną hodowlę rozcieńczono w stosunku 1:10 i zmierzono wartość OD przy długości fali 600 nm (OD_{600}), a następnie hodowlę nocną rozcieńczono na podstawie tego pomiaru do końcowej wartości OD_{600} równej 0,2 w LB z dodatkiem antybiotyku i 1x *CopyCutter™ Induction Solution* (Biosearch Technologies). Tak powstała mieszaninę następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny z energicznym wytrząsaniem, a następnie izolowano plazmidowe DNA.

5.1.9. Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych

Plazmidowe DNA izolowano z komórek bakteryjnych z wykorzystaniem zestawu Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx, Polska). W pierwszym etapie do mikrokolumny naniesiono 30 µl buforu aktywacyjnego *Buffer PL* i pozostawiono w temperaturze pokojowej do momentu naniesienia lizatu na mikrokolumnę. Nocną hodowlę bakteryjną (4 ml) zwirowano przez 2 minuty przy 12 000 x g. Uzyskany osad bakteryjny zawieszono w 250 µl buforu do zawieszania *Cell R*. Do powstałej zawiesiny dodano 250 µl niebieskiego buforu lizującego *Lysis Buffer*, a następnie powoli wymieszano przez ostrożne kilkukrotne odwracanie probówki, aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny. Do powstałej zawiesiny dodano 350 µl buforu *Neutral B*. Zawartość probówki następnie dokładnie, delikatnie mieszano poprzez kilkukrotne odwracanie, aż do momentu całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny, a następnie wirowano w mikrowirówce przez 7 minut przy 12 000 x g. Otrzymany klarowny supernatant przeniesiono do kolumnienki wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej i wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Następnie kolumnienkę przepłukano kolejno za pomocą 500 µl buforu płuczącego *Wash PLX1* oraz 650 µl buforu płuczącego *Wash PLX2*, po każdym mikrokolumnę wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Następnie próbkę wirowano przez 2 minuty przy 11 000 x g w celu usunięcia resztek buforu płuczącego. Elucję wykonywano za pomocą 50 µl buforu *Elution*. Po dwuminutowej inkubacji mikrokolumny wiążącej z buforem do elucji, mikrokolumnę wirowano przez 1 minutę przy 11 000 x g. Uzyskane DNA przechowywano w -20°C.

W celu uzyskania większej ilości plazmidowego DNA wykorzystywano zestaw PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega) według instrukcji producenta. W pierwszym etapie wykonano lizę komórek bakteryjnych. W tym celu 250 ml nocnej hodowli wirowano przez 10 minut przy 5 000 x g, a następnie usunięto supernatant. Otrzymany osad zawieszono w 12 ml buforu *Cell Resuspension Solution*, a następnie dodano 12 ml buforu *Cell Lysis Solution*, mieszaninę wymieszano, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu do zlizowanych komórek dodano

12 ml buforu *Neutralization Solution* i wymieszano przez około 10/15 – krotne odwracanie probówki. Lizat komórkowy zwirowano przy 14 000 x g przez 20 minut w temperaturze pokojowej. W następnym kroku przygotowano kolumnę do oczyszczania DNA. W tym celu kolumnę *PureYield™ Clearing Column* umieszczono w kolumnie *PureYield™ Maxi Binding Column*. Taki zestaw następnie podłączano do pompy próżniowej. Lizat dekantowano, a supernatant przeniesiono do kolumny *PureYield™ Clearing Column*. Za pomocą próżni supernatant przesączano na kolumnę *PureYield™ Maxi Binding Column*, której złożę wiązało DNA plazmidowe. Próżnię utrzymywano do momentu, kiedy cały lizat przesączył się przez obie kolumny. Następnie usuwano kolumnę *PureYield™ Clearing Column*, pozostawiając kolumnę wiążącą *PureYield™ Maxi Binding* na kolektorze próżniowym. Przed elucją kolumnę *PureYield™ Maxi Binding* przepłukano za pomocą 5 ml buforu *Endotoxin Removal Wash*. Następnie przepłukano ją za pomocą 20 ml buforu *Column Wash*. Membranę kolumny wysuszono poprzez zostawienie jej przez 5 minut pod próżnią. DNA eluowano za pomocą 1 ml wody wolnej od nukleaz. W tym celu 1,5 ml probówkę umieszczono w podstawie do elucji próżniowej *Eluator™ Vacuum Elution Device*, w której umieszczono kolumnę *PureYield™ Maxi Binding*. Tak zmontowany zestaw umieszczono na kolektorze próżniowym. Otrzymane DNA przechowywano w -20°C.

5.2. HODOWLE BAKTERYJNE

5.2.1. Prowadzenie hodowli

Kultury bakteryjne prowadzono zarówno na podłożach stałych – płytki z podłożem agar-LB (ang. *Luria Broth*), jak również na podłożach płynnych LB (10 g/l trypton; 10 g/l NaCl; 5g/l ekstrakt drożdżowy; pH 6,8–7,2). Komórki bakteryjne po transformacji wysiewano na płytki agar-LB z odpowiednim antybiotykiem. Hodowle płynne wykorzystano do namnożenia bakterii w celu izolacja plazmidowego DNA (punkt 5.1.9) oraz produkcji białka w komórkach bakteryjnych (punkt 5.2.3).

5.2.2. Szczepy bakterii *Escherichia coli* wykorzystywane w prowadzonych badaniach

5.2.2.1. *E. coli* XL1-Blue MRF'

Bakterie *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) charakteryzują się następujących genotypem: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacI}^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$.

Szczep ten charakteryzuje się niedoborem endonukleazy (*endA*), co poprawia jakość izolowanego DNA oraz obniżonym poziomem rekombinacji (*recA*), czego wynikiem

jest poprawa stabilności plazmidowego DNA. Dodatkowo występująca mutacja *hsdR* zapobiega trawieniu sklonowanego DNA przez system endonukleaz (EcoK). Obecność genu *lacIqZAM15* w episomie F' umożliwia badanie przesiewowe pod kątem rekombinowanych plazmidów z wykorzystaniem α -komplementacji.

5.2.2.2. *E. coli* BL21(DE3)-pLysS

Szczep bakterii *E. coli* BL21(DE3)-pLysS charakteryzuje się następującym genotypem: F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)* λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*⁺]_{K-12}(λ^S) pLysS[T7p20 *ori_{p15A}*](Cm^R)

Szczep bakteryjny *E. coli* BL21(DE3) jest stabilnym lizogenem λ DE3, który zawiera integrowany do chromosomu gen polimerazy RNA T7 pod kontrolą promotora *lacUV5*, co pozwala na wykorzystania tego szczepu do ekspresji białek w układzie Tabora-Studiera (Studier i wsp., 1990). Dodatkowa obecność plazmidu *pLysS* pozwala na obniżenie podstawowej (nieindukowanej) ekspresji genu docelowego.

5.2.2.3. CopyCutter™ EPI400™

Linia CopyCutter™ EPI400™ charakteryzuje się następującym genotypem: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacZAM15* Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ *rpsL* (*Str*^R) *nupG trfA tonA pcnB4 dhfr*.*

Linia CopyCutter™ EPI400™ została wyprowadzona ze szczepu TransforMAX™ EC100™ -T1^R *E. coli* o wysokiej wydajności transformacji faga T1 firmy Epicentre poprzez manipulację genem *pcnB* kontrolującym liczbę kopii wektorów zawierających początek replikacji ColE1 lub pMB1. Konstytutywnie ekspresjonowany gen *pcnB* usunięto ze szczepu TransforMAX EC100 i zastąpiono zmodyfikowanym genem *pcnB* kontrolowanym przez indukowalny promotor, tworząc szczep CopyCutter™ EPI400™. Obecność w episomie F' genów *endA1* oraz *rexA1* zapewnia odpowiednio wysoką wydajność izolacji DNA oraz większą stabilność dużych wstawek. Szczep ten został opracowany w celu znacznego obniżenia liczby kopii plazmidów, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie niestabilnych sekwencji DNA.

5.2.2.4. NEB® Stable

Baterie kompetentne NEB® Stable określane są poprzez następujący genotyp: F' *proA+B+ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet^R)/ Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC).*

Szczep ten charakteryzuje się brakiem endonukleazy (*endA1*), co poprawia jakość izolowanego DNA oraz obniżonym poziomem rekombinacji (*recA*), czego wynikiem jest poprawa stabilności plazmidowego DNA. Obecność mutacji *mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)* pozwala na efektywną transformację metylowanego DNA pochodzącego ze źródeł eukariotycznych lub też niemetylowanego DNA pochodzącego z PCR oraz innych źródeł. W episomie F' obecna jest również mutacja *fhuA* zapewniająca oporność na faga T1. Obecność genu *lacIqZΔM15* umożliwia badanie przesiewowe pod kątem rekombinowanych plazmidów z wykorzystaniem α-komplementacji.

5.2.3. Produkcja białka ROMK1/ROMK2 w komórkach bakteryjnych

5.2.3.1. Sprawdzenie poziomu produkcji białka ROMK1 oraz ROMK2 w *E. coli*

W celu sprawdzenia produkcji białka ROMK1 oraz ROMK2 bakterie *E. coli* BL21(DE3)-pLysS niosące odpowiednie wektory (*pKirBac1.3-ROMK1bac-6xHis*, *pROMK1bac-6xHis*, *pSUMO-K_{ir}Bac1.3-ROMK1bac-6xHis*, *pSUMO-ROMK1bac-6xHis*, *pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis*, *pET28aMISTIC-ROMK1bac-6xHis*, *pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis*, *pOmpF-ROMK1bac-6xHis* oraz *pROMK2bac-6xHis*) hodowano przez noc w 5 ml medium LB zawierającego kanamycynę (50 µg/ml) oraz chloramfenikol (34 µg/ml) w 37°C z wytrząsaniem (220 obrotów/min). Następnego dnia rozcieńczono ją w stosunku 1:100 za pomocą świeżej pożywki LB zawierającej antybiotyki (końcowa objętość 25 ml). Komórki po rozcieńczeniu hodowano następnie w temperaturze 37°C (220 obrotów/min) do momentu osiągnięcia wartości absorbancji przy 595 nm (OD₅₉₅) wynoszącej 0,4 - 0,6. Po osiągnięciu tej wartości pobrano próbki (proporcjonalnie co do wartości OD₅₉₅) do analizy za pomocą metody Western Blot. Następnie produkcję białka indukowano za pomocą 1 mM IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd, ang. *isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside*). Hodowlę kontynuowano przez kolejne 3 godziny w tych samych warunkach. Po upływie tego czasu ponownie pobrano próbki zgodnie z wartością OD₅₉₅ w celu analizy Western Blot. Wszystkie próbki wirowano przy 5 000 x g przez 10 min, aby osadzić komórki bakteryjne.

5.2.3.2. Produkcja białka ROMK1 oraz ROMK2 w *E. coli*

Produkcję białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis prowadzono w bakteriach *E. coli* BL21(DE3)-pLysS niosących odpowiednio wektory: *pROMK1bac-6xHis*, *pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis*, *pMISTIC-ROMK1bac-6xHis* oraz *pROMK2bac-6xHis*. W pierwszym etapie hodowlę nocną, tj. 60 ml medium LB zawierającego kanamycynę (50 µg/ml) oraz chloramfenikol (34 µg/ml) zaszczepiono wyżej wymienionym szczepem bakterii i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (220 obrotów/min). Całonocną hodowlę wykorzystano następnie do zaszczepienia 6 litrów świeżej pożywki LB zawierającej antybiotyki. Komórki hodowano następnie w temperaturze 37°C (220 obrotów/min) do momentu osiągnięcia wartości OD₅₉₅ wynoszącej około 1,0. Wówczas ekspresję indukowano przez dodanie IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM. Hodowlę kontynuowano w temperaturze 37°C przez następne 3 godziny przy mieszaniu (220 obrotów/min). Po upływie tego czasu komórki wirowano przy 5 000 x g przez 30 minut w temperaturze 4°C. Następnie uzyskany osad zawierający komórki bakteryjne zawieszono w roztworze buforu fosforanowego (PBS, ang. *phosphate buffer solution*, Laboratorium Chemii Ogólnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN) i mrożono w ciekłym azocie. Komórki przechowywano w temperaturze -80°C.

5.2.4. Izolacja błon *E. coli*

Zamrożone komórki bakterii *E. coli* rozmrożono na lodzie, a następnie do zawiesiny dodano 1 mM PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu, ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*), 10 mM 1,4-ditiotreitol (DTT, ang. *1,4-dithiothreitol*) oraz inhibitory proteaz (protease inhibitor cocktail cComplete™, Roche). Komórki dezintegrowano z wykorzystaniem prasy French'a (Thermo Spectronic). Niezdezintegrowane komórki usunięto poprzez wirowanie zawiesiny przy 5 000 x g przez 30 min w temperaturze 4°C. Obecne w supernatancie pęcherzyki błonowe zebrano przez wirowanie supernatantu przy 160 000 x g przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Uzyskany osad ponownie zawieszono w PBS, zamrożono w ciekłym azocie w porcjach po około 500 µl, a następnie przechowywano w -80°C do dalszych analiz. Z 1 litra zawiesiny komórkowej otrzymano około 2 - 2,5 g błon.

5.3. HODOWLA KOMÓRKOWA KOMÓREK SSACZYCH

5.3.1. Linia komórkowa

W prezentowanej rozprawie doktorskiej wykorzystywana była linia komórkowa HEK293T. Jest to ludzka linia komórkowa, która pochodzi z embrionalnych komórek nerki (ang. *Human embryonic kidney*) ekspresyjna zmutowaną wersją dużego antygeny T wirusa SV40.

5.3.2. Prowadzenie hodowli

Komórki HEK293T hodowano w medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Laboratorium Chemii Ogólnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN) z dodatkiem 10% (vol/vol) płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. *fetal bovine serum*) (Gibco, USA), 100 jednostek/ml penicyliny (Sigma-Aldrich) i 100 µg/ml streptomycyny (Sigma Aldrich) oraz 2 mM L-glutaminy (Gibco, USA) w inkubatorze w wilgotnej atmosferze, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Komórki przesiewano co około trzy - cztery dni.

5.3.3. Transfekcja komórek HEK293T

W badaniach wykonywano transfekcję przejściową z wykorzystaniem polietylenoiminy (PEI, ang. *polyethylenimine*, Sigma Aldrich, 408727). Transfekcję przeprowadzano na komórkach o konfluencji wynoszącej około 60-80%.

Eksperymenty typu TurboID oraz Co-IP przeprowadzono na komórkach hodowanych na szalkach o średnicy 150 mm. Na eksperyment TurboID wykorzystano 5 - 10 szalek, a na eksperyment Co-IP wykorzystano 4 szalki.

Do immunofluorescencji 150 000 komórek wysiano na 35 mm szalkę ze szklanym dnem (Cellvis).

5.3.3.1. Transfekcja komórek w eksperymentach typu TurboID

W pierwszym etapie eksperymentów typu TurboID wykonano optymalizację transfekcji, którą przeprowadzono na szalkach 6-dołkowych. W tym celu wykorzystano dwie różne ilości DNA, tj. 0,5 oraz 2,5 µg oraz różne stosunki PEI do DNA wynoszące 2:1, 4:1 oraz 8:1. Jako optymalne warunki wybrano 2,5 µg DNA oraz stosunek PEI:DNA wynoszący 4:1.

Do eksperymentów TurboID komórki hodowano na szalkach 150 mm, które transfekowano po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji (70-80%). W pierwszym etapie

do 860 μ l pożywki OPTIMEM (Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium, Gibco) dodano 10,75 μ g DNA (*pcDNA3.1*, *pSMAC-TurboID*, *pOTC-TurboID* lub *pROMK2-TurboID*) oraz 43 μ g PEI. Po 15 minutowej inkubacji wcześniej przygotowaną mieszaninę dodano do komórek, którym medium wymieniono na medium bez antybiotyku (DMEM z dodatkiem 10% (vol/vol) FBS-u oraz 2 mM L-glutaminy).

W eksperymentach immunocytochemicznych komórki transfekowano za pomocą 2,5 μ g DNA, tj. *pcDNA3.1*, *pSMAC-TurboID*, *pOTC-TurboID* lub *pROMK2-TurboID* i stosunku PEI:DNA wynoszącym 4:1 w 200 μ l OPTIMEM. Mieszaninę tę po 15 minutach dodano do komórek, w których wcześniej wymieniono medium na medium bez dodatku antybiotyków.

5.3.3.2. Transfekcja komórek w eksperymentach typu Co-IP

W pierwszym etapie eksperymentów typu Co-IP wykonano optymalizację transfekcji komórek HEK293T plazmidem *pROMK2-V5*, którą przeprowadzono na szalkach 6-dołkowych. W tym celu wykorzystano dwie różne ilości DNA, tj. 0,5 oraz 2,5 μ g oraz trzy różne stosunki PEI do DNA, czyli 2:1, 4:1 oraz 8:1. Jako optymalne warunki wybrano 2,5 μ g DNA oraz stosunek PEI:DNA wynoszący 4:1.

W kolejnym kroku wykonano optymalizację transfekcji komórek HEK293T za pomocą plazmidów niosących ORF-y kodujące potencjalne białka partnerskie: kinazę acyloglicerolową (AGK, ang. *acylglycerol kinase*), polimerazę poli[ADP-rybozy] (PARP1, ang. *poly[ADP-ribose] polymerase 1*), białko GPATCH8 (ang. *G patch domain-containing protein 8*), białko p53 będące antygenem nowotworowym (ang. *cellular tumor antigen p53*), peroksyredoksynę-1 (PRDX1, ang. *peroxiredoxin 1*) oraz dehydrogenazę inozyno-5'-monofosforanu 2 (IMPDH2, ang. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2*) produkowane jako C-terminalne z etykietami Myc-FLAG. Komórki transfekowano na szalkach 6-dołkowych i sprawdzano trzy różne stosunki PEI:DNA, tj. 2:1, 4:1 oraz 8:1 przy stałej ilości DNA wynoszącej 2,5 μ g. Jako optymalne warunki wybrano stosunek PEI:DNA wynoszący 4:1.

W celu przeprowadzenia eksperymentów koimmunoprecypitacji komórki HEK293T transfekowano za pomocą plazmidu *pROMK2-V5* oraz jednego z plazmidów zawierającego sekwencję kodującą potencjalne białko oddziałujące wyznakowane etykietą Myc-FLAG, tj.: AGK-Myc-FLAG, p53-Myc-FLAG, GPATCH8-Myc-FLAG, IMPDH2-Myc-FLAG, PRDX1-Myc-FLAG oraz PARP1-Myc-FLAG. Do transfekcji komórek przygotowano mieszaninę zawierającą 860 μ l OPTIMEM-u, 10,75 μ g plazmidu *pROMK2-V5*, a także

10,75 µg plazmidu produkującego potencjalne białko partnerskie oraz 43 µg PEI i inkubowano ją w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po upływie tego czasu mieszaninę dodano do komórek HEK293T. Jako kontrole stosowano komórki transfekowane wyłącznie plazmidem *pROMK2-V5* lub plazmidem zawierającym sekwencje kodującą potencjalne białko oddziałujące (DNA 10,75 µg; stosunek PEI:DNA wynosił 4:1). Dodatkowo jako kontrole negatywną stosowano nietransfekowane komórki HEK293T.

W celu przygotowania preparatów do barwień immunocytochemicznych komórki transfekowano za pomocą 2,5 µg DNA *pROMK2-V5* i/lub *pAGK* i stosunku PEI:DNA wynoszącym 4:1 w 200 µl OPTIMEM. Mieszaninę tę po 15 minutach dodawano do komórek, w których wcześniej wymieniono pożywkę na medium bez dodatku antybiotyków.

5.3.4. Biotynylacja białek w eksperymentach typu TurboID

W pierwszym etapie eksperymentów TurboID zoptymalizowano warunki biotynylacji. Komórki transfekowane plazmidami *pSMAC-TurboID*, *pOTC-TurboID* lub *pROMK2-TurboID* traktowano dwoma różnymi stężeniami biotyny, tj. 50 oraz 500 µM i sprawdzano poziom biotynylacji białek. Dodatkowo dla plazmidu *pROMK2-TurboID* sprawdzono także różne czasy biotynylacji: 20 minut, 1 godzina oraz trzy godziny. Po analizie otrzymanych wyników do właściwych eksperymentów wykorzystano trzygodzinny czas biotynylacji.

We właściwych eksperymentach TurboID po upływie 24 godzin od transfekcji medium wymieniono na DMEM z dodatkiem FBS oraz L-glutaminy zawierający dodatkowo 500 µM biotynę (w jednym z eksperymentów użyto biotynę w stężeniu 50 µM) i inkubowano przez 3 godziny w inkubatorze w wilgotnej atmosferze, w temperaturze 37°C, w obecności 5% CO₂. Po upływie tego czasu komórki przepłukano dwukrotnie za pomocą PBS, aby usunąć nadmiar biotyny. Następnie komórki oderwano mechanicznie i zebrano przez wirowanie przez 10 minut przy 800 x g. Uzyskany osad komórek zamrożono w -80°C.

5.3.5. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria

Frakcję wzbogaconą w mitochondria, w zależności od ich dalszego przeznaczenia, izolowano z wykorzystaniem dwóch różnych protokołów. W przypadku eksperymentów typu TurboID frakcję wzbogaconą w mitochondria izolowano za pomocą metody opisanej w podpunkcie 5.3.5.1., natomiast w przypadku eksperymentów, w których białka błonowe solubilizowano kopolimerami frakcję wzbogaconą w mitochondria izolowano zgodnie z procedurą prezentowaną w punkcie 5.3.5.2.

5.3.5.1. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria z zastosowaniem digitoniny

Do eksperymentów typu TurboID mitochondria izolowano zgodnie ze zmodyfikowanym wcześniej opublikowanym protokołem (Kudin i wsp., 2004). Osad komórkowy (300–500 mln komórek) zawieszono w 16 ml buforu do izolacji (IB, o składzie: 210 mM mannitol; 70 mM sacharoza; 500 mM HEPES/KOH; pH 7,2) z dodatkiem 0,25% surowiczej albuminy wołowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*) oraz mieszaniny inhibitorów proteaz cOmplete™ (Roche) oraz 1 mM PMSF. Następnie dodano digitoninę do osiągnięcia permabilizacji komórek na poziomie 80-90% (końcowe stężenie 200-400 ng/μl). W celu usunięcia nadmiaru digitoniny próbkę rozcieńczono do końcowej objętości 50 ml i wirowano przy 3 000 x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Otrzymany gęsty, biały, galaretowaty osad zawieszono w 15 ml IB z dodatkiem BSA, a następnie homogenizowano. Homogenat wirowano przy 1 200 x g przez 10 min w temperaturze 4°C, a supernatant dekantowano. Wirowania powtarzano do momentu zaniku osadu (około 3 razy). Ostatecznie supernatant wirowano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C przy 10 000 x g. Uzyskany osad zawieszono w 5 ml IB i wirowano (10 000 x g, 4°C, 30 minut). Po wirowaniu odrzucono supernatant pozostawiając brązowy osad zawierający mitochondria. Osad frakcji wzbogaconej w mitochondria ponownie zawieszono w 1 ml IB i wirowano przy 10 000 x g w temperaturze 4°C przez 15 minut, a następnie odrzucono supernatant. Ostatnie wirowanie powtarzano dwukrotnie.

5.3.5.2. Izolacja frakcji wzbogaconej w mitochondria z zastosowaniem buforu sacharozowego

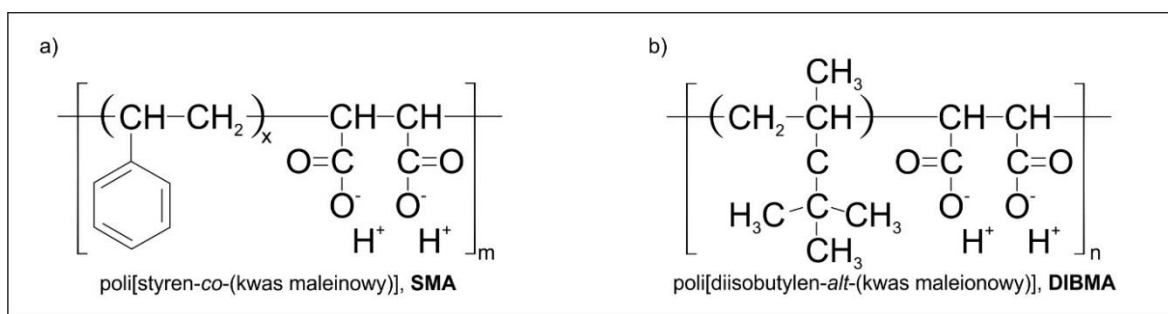
Frakcję wzbogaconą w mitochondria do eksperymentów przeprowadzanych z wykorzystaniem polimerów SMA (poli[styren-*co*-(kwas maleinowy)]) oraz DIBMA (poli[diisobutylen-*alt*-(kwas maleinowy)]) (punkt 5.4) izolowano zgodnie z opublikowanym wcześniej protokołem (Bednarczyk i wsp., 2013). Zamrożone komórki (z 8-10 szalek hodowlanych o średnicy 150 mm) rozmrożono na lodzie, a następnie zawieszono w 10 ml roztworu sacharozy (250 mM) w buforze składającym się z: 1 mM EGTA; 5 mM HEPES/KOH; pH 7,2 z dodatkiem 1mM PMSF oraz inhibitorów proteaz (cOmplete™, Roche) (SIB). Komórki homogenizowano, a następnie wirowano przy 9 200 x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Powstały osad zawieszono w 5 ml buforu SIB i wirowano przy 800 x g przez 20 min w temperaturze 4°C. Supernatant zawierający mitochondria przeniesiono do nowej probówki typu Falcon i wirowano (9 200 x g, 4°C, 10 min). Frakcję wzbogaconą

w mitochondria znajdującą się w osadzie zawieszono w 1 ml buforu SIB i ponownie wirowano przy 9 200 x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Wirowanie to powtórzono dwukrotnie. Osad zawierający mitochondria używano natychmiast, bądź zawieszano w niewielkiej ilości buforu do przechowywania (BP: 150 mM KCl; 10 mM HEPES/KOH; pH 7,2), dzielono na porcje po około 10 µl i przechowywano w -80°C.

5.4. IZOLACJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK

Białka błonowe w celu ich oczyszczenia muszą najpierw zostać wyizolowane z błon biologicznych poprzez solubilizację. Powszechnie do solubilizacji białek błonowych stosowane są detergenty będące małymi cząsteczkami amfipatycznymi zawierającymi zarówno grupy hydrofobowe (tzw. "ogon hydrofobowy"), jak również grupy hydrofilowe (tzw. „hydrofilowa grupa czołowa”). Rozpuszczają one białka błonowe poprzez interakcję między "hydrofobowym ogonem" detergentu i hydrofobowymi domenami białka błonowego. Stężenie detergentu musi być w tym przypadku utrzymywane powyżej krytycznego stężenia micelizacji (CMC, ang. *critical micelle concentration*) (Seddon i wsp., 2004). Stosowanie detergentów ma jednak poważne wady. Białka błonowe często tracą aktywność w roztworach detergentów, ponieważ detergent może destabilizować wewnątrzcząsteczkowe interakcje w białku powodując nieodwracalne zmiany konformacji białka lub jego agregację (Smith, 2011). Może być to spowodowane usunięciem lipidów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania białka (Palsdottir i wsp., 2004). Detergenty wybierane są eksperymentalnie. Wybrany detergent powinien wystarczająco rozpuszczać białko błonowe bez nieodwracalnej denaturacji, a ponadto nie powinien wpływać na strukturę i właściwości funkcjonalne białka. Wybrany detergent powinien być również zgodny z kolejnymi etapami oczyszczania (Seddon i wsp., 2004).

W ostatnich latach opracowano nową metodę ekstrakcji białek błonowych poprzez amfifilowe kopolimery. Powszechnie w tym celu wykorzystywane są dwa kopolimery: poli[styren-co-(kwas maleinowy)], tzw. SMA (ang. *poly[styrene-co-(maleic acid)]*) (Lee i wsp., 2016) oraz poli[diisobutylen-alt-(kwas maleinowy)] – DIBMA (ang. *poly[diisobutylene-alt-(maleic acid)]*) (Oluwole i wsp., 2017b, Oluwole i wsp., 2017a).



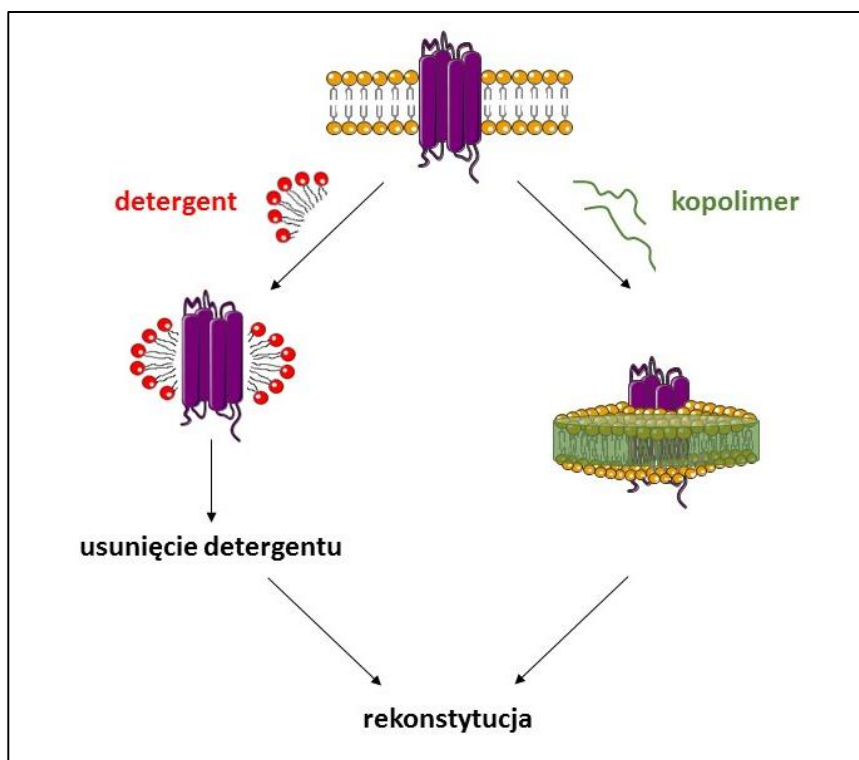
Rycina 6. Struktury chemiczne kopolimerów: a) SMA i b) DIBMA w neutralnym pH. Średnie wartości $m \approx 9$, $x \approx 1$ dla SMA (1,2:1); $m \approx 8$, $x \approx 2$ dla SMA (2,3:1); $m \approx 9$, $x \approx 3$ dla SMA (3:1) i $n \approx 37$ dla DIBMA.

Wspomniane polimery wytwarzają struktury, w których białko błonowe jest „zamknięte” wraz z lipidami w tzw. natywnych/polimerowych nanodyskach (cząsteczkach lipidowych) – SMALPs (ang. *SMA lipid particles*) lub DIBMALPs (ang. *DIBMA lipid particles*), odpowiednio dla kopolimeru SMA i jego pochodnych oraz DIBMA. Zastosowanie tej metody solubilizacji pozwala na wyeliminowanie wielu problemów obserwowanych w przypadku ekstrakcji białek za pomocą detergentów np. zachowanie białka w jego natywnym środowisku lipidowym (Gulati i wsp., 2014). Dane literaturowe dowodzą, że białka błonowe ekstrahowane za pomocą kopolimeru SMA wykazują się 7-krotnie zwiększoną stabilnością, a także są stabilniejsze w szerszym zakresie temperatur w porównaniu do białek solubilizowanych w detergentach (Dörr i wsp., 2014). Jednakże istnieją również pewne ograniczenia w stosowaniu kopolimerów. W przypadku SMA wadą jest niestabilność SMALPs w pH poniżej 7,0 oraz w obecności kationów dwuwartościowych, co może być problematyczne w przypadku białek wymagających niskiego pH lub wiązania kationów dwuwartościowych do prawidłowego funkcjonowania (Morrison i wsp., 2016; Lee i wsp., 2016). Dodatkowo zastosowanie kopolimerów SMA lub DIBMA nie wymaga usunięcia nadmiaru polimeru przed rekonstytucją białka do dwuwarstwy lipidowej (Dörr i wsp., 2014)

Do tworzenia nanodysków polimerowych wykorzystuje się również pochodne kopolimeru SMA, takie jak np.: SMA-EA (ang. *SMA-ethanolamine*) (Ravula i wsp., 2017; Ramadugu i wsp., 2017) oraz SMA-QA (ang. *styrene maleimide quaternary ammonium*) (Ravula i wsp., 2019a), a ich zastosowanie pozwala na ominięcie niektórych ze wcześniej wspomnianych ograniczeń. SMA-EA pozwala na otrzymanie tzw. „makro-nanodysków” o średnicy ok. 50 nm, co pozwala na izolację dużych kompleksów białkowych (Ravula i wsp., 2017). Ponadto nanodyski te są bardziej tolerancyjne na niskie pH i wykazują większą stabilność temperaturową oraz stabilność w obecności soli, a przede wszystkim jonów metali

dwuwartościowych (Ravula i wsp., 2017). Kopolimer SMA-QA pozwala na tworzenie nanodysków o średnicy w zakresie od 10 do 30 nm, które charakteryzują się stabilnością w szerokim zakresie pH (od ok. 2,5 do 10,0) oraz w obecności wyższych stężeń jonów dwuwartościowych (do 200 mM). Ponadto dodatni ładunek może decydować o jego specyficzności wobec innych rejonów błony niż jest to w przypadku „klasycznego” ujemnie naładowanego kopolimeru SMA (Ravula i wsp., 2019a).

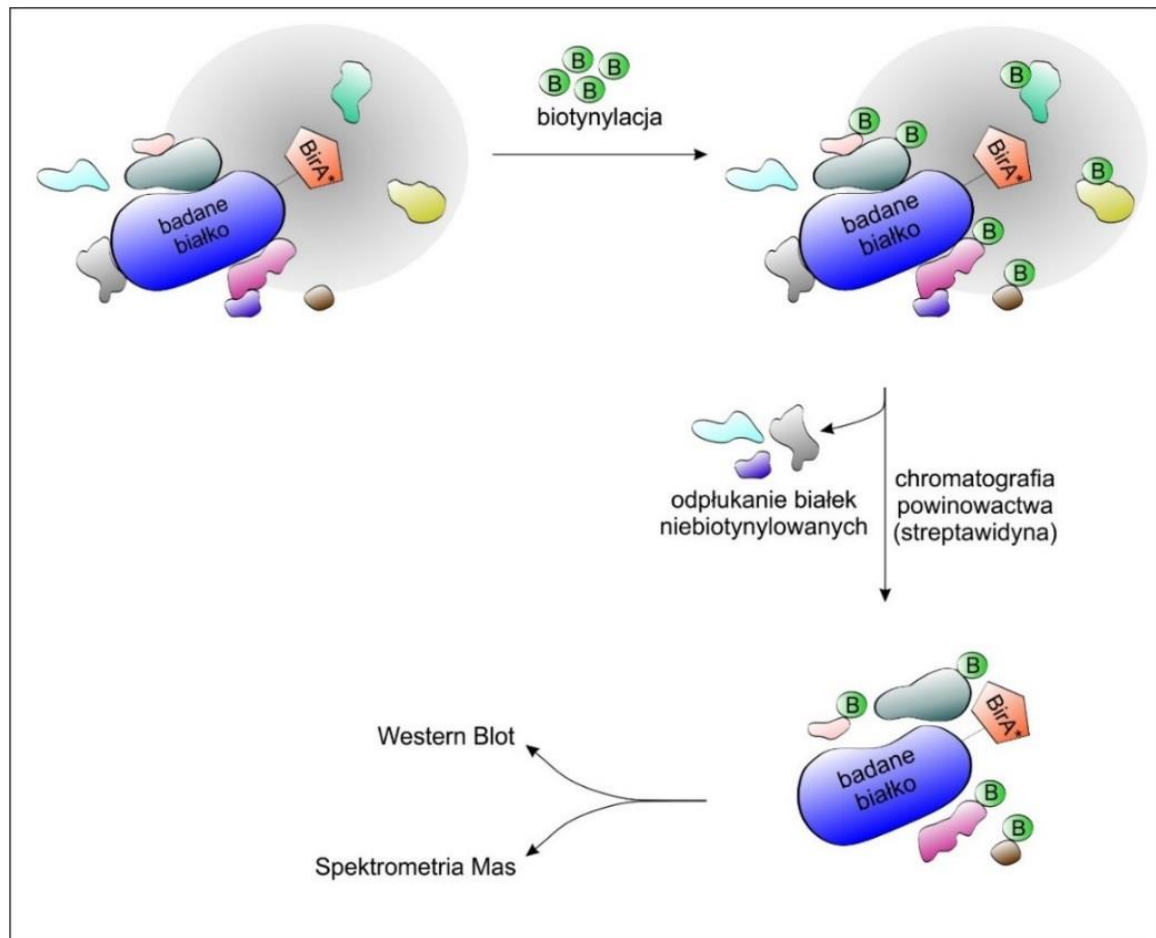
Wykorzystanie technologii natywnych nanodysków pozwoliło na wyizolowanie i oczyszczenie różnych białek błonowych, np. białek kasety wiążącej ATP (ABC) (Gulati i wsp., 2014; Horsey i wsp., 2020; Baeta i wsp., 2021; Gulamhussein i wsp., 2019), receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) (Jamshad i wsp., 2015; Gulamhussein i wsp., 2020; Szundi i wsp., 2021; Tedesco i wsp., 2021), a także różnych transporterów (Rehan i wsp., 2017; Dilworth i wsp., 2021). Solubilizacja z zastosowaniem kopolimerów została również z powodzeniem zastosowana do ekstrakcji kanałów jonowych, m. in.: bakteryjnego kanału potasowego KcsA (Dörr i wsp., 2014; Kopf i wsp., 2020), bakteryjnego kanału jonowego ELIC (Kumar i wsp., 2021), a także kanału potasowego bramkowanego napięciem K_v znajdującego się w neuronach oraz sercu (Karlova i wsp., 2019).



Rycina 7. Schematyczne przedstawienie solubilizacji, oczyszczenia i rekonstrukcji białka błonowego przy użyciu detergentu lub kopolimeru SMA lub DIBMA.

5.4.1. Oczyszczanie biotynylowanych białek

W prezentowanej rozprawie doktorskiej do identyfikacji oddziaływań międzybiałkowych wykorzystywana jest metoda TurboID, która jest kolejną z generacji metody biotynylacji białek sąsiadujących (BioID, ang. *proximity-dependent biotin identification*) (Branon i wsp., 2018). Metoda BioID oparta jest o ekspresję fuzji genowej badanego białka i noszącą mutację R118G ligazy biotyny *E. coli* - BirA* (Roux i wsp., 2012). W wersji TurboID do systemu wprowadzono aż 14 dodatkowych mutacji do BirA* zwiększających aktywność enzymu (Branon i wsp., 2018). W metodzie tej ligaza BirA* wykorzystuje wewnątrzkomórkową biotynę do produkcji reaktywnych cząsteczek bioAMP (biotynylo-5-adenozynomonofosforanu, ang. *biotinyl-5'-adenylate*), które następnie reagują z aminami pierwszorzędowymi sąsiednich białek, co prowadzi do kowalencyjnego związania biotyny (May i wsp., 2020). Wykazano, że w wersji TurboID reakcja ta katalizowana jest ze znacznie większą szybkością, niż w przypadku BioID (Branon i wsp., 2018). Dodatkowo publikowane wyniki wskazują, że biotynylacja katalizowana przez TurboID jest 22-krotnie wydajniejsza, niż w przypadku BioID (May i wsp., 2020; Branon i wsp., 2018; Mair i wsp., 2019; Laroche i wsp., 2019). Zaletą metody BioID jest znakowanie białek w ich natywnym środowisku komórkowym, co pozwala na identyfikację słabych i przejściowych oddziaływań międzybiałkowych (Roux i wsp., 2012). Oczyszczanie białek biotynylowanych w metodzie BioID jest kluczowe dla specyficznej identyfikacji białek sąsiadujących. Białka biotynylowane oczyszczane są za pomocą złoża z immobilizowaną streptawidyną, a następnie analizowane za pomocą techniki Western Blot i identyfikowane z wykorzystaniem spektrometrii mas (Kim i wsp., 2014).



Rycina 8. Schemat przedstawiający proces identyfikacji białek biotynylowanych w technologii TurboID. Komórkowa produkcja białka znakowanego zmodyfikowaną ligazą biotyny BirA* (TurboID) prowadzi do selektywnej biotynylacji białek znajdujących się w jego pobliżu. Po lizie komórek w warunkach denaturujących biotynylowane białka są oczyszczane poprzez chromatografię powinowactwa względem streptawidyny. Oczyszczone białka można następnie zidentyfikować za pomocą metody spektrometrii mas lub analizy Western Blot.

Mitochondria po transfekcji plazmidami serii TurboID i biotynylacji oczyszczono zgodnie z opublikowaną wcześniej metodologią (Roux i wsp., 2013). Do mitochondriów dodano 5 ml buforu *TurboID Lysis Buffer* (TLB: 150 mM NaCl; 0,4% SDS; 1% NP-40; 1 mM EGTA; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM Tris/HCl; pH 7,4 oraz dodawane na świeżo: 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche) i 1 mM PMSF). Następnie próbkę sonikowano na lodzie przez 1 minutę (2 minuty, 50% cyklu pracy). Po sonikacji do próbki dodano dodatkowe 9 ml buforu TLB i mieszano próbkę przez 10 minut w temperaturze 4°C, a następnie wirowano przez 30 minut przy 5 500 x g w temperaturze 4°C. Otrzymany supernatant przeniesiono do nowej próbówki typu Falcon i dodano do niego złożo magnetyczne z immobilizowaną streptawidyną *Dynabeads C1 Streptavidin* (Thermo

Scientific), które wcześniej zrównoważono za pomocą buforu LB. Próbkę ze złożem mieszano przez noc w 4°C. Po nocy za pomocą statywu magnetycznego usunięto roztwór ze złoża, a następnie złożo przepłukano dwukrotnie za pomocą 5 ml *TurboID Wash Buffer 1* (TWB1: 2% SDS; 50 mM Tris; pH 7,4). Złożo mieszano przez 10 minut z każdą porcją tego buforu. Następnie w ten sam sposób złożo przepłukano kolejno buforami: *TurboID Wash Buffer 2* (TBW2: 0,1% deoksychoalan sodu; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 500 mM NaCl; 50 mM HEPES/NaOH; pH 7,5) oraz *TurboID Wash Buffer 3* (TBW3: 5% deoksychoalan sodu; 0,5% NP-40; 1 mM EDTA; 250 mM LiCl; 10 mM Tris; pH 7,4). Dodatkowo złożo przepłukano około 7-10 razy za pomocą 5 ml 10 mM Tris pH 7.4. Na koniec złożo zawieszano w 100 µl 10 mM Tris pH 7.4. Białka zatrzymane na złożu magnetycznym analizowano za pomocą spektrometrii mas (punkt 5.6.3). Dodatkowo w jednym z eksperymentów białka wymyto ze złoża przez inkubację w buforze *2x Laemmli Sample Buffer* z 5 mM biotyną w 95°C przez 10 min i analizowano za pomocą metody Western Blot (punkt 5.6.1).

5.4.2. Koimmunoprecypitacja

Immunoprecypitacja jest metodą polegającą na izolacji konkretnego białka z mieszaniny za pomocą swoistego przeciwciała związanego kowalencyjnie ze złożem (Bonifacino i wsp., 2016). Metoda ta pozwala na identyfikację białek znajdujących się w kompleksach białkowych poprzez interakcje bezpośrednie lub pośrednie (Bonifacino i wsp., 2016; Pazour, 2009).

Metoda koimmunoprecypitacji została z sukcesem zastosowana do poszukiwania białek oddziałujących z różnymi kanałami potasowymi, np. Kir4.1 (Connors i wsp., 2004), BK_{Ca} (Sokolowski i wsp., 2012; Sokolowski i wsp., 2011; Singh i wsp., 2016).

5.4.2.1. Koimmunoprecypitacja białek solubilizowanych w detergencie

Komórki po transfekcji plazmidami *pROMK2-V5*, *pPRDX*, *pGPATCH8*, *pTP53*, *pIMPDH2*, *pAGK*, *pPARP1* (Tabela 2) oczyszczano dzięki obecności znaczników epitopowych V5 oraz DDDDK (FLAG) w badanych białkach. Do oczyszczania wykorzystano chromatografię powinowactwa wobec przeciwciał monoklonalnych anty-V5 (V5-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science) lub anty-FLAG (DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit, MBL Life Science).

Komórki nietransfekowane oraz komórki transfekowane po upływie 24 godzin przepłukano za pomocą zimnego PBS, a następnie oderwano mechanicznie i wirowano przy 800 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Następnie do otrzymanego osadu

komórkowego dodano 1 ml *Co-IP Lysis Buffer* (CLB: 1% Triton X-100; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,5; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche); 1 mM PMSF) i zawiesinę mieszano przez 20 minut w temperaturze 4°C. Po upływie tego czasu próbkę wirowano przy 15 000 x g przez 15 minut również w temperaturze 4°C. Otrzymany supernatant podzielono na dwie części. Jedną z nich oczyszczono z wykorzystaniem zestawu DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science), a drugą z wykorzystaniem V5-tagged Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science) zgodnie z protokołami załączonym przez producenta z niewielkimi zmianami. W obu przypadkach przed użyciem złoże przepłukano trzykrotnie za pomocą 5 ml buforu płuczącego *Co-IP Wash Buffer* (CWB: 0,1% Tween-20; 300 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,5, z dodatkiem 1mM PMSF oraz inhibitorów proteaz (cOmplete™, Roche)), a następnie zrównoważono za pomocą buforu CLB. Po zrównoważeniu 50 µl złoża dodano do podzielonego wcześniej supernatantu i inkubowano przez 1 godzinę z mieszaniem w temperaturze 4°C. Po upływie tego czasu złoże oddzielono z wykorzystaniem magnezu, a niezwiązaną frakcję usunięto. Złoże przepłukano dziesięciokrotnie za pomocą 1 ml buforu CWB. Po ostatnim płukaniu dokładnie usunięto bufor, złoże zawieszono w 40 µl roztworu peptydu: odpowiednio 2 mg/ml peptydu V5-tag lub 1 mg/ml peptydu DDDDK, a następnie inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Frakcję elucji zebrano poprzez oddzielenie złoża za pomocą statywu magnetycznego.

5.4.2.2. Koimmunoprecypitacja białek solubilizowanych za pomocą polimerów

W celu dodatkowego potwierdzenia interakcji pomiędzy białkiem kanałowym ROMK2-V5, a białkiem AGK-Myc-FLAG postanowiono wykorzystać metodę polimerowych (natywnych) nanodysków.

W pierwszym etapie eksperymentu z komórek HEK293T po transfekcji plazmidem *pROMK2-V5* izolowano frakcję wzbogaconą w mitochondria zgodnie z procedurą zamieszczoną w punkcie 5.3.5.2, a następnie solubilizowano z wykorzystaniem kopolimerów SMA (3:1; 2,3:1 oraz 1,2:1) (Polyscope Polymers, Holandia) oraz DIBMA (BASF, Polska) o końcowym stężeniu 2,5%. Solubilizację prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 25°C w buforze *Polimer Solubilization Buffer* (PSB: 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 50 mM Tris; pH 7,4; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche); 1 mM PMSF). Następnie próbkę wirowano przy 15 000 x g przez 20 minut w temperaturze 4°C w celu usunięcia nierozpuszczalnej frakcji. Próbki analizowano zgodnie z procedurą zamieszczoną w punkcie 5.6.1.

Po zoptymalizowaniu warunków solubilizacji komórki HEK293T kotransfekowane plazmidami eksprymującymi *ROMK2-V5* oraz *AGK-Myc-FLAG* solubilizowano w buforze PSB zawierającym 2,5% DIBMA przez całą noc z delikatnym mieszaniem. Następnego dnia mieszaninę przeciętnie 3-krotnie przez cienką igłę, a następnie zwirowano przez 20 minut przy 15 000 x g w temperaturze 4°C. Supernatant podzielono na dwie części, z których jedną oczyszczono z wykorzystaniem zestawu DDDDK-tagged Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science), a drugą za pomocą zestawu V5-tagged Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta ze zmianami. Procedura w przypadku obu złożeń wyglądała analogicznie. Przed użyciem złożeń przepłukano trzy razy za pomocą 5 ml buforu płuczającego PWB (200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4), a następnie zrównoważono za pomocą PSB. Po zrównoważeniu 50 µl złożeń dodano do supernatantu. Próbkę inkubowano ze złożem przez godzinę w temperaturze 4°C z mieszaniem. Po upływie tego czasu niezwiązaną frakcję usunięto z wykorzystaniem magnezu, a złożę przepłukano dziesięciokrotnie za pomocą 1 ml buforu PWB. Po ostatnim płukaniu dokładnie usunięto roztwór, złożę zawieszono w 40 µl roztworu peptydu - odpowiednio 2 mg/ml peptydu V5-tag lub 1 mg/ml peptydu DDDDK, a następnie inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Frakcję elucji zebrano poprzez oddzielenie złożeń za pomocą statywu magnetycznego. Z każdej frakcji elucji pobrano po 10 µl na analizę Western Blot (punkt 5.6.1), a 30 µl poddano dalszemu oczyszczaniu. Próbkę wcześniej oczyszczaną wobec przeciwciała anti-V5, oczyszczano za pomocą zestawu DDDDK-tagged

Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science), a drugą (tj. oczyszczaną wobec przeciwciała anty-FLAG) oczyszczano za pomocą zestawu V5-tagged Protein Magnetic Purification Kit (MBL, Life Science). Procedura wyglądała analogicznie do tego, co zaprezentowano powyżej. Złoże zrównoważono za pomocą PWB. Po zrównoważeniu 50 μ l złoża dodano do supernatantu. Próbkę inkubowano ze złożem przez godzinę w temperaturze 4°C z mieszaniem. Po upływie tego czasu niezwiązaną frakcję usunięto z wykorzystaniem magnezu, a złoże przepłukano dziesięciokrotnie za pomocą 1 ml buforu PWB. Po ostatnim płukaniu dokładnie usunięto roztwór, złoże zawieszono w 40 μ l roztworu peptydu - odpowiednio 2 mg/ml peptydu V5-tag lub 1 mg/ml peptydu DDDDK, a następnie inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Frakcję elucji zebrano poprzez oddzielenie złoża za pomocą statywu magnetycznego.

5.4.3. Oczyszczanie białek produkowanych w błonach bakterii *E. coli*

Produkcja białek błonowych składa się z wielu etapów, w tym solubilizacji ze środowiska lipidowego, oczyszczania solubilizowanego białka z wykorzystaniem metod chromatograficznych oraz jego przechowywanie do czasu analizy.

5.4.3.1. Solubilizacja białek z błon bakteryjnych

5.4.3.1.1. Solubilizacja z wykorzystaniem detergentów

W pierwszym etapie badań błony bakteryjne zawierające białka ROMK1-6xHis, MISTIC-ROMK1-6xHis, MISTIC-Kir1.3-ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis (stężenie końcowe 20 mg/ml) solubilizowano w różnych detergentach w buforze *Detergent Solubilization Buffer* (DSB: 50 mM KCl; 10% glicerol; 100 μ M EDTA; 20 mM Tris; pH 7,4; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche); 1 mM PMSF) z dodatkiem detergentu. Sprawdzano solubilizację w następujących detergentach: 1% fos-cholina, 1% digitonina, 2% n-dodecylo- β -D-maltozyd (DDM), 0,5% oktylo- β -D-glukopiranozyd (OG), 1% cholan sodu, 0,25% dodecylosiarczan sodu (SDS) oraz 2% Triton X-100. Błony z każdym ze wspomnianych detergentów solubilizowano przez pipetowanie, inkubowano przez 15 minut na lodzie, a następnie wirowano przy 14 000 x g w celu oddzielenia niezsolubilizowanego materiału. Zarówno próbki supernatantu, jak i osadu analizowano metodą Western Blot zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 5.6.1.

Do oczyszczania białek ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis błony bakteryjne rozcieńczono do końcowego stężenia 45 mg/ml w buforze DSB zawierającym 2,5% DDM. Solubilizację prowadzono przez całą noc w 25°C z delikatnym wytrząsaniem. Frakcję

nierozpuszczoną osadzono przez wirowanie przy 100 000 x g przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Supernatant, zawierający solubilizowane białko ROMK2-6xHis, oczyszczono metodą chromatografii metalopowinowactwa, jak opisano w punkcie 5.4.3.2.

5.4.3.1.2. Solubilizacja z wykorzystaniem kopolimerów

Przed użyciem kopolimery SMA (3:1; 2,3:1 oraz 1,2:1) oraz DIBMA poddano dializie przez błonę dializacyjną (NMWCO wynoszące 3,5 kDa, ang. *nominal molecular weight cutoff*). Dializę prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, ze zmianą buforu po około 12-16 godzinach.

Do solubilizacji błony bakteryjne rozcieńczono do końcowego stężenia 45 mg/ml w buforze PSB składającym się z 200 mM KCl oraz 50 mM Tris pH 7,4 z dodatkiem 1 mM PMSF, 100 μM EDTA oraz inhibitorów proteaz (cOmplete™, Roche). Kopolimer SMA lub DIBMA dodano do końcowego stężenia 2,5% i reakcję solubilizacji prowadzono przez całą noc w 25°C z delikatnym mieszaniem. Następnego dnia mieszaniny reakcyjne wirowano przy 100 000 x g przez 1 godzinę w 4°C w celu usunięcia niesolubilizowanych frakcji. Zebrany supernatant zastosowano do późniejszego oczyszczania białka metodą chromatografii metalopowinowactwa zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 5.4.3.2.

5.4.3.2. Oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis z pomocą chromatografii metalopowinowactwa

Podstawę chromatografii powinowactwa wobec jonów metali - metalopowinowactwa (IMAC, ang. *ion metal affinity chromatography*) stanowią odwracalne niekowalencyjne oddziaływania pomiędzy izolowanym białkiem, a specyficznym dla niego ligandem.

W przypadku białka ROMK1 oraz ROMK2 produkowanego w bakteriach zastosowano popularny znacznik 6xHis. Dzięki obecności pierścienia imidazolowego reszt histydynowych znacznik ten oddziałuje z jonami metali przejściowych bloku d układu okresowego, takimi jak Ni²⁺ i Co²⁺ unieruchomionymi na nośniku. Po solubilizacji próbki białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis inkubowano z złożem przez całą noc w 4°C. W przypadku próbek z detergentem zastosowano His-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich), a próbki z kopolimerami inkubowano ze złożem HisPure™ Ni-NTA Superflow agarose (Thermo Scientific). Złoża wcześniej zrównoważono za pomocą buforu *Primary buffer* (200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4 z dodatkiem 1 mM PMSF oraz inhibitorów proteazy cOmplete™ (Roche)). Następnie złożę przeniesiono do kolumn z przepływem grawitacyjnym (Mobicol "Classic", MoBiTec Molecular Biotechnology) i przesącz zebrano. Złożę

przepłukano czterokrotnie za pomocą buforu PB z dodatkiem 40 mM imidazolu objętością równoważną dwóm objętościom złoza (CV, ang. *column volumes*). Białko ROMK2-6xHis eluowano 1,5 - 2,5 CV buforu *Elution Buffer* (EB: 250 mM imidazol; 200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4 z dodatkiem 1 mM PMSF oraz inhibitorów protease cOmplete™ (Roche)). Do oczyszczania próbek solubilizowanych w DDM bufor *Primary buffer* zawierał 2,5% DDM, a *Wash Buffer* oraz *Elution Buffer* zawierały 1% DDM. Oczyszczone białko rozpipetowano na porcje (20 - 50 µl), a następnie mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.4.3.3. Dysocjacja agregatów białka ROMK2

W celu dysocjacji agregatów białka ROMK2 błony bakteryjne zawierające białko solubilizowane w kopolimerze SMA 2,3:1 (punkt 5.4.3.1.2) oraz w DDM (punkt 5.4.3.1.1) wirowano (100 000 x g, 1 godzina, 4°C) a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z dodatkiem 20% lub 40% 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE, ang. *2,2,2-Trifluoroethanol*). Próbkę schłodzono na lodzie przez około 10 min. Po upływie tego czasu dodano *4xLaemmlis Sample Buffer* (BioRad) oraz 1 µl 1 M DTT. W innych wariantach do kolejnych próbek białka solubilizowanego w DDM oraz SMA 2,3:1 dodano mocznik do końcowego stężenia wynoszącego 4 M lub tiomocznik do końcowego stężenia 0,5 M lub 1 M. Przygotowano również próbki, w których białko denaturowano mieszaniną 2 M mocznika i 0,5 M tiomocznika. Otrzymane próbki analizowano metodą Western Blot (punkt 5.6.1).

5.5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA W PRÓBKACH

W celu określenia stężenia białka w próbkach opierano się na trzech różnych metodach, tj.: Bradforda, kwasu bicynochoninowego (BCA, ang. *bicinchoninic acid*), a w przypadku białka ROMK2-6xHis kompetencyjnego testu ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

5.5.1. Metoda z zastosowaniem kwasu bicynochoninowego

Metoda z zastosowaniem kwasu bicynochoninowego (BCA, ang. *bicinchoninic acid*) opiera się na redukcji w środowisku zasadowym jonów miedzi Cu^{2+} do Cu^{+} , które następnie reagują z BCA tworząc barwny kompleks.

Do oznaczenia stężenia białka z wykorzystaniem kwasu bicynochoninowego wykorzystywano zestaw BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible, Pierce™

(Thermo Scientific). Całą procedurę wykonywano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Pokróćce, w pierwszym etapie przygotowano krzywą wzorcową białka BSA o stężeniach 25, 50, 100, 200, 300, 600 i 1200 ng/ μ l (w odpowiednim buforze), którą następnie rozpipetowano po 10 μ l na płytce 96-dółkowej w dwóch powtórzeniach. Badaną próbkę nakładano w różnych rozcieńczeniach w końcowej objętości 10 μ l. Następnie do każdego z dołków dodano po 200 μ l mieszaniny *Reagent A* i *Reagent B* wcześniej wymieszanych z sobą w stosunku 1:50. Płytkę inkubowano w 37°C z delikatnym mieszaniem (100 rpm) przez 30 minut, a następnie mierzono wartości absorbancji przy długości fali 562 nm na czytniku mikroplitek (PerkinElmer) z wykorzystaniem programu EnSpireMenager (PerkinElmer).

5.5.2. Metoda Bradforda

Metoda Bradforda oparta jest na reakcji reszt aminokwasowych lizyny, argininy oraz w mniejszym stopniu histydyny i aminokwasów aromatycznych w białkach z anionową formą błękitu Coomassie G-250 (Bradford, 1976).

W pierwszym etapie przygotowano krzywą wzorcową białka BSA o stężeniach: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 oraz 20 μ g/ μ l, które rozcieńczano w 100 mM NaOH do końcowej objętości 50 μ l. Badaną próbkę przygotowano poprzez rozcieńczenie 1 μ l próbki w 49 μ l 100 mM NaOH. Następnie do krzywej wzorcowej i próby badanej dodano po 1 ml rozcieńczonego w stosunku 1:4 odczynnika *Protein Assay Dye Reagent* (BioRad), a następnie próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm z wykorzystaniem spektrofotometru Biomate3 (Thermo Scientific). Do określenia stężenia nieznanymi próbek wykorzystano metodę krzywej wzorcowej.

5.5.3. Pomiar stężenia białka ze znacznikiem 6xHis

Do ilościowego określenia stężenia białka ROMK2-6xHis rekonstruowanego w liposomach oraz natywnych nanodyskach wykorzystywano zestaw His-Tag Protein ELISA kit (Cell Biolabs, Inc) oparty o kompetencyjny test immunoenzymatyczny typu ELISA zgodnie z instrukcją producenta. Wzorce białek 6xHis oraz próbki ROMK2-6xHis nałożono na płytkę pokrytą polihistydyną. Następnie dodano przeciwciało monoklonalne anty-6xHis oraz przeciwciało drugorzędowe koniungowane z HRP. Mierzono absorbancje przy długości fali 450 nm z wykorzystaniem czytnika mikroplitek EnSpire (PerkinElmer). Do określenia stężenia nieznanymi próbek wykorzystano metodę krzywej wzorcowej.

5.6. ANALIZA SKŁADU PRÓBEK

5.6.1. Metoda Western Blot

Metoda Western Blot jest podstawową techniką biologii molekularnej, która pozwala na wykrycie obecności konkretnych białek w analizowanych próbkach, a jej działanie opiera się na reakcji typu antygen-przeciwciało. Pierwszym etapem po przygotowaniu próbek jest rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (SDS, ang. *sodium dodecyle sulfat*) – metoda SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyle sulfat polyacrylamide gel electrophoresis*). Pozwala ona na rozdział białek znajdujących się w analizowanej próbce ze względu na masę cząsteczkową. Kolejnym etapem jest transfer rozdzielonych białek na membranę, a następnie detekcja za pomocą swoistego przeciwciała.

5.6.1.1. Przygotowanie próbek

W eksperymentach typu TurboID biotynylowane białka zatrzymane na złożu magnetycznym eluowano poprzez inkubację złoża z mieszaniną składającą się z: *2x Laemmli Sample Buffer* (BioRad), 10 mM DTT, 1 mM PMSF oraz 5 mM biotyny w temperaturze 95°C przez 15 minut.

Do frakcji elucji otrzymanej w eksperymentach koimmunoprecypitacji dodano *4x Laemmli Sample Buffer* (BioRad) do końcowego stężenia 1x, 10 mM DTT oraz 1 mM PMSF, a następnie ogrzewano je w temperaturze 95°C przez 15 minut.

W eksperymentach badających produkcję białka ROMK1 oraz ROMK2 w *E. coli* komórki bateryjne osadzano przez wirowanie (10 000 x g, 2 minuty), a osad komórek solubilizowano w 200 µl *1x Laemmli Sample Buffer* z dodatkiem 10 mM DTT, 1 mM PMSF. Próbkę ogrzewano w temperaturze 95°C przez 15 minut.

Do próbek otrzymanych podczas solubilizacji i oczyszczania białka ROMK2-6xHis dodano odczynniki do następujących końcowych stężeń: *1x Laemmli Sample Buffer* (BioRad), 10 mM DTT oraz 1 mM PMSF, a następnie ogrzewano je przez 15 minut w temperaturze 37°C przed nałożeniem na żel.

5.6.1.2. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Próbki rozdzielano w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (żel zagęszczający i 10% żel poliakryloamidowy – składy *Tabela 3*) w obecności SDS (SDS-PAGE) z wykorzystaniem aparatów firmy BioRad. W analizie SDS-PAGE stosowano dwa wzorce białek o znanych masach cząsteczkowych: *PageRuler™ Prestained Protein*

Ladder (ThermoFisher Scientific) oraz *Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific).

Typ żelu	Skład
Żel zagęszczający	16,6% akryloamid/bis-akryloamid (30/0,8)
	80 mM Tris pH 6,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
10% żel rozdzielający	0,2% TEMED
	10% akryloamid/bis-akryloamid (30/0,8)
	386 mM Tris pH 8,0
	0,1% SDS
	0,059% APS
	0,058% TEMED

Tabela 3. Skład żeli wykorzystywanych w analizie SDS-PAGE.

Elektroforezę prowadzono przez około 1,5 - 2 godziny w buforze *Running buffer* (RB: 25 mM Tris; 191 mM glicyna; 0,1% SDS; pH 7,4) w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu wynoszącym 100 V.

5.6.1.3. Elektrotransfer

Białka po rozdziale w żelu SDS-PAGE przenoszono w polu elektrycznym (elektrotransfer) na membranę z difluorku poliwinylidenu (PVDF, ang. *polyvinylidene difluoride*; BioRad) w buforze *Transfer Buffer* (TB: 20 mM Tris; 150 mM glicyna; 0,02% SDS; 20% metanol). Transfer prowadzono przez 2 godziny przy natężeniu 250 mA z wykorzystaniem aparatu BioRad. Cała procedura odbywała się temperaturze 4°C.

5.6.1.4. Immunocytochemia

Membrany PVDF z białkami przepłukiwano wodą, blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST (ang. *TRIS-buffered saline*; o składzie: 20 mM Tris, 125 mM NaCl, 0,1% Tween-20; pH 7,5) lub PBST (PBS z 0,1% Tween-20) i inkubowano z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (Tabela 4). Membrany płukano 3 razy w TBST/PBST i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem związanym z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *horseradish peroxidase*). Następnie membrany płukano minimum

3 razy w TBST/PBST. Aktywność HRP wizualizowano metodą chemiluminescencji (ECL Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) i rejestrowano za pomocą klisz rentgenowskich (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare).

Przeciwciało	Blokowanie	Inkubacja (czas, temperatura, rozcieńczenie)	Przeciwciało drugorzędowe (organizm, rozcieńczenie)
Anti-6xHis tag® [HIS.H8] Abcam 18184	5% mleko, PBST*, noc, 4°C	2 godziny, RT 1 : 1 000	anty-mysie 1: 5 000
Anti-HA Sigma Aldrich H9658	5% mleko, TBST**, noc, 4°C	2 godziny, RT 1 : 1 000	anty-mysie 1: 5 000
Streptavidin-HRP Thermo Scientific	5% mleko, TBST**, noc, 4°C	2 godziny, RT 1 : 40 000	-
Anti-V5 Sigma Aldrich V8012	10% mleko, PBST*, 2 godziny, RT	noc, 4°C 1 : 1 000	anty-mysie 1: 5 000
Anti-KCNJ1 (ROMK) Sigma Aldrich HPA026962	10% mleko, TBST**, 2 godziny, RT	noc, 4°C 1 : 200	anty-królicze 1: 5 000
Anti-DDK (FLAG) OriGene TA50011	10% mleko, PBST*, 2 godziny, RT	noc, 4°C 1 : 1 000	anty-królicze 1: 5 000
Anti-AGK OriGeneTA344897	10% mleko, PBST*, 2 godziny, RT	noc, 4°C 1 : 500	anty-królicze 1: 5 000
Anti-SDHA Abcam 137040	5% mleko, TBST**, noc, 4°C	2 godziny, RT 1 : 500	anty-królicze 1: 5 000
Anti-Na⁺/K⁺-ATPaza Abcam 7671	5% mleko, TBST**, noc, 4°C	2 godziny, RT 1 : 1000	anty-mysie 1: 5 000

Tabela 4. Zestawienie przeciwciał wykorzystywanych w eksperymentach wraz z warunkami blokowania membran, inkubacji, a także informacja o przeciwciele drugorzędowym; *PBST (PBS z dodatkiem 0,1% Tween-20), **TBST (20 mM Tris, 125 mM NaCl, pH 7,5 z dodatkiem 0,1% Tween-20)

5.6.2. Mikroskopia immunofluorescencyjna z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego

Mikroskopię konfokalną wykorzystano do zbadania lokalizacji białek ROMK2-TurboID-3xHA, SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA po transfekcji przejściowej w komórkach HEK293T, a także kolokalizacji pomiędzy białkiem ROMK2-V5 i AGK-Myc-FLAG.

W celu przygotowania preparatów do mikroskopii konfokalnej komórki 24 godziny po transfekcji płukano dwukrotnie buforem PBS.

W przypadku konstruktów TurboID komórki utrwalono poprzez 20-minutową inkubację w 4% paraformaldehydzie (PFA ang. *paraformaldehyde*, Cell Signaling) w PBS, a następnie permabilizowano przez dwukrotną inkubację komórek przez 3 minuty w buforze PBS zawierającym dodatkowo 0,05% Triton X-100. Komórki inkubowano przez całą noc z przeciwciałem anti-HA (Sigma Aldrich) (rozcieńczenie 1:200 w PBS zawierającym 4% FBS) oraz anti-TOMM20 (1:500, Sigma Aldrich). Następnego dnia komórki płukano trzykrotnie po 8 minut za pomocą PBS i inkubowano je w buforze PBS z drugorzędowymi przeciwciałami: anti-mysim Alexa488 (Invitrogen) oraz anti-króliczym Alexa555 przez 2 godziny w RT. Po upływie tego czasu komórki przepłukano 3 x 5 min za pomocą PBS, a następnie utrwalono za pomocą *Vectashild* (VectorLaboratories).

Komórki transfekowane plazmidem *p-ROMK2-V5* po przepłukaniu inkubowano przez 20 minut w inkubatorze z 100 nM Mito Red (Sigma Aldrich) w DMEM bez czerwieni fenolowej (FluoroBrite™ DMEM, Gibco), a po upływie tego czasu przepłukano trzykrotnie za pomocą PBS. Następnie komórki utrwalono poprzez 20-minutową inkubację w 4% PFA (Cell Signaling) w PBS i permabilizowano przez dwukrotną 3-minutową inkubację komórek w buforze PBS zawierającym 0,05% Triton X-100. Komórki następnie inkubowano przez całą noc z przeciwciałem anti-KCNJ1 (Sigma Aldrich) (rozcieńczenie 1:200 w PBS zawierającym 4% FBS). Następnego dnia komórki płukano trzykrotnie po 8 minut za pomocą PBS i inkubowano przez 2 godziny w RT w buforze PBS z drugorzędowym przeciwciałem anti-króliczym Alexa488 (Invitrogen). Po upływie tego czasu komórki przepłukano 3 x 5 min za pomocą PBS, a następnie utrwalono za pomocą *Vectashild* (VectorLaboratories). Drugi preparat komórek transfekowanych plazmidem *p-ROMK2-V5* po przepłukaniu i utrwaleniu (4% PFA, 20 min) permabilizowano przez dwukrotną 3-minutową inkubację komórek w buforze PBS zawierającym 0,05% Triton X-100. Komórki inkubowano przez całą noc z przeciwciałem anti-V5 (Sigma Aldrich) oraz anti-coxIV (1:200, Cell Signaling). Następnego dnia komórki płukano trzykrotnie po 8 minut za pomocą PBS i inkubowano je przez 2 godziny w RT w buforze PBS z drugorzędowymi przeciwciałami: Alexa555 rabbit (1:1000, Invitrogen) oraz Alexa488 mouse 1:1000 (Invitrogen). Po upływie tego czasu komórki przepłukano 3 x 5 min za pomocą PBS, a następnie utrwalono za pomocą *Vectashild* (VectorLaboratories).

W preparacie komórek kotransfekowanych plazmidami *p-ROMK2-V5* oraz *pAGK-Myc-FLAG* całą procedurę wykonywano tak jak wspomniano powyżej

wykorzystując przeciwciała anty-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich) oraz anty-FLAG (1:200, Origene) wraz z przeciwciałami: Alexa555 rabbit (1:1000, Invitrogen) oraz Alexa488 mouse 1:1000 (Invitrogen).

Przed obrazowaniem preparaty mikroskopowe przechowywano w 4°C i chroniono przed światłem. Obrazowanie komórek przeprowadzono za pomocą mikroskopu konfokalnego Olympus FV1200 z oprogramowaniem FLUOVIEW FV1000 4.2.1.20. Fluorescencję wzbudzano przy długościach 473 oraz 599 nm, a emisję obserwowano z użyciem filtra BA575-675. Obrazy zrobiono przy użyciu tych samych ustawień konfokalnych i przetworzono wykorzystując program ImageJ.

przeciwciało	rozcieńczenie	przeciwciało drugorzędowe
MitoRed Sigma Aldrich 53271	100 nM	-
Anti-HA Sigma Aldrich H9658	1: 200	Alexa488 mouse 1 : 1 000 Invitrogen
Anti-V5 Sigma Aldrich V8012	1: 200	Alexa488 mouse 1 : 1 000 Invitrogen
Anti-coxIV Cell Signaling 4844S	1: 200	Alexa555 rabbit 1 : 1 000 Invitrogen
Anti-KCNJ1 (ROMK) Sigma Aldrich HPA026962	1: 200	Alexa488 rabbit 1 : 1000 Invitrogen
Anti-DDK (Flag) OriGene TA50011	1: 200	Alexa555 mouse 1 : 1000 Invitrogen
Anti-TOMM20 Sigma Aldrich HPA011562	1:500	Alexa555 rabbit 1 : 1 000 Invitrogen

Tabela 5. Zestawienie przeciwciał wykorzystywanych w eksperymentach immunofluorescencji, a także informacja o przeciwciele drugorzędowym. Przeciwciała rozcieńczano w PBS zawierającym 4% FBS.

5.6.3. Spektrometria mas

Biotynyłowane białka, które uzyskano w eksperymentach typu TurboID, zatrzymane na złożu magnetycznym analizowano za pomocą spektrometrii mas, która wykonywana była w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

5.7. POMIARY AKTYWNOŚCI KANAŁOWEJ BIAŁKA ROMK2-6xHis

5.7.1. Przygotowanie proteoliposomów

5.7.1.1. Optymalizacja warunków przygotowywania proteoliposomów

W pierwszym etapie sprawdzono stabilność oczyszczonego białka ROMK2-6xHis (punkt 5.4.3.2) w zależności od różnych stężeń KCl. W tym celu przygotowano serię buforów do rekonstytucji (punkt 5.7.1.2) zawierających 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,0, 5 mM OG i różne stężenia KCl (50, 150, 300 lub 500 mM). Do 500 μl każdego z buforów do rekonstytucji dodano 10 μl białka ROMK1-6xHis o stężeniu 50 ng/ μl , próbki zmieszano, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu próbki wirowano przez 1 godzinę przy 100 000 x g, frakcje osadu i supernatantu rozdzielono. Białko znajdujące się w supernatancie strącono za pomocą zestawu do zagęszczania białek (Protein Precipitation Kit, A&A Biotechnology). Osady i strącone białko znajdujące się w proteoliposomach analizowano za pomocą techniki Western Blot (punkt 5.6.1).

W kolejnym kroku sprawdzono wpływ glicerolu na stabilność oczyszczonego z wykorzystaniem detergentu białka ROMK2-6xHis (punkt 5.4.3.2). W tym celu 500 ng białka ROMK2-6xHis inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w buforach o składzie: 300 mM KCl; 5 mM OG; 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,0 zawierających dodatkowo różne stężenia glicerolu, tj.: 2%, 5%, 10%, 20% lub 50%. Po upływie godziny próbki wirowano przy 100 000 x g przez 1 godzinę w celu rozdzielenia frakcji rozpuszczalnej i osadu. Białko znajdujące się w supernatancie strącono za pomocą zestawu do precypitacji białek (Protein Precipitation Kit, A&A Biotechnology), a następnie zarówno ze strąconego białka, jak i osadu przygotowano próbki do analizy SDS-PAGE/Western Blot.

5.7.1.2. Rekonstytucja białka ROMK2-6xHis w proteoliposomach

Proteoliposomy zawierające białko ROMK2-6xHis były przygotowywane zgodnie ze zmodyfikowanym opublikowanym protokołem (Raja and Vales, 2011). W pierwszym etapie 10 mg azolektyny (L- α -fosfatydylocholina z nasion soi, Typ II-S, Sigma Aldrich) rozpuszczono w chloroformie (Sigma Aldrich), a następnie na powierzchni szklanej fiolki utworzono z niej ciekły film poprzez odparowanie chloroformu pod strumieniem azotu. Do powstałego filmu dodano 1 ml buforu do rekonstytucji (300 mM KCl; 10% glicerol; 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,0 oraz inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche) oraz 1 mM PMSF) z dodatkiem 5 mM OG i mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę, a następnie krótko sonikowano na lodzie w celu utworzenia destabilizowanych detergentem liposomów. Liposomy osadzono przez wirowanie przy 5 000 x g przez 3 minuty.

Do przygotowania proteoliposomów solubilizowane i oczyszczone w DDM białko ROMK2-6xHis połączono z liposomami destabilizowanymi przez detergent w stosunku białko:lipid wynoszącym 1:100 (% mol), krótko mieszano, po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę. Przygotowywano również kontrolne liposomy, w których pominięto dodatek białka. Detergent usuwano przez adsorpcję na hydrofobowym złożu polistyrenowym Bio-Beads SM-2 (BioRad) w 4°C. Adsorbent wymieniano trzykrotnie, po ostatniej wymianie próbki inkubowano przez noc. Następnego dnia supernatant zwirowano przez godzinę w 4°C przy 100 000 x g w celu zebrania proteoliposomów. Osad zawierający proteoliposomy zawieszano w 100 µl buforu do rekonstrukcji, dzielono na niewielkie porcje (10 µl), mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do dalszej analizy.

5.7.2. Przygotowanie nanodysków do doświadczeń metodą sztucznych błon lipidowych

W pierwszym etapie zoptymalizowano warunki dializy nanodysków SMALPs oraz DIBMALPs zawierających rekonstruowane białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis. W tym celu po 100 µl zawiesiny SMALPs/ROMK1-6xHis, SMALPs/ROMK2-6xHis, DIBMALPs/ROMK1-6xHis oraz DIBMALPs/ROMK2-6xHis, dializowano do dwóch różnych buforów: 200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4 oraz 300 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4. Dializę prowadzono wobec 1 litra buforu przez noc w temperaturze pokojowej, potem próbki nanodysków przeniesiono do probówek wirówkowych i wirowano przy 100 000 x g przez 1 godzinę. Zarówno supernatant, jak i osad, analizowano za pomocą metody Western Blot.

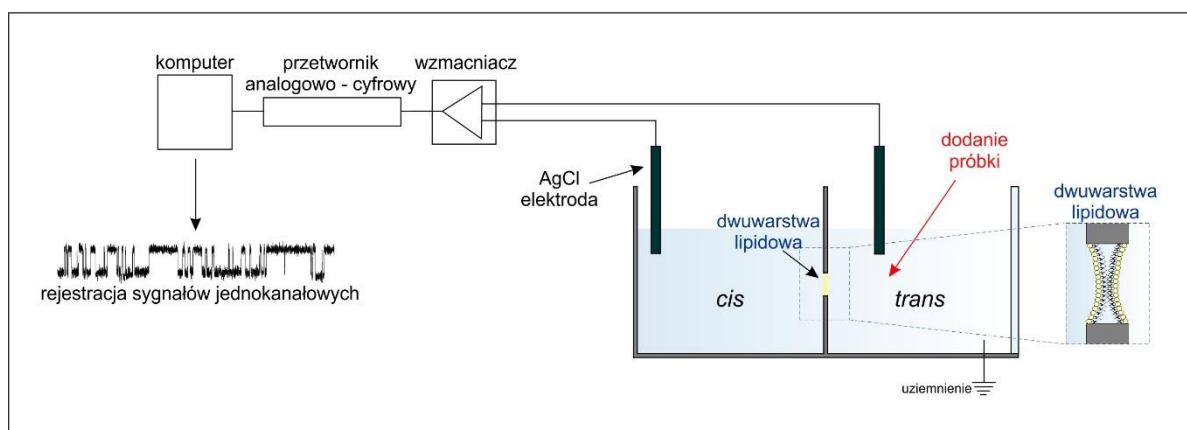
Ostatecznie nanodyski SMALPs zawierające białko ROMK2-6xHis dializowano wobec buforu zawierającego 300 mM KCl; 50 mM Tris/HCl; pH 7,4 (z dwukrotną zmianą buforu) i podzielono na porcje po 10 µl i przechowywano w -80°C.

W celu usunięcia imidazolu natywne nanodyski zawierające białko ROMK2-6xHis dializowano z wykorzystaniem kaset dializacyjnych 3,5 kDa NMWCO (Pierce, no. 63552).

5.7.3. Metoda sztucznych błon lipidowych

Metoda sztucznych błon lipidowych (PLB, ang. *planar lipid bilayer*), znana również jako metoda czarnych błon lipidowych (BLM, z ang. *black lipid membranes*) została opisana przez Muellera w 1962 roku (Mueller i wsp., 1962) i jest ona wykorzystywana do rejestrowania aktywności elektrycznej kanałów jonowych. Polega na wbudowaniu białka z frakcji błonowych, proteoliposomów, czy nanodysków w sztuczną błonę lipidową i pomiarze prądów płynących przez pojedyncze białka kanałowe.

Pomiary elektryczne z wykorzystaniem metody sztucznych błon lipidowych przeprowadzono w sposób opisany wcześniej (Bednarczyk i wsp., 2004; Bednarczyk i wsp., 2005; Choma i wsp., 2009). Wszystkie pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej. Dwuwarstwę lipidową tworzą z azolektyny (*L- α -fosfatydylocholina*) (*L- α -phosphatidylcholine from soybeans, Type II-S*, Sigma Aldrich) rozpuszczonej w n-dekanie (25 mg/ml) na otworze o średnicy $\sim 250 \mu\text{m}$ znajdującym się na ścianie naczynka z teflonu (Warner Instrument Corp., Hamden, CT USA) dzielącej dwie komory: *cis* oraz *trans* (każda o objętości 1 ml). Połączenia elektryczne wykonano agarowymi mostkami solnymi (3 M KCl) i elektrodami chlorosrebrowymi (Ag/AgCl). Przedział *trans* uziemiono, a napięcie przykładano do przedziału *cis* (Rycina 9). Cały układ pomiarowy umieszczony był w klatce Faraday'a, aby zminimalizować wpływ zakłóceń elektromagnetycznych. Dodatkowo cały układ pomiarowy znajdował się na stole antywibracyjnym, aby zabezpieczyć go przed wpływami drgań mechanicznych.



Rycina 9. Schemat budowy układu PLB. W skład podstawowego wyposażenia stanowiska badawczego wchodzi komputer z oprogramowaniem, przetwornik analogowo-cyfrowy, wzmacniacz oraz naczynka pomiarowe tworzące przedziały *cis* i *trans*. Przedziały *cis* i *trans* oddzielone są przegrodą teflonową z otworem o średnicy około $250 \mu\text{m}$. Próbka badanego białka umieszczana była w przedziale *trans*.

Tworzenie się dwuwarstwy monitorowano przez pomiar pojemności elektrycznej z użyciem modułu, w który wyposażono wzmacniacz (BLM-120, BioLogic). Pojemność elektryczna jest charakterystycznym parametrem PLB. Tworzona dwuwarstwa lipidowa może być modelowana jako kondensator. Jeśli potraktujemy PLB jako kondensator, wówczas pojemność można wyznaczyć z zależności:

$$C = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon S}{d}, \text{ gdzie:}$$

C – pojemność całkowita membrany

ε_0 – przenikalność elektryczna w próżni ($8,854 \cdot 10^{-12}$ F/m)

ε – efektywna względna przenikalność elektryczna lipidów (około 2,3 - 2,5)

S – pole powierzchni dwuwarstwy

d – efektywna grubość dwuwarstwy lipidowej (ok. 3 - 5 nm)

Obliczenia pokazują, że idealna pojemność dwuwarstwy utworzonej na całej powierzchni otworu powinna wynosić około 280 pF, jednakże w przeprowadzanych badaniach typowa pojemność dwuwarstwy wynosiła 90 - 150 pF. Wybierano błony w tym zakresie, ponieważ te o mniejszej pojemności mają zbyt małą powierzchnię do inkorporacji białka, a błony o dużej pojemności są bardziej wrażliwe na wpływy zewnętrzne. Pomiar prądu przepływającego przez dwuwarstwę pozwalał określić szczelność błony. Prąd jonowy płynący przez utworzoną dwuwarstwę lipidową po przyłożeniu napięcia ± 50 mV nie przekraczał 2 pA. Prąd mierzono za pomocą wzmacniacza (BLM-120, BioLogic) z głowicą $1\text{G}\Omega$. Częstotliwość próbkowania sygnału wynosiła 500 kHz. Konwersję sygnału elektrycznego z analogowego na cyfrowy wykonywano za pomocą konwertera PowerLab 2/20 (ADInstruments). Do zapisu danych wykorzystano oprogramowanie Chart v5.2.7 (PowerLab, ADInstruments).

Przedziały *cis* oraz *trans* zawierały 50 mM roztwór KCl (warunki symetryczne) lub odpowiednio 50 mM oraz 150 mM roztwór KCl (warunki niesymetryczne) buforowany 10 mM HEPES o pH 7,4.

Proteoliposomy lub natywne nanodyski zawierające białko ROMK2-6xHis dodawano do przedziału *trans*, a następnie delikatnie mieszano (mieszadło magnetyczne) do momentu zaobserwowania wbudowania się kanału w dwuwarstwę lipidową. Czasy, po których obserwowano aktywności kanałów znacznie się różniły i wahały od kilku sekund do ponad 30 minut. Aktywność kanału obserwowano po dodaniu od 1 do 5 μl białka ROMK2 w stężeniu około 750 pg/ μl dla proteoliposomów i 40-50 pg/ μl dla nanodysków.

5.7.4. Pomiary aktywności białka kanałowego ROMK2-6xHis w obecności modulatorów

Modulatory aktywności białka kanałowego ROMK2-6xHis dodawano jednocześnie do przedziałów *cis* i *trans* lub kolejno do każdego z nich.

W celu potwierdzenia, iż rejestrowane aktywności pochodzą od białka ROMK2-6xHis wykorzystywano dobrze znany inhibitor – VU591. Sprawdzone również wpływ innych

substancji, wcześniej opisywanych jako modulatory kanału mitoK_{ATP}, na aktywność białka ROMK2-6xHis (Tabela 6).

W ostatnim etapie zbadano również dwie pochodne fosfolipidowe, tj. kwas lizofosfatydowy (LPA, ang. *lysophosphatidic acid*) oraz kwas fosfatydowy (PA, ang. *phosphatidic acid*), które są produktami aktywności białka AGK.

Modulator	Wzór strukturalny	Rozpuszczalnik
ATP/Mg ²⁺		H ₂ O
VU591		DMSO
diazoksyd		H ₂ O
glibenklamid		H ₂ O
Kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD)		H ₂ O
kwas lizofosfatydowy (LPA)		50 mM KCl; 10 mM HEPES/KOH; pH 7,4
kwas fosfatydowy (PA)		50 mM KCl; 10 mM HEPES/KOH; pH 7,4

Tabela 6. Związki testowane jako modulatory aktywności białka ROMK2 wraz ze wzorami strukturalnymi oraz stosowanymi rozpuszczalnikami.

5.8. ANALIZA DANYCH

5.8.1. Analiza wyników spektrometrii mas

Widma spektrometrii mas (MS) przeszukiwano w bazie danych sekwencji białek *Homo sapiens* przy użyciu wyszukiwarki MASCOT. Tolerancja masy prekursora wynosiła 5 ppm. Jony produktu przeszukiwano z tolerancją masy 0,01 Da. Maksymalny stan naładowania jonu prekursora użytego do poszukiwań wynosił 7. Metylację cystein poszukiwano jako utrwaloną modyfikację, natomiast utlenianie metionin jako modyfikacje zmienne. Jako enzym stosowano trypsynę (wykonane przez Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN).

Do zidentyfikowania lokalizacji subkomórkowej białek zidentyfikowanych jako potencjalne białka oddziałujące z białkiem ROMK2 wykorzystano następujące bazy danych: Uniprot (www.uniprot.org), Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) oraz MitoCarta3.0 (<https://www.broadinstitute.org/files/shared/metabolism/mitocarta/human.mitocarta3.0.html>).

Do wizualizacji sieci interakcji białek wykorzystano program Cytoscape z wykorzystaniem bazy STRING.

5.8.2. Analiza rejestracji elektrofizjologicznych

Rejestracje elektrofizjologiczne analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Wstępnie rejestracje filtrowano przy 100 Hz. Dalsza analiza otrzymanych wyników pozwoliła na wyznaczenie kilku parametrów pozwalających na charakterystykę białka ROMK2-6xHis. Jednym z nich jest przewodnictwo jednostkowe, które określane jest różnicą między wartością prądu, przy którym kanał jest w stanie zamkniętym, a wartością prądu, przy którym kanał jest w stanie otwartym. Zmiany te związane są ze zmianą konformacji kanału. W trakcie trwania eksperymentów rejestrowano zmiany natężenia prądu w wyniku przejść pomiędzy stanem zamkniętym, a stanem otwartym dla pojedynczych kanałów w zależności od przyłożonego napięcia, co następnie po wykreśleniu zależności prądu od napięcia (uśrednieniu wyników uzyskanych w kilkunastu - kilkudziesięciu eksperymentach) pozwoliło na wyznaczenie wartości przewodnictwa kanału. W przypadku układu symetrycznego w badanym zakresie napięcia (od -90 do 90 mV) wykreślona zależność prądowo - napięciowa była w przybliżeniu zależnością prostoliniową, a zatem spełniała prawo Ohma. W przypadku układu niesymetrycznego do obliczeń wykorzystywano prostoliniowy zakres znajdujący się przy ujemnych wartościach przykładanego napięcia.

Analiza danych pozwoliła również na określenie tzw. potencjału odwrócenia. Transport jonów pomiędzy obszarami o różnym stężeniu można opisać poprzez dyfuzję, a strumień dyfuzji (J_D) jest wielkością wprost proporcjonalną co do gradientu stężenia danej substancji, co zostało opisane przez prawo Ficka:

$$J_D = -D \frac{\partial C}{\partial x}, \text{ gdzie:}$$

J_D – strumień dyfuzji

D – współczynnik dyfuzji, który zależy jest od rodzaju substancji dyfundującej, ośrodka w którym zachodzi dyfuzja oraz od temperatury:

$$D = \frac{RT}{F} U, \text{ gdzie:}$$

R – stała gazowa $\left(8,314 \frac{J}{mol \cdot K}\right)$

T – temperatura [K]

F – stała Faradaya $\left(9,64 \cdot 10^4 \frac{C}{mol}\right)$

U – ruchliwość jonów

C – stężenie

x – odległość od źródła dyfuzji

Dodatkowo, w przypadku dyfuzji jonów należy pamiętać również o posiadany przez nie ładunku elektrycznym, który determinuje ich ruch pod wpływem pola elektrycznego (strumień migracji - J_M):

$$J_M = -UzC \frac{\partial \varphi}{\partial x}, \text{ gdzie:}$$

J_M – strumień migracji jonów

U – ruchliwość jonów

z – ilość ładunków przenoszonych przez jeden jon

φ – potencjał elektryczny

$\frac{\partial \varphi}{\partial x}$ – gradient potencjału elektrycznego

W związku z powyższym, całkowity strumień przepływu jonów w jednostce czasu można zapisać jako:

$$J_D + J_M = -\frac{RT}{F} U \frac{\partial C}{\partial x} - UzC \frac{\partial \varphi}{\partial x}$$

W skrajnym przypadku, gdy pole elektryczne działa przeciwnie do strumienia dyfuzji, może dojść do zablokowania przepływu jonów, wówczas całkowity strumień przepływu jonów wynosi 0. Mówi się, że dochodzi wówczas do równowagi Nernsta. W stanie tym nie może płynąć prąd jonowy, można zatem wyznaczyć potencjał elektryczny, przy którym do niej dochodzi stosując poniższą zależność:

$$\varphi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}, \text{ gdzie:}$$

φ – potencjał Nernsta

R – stała gazowa $\left[8,314 \frac{J}{mol \cdot K}\right]$

T – temperatura [K]

z – ładunek elektryczny (ilość ładunków elementarnych przenoszonych przez jeden jon)

F – stała Faradaya $\left[96485 \frac{C}{mol}\right]$

C_o – stężenie molowe jonów na zewnątrz

C_i – stężenie molowe jonów wewnątrz

Należy jednak pamiętać, iż równanie to przedstawia idealne warunki, w których przez błonę przepływa tylko jeden rodzaj jonów, a dodatkowo transport odbywa się przez całą jej powierzchnię. W rzeczywistości jednak obserwujemy zjawisko, w którym mogą być transportowane różne jony, a ich transport odbywa się przez kanały jonowe. Dzięki tej uproszczonej zależności jesteśmy w stanie oszacować tzw. potencjał odwrócenia, jednakże przyjmując kilka założeń, tj.: jednorodność dwuwarstwy lipidowej, ciągły i niezależny przepływ jonów, różnica stężeń oraz potencjałów elektrochemicznych ma wpływ na ruch jonów, a wewnątrz pojedynczego poru kanału rekonstruowanego do dwuwarstwy stężenie jonów i wartość potencjału zmienia się liniowo. W niniejszej rozprawie potencjał odwrócenia był określany poprzez wyznaczenie wartości napięcia, przy którym zależność prądowo-napięciowa o liniowym zakresie w warunkach niesymetrycznych przyjmowała wartość 0 pA.

Następnym wyznaczanym parametrem było prawdopodobieństwo otwarcia kanału $P(o)$. Prawdopodobieństwo czasu otwarć kanału jest stosunkiem czasu otwarć kanału do całkowitego czasu obserwacji. W prezentowanej rozprawie było ono obliczane z wykorzystaniem modułu wyszukiwania pojedynczego kanału (*Single-Channel Search* programem Clampfit 10.7), który pozwala na określenie zarówno poziomu zamkniętego, jak również ośmiu poziomów otwarć.

W rozprawie doktorskiej prezentowane są reprezentatywne przebiegi aktywności kanałów dla danych warunków wraz z wyznaczonymi dla nich wartościami prawdopodobieństwa otwarcia podawanymi jako ułamki dziesiętne.

5.8.3. Analiza statystyczna

Dane statystyczne analizowano z wykorzystaniem programu Excel2016 oraz Origin 2019 Graphing & Analysis. Dane przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testów t-Studenta (test t-Studenta dla par) oraz jednokierunkową analizę wariancji ANOVA z testem Turkey'a (test post-hoc). Wartości istotności statystycznej p poniżej 0,05 uznano za istotną statystycznie (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.9. DODATKOWE MATERIAŁY

5.9.1. Bufory wykorzystywane w przedstawionych eksperymentach

W prezentowanych badaniach wykorzystywano różne bufory. W związku z ich dużą różnorodnością postanowiono je wszystkie dodatkowo zebrać w jednym miejscu (*Tabela 7*).

Stosowana skrócona nazwa buforu	Bufor	Skład buforu
TBE	bufor Tris/Boran/EDTA	89 mM Tris; 89 mM kwas borowy; 2 mM EDTA; pH 8.3
IB	bufor do izolacji frakcji wzbogaconej w mitochondria z zastosowaniem digitoniny	210 mM mannitol; 70 mM sacharoza; 500 mM HEPES/KOH; pH 7,2
SIB	bufor sacharozowy	250 mM sacharoza; 1 mM EGTA; 5 mM HEPES/KOH; pH 7,2
BP	buforu do przechowywania	150 mM KCl; 10 mM HEPES/KOH; pH 7,2
TLB	<i>TurboID Lysis Buffer</i>	150 mM NaCl; 0,4% SDS; 1% NP-40; 1 mM EGTA; 1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM Tris/HCl; pH 7,4 oraz dodawane na świeżo: 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche) i 1 mM PMSF
TWB1	<i>TurboID Wash Buffer 1</i>	2% SDS; 50 mM Tris; pH 7,4
TWB2	<i>TurboID Wash Buffer 2</i>	0,1% deoksycholanol sodu; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 500 mM NaCl; 50 mM HEPES/NaOH; pH 7,5
TWB3	<i>TurboID Wash Buffer 3</i>	5% deoksycholanol sodu; 0,5% NP-40; 1 mM EDTA; 250 mM LiCl; 10 mM Tris; pH 7,4
CLB	<i>Co-IP Lysis Buffer</i>	1% Triton X-100; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,5; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche)
CWB	<i>Co-ID Wash Buffer</i>	0,1% Tween-20; 300 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,5
PSB	<i>Polimer Solubilization Buffer</i>	200 mM KCl; 1 mM EDTA; 50 mM Tris; pH 7,4; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche); 1 mM PMSF
PWB	<i>Polimer Wash Buffer</i>	200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4
DSB	<i>Detergent Solubilization Buffer</i>	50 mM KCl; 10% glicerol; 100 μM EDTA; 20 mM Tris; pH 7,4; 1x inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche); 1 mM PMSF
PEB	<i>Elution Buffer</i>	250 mM imidazol; 200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4
PB	<i>Primary buffer</i>	200 mM KCl; 50 mM Tris; pH 7,4
RB	<i>Running buffer</i>	25 mM Tris; 191 mM glicyna; 0,1% SDS; pH 7,4
TB	<i>Transfer Buffer</i>	20 mM Tris; 150 mM glicyna; 0,02% SDS; 20% metanol
TBST	<i>TRIS-buffered saline</i>	20 mM Tris, 125 mM NaCl, 0,1% Tween-20; pH 7,5
PRB	<i>Bufor do rekontytucji proteoliposomów</i>	300 mM KCl, 10% glicerol, 10 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH 7,0, inhibitory proteaz cOmplete™ (Roche)

Tabela 7. Zestawienie wszystkich buforów wykorzystywanych w badaniach

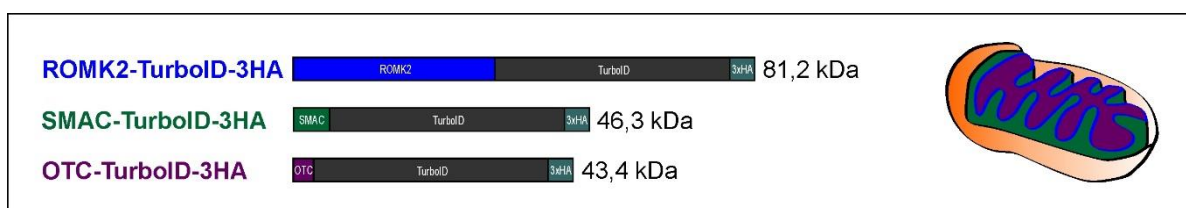
6. WYNIKI

6.1. IDENTYFIKACJA BIAŁEK ODDZIAŁUJĄCYCH Z BIAŁKIEM KANAŁOWYM ROMK2 Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI TURBO-ID

Obecność kanałów jonowych w błonie komórkowej jest powszechnie znana. Kanały potasowe regulowane przez ATP (K_{ATP}) zostały również zidentyfikowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Jedną z hipotez mówi, że białko ROMK2, będące izoformą plazmatycznego białka ROMK1, jest podstawową jednostką tworzącą mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (mito K_{ATP}) (Foster i wsp., 2012). Wiadomo, że kanały K_{ATP} zlokalizowane w błonie komórkowej tworzą kompleksy z różnymi białkami wpływającymi na jego aktywność i jej regulację przez różne ligandy (Ruknudin i wsp., 1998; Yoo i wsp., 2004; Lu i wsp., 2006; Simon i wsp., 1996; Zeng i wsp., 2002). Jednakże w przypadku kanału mito K_{ATP} nie poznane zostały żadne tego typu interakcje. W związku z założeniem, że kanał mito K_{ATP} tworzony jest przez białko ROMK2 w poniższej rozprawie doktorskiej podjęto próbę zidentyfikowania potencjalnych białek oddziałujących z białkiem ROMK2 (proksysomu białka ROMK2), a także określenie ich potencjalnej roli w regulacji jego funkcji.

Do identyfikacji potencjalnych interakcji białka ROMK2 wykorzystano metodę Turbo-ID (Branon i wsp., 2018). Jest to najnowszy wariant metody biotynylacji białek sąsiadujących (Bio-ID), która ma na celu identyfikację białek znajdujących się w najbliższym otoczeniu molekularnym. W tym celu skonstruowano plazmid niosący fuzję ORF białka ROMK2 z ORF tzw. mutantu TURBO ligazy biotyny BirA*. Mutant BirA* niesie mutację R118G skutkującą uwolnieniem reaktywnego produktu pośredniego bio-5'-AMP (Kwon i wsp., 2000; Choi-Rhee i wsp., 2004), który dyfunduje z miejsca aktywnego i reaguje z aminami pierwszorzędowymi lizyn znajdującymi się na sąsiadujących białkach, co prowadzi do ich kowalencyjnej biotynylacji (Chapman-Smith i wsp., 1999, Beckett i wsp., 1999). Spodziewano się również niespecyficjnej biotynylacji białek w wyniku dyfuzji stochastycznej i molekularnego zatłoczenia (ang. *molecular crowding*) w obu przedziałach mitochondrialnych, tj. przestrzeni międzybłonowej i macierzy mitochondrialnej. W związku z tym dodatkowo skonstruowano fuzje ORF TurboID z sekwencjami kierującymi białek OTC (transkarbamyłaza ornityny, ang. *ornithine transcarbamylase*) oraz SMAC (mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy, ang. *second mitochondria-derived activator of caspase*). Lider OTC determinuje lokalizację białka fuzyjnego OTC-TurboID w macierzy mitochondrialnej (Wang i wsp., 2013; Horwich i wsp., 1986, Horwich i wsp., 1985), podczas gdy lider SMAC determinuje lokalizację białka fuzyjnego SMAC-TurboID w przestrzeni międzybłonowej (Du i wsp., 2000, Fu i wsp., 2003). Dodatkowo wszystkie białka

wyznakowane zostały przez metkę 3xHA umożliwiającą detekcję metodą Western Blot przy użyciu specyficznych przeciwciał anti-HA (Rycina 10).

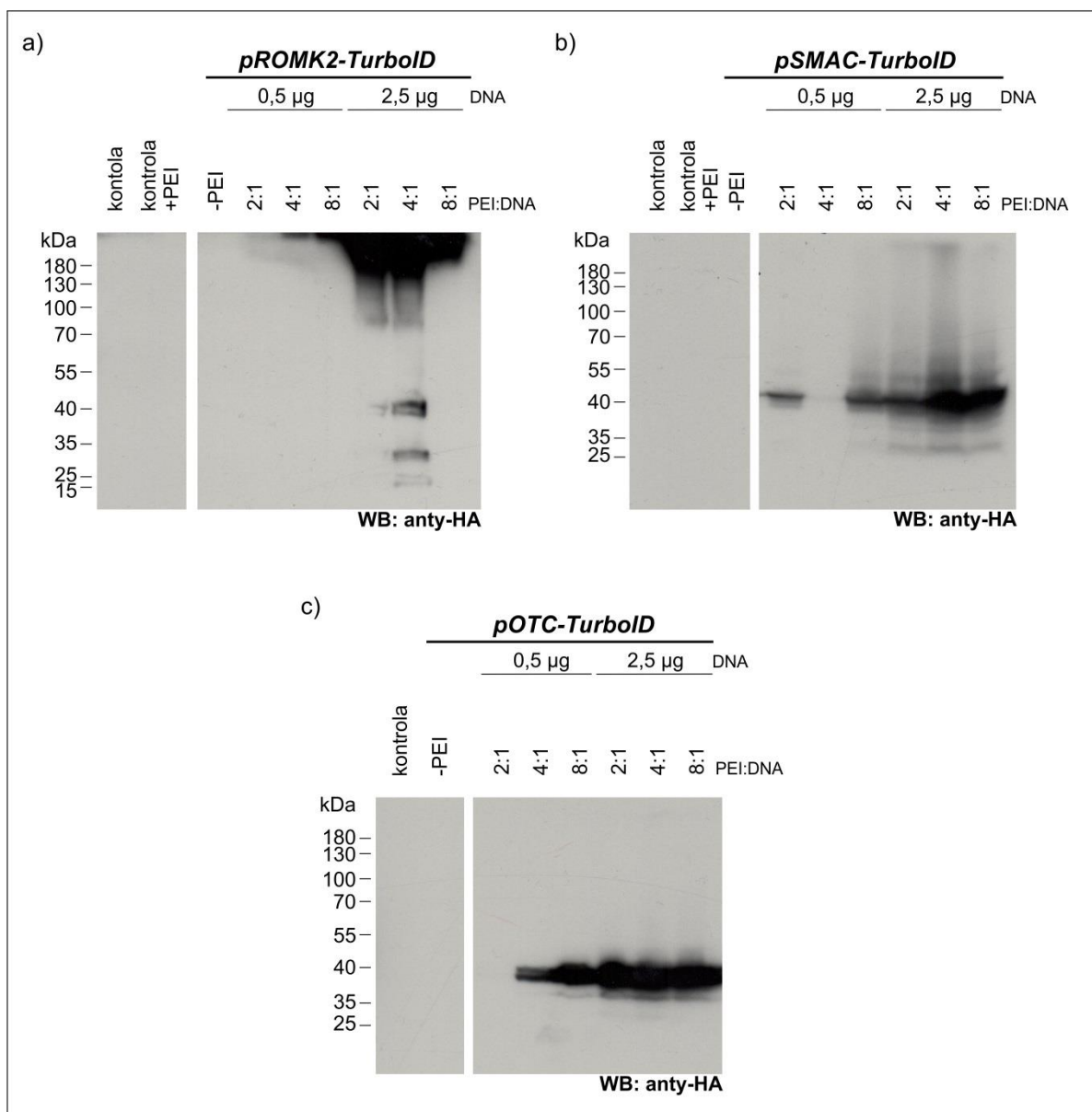


Rycina 10. Schematyczne przedstawienie białek produkowanych w wyniku ekspresji konstruktyw wykorzystywanych w eksperymentach typu TurboID: ROMK2-TurboID-3xHA, SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA wraz z wizualizacją spodziewanej lokalizacji.

6.1.1. Optymalizacja warunków transfekcji i biotynylacji komórek

Endogenną aktywność białka ROMK2 opisano w szczurzej linii komórkowej H9c2 (Foster i wsp., 2012, Laskowski i wsp., 2019). Jednakże mimo szeregu prób nie udało się uzyskać zadowalającej wydajności transfekcji tej linii, ani z wykorzystaniem PEI, ani odczynnika H9c2(2-1) Cell Avalanche™ Transfection Reagent (EZBiosystems) (nie pokazano). W związku z powyższym do eksperymentów użyto komórek HEK293T i w pierwszym etapie zoptymalizowano warunki transfekcji komórek tej linii za pomocą zestawu trzech plazmidów: *pROMK2-TurboID*, *pSMAC-TurboID* oraz *pOTC-TurboID*. Użyto kombinacje dwóch ilości plazmidowego DNA (0,5 µg oraz 2,5 µg) i trzech proporcji PEI:DNA (2:1, 4:1 oraz 8:1). Analiza Western Blot z użyciem przeciwciała anti-HA po rozdzielaniu białek poprzez elektroforezę SDS-PAGE wykazała, że wszystkie konstrukty ulegają ekspresji w komórkach HEK293T (Rycina 11). Najwydajniejszą produkcję białka ROMK2-TurboID-3xHA zaobserwowano w warunkach, w których wykorzystano 2,5 µg DNA, a stosunek PEI:DNA wynosił 4:1. W przypadku białka ROMK2-TurboID-3xHA obserwowano sygnał odpowiadający masie powyżej 180 kDa, zamiast spodziewanej masy monomeru 81,3 kDa. Natywne białko ROMK2 jest homotetramerem, więc obecność formy o wysokiej masie może wskazywać na wysoką stabilność oligomerów białka ROMK2 w warunkach denaturujących. Podobne zachowanie zaobserwowano w przypadku białka ROMK2-6xHis nadprodukowanego w *Escherichia coli* (Krajewska and Koprowski, 2021). Ponadto zaobserwowano, że białko ROMK2-TurboID-3xHA ulega degradacji, a uwalniane jest białko o masie około 40 kDa, co odpowiada masie TurboID-3xHA (38,8 kDa). Te same warunki optymalizacji transfekcji zastosowano również w przypadku ekspresji SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA i zaobserwowano produkcję białek o masie

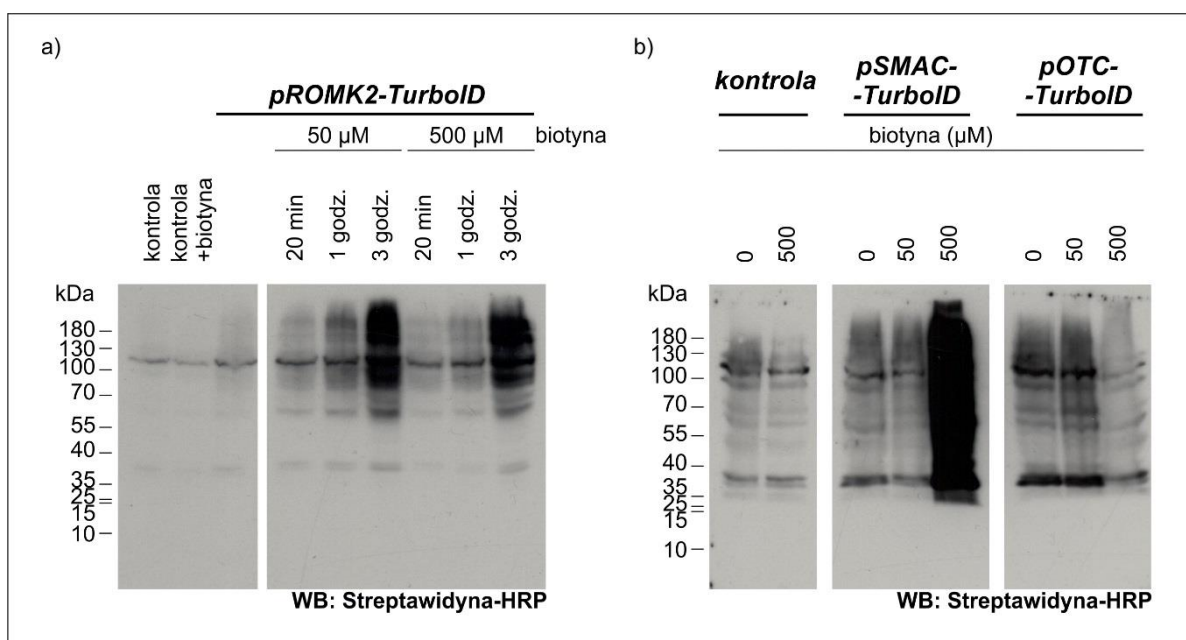
około 40 kDa, co w przybliżeniu odpowiada oczekiwanym ich masom (odpowiednio 46,3 kDa oraz 43,4 kDa) (Rycina 11).



Rycina 11. Optymalizacja warunków transfekcji komórek HEK293T plazmidami: a) pROMK2-TurboID, b) pSMAC-TurboID oraz c) pOTC-TurboID. Komórki transfekowano dwiema ilościami DNA (0,5 µg oraz 2,5 µg) i trzema proporcjami PEI do DNA (2:1, 4:1 i 8:1). Jako kontrole stosowano komórki HEK293T nie transfekowane. Do wykrywania białek zastosowano przeciwciało anty-HA (1:1000, Sigma Aldrich).

W następnym kroku na komórkach transfekowanych plazmidem *pROMK2-TurboID* w optymalnych warunkach, tj. ilości DNA wynoszącym 2,5 μg oraz stosunku PEI:DNA wynoszącym 4:1 zoptymalizowano warunki biotynylacji. Testowano dwa różne stężenia biotyny, tj. 50 μM oraz 500 μM oraz trzy czasy biotynylacji: 20, 60 i 180 minut.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono najwyższy poziom biotynylacji po 180 minut. Nie zauważono natomiast istotnej różnicy biotynylacji w zależności od stężenia biotyny (*Rycina 12a*). Postanowiono sprawdzić wydajność biotynylacji przy 3 godzinnym czasie biotynylacji również w przypadku pozostałych konstruktów, tj. *pSMAC-TurboID* oraz *pOTC-TurboID*. W przypadku *pSMAC-TurboID* zaobserwowano znaczące zwiększenie ilości biotynylowanych białek przy stężeniu biotyny wynoszącym 500 μM , odwrotną sytuację zaobserwowano natomiast w przypadku *pOTC-TurboID* (*Rycina 12b*).

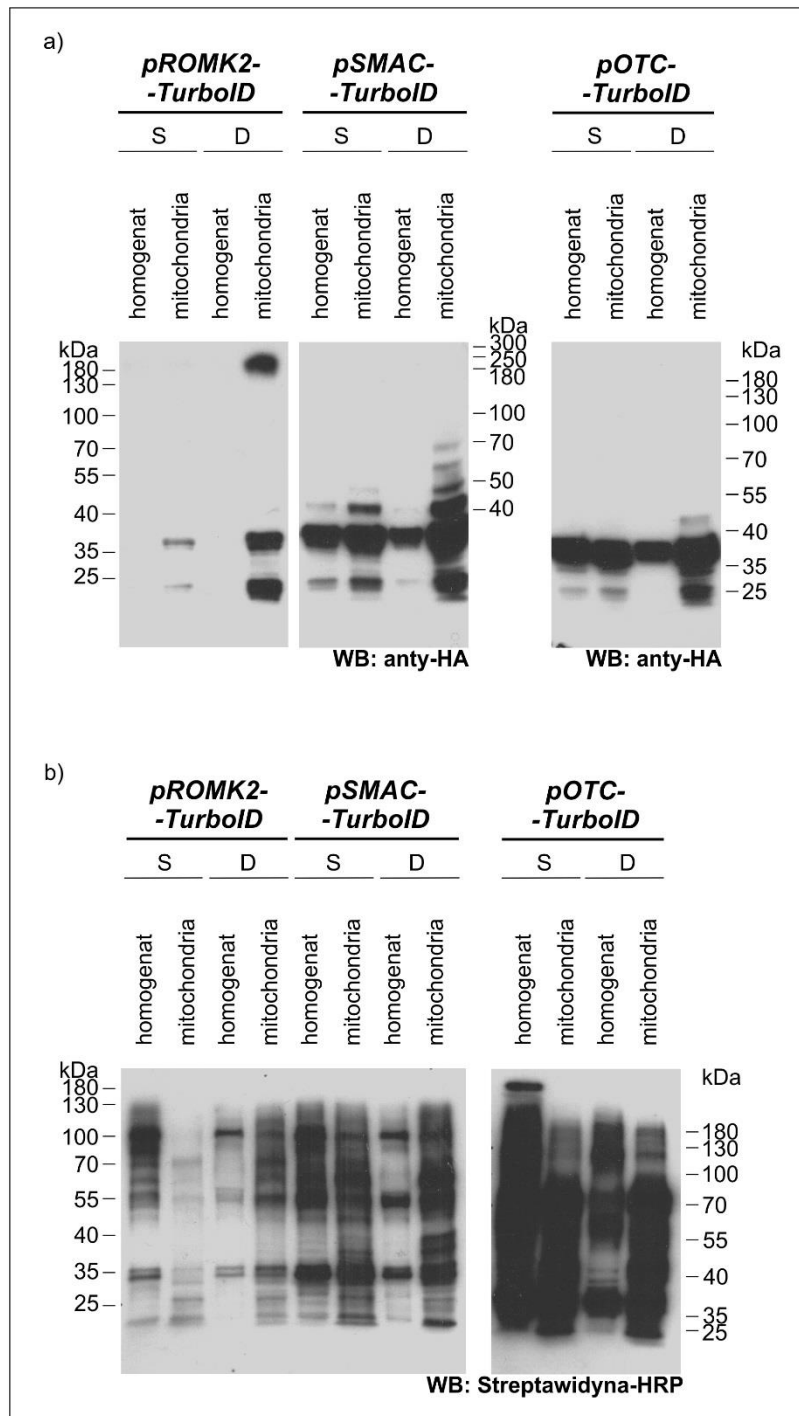


Rycina 12. Optymalizacja warunków biotynylacji komórek HEK293T transfekowanych plazmidami: a) pROMK2-TurboID oraz b) pSMAC-TurboID i pOTC-TurboID. a) Wpływ stężenia biotyny i czasu inkubacji na efektywność znakowania biotyną. Komórki po transfekcji pROMK2-TurboID poddano działaniu biotyny w stężeniach 50 μM i 500 μM przez 20, 60 i 180 minut; b) Komórki po transfekcji plazmidami pSMAC-TurboID oraz pOTC-TurboID poddano działaniu biotyny w stężeniach 50 μM i 500 μM przez 3 godziny. W komórkach kontrolnych obecność biotyny nie wpływa na poziom endogennie biotynylowanych białek. Do detekcji biotynylacji białek wykorzystano streptawidynę-HRP (1:40.000, Thermo Scientific).

6.1.2. Wybór metody izolacji frakcji wzbogaconej w mitochondria

Ze względu na cel pracy - identyfikację mitochondrialnego proksysomu ROMK2 postanowiono wyizolować frakcję wzbogaconą w mitochondria. Porównano ze sobą dwie różne metody izolacji: w obecności sacharozy (Bednarczyk i wsp., 2013) oraz w obecności digitoniny (Kudin i wsp., 2004). Analiza Western Blot wykazała, że wyższą wydajność izolacji białka ROMK2-TurboID-3xHA można uzyskać za pomocą metody z wykorzystaniem digitoniny. W przypadku SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA różnica w ilości wyizolowanych białek nie była znaczna pomiędzy testowanymi metodami (*Rycina 13a*). Dodatkowo porównano również ilość wyizolowanych białek biotynylowanych wykorzystując detekcję za pomocą streptawidyny-HRP. W przypadku komórek produkujących białko ROMK2-TurboID-3xHA zaobserwowano większą wydajność izolacji biotynylowanych białek z użyciem metody z digitoniną, niż metodą z wykorzystaniem sacharozy. W przypadku komórek produkujących białka SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA nie zaobserwowano znacznej różnicy w ilości białek biotynylowanych wyizolowanych różnymi metodami (*Rycina 13b*).

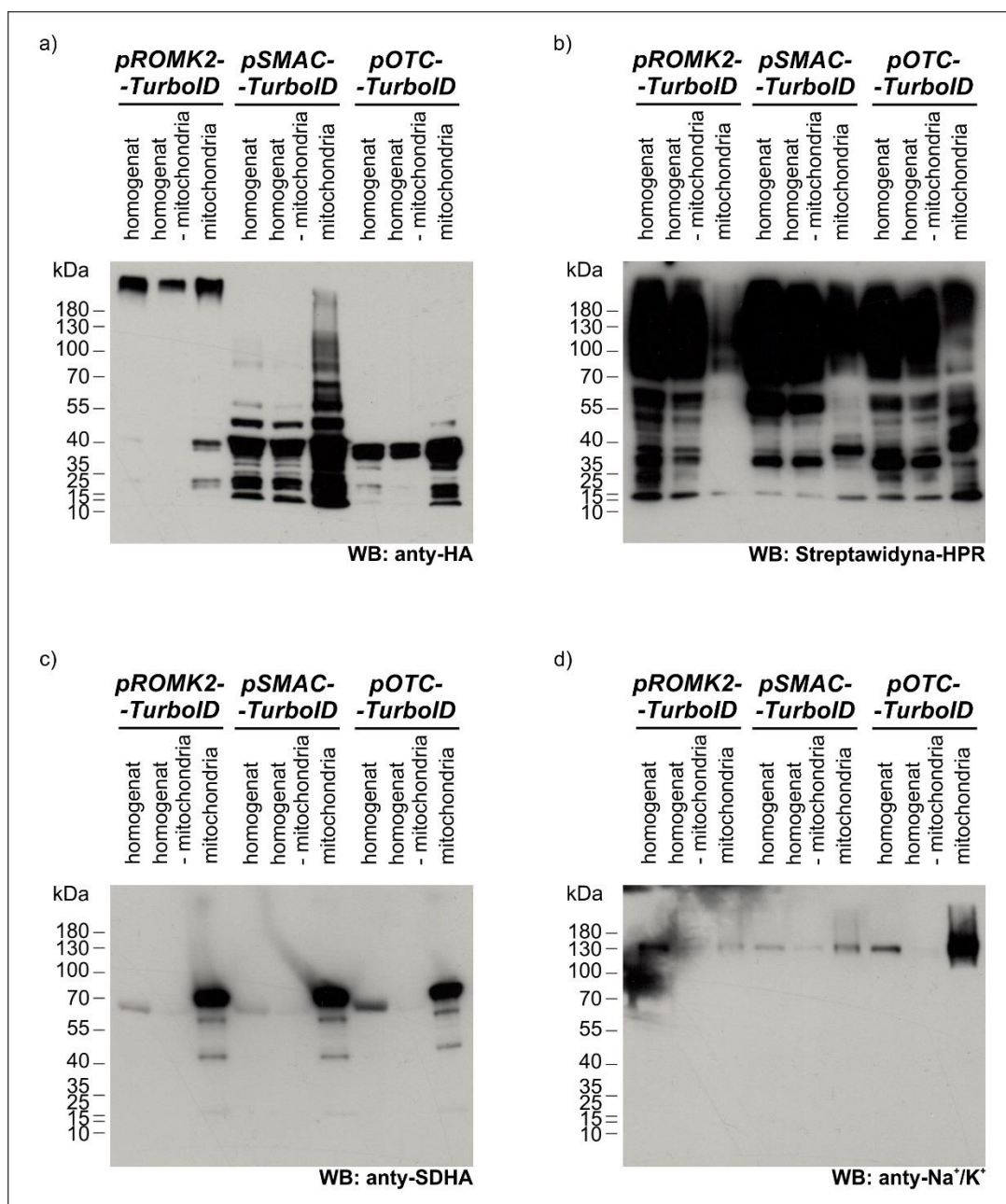
Ze względu na większą wydajność izolacji białka ROMK2-TurboID-3xHA oraz białek biotynylowanych do kolejnych eksperymentów typu TurboID zastosowano metodę izolacji frakcji wzbogaconej w mitochondria z wykorzystaniem digitoniny.



Rycina 13. Porównanie metod izolacji mitochondriów: S – metoda z wykorzystaniem sacharozy, D – metoda z wykorzystaniem digitoniny. Mitochondria izolowano z komórek HEK293T po transfekcji plazmidami pROMK2-TurboID, pSMAC-TurboID oraz pOTC-TurboID. a) Do wykrycia białek wyznakowanych metką 3xHA zastosowano przeciwciało anty-HA (1:1000, Sigma Aldrich); b) Do wykrycia białek biotynylowanych wykorzystano streptawidynę-HRP (1:40 000, Thermo Scientific).

6.1.2.1. Określenie czystości frakcji wzbogaonej w mitochondria izolowanej z wykorzystaniem digitoniny

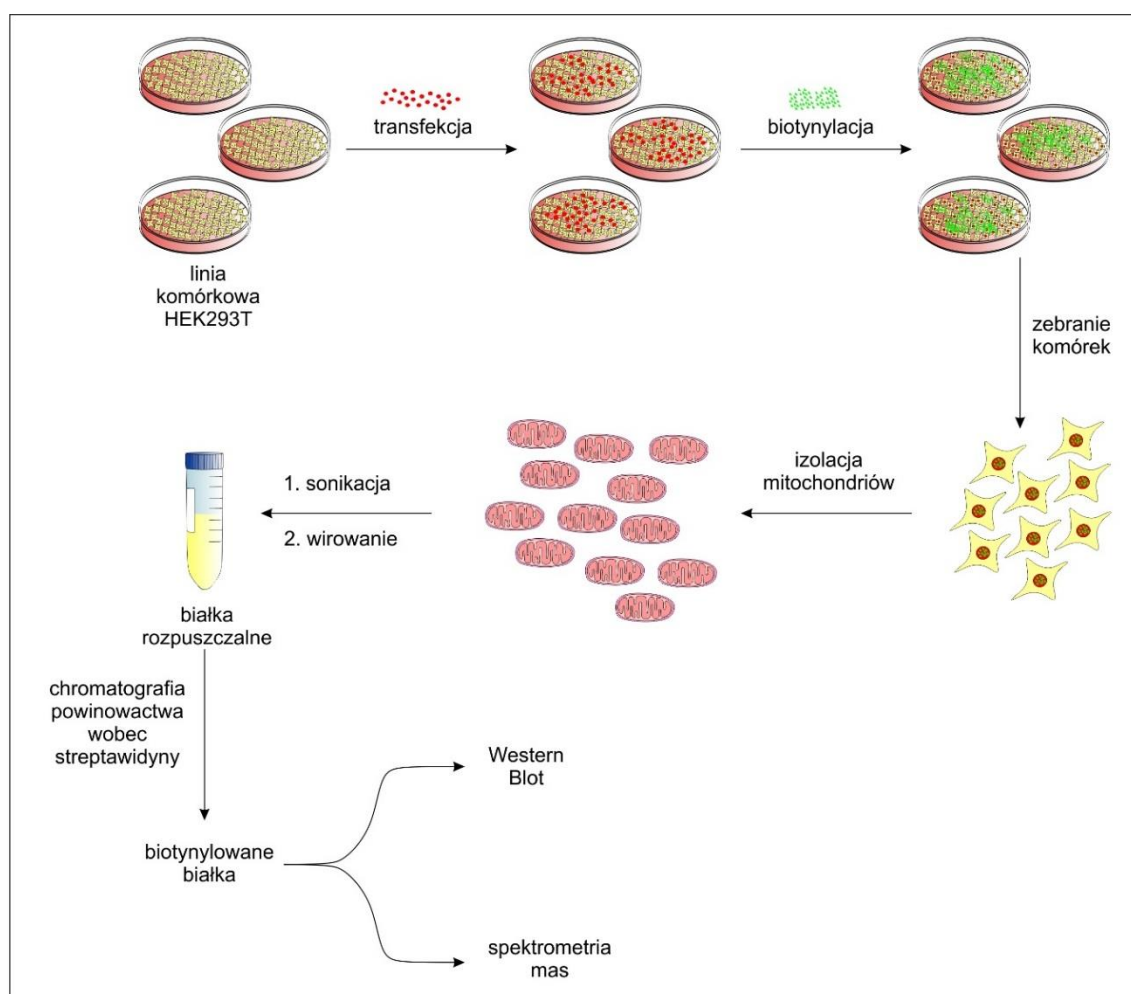
W następnym etapie badań sprawdzono obecność markerów charakterystycznych dla mitochondriów tj. podjednostki A kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej (SDHA, ang. *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*) oraz błony komórkowej, tj. pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ ATP-aza) we frakcjach: homogenatu, wzbogaconych mitochondriów oraz homogenatu pozbawionego mitochondriów. Detekcja białek za pomocą przeciwciała anty-HA wykazała obecność ROMK2-TurboID-3xHA, SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA w większej ilości we frakcji wzbogaonej w mitochondria, niż we frakcji homogenatu pozbawionego mitochondriów (*Rycina 14a*). Uwagę zwraca fakt, że tylko niewielka część białek biotynylowanych w komórkach produkujących ROMK2-TurboID-3xHA została wyizolowana we frakcji wzbogaonej w mitochondria (*Rycina 14b*). Silny sygnał SDHA we frakcjach zawierających mitochondria, w porównaniu z pozostałymi frakcjami, wskazuje na wydajną izolację tych organelli (*Rycina 14c*). Jednakże obecność sygnału przeciwciała znakującego pompę sodowo-potasową wykazało, iż frakcja ta może zawierać również białka błony komórkowej (*Rycina 14d*).



Rycina 14. Analiza Western Blot frakcji uzyskanych podczas izolacji mitochondriów. Homogenat, homogenat po oddzieleniu mitochondriów („homogenat-mitochondria”) i frakcję wzbogaconą w mitochondria („mitochondria”) rozdzielono przy pomocy 10% SDS-PAGE, a białka wykryto metodą Western Blot za pomocą: a) przeciwciała anty-HA (1:1000, Sigma Aldrich), b) streptawidyny-HRP (1:40 000, Thermo Scientific), c) przeciwciała anty-SDHA (1:500, Abcam), d) przeciwciała anty-Na⁺/K⁺ ATP-aza (1:1000, Abcam). Na żel nakładano próbki zawierające po 33 µg białka całkowitego.

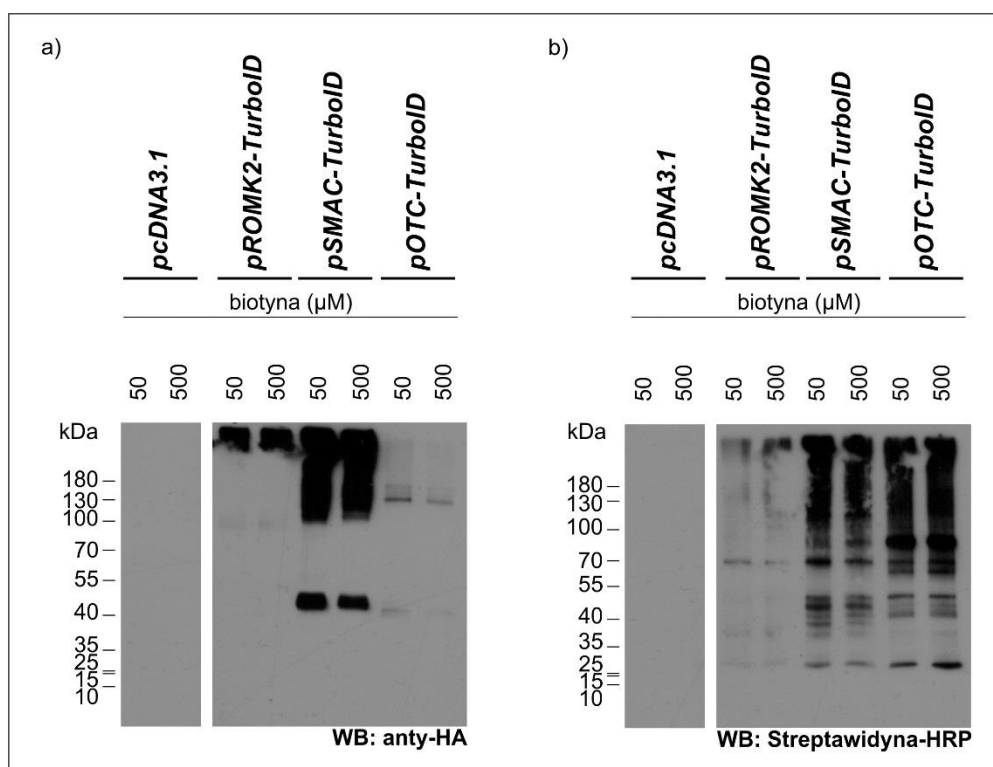
6.1.3. Oczyszczanie białek biotynylowanych

Po optymalizacji i weryfikacji wydajności w uzyskiwaniu frakcji mitochondrialnej wykonano serię eksperymentów TurboID. Komórki transfekowano w zoptymalizowanych warunkach za pomocą plazmidów *pcDNA3.1* (kontrola negatywna), *pROMK2-TurboID*, *pSMAC-TurboID* i *pOTC-TurboID*, a po upływie około 24 godzin traktowano biotyną w stężeniu 500 μM (w jednym z eksperymentów 50 μM) przez 180 minut. Po upływie tego czasu komórki zbierano, izolowano frakcję wzbogaconą w mitochondria, którą następnie solubilizowano w obecności detergentów i sonikowano. Białka nierozpuszczalne osadzano przez wirowanie. Po wirowaniu z frakcji supernatantu biotynylowane białka oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa wobec streptawidyny. Białka zatrzymane na złożu analizowano za pomocą analizy Western Blot, jak również poprzez spektrometrię mas (Rycina 15).



Rycina 15. Schemat eksperymentu TurboID.

Analiza metodą Western Blot frakcji białek zatrzymanych na złożu z immobilizowaną streptawidyną wykazała obecność ROMK2-TurboID-3xHA, SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA (Rycina 16a). Wskazuje to na autoubiotynylację białek fuzyjnych zawierających ligazę TurboID. Wykryto również obecność wielu innych białek biotynylowanych. Jednak w przypadku białka ROMK2-TurboID-3xHA ilość białek biotynylowanych była znacznie mniejsza, niż w przypadku SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA. Ponadto w próbie kontrolnej nie wykryto sygnału endogennie biotynylowanych białek (Rycina 16b).



Rycina 16. Analiza Western Blot frakcji wzbogaconej w mitochondria po oczyszczeniu białek biotynylowanych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa wobec streptawidyny. Analizie poddano próbki elucji z eksperymentu, w którym wykorzystano dwa różne stężenia biotyny (50 μ M oraz 500 μ M). a) Przeciwciało anty-HA (1:1000) zastosowano do wykrywania fuzji białkowych z TurboID-3xHA, b) biotynylowane białka wykrywano za pomocą streptawidyny-HRP (1:40 000, Thermo Scientific).

Eksperyment typu TurboID na frakcji wzbogaconej w mitochondria przeprowadzono siedmiokrotnie dla każdej próbki z serii, tj. pROMK2-TurboID, pSMAC-TurboID, pOTC-TurboID oraz pcDNA3.1.

6.1.4. Analiza wyników uzyskanych za pomocą spektrometrii mas

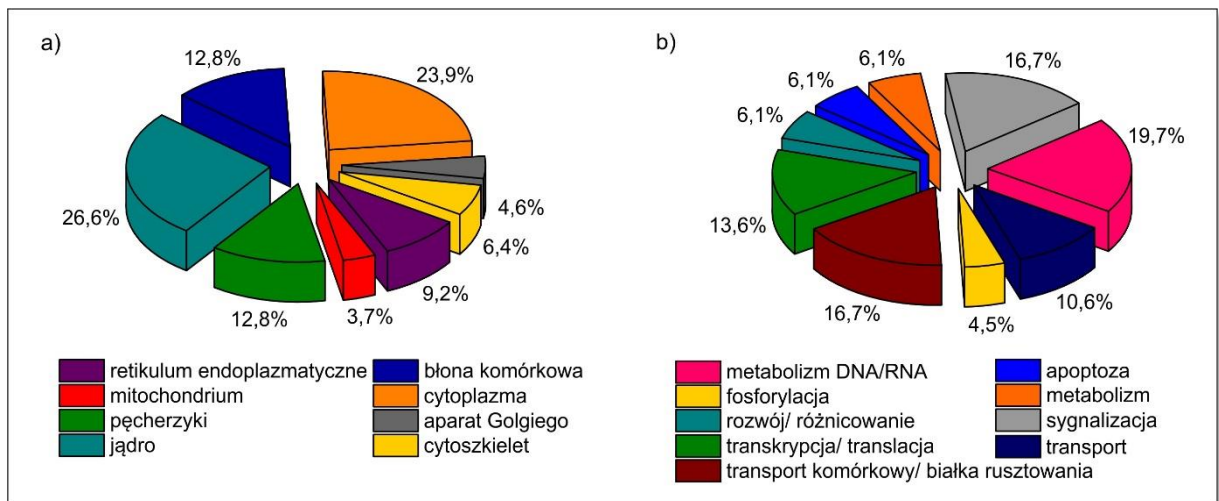
Przeprowadzenie eksperymentów w kilkukrotnym powtórzeniu pozwoliło na uzyskanie próby statystycznej do analizy danych. Dzięki porównaniu częstości występowania poszczególnych białek i liczby zidentyfikowanych peptydów w próbce ROMK2-TurboID-3xHA z próbkami pcDNA3.1, OTC-TurboID-3xHA oraz SMAC-TurboID-3xHA możliwe było wytypowanie białek specyficznych dla proksysomu ROMK2-TurboID-3xHA. Zidentyfikowano 915 białek, które występowały przynajmniej raz w próbce ROMK2-TurboID-3xHA. Jednakże wśród tych białek znalazły się również białka, które w jednym eksperymencie występowały jako specyficzne, a w innym natomiast już jako białka występujące również w próbkach kontrolnych. Z tego powodu podczas analizy wyników postanowiono skupić się na białkach występujących przynajmniej trzykrotnie jako białka potencjalnie charakterystyczne tylko dla otoczenia białkowego ROMK2-TurboID-3xHA. Na podstawie tego kryterium zidentyfikowano 45 białek będących potencjalnymi białkami oddziałującymi z białkiem ROMK2 (*Tabela 8*).

białko	gen	masa [kDa]	„score”							liczba zidentyfikowanych peptydów							lokalizacja
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
β - tubulina (Tubulin beta chain)	TUBB	50,007	462	237	292	0	100 ^{c219, o288}	834 ^{o194}	145 ^{c66}	10	5	5	0	14 ^{c6, o6}	13 ^{o6}	3 ^{cl}	CS ^{U, A}
białko przeciwwirusowe 1 (zinc finger CCCH-type antiviral protein 1)	ZC3HAV1	102,793	115 ^{o51}	54	99	11	204 ^{s71}	260 ^{o96, s233}	68	3 ^{o1}	1	1	1	5 ^{s1}	7 ^{o1, s4}	2	C ^{U, A} / AG ^A / J ^U
synaptotagmina-1 (Extended synaptotagmin-1)	ESYT1	123,194	112	75	127	0	124 ^{o64, s52}	198 ^{s84}	132 ^{s77}	2	1	2	0	2 ^{o1, s1}	4 ^{s1}	2 ^{s1}	RE ^{U, A} / B ^{U, A}
G patch domain-containing protein 8	GPATCH8	164,834	194	60	51	0	128 ^{c125, s39}	193 ^{c131, o97, s59}	95 ^{c66, o61, s60}	2	1	1	0	3 ^{c3, s1}	4 ^{c2, o2, s1}	1 ^{cl, o1, s1}	MA ^A / N ^A
phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	PICALM	70,848	164 ^{o45}	0	58	0	126	248 ^{s159}	95	4 ^{o1}	0	1	0	2	4 ^{s3}	2	AG ^U / N ^U / B ^U / P ^A
plakofilina-4 (plakophilin-4)	PKP4	142,431	137	0	75	0	35	215 ^{o121}	219 ^{o44}	2	0	1	0	1	8 ^{o2}	4 ^{o1}	CS ^U / B ^U
białko szoku cieplnego DNAJC16 (DnaJ homolog subfamily C member niekonwencjonalna miozyna IV (unconventional myosin-VI))	DNAJC16	90,948	42	47	0	0	197	232	77	1	1	0	0	4	5	2	C ^{U, A} / P ^A
polyadenylate-binding protein 1	MYO6	150,700	96	0	50	0	102	212 ^{s104}	131	1	0	1	0	1	3 ^{s3}	2	C ^U / AG ^U / J ^{U, A} / B ^U
kinaza acyloglicerolowa (zcyglycerol kinase)	PABPC1	70,810	61	48	51	0	200	185 ^{s34}	0	2	1	1	0	5	5 ^{s1}	0	C ^{U, A} / J ^U
dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu 2 (inosine-5'-monophosphate)	AGK	47,475	144	108	127	0	0	139	0	1	1	1	0	0	1	0	M ^{U, A, M} / P ^A
fibronectin type-III domain-containing protein 3A	IMPDH2	56,138	47	0	0	70	253	119	0	1	0	0	1	5	1	0	C ^{U, A} / J ^U
rybosomalne białko L6 (60S ribosomal protein L6)	FNDC3A	133,377	49	99 ^{o63}	110 ^{o81}	0	0	70	103	1	1 ^{s1}	1 ^{s1}	0	0	1	1	C ^A / AG ^{U, A} / J ^A / P ^A
nucleolar protein 56	RPL6	32,754	40	0	50	46	116 ^{s38, o81}	52 ^{o72, s45}	123 ^{c140, o91, s99}	1	0	1	1	4 ^{s1, o2}	1 ^{o1, s1}	2 ^{c2, o1, s1}	C ^U / CS ^A / RE ^U
RNA-binding protein 39	NOP56	66,331	0	59	69	0	187 ^{c56, o136}	74	0	0	1	1	0	3 ^{cl, o3}	1	0	C ^U / J ^{U, A}
erbin	RBM39	59,573	43	0	0	0	153	76 ^{o41}	75	1	0	0	0	3	1 ^{s1}	1	CS ^A / J ^{U, A}
białko Notch1 (neurogenic locus notch homolog protein 1)	ERBIN	158,798	85	0	0	0	0	112	133	2	0	0	0	0	5	4	J ^{U, A} / B ^{U, A}
rybosomalne białko L7 (60S ribosomal protein L7)	NOTCH1	283,636	59	0	0	0	55	105	92	1	0	0	0	1	5	3	J ^{U, A} / PM ^{U, A}
kinaza D-interacting substrate of 220 kDa	RPL7	29,253	140	0	0	54	60 ^{o48}	45	0	3	0	0	1	2 ^{o1}	1	0	C ^{U, A} / RE ^A / J ^{U, A}
pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	KIDINS22	197,707	57	0	0	0	69	97 ^{o31}	72	1	0	0	0	1	2 ^{o1}	1	P ^{U, A}
vesicle-associated membrane protein-associated protein A	PRPF40A	108,967	0	0	54	0	141	100	0	0	0	1	0	3	2	0	J ^{U, A}
niekonwencjonalna miozyna Id (unconventional myosin-Id)	VAPA	28,059	106 ^{o48}	49	40	0	41	58 ^{o61}	0	2 ^{o1}	1	1	0	1	2 ^{o2}	0	RE ^{U, A} / J ^A / B ^U
protein numb homolog	MYO1D	116,772	119	0	0	0	94	70	0	2	0	0	0	1	1	0	C ^{U, A} / P ^U
ciężki łańcuch klatryny (clathrin heavy chain 1)	NUMB	71,311	38	0	0	0	62	107	72	1	0	0	0	1	3	2	PM ^U / P ^U
Cu ²⁺ ATPaza (copper-transporting ATPase 2)	CLTC	192,918	48	0	66	0	82	82	0	1	0	1	0	2	1	0	C ^{U, A} / P ^A
rybosomalne białko S16 (40S ribosomal protein S16)	ATP7B	158,496	67	0	0	0	0	115	88	1	0	0	0	0	3	1	C ^U / AG ^{U, A} / M ^U / P ^U
prosopozyna (Prosaposin)	RPS16	16,527	59	0	84	0	64 ^{c72}	52	0	1	0	1	0	1 ^{cl}	1	0	C ^{U, A} / RE ^A / J ^U
rybosomalne białko L18 (60S ribosomal protein L18)	PSAP	59,545	60	50	91	0	0	0	57 ^{c89, o48, s50}	1	1	2	0	0	0	0	1 ^{cl, o1, s1}
rybosomalne białko S3 (40S ribosomal protein S3)	RPL18	20,979	0	62	0	0	118	77	0	0	1	0	0	2	1	0	C ^{U, A} / RE ^{U, A} / J ^A
białko Numb (Numb-like protein)	RPS3	45,382	0	0	0	52	122	70	0	0	0	0	1	3	2	0	C ^{U, A} / C ^U / RE ^A / M ^U /
rybosomalne białko L11 (60S ribosomal protein L11)	NUMBL	65,449	0	0	0	0	52	118	71	0	0	0	0	2	3	2	C ^U
vezatin	RPL11	20,424	52	0	52	46	90	0	0	1	0	1	1	3	0	0	C ^U / J ^U / V ^A
putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase	VEZT	89,299	0	0	0	0	33	103	102	0	0	0	0	1	1	1	C ^A / J ^{U, A} / PM ^U
leucine-rich repeat-containing protein 59	FTSJ1	36,562	45	0	0	0	34	83 ^{s39}	70	1	0	0	0	1	2 ^{s1}	1	C ^{U, A}
kinaza epsilon diacyloglicerolu (diacylglycerol kinase epsilon)	LRRC59	35,231	57	0	57	0	52	65 ^{o34}	0	1	0	1	0	1	1 ^{o4}	0	RE ^{U, A} / J ^U
białko p53 (cellular tumor antigen p53)	DGKE	65,173	60	0	0	0	0	83	84	1	0	0	0	0	2	1	C ^{U, A} / J ^A / B ^{U, A}
epsin-3	TP53	44,085	42	0	49	0	57	77	0	1	0	1	0	2	1	0	C ^{U, A} / CS ^U / J ^{U, A} / P ^U
guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	EPN3	68,318	54	0	0	0	48	49	61	1	0	0	0	1	1	1	C ^U / J ^{U, A} / P ^A
rybosomalne białko L8 (60S ribosomal protein L8)	GNAS	111,553	63	0	0	0	85	50	0	1	0	0	0	1	1	0	C ^A / J ^A / B ^{U, A}
kinazyzna IF14 (Kinesin-like protein KIF14)	RPL8	28,191	0	0	47	0	91	57	0	0	0	1	0	2	1	0	C ^{U, A} / RE ^A / J ^A
sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	KIF14	187,479	97	0	59	0	0	34	0	3	0	1	0	0	1	0	C ^{U, A} / CS ^U / N ^U
ER membrane protein complex subunit 8	SLC6A15	82,518	0	0	0	0	65	68	48	0	0	0	0	2	1	1	N ^A / B ^U / P ^A
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	EMC8	24,126	38	0	0	0	0	73	67	1	0	0	0	0	3	1	C ^A / RE ^U
nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	CNOT1	268,653	54	0	0	0	52	67	0	1	0	0	0	1	2	0	C ^A / J ^U
	NUCKS1	27,280	0	54	51	0	39	0	0	0	1	1	0	1	0	0	J ^{U, A}

Tabela 8. Zestawienie unikalnych białek obecnych w próbkach ROMK2-TurboID-3xHA zidentyfikowanych za pomocą spektrometrii mas. W kolejnych kolumnach podano nazwę białka, genu, przewidywaną masę białka, liczbę zliczeń w poszczególnych eksperymentach („score”), liczbę zidentyfikowanych peptydów w poszczególnych eksperymentach oraz przeprowadzoną lokalizację białka: CS – cytoszkielet, C – cytoplazma, AG – aparat Golgiego, J – jądro, RE – retikulum endoplazmatyczne (siateczka śródplazmatyczna), B – błona komórkowa, P – pęcherzyki, M – mitochondrium. Lokalizację podano na podstawie dwóch informacji z baz danych: U – uniprot (www.uniprot.org), A – human protein atlas (www.proteinatlas.org). W przypadku braku odpowiednich nazw polskich podano nazwę w języku angielskim. Dodatkowo przy liczbie zliczeń w poszczególnych eksperymentach i liczbie zidentyfikowanych peptydów w poszczególnych eksperymentach zaznaczono, gdy białko wykryto również w innych próbkach, tj. c – kontrola (pcDNA3.1), o – OTC-TurboID-3xHA, s – SMAC-TurboID-3xHA.

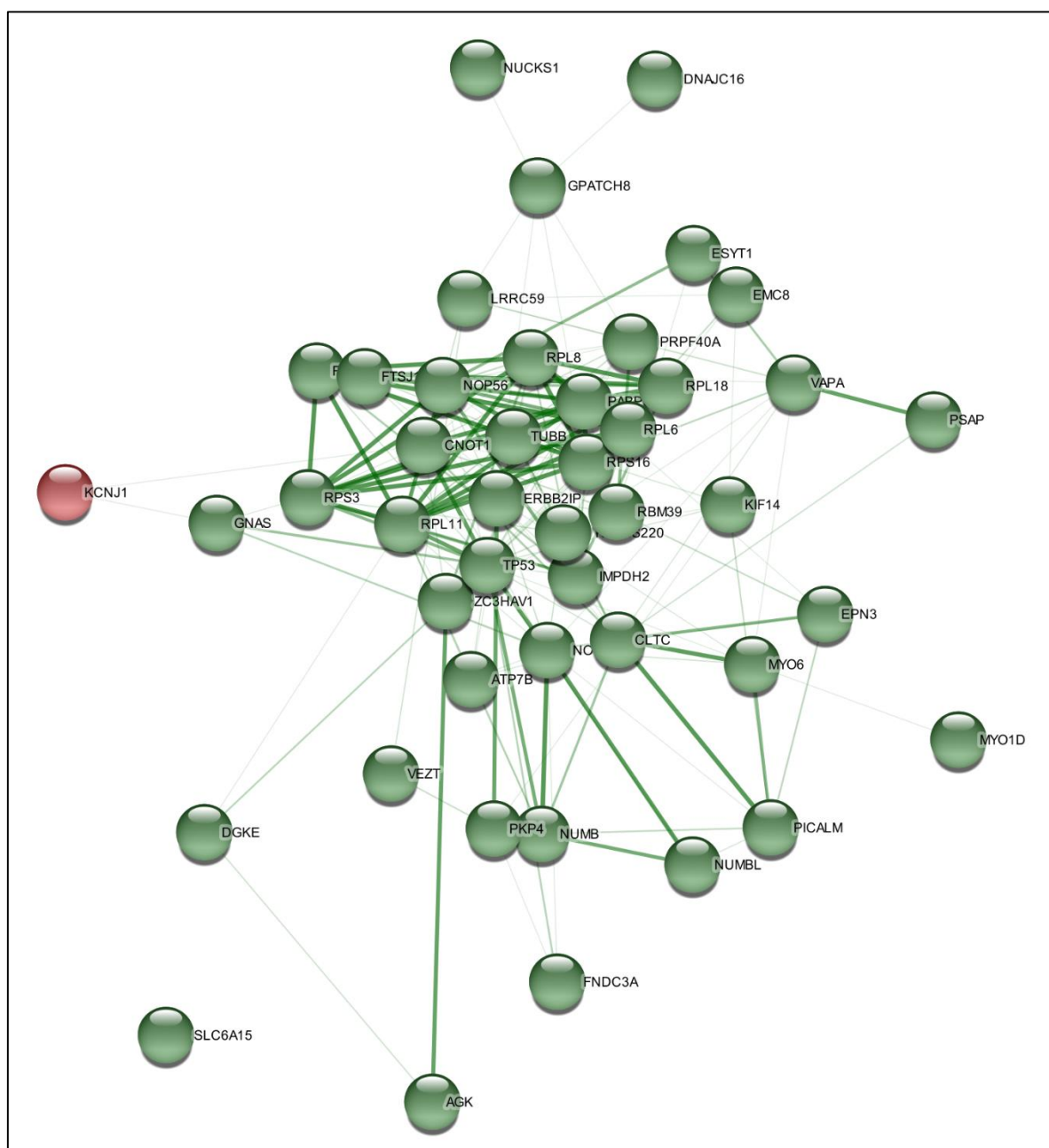
Zidentyfikowane białka sklasyfikowano według lokalizacji subkomórkowej. Spośród 45 białek 26,6% zidentyfikowano jako białka jądrowe, a 23,9% jako cytoplazmatyczne. W błonie komórkowej zlokalizowanych jest 12,8% zidentyfikowanych białek i dokładnie tyle samo w pęcherzykach. Białka zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym stanowią 9,2% ze wszystkich zidentyfikowanych białek. Białka cytoszkietalne stanowią 6,4%, a w aparacie Golgiego znajduje się 4,6% zidentyfikowanych białek. Tylko 3,7% z analizowanych białek przypisano lokalizację mitochondrialną (*Rycina 17a*).

Zidentyfikowane białka, na podstawie anotacji trzech różnych baz danych, sklasyfikowano również zgodnie z pełnionymi przez nimi funkcjami w różnych procesach biologicznych. Na jej podstawie określono, że 19,7% zidentyfikowanych białek bierze udział w metabolizmie DNA lub RNA. Spośród pozostałych białek 16,7% jest białkami rusztowania związanymi z transportem komórkowym i tyle samo pełni funkcje sygnalizacyjne. 13,6% ze zidentyfikowanych białek bierze udział w procesach transkrypcji i translacji. Z transportem przez błony biologiczne natomiast związanych jest 10,6% ze zidentyfikowanych białek. Wśród białek proksysomu ROMK2-TurboID znajdują się również białka pełniące role w metabolizmie (6,1%), apoptozie (6,1%), rozwoju i różnicowaniu (6,1%) oraz fosforylacji (4,5%) (*Rycina 17b*).



Rycina 17. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek ze względu na: a) lokalizację subkomórkową oraz b) pełnioną funkcję. Lokalizację i funkcje białek określano na podstawie dwóch baz danych: Uniprot (www.uniprot.org) oraz human protein atlas (www.proteinatlas.org)

Wykorzystując program Cytoscape (cytoscape.org) zwizualizowano znane do tej pory relacje pomiędzy zidentyfikowanymi białkami, a białkiem ROMK2. Okazało się, że znanych jest wiele relacji między większością ze zidentyfikowanych białek (*Rycina 18*), nieliczne z nich są niezwiązane z żadnym ze zidentyfikowanych białek. Sieć tę w kolejnym etapie poddano bardziej szczegółowej analizie.

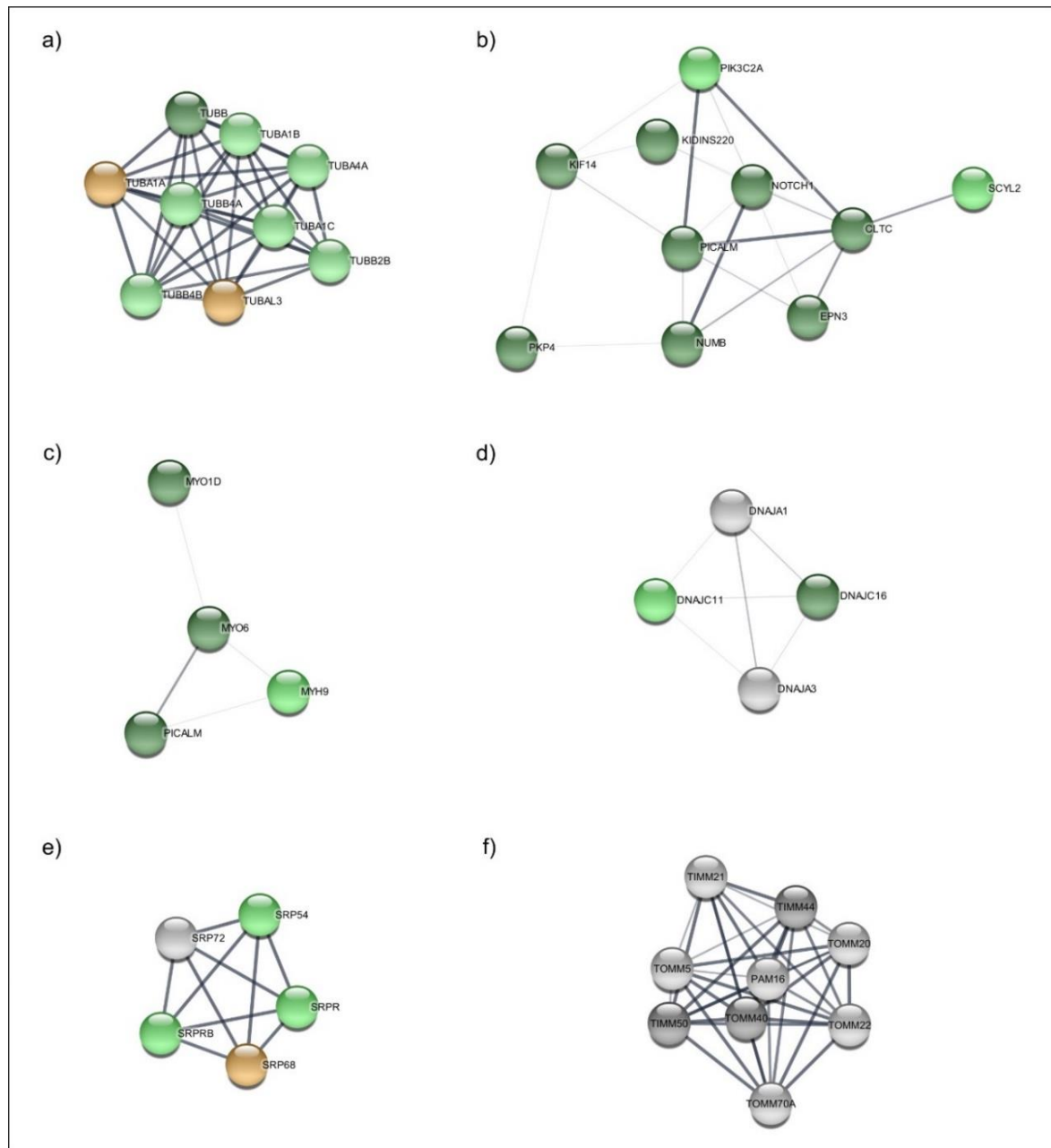


Rycina 18. Sieć relacji potencjalnego proksysomu białka ROMK2 wykonana z wykorzystaniem oprogramowania Cytoscape na podstawie danych bazy STRING.

W tej rozbudowanej sieci relacji udało się również określić mniejsze sieci wewnętrzne (*Rycina 19*). Zidentyfikowano 9 różnych białek z rodziny tubulin (*Rycina 19a*), a także białka zaangażowane w endocytozę zależną od klatryny (*Rycina 19b*). Wśród zidentyfikowanych białek występują również trzy różne miozyny, w tym miozyna I (Myo1D) oraz miozyna VI (Myo6), a także oddziałujące z nimi białka biorące udział w transporcie pęcherzyków endosomalnych (*Rycina 19c*). Ponadto, zidentyfikowano białka opiekuńcze z rodziny DnaJ (DnaJC16, DnaJC11, DnaJA1, DnaJA3), które zaangażowane są w fałdowanie i transport białek do mitochondriów (*Rycina 19d*). Dodatkowo zidentyfikowano również 4 białka SPR (ang. *signal recognition particle*) zaangażowane w kotranslacyjny transport białek do retikulum endoplazmatycznego (*Rycina 19e*). Wśród białek z otoczenia ROMK2-TurboID-3xHA znaleziono również białka TIM i TOM związane z transportem przez błonę mitochondrialną (*Rycina 19f*). Wykryto białko TOM40 wchodzące w skład kompleksu TOM odpowiadającego za transport białek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną oraz białka TIM44 i TIM50, które wraz z innymi białkami zidentyfikowanymi w próbkach SMAC-TurboID-3xHA i OTC-TurboID-3xHA, tj. TIM16, TIM21 tworzą kompleks TIM23 znajdujący się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (*Tabela 9*).

kompleks	podjednostka	kontrola	SMAC-TurboID-3xHA	OTC-TurboID-3xHA	ROMK2-TurboID-3xHA
zewnątrzna błona mitochondrialna					
TOM	TOM5	0	6 ^{0, 1, 1, 2, 1, 1, 1}	1 ^{3, 0, 0, 0, 0, 0, 0}	0
	TOM20	0	5 ^{1, 1, 0, 3, 1, 1, 0}	3 ^{2, 0, 0, 1, 1, 0, 0}	0
	TOM22	0	5 ^{2, 1, 0, 1, 1, 1, 0}	5 ^{2, 1, 1, 1, 1, 0, 0}	0
	TOM40	0	5 ^{0, 1, 1, 3, 1, 1, 0}	1 ^{4, 0, 0, 0, 0, 0, 0}	2 ^{1, 0, 0, 0, 0, 1, 0}
	TOM70	0	5 ^{15, 0, 1, 3, 1, 1, 0}	7 ^{3, 8, 6, 11, 10, 5, 5}	0
wewnętrzna błona mitochondrialna					
TIM23	TIM16	0	5 ^{3, 1, 1, 2, 0, 1, 0}	6 ^{1, 2, 0, 1, 3, 2, 1}	0
	TIM21	0	0	2 ^{1, 0, 0, 0, 1, 0, 0}	0
	TIM44	0	7 ^{20, 19, 12, 22, 21, 19, 18}	6 ^{28, 19, 0, 20, 1, 18, 17}	3 ^{2, 0, 0, 1, 0, 1, 0}
	TIM50	0	7 ^{2, 2, 2, 1, 1, 3, 2}	6 ^{6, 3, 0, 1, 4, 3, 2}	2 ^{1, 0, 0, 0, 0, 2, 0}
TIM22	AGK	0	0	0	4 ^{1, 1, 1, 0, 0, 1, 0}

Tabela 9. Zestawienie białek odpowiedzialnych za transport mitochondrialny zidentyfikowanych w próbkach SMAC-TurboID-3xHA, OTC-TurboID-3xHA oraz ROMK2-TurboID-3xHA. W tabeli podano liczbę eksperymentów, w których dane białko zostało zidentyfikowane (na 7 eksperymentów), a w indeksie górnym zaznaczono ile peptydów zostało zidentyfikowanych w poszczególnych eksperymentach.



Rycina 19. Podział potencjalnego proksysomu białka ROMK2-TurboID-3xHA w grupy funkcjonalne wykorzystując znane relacje udostępnione w bazie STRING. a) Schematyczne przedstawienie relacji między tubulinami; b) Schematyczne przedstawienie relacji pomiędzy białkami zaangażowanymi w endocytozę zależną od klatryny; c) Relacje pomiędzy miozynami i innymi oddziałującymi z nimi białkami biorącymi udział w transporcie pęcherzyków endosomalnych; d) Sieć białek opiekuńczych z rodziny DnaJ zaangażowanych w faldowanie i transport białek do mitochondriów; e) Sieć białek SPR (z ang. signal recognition particle) zaangażowanych w ko-translacyjny transport białek do retikulum endoplazmatycznego; f). Sieć białek biorących udział w transporcie białek do mitochondriów. Punkty (węzły) odpowiadające białkom zabarwiono na podstawie częstości identyfikacji białka w proksysomie ROMK2: **ciemnozielone węzły** – białka zidentyfikowane jako unikalne przynajmniej trzykrotnie, **jasnozielone węzły** – białka zidentyfikowane jako unikalne mniej niż trzy razy, **pomarańczowe węzły** – białka zidentyfikowane jako unikalne wyłącznie po stresie oksydacyjnym, **szare węzły** – nie unikatowe białka. Szare linie oznaczają interakcje typu białko-białko.

W próbce ROMK2-TurboID-3xHA wykryto również mitochondrialną kinazę acyloglicerolową (AGK), która jest białkiem dwufunkcyjnym. AGK jest podjednostką kompleksu TIM22 zaangażowanego w transport podgrupy białek mitochondrialnych, a ponadto odgrywa rolę w metabolizmie lipidów przeprowadzając reakcję fosforylacji acylogliceroli do kwasu fosfatydowego z wykorzystaniem ATP (Kang i wsp., 2017). Wśród zidentyfikowanych białek znalazły się również białka PARP1 (Bai i wsp., 2015) oraz p53, które są translokowane do mitochondriów w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Vaseva i wsp., 2012; Zhao i wsp., 2005). Analiza sieci powiązań między białkami wskazuje na związek apoptotycznego białka p53 z peroksyredoksyną 1 (PRDX1), którą również zidentyfikowano w próbce ROMK2-TurboID-3xHA (Noda i wsp., 2017; Zhao i wsp., 2005).

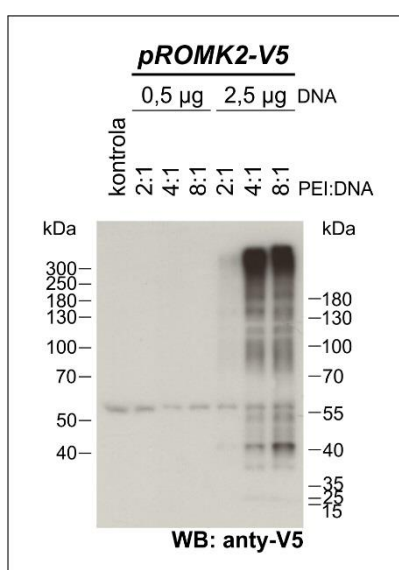
Ponadto wśród zidentyfikowanych białek była również dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanowa 2 (IMPDH2) (Naffouje i wsp., 2019; McLean i wsp., 2004). IMPDH katalizuje zależne od NAD utlenianie monofosforanu inozyny (IMP) do 5'-monofosforanu ksantozyny (XMP) będącego metabolitem pośrednim w produkcji trifosforanu guanozyny (GTP). Z drugiej strony IMP może być przekształcone w ATP (Naffouje i wsp., 2019). Można zatem wnioskować, że IMPDH reguluje produkcję GTP, ale także ilość wytwarzanego ATP, co w konsekwencji może mieć wpływ na regulację aktywności białka ROMK2 będącego podjednostką kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Wśród zidentyfikowanych białek znaleziono również mało poznane dotychczas białko GPATCH8 o potencjalnej mitochondrialnej lokalizacji (Kaneko i wsp., 2011).

6.2. ODDZIAŁYWANIA BIAŁKA ROMK2

Zidentyfikowanie potencjalnych białek sąsiadujących z białkiem ROMK2 może sugerować fizyczne oddziaływania między ROMK2, a tymi białkami. W związku z tym zdecydowano się na przeprowadzenie koimmunoprecypitacji (Co-IP) między ROMK2, a wybranymi białkami proksysomu. Do tych badań, w związku ze wspomnianymi w punkcie 6.1.4 właściwościami, wybrano następujące białka: AGK, PARP1, GPATCH8, p53, PRDX1 oraz IMPDH2. Pozyskano plazmidy produkujące te białka wyznakowane znacznikami Myc oraz FLAG na ich karboksylowych końcach. Skonstruowano również plazmid *pROMK2-V5* produkujący białko ROMK2 wyznakowane na jego karboksylowym końcu metką V5 (ROMK2-V5).

6.2.1. Optymalizacja warunków transfekcji

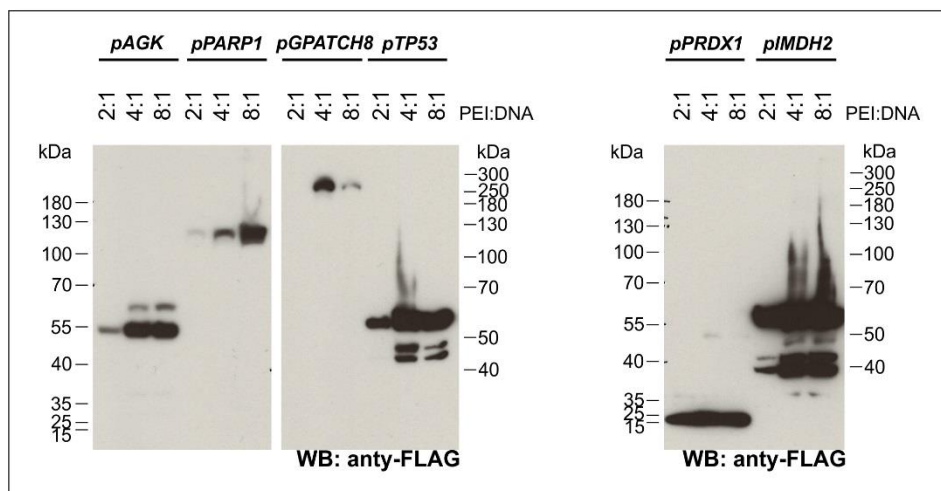
W pierwszym etapie zoptymalizowano warunki transfekcji komórek HEK293T plazmidem *pROMK2-V5*. Użyto dwóch różnych ilości plazmidowego DNA (0,5 μ g oraz 2,5 μ g), a także trzech różnych stosunków PEI do DNA (2:1, 4:1 oraz 8:1). Ekspresje białka ROMK2-V5 obserwowano przy 2,5 μ g DNA oraz stosunku PEI:DNA wynoszącym 4:1 oraz 8:1, a ponieważ w obu warunkach poziom ekspresji konstruktyw był podobny w dalszych badaniach wykorzystano stosunek PEI:DNA równy 4:1 (Rycina 20).



Rycina 20. Optymalizacja warunków transfekcji komórek HEK293T plazmidem ROMK2-V5. Komórki transfekowano dwiema ilościami DNA (0,5 i 2,5 μ g) oraz trzema proporcjami PEI do DNA (2:1, 4:1 i 8:1). Jako kontrole zastosowano komórki HEK293T nietransfekowane. Do wykrywania poziomu ekspresji białka zastosowano przeciwciało anti-V5 (1:1000, Sigma Aldrich).

W optymalizacji transfekcji plazmidami produkującymi potencjalne białka partnerskie (AGK-Myc-Flag, PARP1-Myc-Flag, GPATCH8-Myc-Flag, p53-Myc-Flag, PRDX1-Myc-Flag oraz IMPDH2-Myc-Flag) wykorzystano 2,5 μ g DNA każdego z plazmidów, zwiększając stosunki PEI:DNA, tj. 2:1, 4:1 oraz 8:1. Analiza Western Blot wykazała, że w przypadku transfekcji plazmidami *pAGK*, *pTP53*, *pPRDX1* oraz *pIMPDH2* nie widać znacznej różnicy pomiędzy ilościami produkowanego białka przy stosunkach PEI:DNA wynoszącymi 4:1 oraz 8:1. Największą ilość białka GPATCH8-Myc-FLAG obserwowano przy stosunku PEI do DNA wynoszącym 4:1. W przypadku PARP1-Myc-FLAG największą ilość białka obserwowano w warunkach transfekcji, w których stosunek PEI:DNA wynosił 8:1, jednakże w przypadku stosunku 4:1 ilość wykrywanego białka również była zadawalająca.

Po analizie uzyskanych wyników stwierdzono, iż w celu uproszczenia prowadzenia dalszych eksperymentów przy transfekcji zastosowany zostanie jeden stosunek PEI:DNA wynoszący 4:1 (Rycina 21).



Rycina 21. Optymalizacja warunków transfekcji komórek HEK293T plazmidami pAGK, pPARP1, pGPATCH8, pTP53, pPRDX1 oraz pIMPDH2. Komórki transfekowano 2,5 μ g DNA i trzema proporcjami PEI:DNA (2:1, 4:1 oraz 8:1). Do wykrywania białka zastosowano przeciwciało anti-FLAG (1:1000, OriGene).

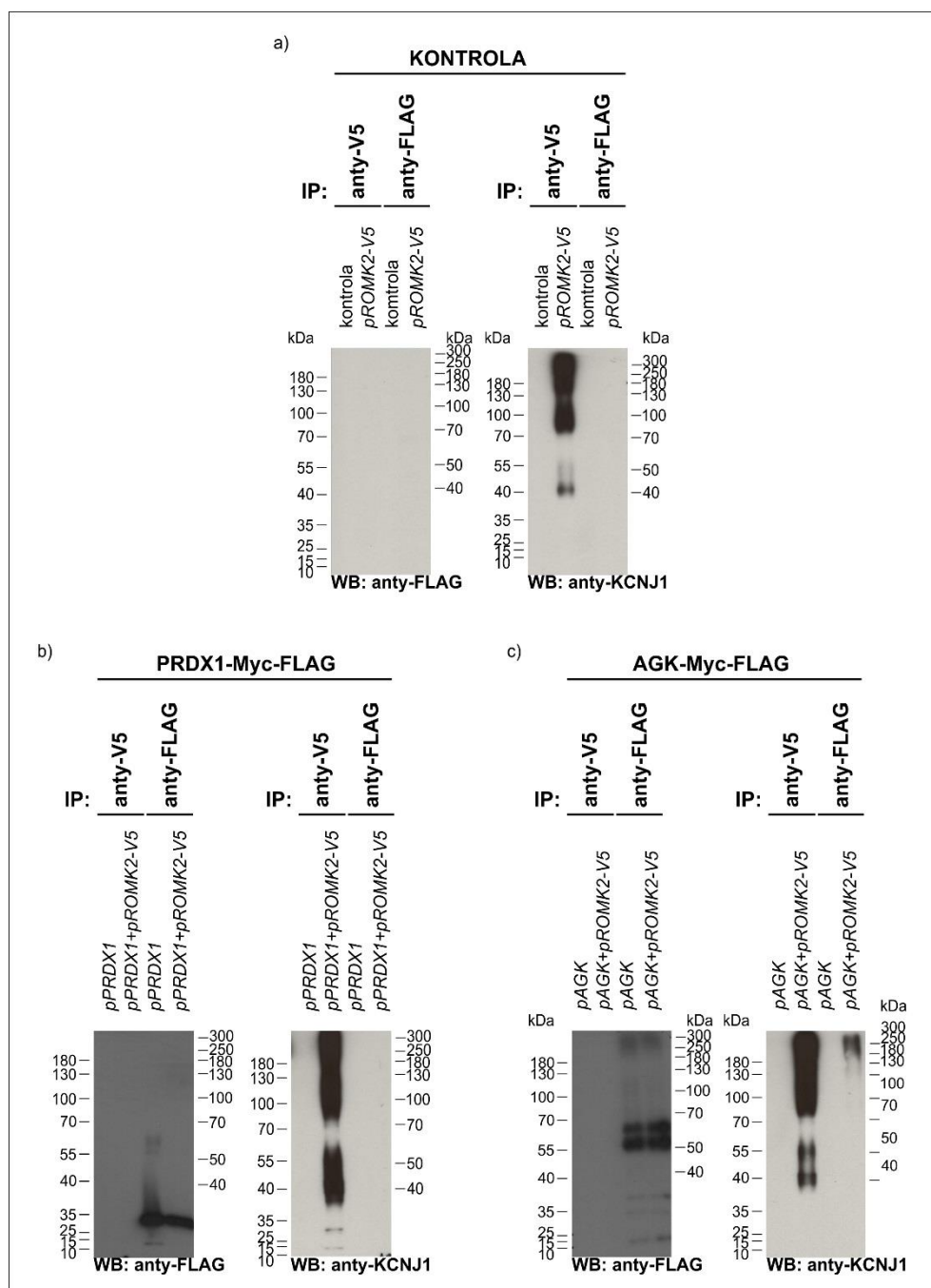
6.2.2. Badanie oddziaływań potencjalnych białek oddziałujących z białkiem ROMK2-V5 za pomocą metody koimmunoprecypitacji

Potencjalne oddziaływania fizyczne białka ROMK2-V5 z białkami PRDX1-Myc-FLAG, AGK-Myc-FLAG, IMPDH2-Myc-FLAG, p53-Myc-FLAG, PARP1-Myc-FLAG oraz GPATCH8-Myc-FLAG weryfikowano w następnym kroku za pomocą koimmunoprecypitacji. W tym celu komórki HEK293T kotransfekowano plazmidem pROMK2-V5 oraz jednym z plazmidów produkujących potencjalne białko oddziałujące. Jako kontrolę stosowano komórki transfekowane tylko plazmidem pROMK2-V5 lub tylko plazmidem niosącym potencjalne białko oddziałujące. Białka immunoprecypitowano na złożach z przeciwciałem anti-V5 lub anti-FLAG.

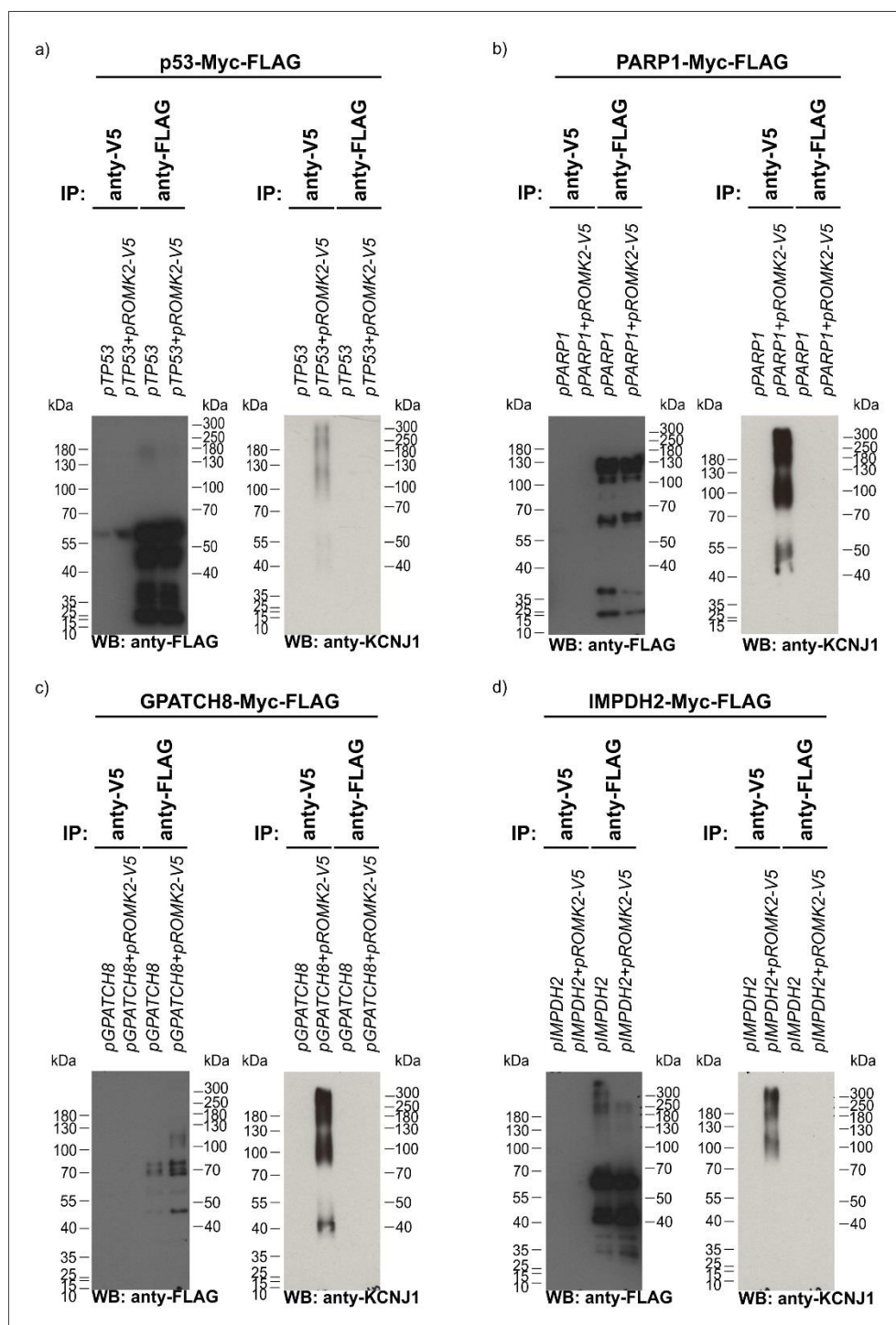
We wstępnym doświadczeniu przeprowadzono immunoprecypitację z użyciem przeciwciał anti-FLAG i anti-V5 próbek kontrolnych tzn. komórek nietransfekowanych i transfekowanych wyłącznie plazmidem pROMK2-V5. Immunoprecypitowane frakcje analizowano metodą Western Blot. Nie zaobserwowano sygnałów w tych frakcjach po detekcji przeciwciałem anti-Flag (Rycina 22a, lewy panel). Natomiast detekcja przeciwciałem anti-KCNJ1 wykazała obecność białka ROMK2-V5 jedynie w próbce białek precypitowanych z użyciem przeciwciała anti-KCNJ1 pochodzącej z lizatu komórek transfekowanych

plazmidem *pROMK2-V5*. W tej próbce obserwowano prążki odpowiadające różnym formom białka ROMK2-V5: monomerowi (ok. 40 kDa), dimerowi (prążek pomiędzy 70-100 kDa), trimerowi (prążek pomiędzy 130, a 180 kDa), a także wyższym formom oligomerycznym (*Rycina 22a, prawy panel*).

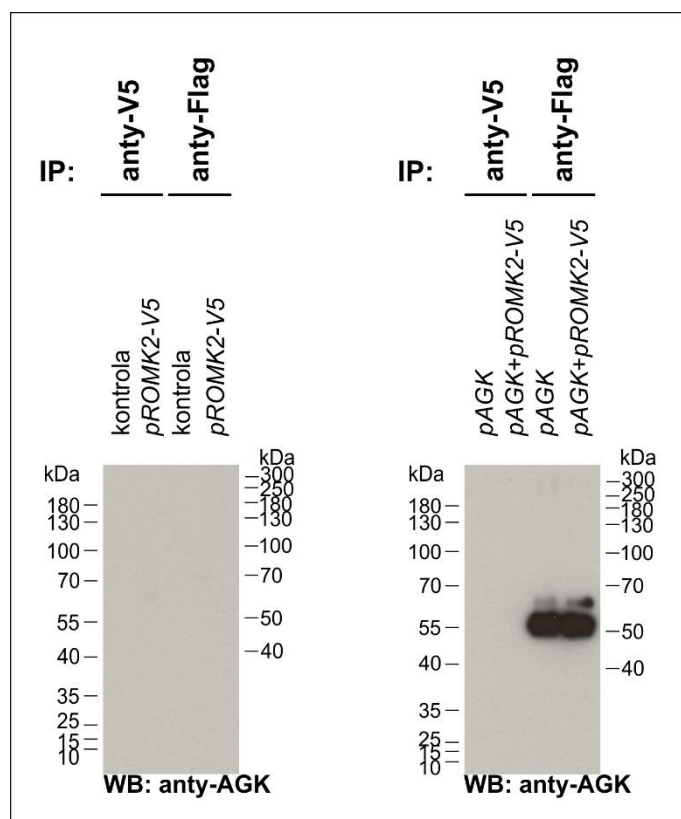
W następnym etapie przeprowadzono immunoprecypitację przy użyciu przeciwciała anti-FLAG z lizatów komórek transfekowanych bądź to plazmidem produkującym potencjalne białko oddziałujące, bądź też kotransfekowanym plazmidem produkującym potencjalne białko oddziałujące i plazmidem *pROMK2-V5*. Po przeprowadzeniu analizy produktów immunoprecypitacji metodą Western Blot z użyciem przeciwciała anti-FLAG (*Rycina 22 i Rycina 23*) okazało się, że wszystkie białka potencjalnych partnerów zostały zatrzymane przez złożę z przeciwciałem anti-FLAG. W każdym przypadku obserwowano prążki o wielkości odpowiadającej masie danego białka, zarówno w próbkach lizatów komórek transfekowanych plazmidem produkującym białko potencjalnego partnera, jak i po kotransfekcji z plazmidem *pROMK2-V5*, co potwierdza obecność tychże białek we wszystkich próbkach. Po immunoblottingu membran z wykorzystaniem przeciwciała anti-KCNJ1 zauważono sygnał odpowiadający białku ROMK2 tylko w próbce pochodzącej z lizatu komórek kotransfekowanych plazmidami *pROMK2-V5* oraz *pAGK* (*Rycina 22c*). Świadczy to, że wraz z białkiem współstrąca się białko ROMK2-V5 (*Rycina 22c*). Obecność AGK-Myc-FLAG dodatkowo potwierdzono przeciwciałami anti-AGK (*Rycina 24*). Wynik ten sugeruje fizyczne oddziaływanie obu białek. Co ciekawe, gdy przeprowadzono immunoprecypitację białek przy użyciu przeciwciała anti-V5 zaobserwowano obecność białka ROMK2-V5 we wszystkich właściwych próbkach, lecz nie zaobserwowano koimmunoprecypitacji żadnych potencjalnych partnerów białkowych, w tym również białka AGK-Myc-FLAG (*Rycina 22 i Rycina 23*).



Rycina 22. Analiza Western Blot eksperymentów typu Co-IP próbek z lizatów komórkowych kontrolnych, jak również próbek z lizatów komórek transfekowanych plazmidami pROMK2-V5 oraz pPRDX1 lub pAGK. Immunoprecypitację (IP) prowadzono z użyciem przeciwciała anty-V5 i anty-FLAG. Detekcja białek metodą Western Blot (WB) z wykorzystaniem przeciwciała anty-FLAG (1:1 000; Origene) oraz anty-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich).



Rycina 23. Analiza Western Blot eksperymentów typu Co-IP próbek z lizatów komórkowych kontrolnych, jak również próbek z lizatów komórek transfekowanych plazmidami pROMK2-V5 oraz a) pTP53, b) pPARP1, c) pGPATCH8 oraz d) pIMPDH2. Immunoprecypitację (IP) przeprowadzono z użyciem przeciwciała anti-V5 i anti-FLAG. Detekcja metodą Western Blot (WB) z wykorzystaniem przeciwciała anti-FLAG (1:1 000; Origene) oraz anti-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich).

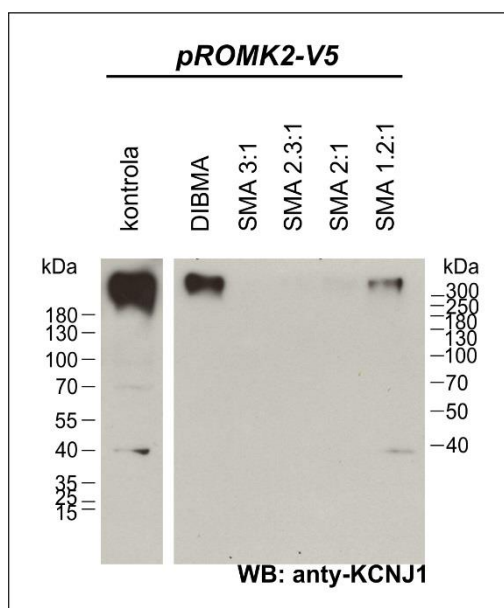


Rycina 24. Analiza Western Blot eksperymentów typu Co-IP próbek z lizatów komórkowych kontrolnych, jak również próbek z lizatów komórek transfekowanych plazmidami *pAGK* i *pROMK2-V5*. Detekcja z wykorzystaniem przeciwciała anty-AGK (1:500, Origene).

6.2.3. Potwierdzenie oddziaływań pomiędzy białkiem ROMK2, a AGK za pomocą immunoprecypitacji natywnych nanodysków

W celu potwierdzenia oddziaływań pomiędzy białkami ROMK2 oraz AGK zastosowano również inny system solubilizacji białek oparty na polimerach amfipatycznych. Metoda ta pozwala na solubilizację białek lub też kompleksów białek błonowych wraz z lipidami poprzez otoczenie ich warstwą polimeru z utworzeniem tzw. natywnych nanodysków. Metoda ta już wcześniej została z powodzeniem zastosowana do izolacji kompleksów białkowych (Long i wsp., 2013; Paulin i wsp., 2014; Swainsbury i wsp., 2018; Desrames i wsp., 2020; Smirnova i wsp., 2016; Sun i wsp., 2018; Lee i wsp., 2019).

W pierwszym etapie wzbogaconą frakcją mitochondrialną wyizolowaną z komórek transfekowanych plazmidem *pROMK2-V5* poddano solubilizacji za pomocą polimerów DIBMA oraz SMA o różnych stechiometriach (1,2:1, 2,3:1 oraz 3:1). Białko ROMK2-V5 solubilizowało się tylko za pomocą dwóch z testowanych polimerów SMA 1,2:1 oraz DIBMA, jednakże solubilizacja z wykorzystaniem kopolimeru DIBMA była znacznie bardziej efektywna, niż w przypadku kopolimeru SMA 1.2:1 (Rycina 25).



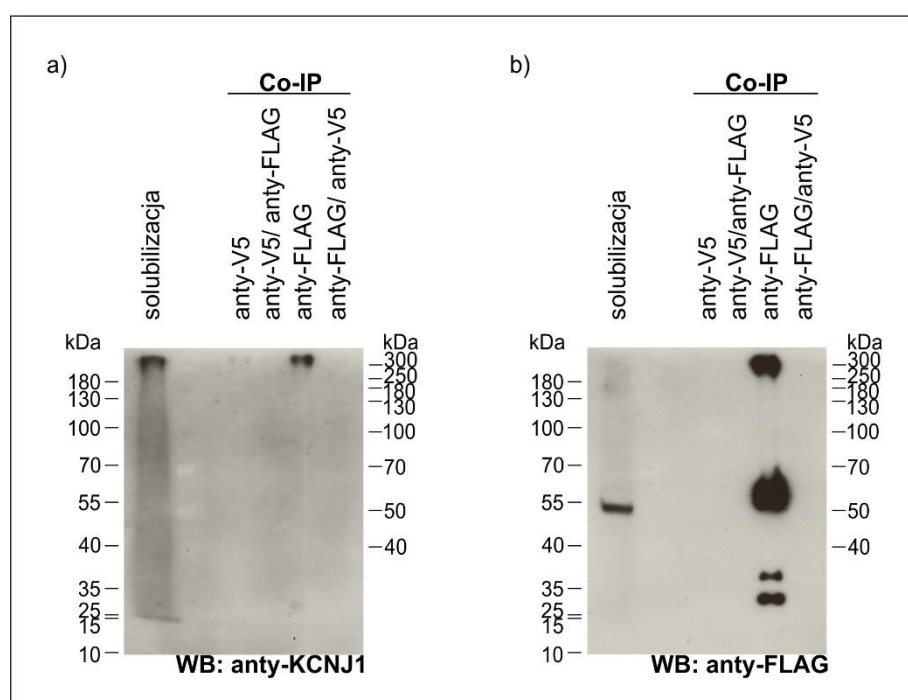
Rycina 25. Solubilizacja białka ROMK2-V5 przez amfipatyczne kopolimery. Mitochondria wyizolowane z komórek transfekowanych plazmidem ROMK2-V5 solubilizowano w 2,5% roztworach kopolimerów: DIBMA, SMA 3:1, SMA 2,3:1, SMA 2:1, SMA 1,2:1. Próbkę zwirowano, a supernatant poddano analizie. Jako kontroli użyto lizat całokomórkowy komórek transfekowanych plazmidem pROMK2-V5. Wszystkie próbki nałożono proporcjonalnie i rozdzielono w 10% SDS-PAGE. Białko wykrywano przeciwciałem anty-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich).

Do solubilizacji lizatu komórek kotransfekowanych pROMK2-V5 oraz pAGK wykorzystano kopolimer DIBMA. Analiza Western Blot wykazała, że w supernatancie po solubilizacji kopolimerem DIBMA obecne było zarówno białko ROMK2-V5 (prążek o masie około 300 kDa - Rycina 26a „solubilizacja”), jak i AGK-Myc-FLAG (prążek o masie około 55 kDa - Rycina 26b „solubilizacja”). Tak jak we wcześniejszych eksperymentach, również w tym przypadku do współstrącania białka zastosowano chromatografię powinowactwa z przeciwciałami anty-V5 oraz anty-FLAG. We frakcji oczyszczonej wobec przeciwciała anty-V5 obecna była niewielka ilość białka ROMK2-V5 (Rycina 26a, Co-IP: anty-V5). W próbce tej nie wykryto obecności białka AGK-Myc-FLAG (Rycina 26b, Co-IP: anty-V5). Dalsze oczyszczanie tej próbki wobec przeciwciała anty-FLAG nie wykazało obecności żadnego z białek (Rycina 26, anty-V5/anty-FLAG).

Równoległe tę samą próbkę oczyszczano względem przeciwciała anty-FLAG (Rycina 26, Co-IP: anty-FLAG). W tym przypadku analiza Western Blot frakcji elucji wykazała obecność zarówno białka AGK-Myc-FLAG (Rycina 26b CoIP: anty-FLAG), jak i ROMK2-V5, które wykrywano za pomocą przeciwciała anty-KCNJ1 (Rycina 26a, Co-IP: anty-FLAG). Co ciekawe białko AGK-Myc-FLAG migrowało w żelu nie tylko jako

forma o masie ok. 55 kDa, ale również jako forma o masie powyżej 300 kDa (*Rycina 26a*, anty-FLAG”), co (jak pokazano wcześniej) odpowiada masie białka ROMK2-V5. W dalszym kroku próbkę tę oczyszczano wobec przeciwciała V5, jednakże w tym przypadku nie wykryto obecności białek ROMK2-V5, ani AGK-Myc-FLAG (*Rycina 26*, Co-IP: anty-FLAG/anty-V5).

Wyniki koimmunoprecypitacji wskazują na obecność kompleksu białkowego zawierającego ROMK2-V5 oraz AGK-Myc-FLAG. Prawdopodobnie w kompleksie tym epitop V5 jest niedostępny dla przeciwciała anty-V5.

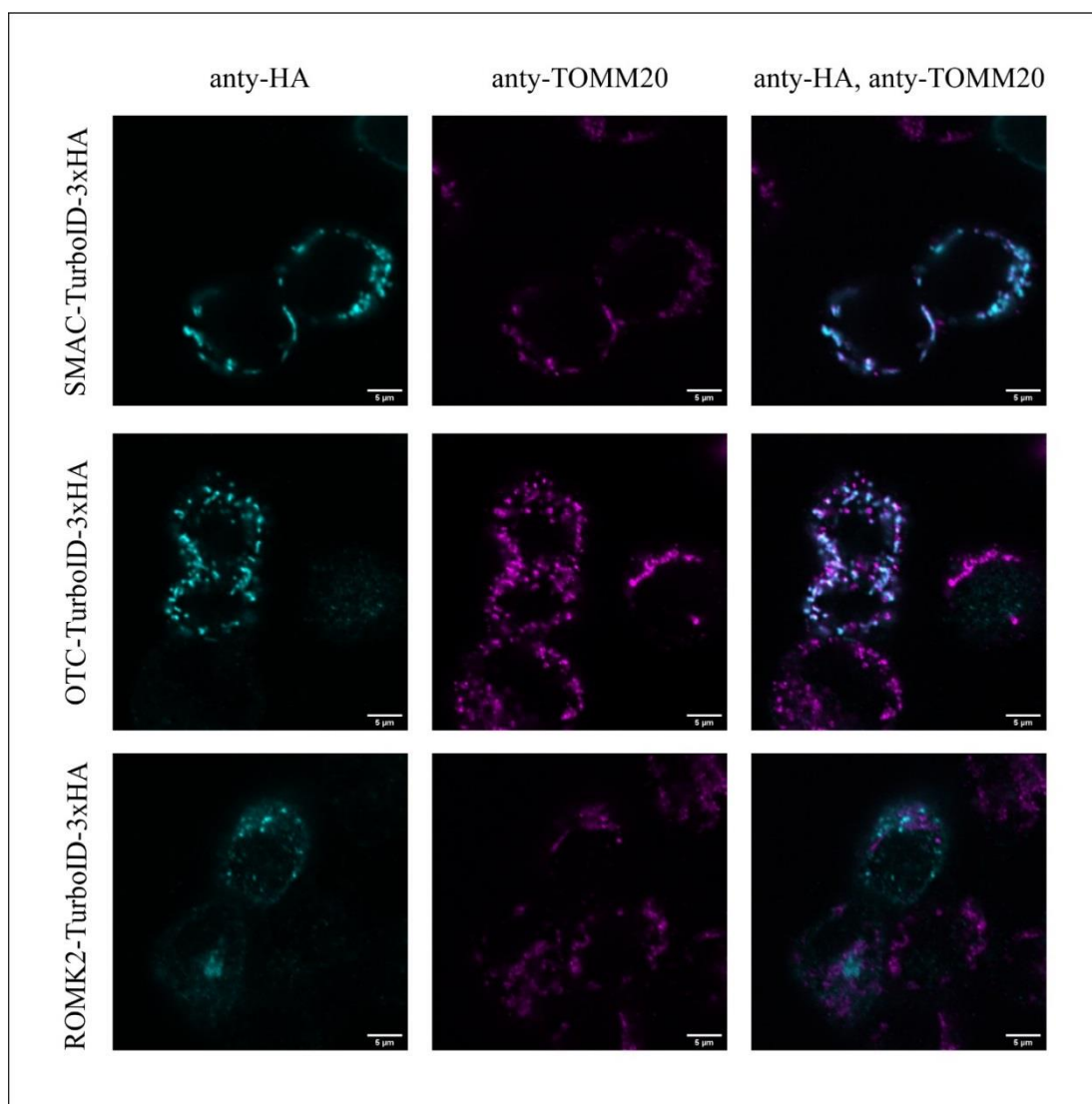


Rycina 26. Analiza Western Blot eksperymentu typu Co-IP i natywnych nanodysków. W pierwszym etapie eksperymentu próbki oczyszczano wobec przeciwciała anty-V5 oraz anty-FLAG, a następnie jej część poddano oczyszczaniu wobec drugiego z przeciwciał (próbka oczyszczana w pierwszej kolejności wobec przeciwciała anty-V5 była następnie oczyszczana wobec przeciwciała anty-Flag i odwrotnie). a) Białko ROMK2-V5 wykryto za pomocą przeciwciała anty-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich), b) białko AGK-Myc-FLAG wykryto przeciwciałem anty-FLAG (1:1 000; Origene).

6.2.4. Subkomórkowa lokalizacja ROMK2-V5 - obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej

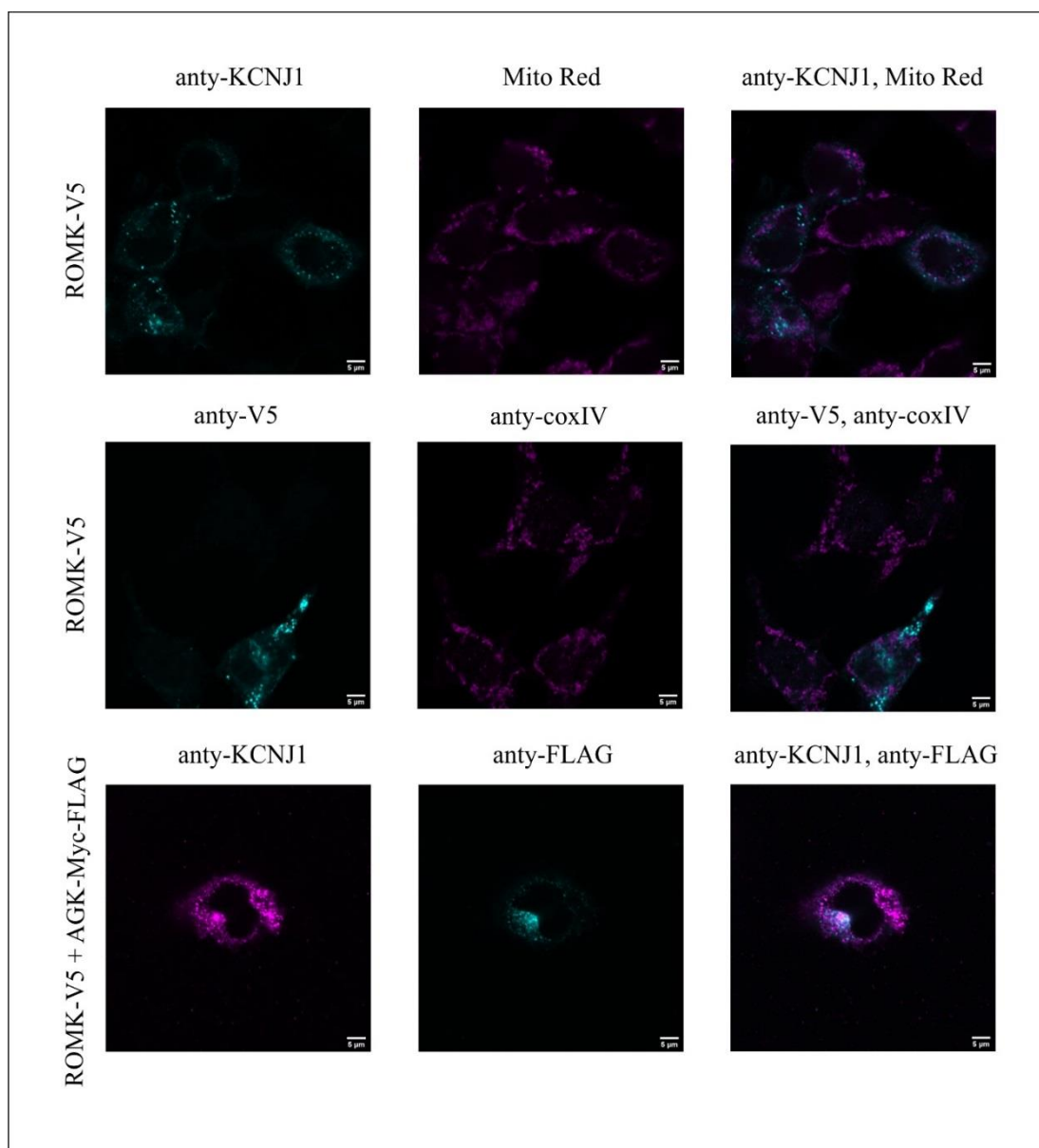
Doświadczenia typu TurboID sugerowały lokalizację białka ROMK2 w wielu kompartmentach komórkowych i prawdopodobnie tylko w niewielkiej części w mitochondriach, aby to potwierdzić komórki transfekowane plazmidami *pROMK2-TurboID*, *pSMAC-TurboID* oraz *pOTC-TurboID* wybarwiono fluorescencyjnie znakowanym przeciwciałem anty-HA

specyficznie rozpoznającymi mętkę 3xHA znajdującą się na C-końcu białek fuzyjnych oraz przeciwciałem anti-TOMM20, jako markerem białka mitochondrialnego (*Rycina 27*). Zaobserwowano ścisłą kolokalizację białka SMAC-TurboID-3xHA oraz OTC-TurboID-3xHA z TOM20. Natomiast białko ROMK2-TurboID-3xHA kolokalizowało się z markerem mitochondrialnym w marginalnym stopniu.



Rycina 27. Subkomórkowa lokalizacja fuzji TurboID zastosowanych w eksperymentach biotynylacji białek sąsiadujących względem markera mitochondrialnego TOM20. Komórki transfekowane plazmidami produkującymi białka SMAC-TurboID-3xHA, OTC-TurboID-3xH i ROMK2-TurboID-3xHA wybarwiono przeciwciałami anti-HA (1:200, Sigma Aldrich) i anti-TOMM20 (1:500, Sigma Aldrich.) wyznakowanymi fluorescencyjnie.

W celu wykluczenia wpływu C-końcowego TurboID-3xHA na subkomórkową lokalizację białka ROMK2 sprawdzono lokalizację białka ROMK2-V5. Podobnie do fuzji z TurboID-3xHA, również i ta wersja ROMK2 w niewielkim stopniu kolokalizowała się z markerami mitochondriów: AGK, coxIV i specyficznym dla mitochondriów barwnikiem fluorescencyjnym Mito Red (Rycina 28).



Rycina 28. Subkomórkowa lokalizacja ROMK-V5 względem markerów mitochondrialnych.. Komórki transfekowane plazmidem produkującym białko ROMK2-V5 wybarwiono przeciwciałami: anti-V5 (1:200, Sigma Aldrich), anti-coxIV (1:200, Cell Signalling) i anti-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich) wyznakowanymi fluorescencyjnie oraz specyficznym dla mitochondriów barwnikiem fluorescencyjnym Mito Red (100 nM, Sigma Aldrich). Komórki kotransfekowane plazmidem ROMK2-V5 oraz AGK-Myc-FLAG wybarwiono przeciwciałami: anti-KCNJ1 (1:200, Sigma Aldrich) oraz anti-FLAG (1:200, Origene) wyznakowanymi fluorescencyjnie.

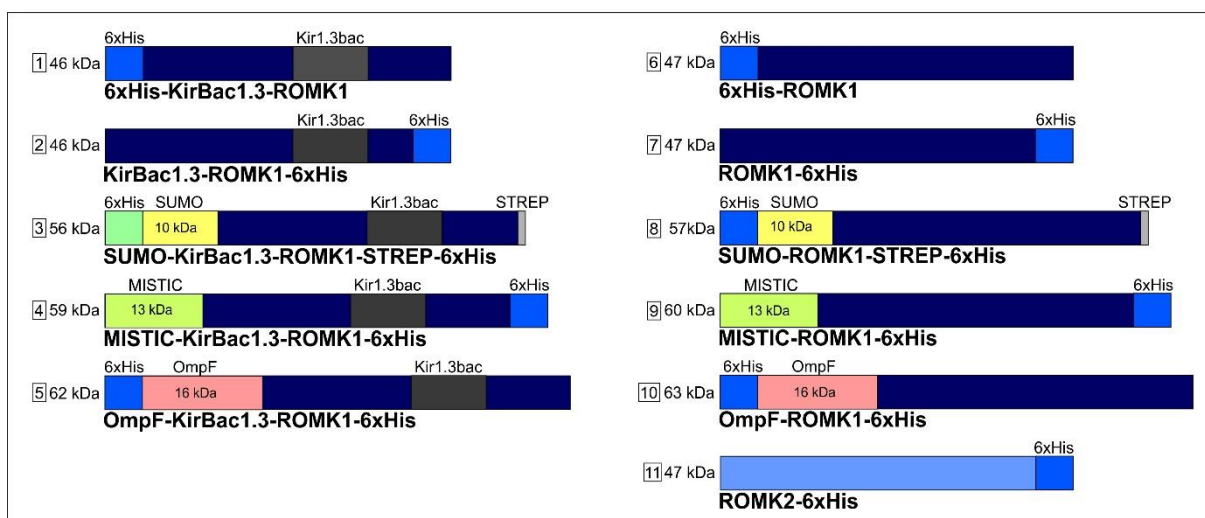
6.3. HETEROLOGICZNA EKSPRESJA ROMK2 W BAKTERIACH *E. COLI*

Wyniki eksperymentów typu TurboID i Co-IP sugerują bezpośrednią fizyczną interakcję pomiędzy białkiem ROMK2 oraz kinazą acyloglicerolu (AGK). AGK przeprowadza reakcję fosforylacji monoacyloglicerolu do kwasu lizofosfatydowego (LPS, ang. *lysophosphatidic acid*) lub diacyloglicerolu do kwasu fosfatydowego (PA, ang. *phosphatidic acid*). Postanowiono zatem sprawdzić, czy produkty aktywności enzymatycznej AGK, tzn. LPA i PA wpływają na aktywność kanału ROMK2.

Zdecydowano się na heterologiczną ekspresję kanału ROMK2 w bakteriiach *Escherichia coli* i jego oczyszczanie z błon bakteryjnych ze względu na: brak ryzyka współczyszczenia endogennych białek regulatorowych mogących wpływać na aktywność kanału, jak na przykład SUR2B, a także łatwość hodowli i możliwość uzyskanie dużej ilości materiału biologicznego oraz niski koszt hodowli.

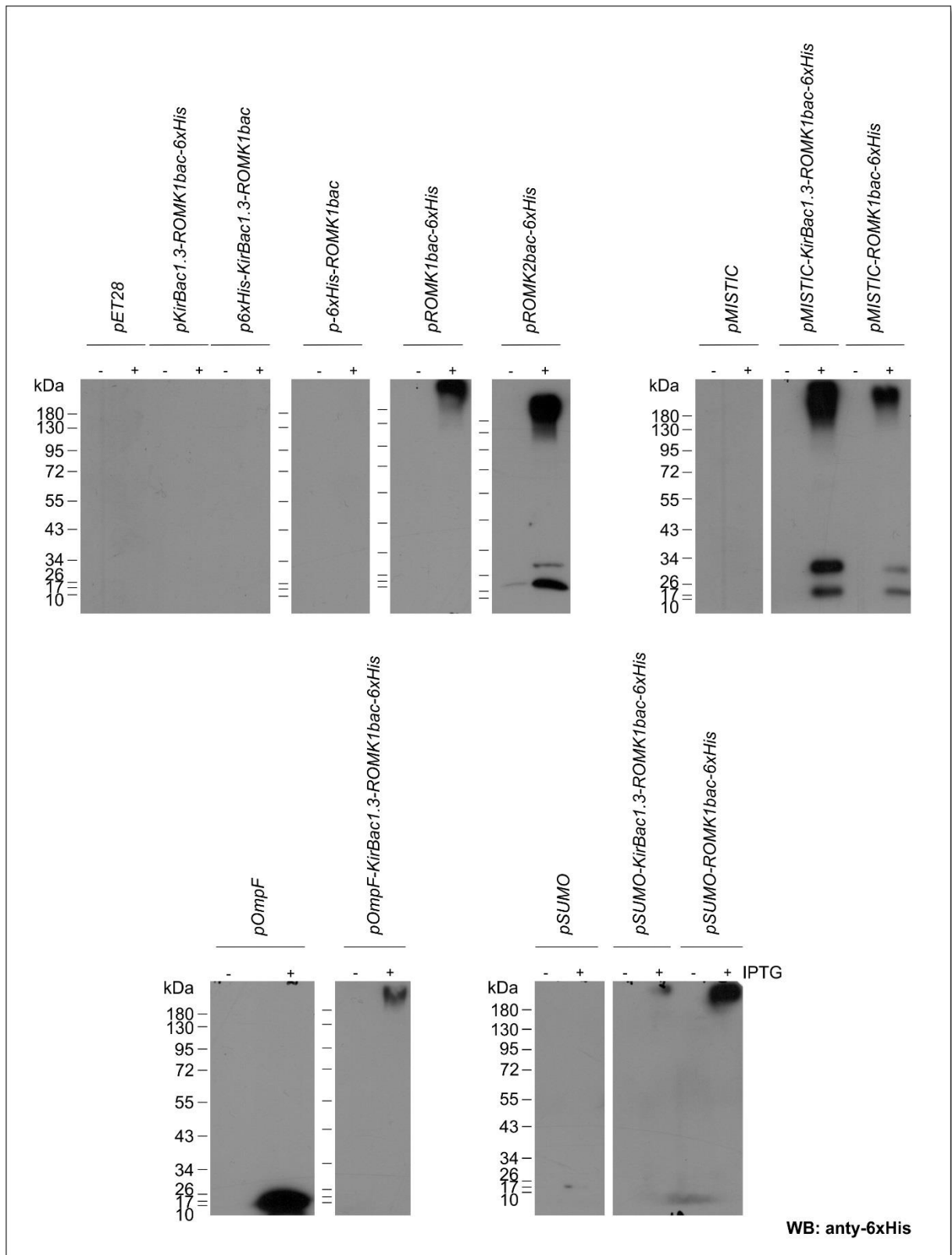
6.3.1. Konstrukty do ekspresji białek ROMK1 oraz ROMK2

Heterologiczna produkcja białek eukariotycznych, zwłaszcza transporterów i kanałów w komórkach *E. coli*, może być problematyczna z powodu nieefektywnej insercji do błon, agregacji i niewydajnej solubilizacji białek podczas oczyszczania. W związku z tym przygotowano szereg konstruktów kodujących fuzje ORF *ROMK1/ROMK2* z serią liderów ułatwiających ekspresję oraz metek umożliwiających oczyszczanie i detekcję produkowanych białek. Kodony ORF *ROMK1/ROMK2* zostały zoptymalizowane do ekspresji w bakterii *E. coli* (www.genescript.com), a także skonstruowano ORF kodujący kanał chimeryczny *Kirbac1.3-ROMK1*, w którym cytozolowe domeny N- i C-końcowe białka ROMK1 połączono z częścią transbłonową prokariotycznego kanału Kirbac1.3. Podejście to było wcześniej wykorzystane do produkcji funkcjonalnego kanału potasowego Kir3.1-Kirbac1.3 w komórkach *E. coli* (Nishida i wsp., 2007). Wśród liderów ułatwiających produkcję białek w błonach zastosowano MISTIC (Deniaud i wsp., 2011), SUMO (Zuo i wsp., 2005) oraz OmpF (Su i wsp., 2013; Visudtiphole i wsp., 2005). Natomiast metki umożliwiające wykrywanie i oczyszczanie białek, które zastosowano to 6xHis i STREP. Wszystkie zaprojektowane białka chimeryczne przedstawiono schematycznie poniżej (Rycina 29).



Rycina 29. Schematyczne przedstawienie fuzji białkowych powstających w wyniku ekspresji konstruktów zawierających ORFy ROMKbac i Kirbac-ROMK1bac wklonowanych do plazmidów pET28 (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11) lub pT51 (3, 8): (1) 6xHis-KirBac1.3-ROMK1, (2) KirBac1.3-ROMK1-6xHis (3) SUMO-KirBac1.3-ROMK1-STREP-6xHis, (4) MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis, (5) OmpF-KirBac1.3-ROMK1-6xHis, (6) 6xHis-ROMK1, (7) ROMK1-6xHis, (8) SUMO-ROMK1-STREP-6xHis, (9) MISTIC-ROMK1-6xHis, (10) OmpF-ROMK1-6xHis oraz (11) ROMK2-6xHis.

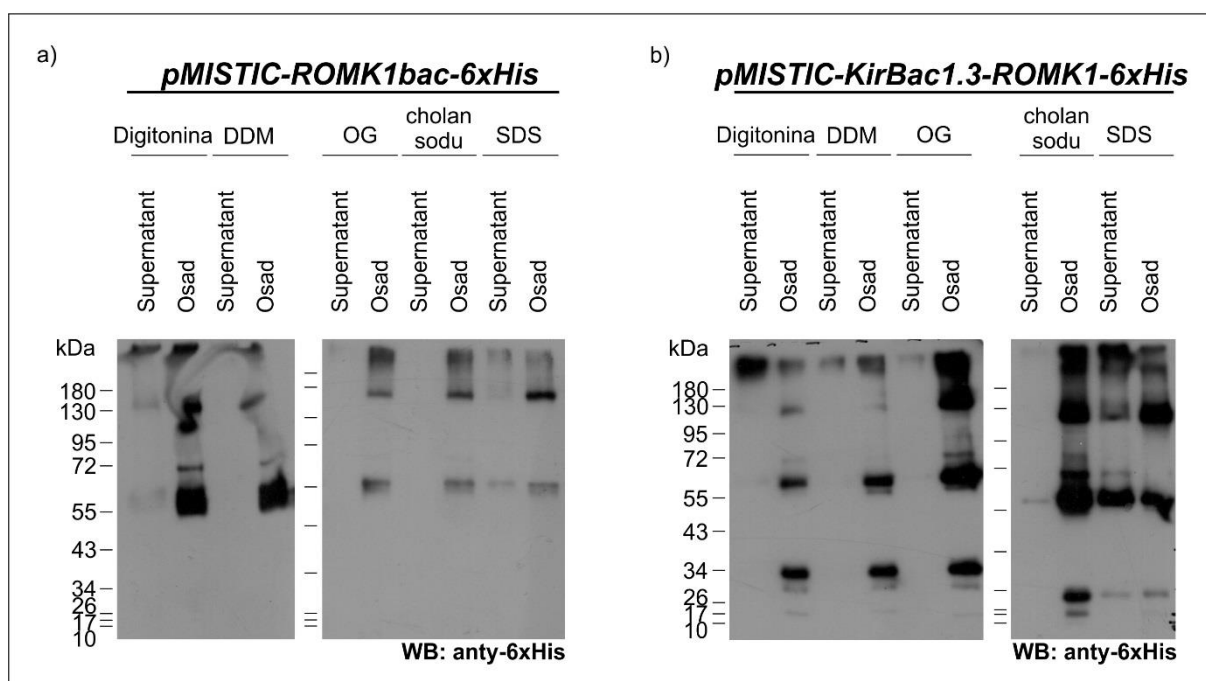
Ekspresję konstruktów sprawdzono w lizatach całokomórkowych za pomocą techniki Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała anty-6xHis (Rycina 30). Z 10 różnych konstruktów produkujących białko ROMK1 tylko 5 ulega ekspresji w bateriach *E. coli*, tj. pROMK1bac-6xHis, pMISTIC-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis, pMISTIC-ROMK1bac-6xHis, pOmpF-KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis oraz pSUMO-ROMK1bac-STREP-6xHis. Obecność liderów OmpF oraz SUMO nie wpłynęło na poprawę wydajności produkcji białka ROMK1. Silny wzrost ekspresji zaobserwowano natomiast w przypadku fuzji lidera MISTIC do KirBac1.3-ROMK1bac-6xHis. Zauważono również wydajną produkcję białka ROMK2-6xHis. Mimo, że białka lizatów całokomórkowych rozdzielano w denaturujących warunkach SDS-PAGE to nie zaobserwowano obecności białek o masie odpowiadających monomerom białek fuzyjnych, a jedynie prążki o masach cząsteczkowych powyżej 180 kDa. Sugeruje to, że białko ROMK produkowane w zarówno w komórkach *E. coli*, jak i w komórkach ssaczych (Rycina 30 vs Rycina 20) tworzy stabilne oligomery odporne na dysocjacje w obecności SDS.



Rycina 30. Analiza Western Blot ekspresji konstruktów kodujących fuzje ROMK1 i Kirbac1.3-ROMK1 oraz ROMK2 w *E. coli*. Ekspresję indukowano za pomocą 1 mM IPTG. (+) próbka indukowana, (-) próbka kontrolna. Wszystkie próbki zawierały 5,5 μ g białka lizatu całych komórek *E. coli*. Białka były wykrywane za pomocą przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, ThermoScientific).

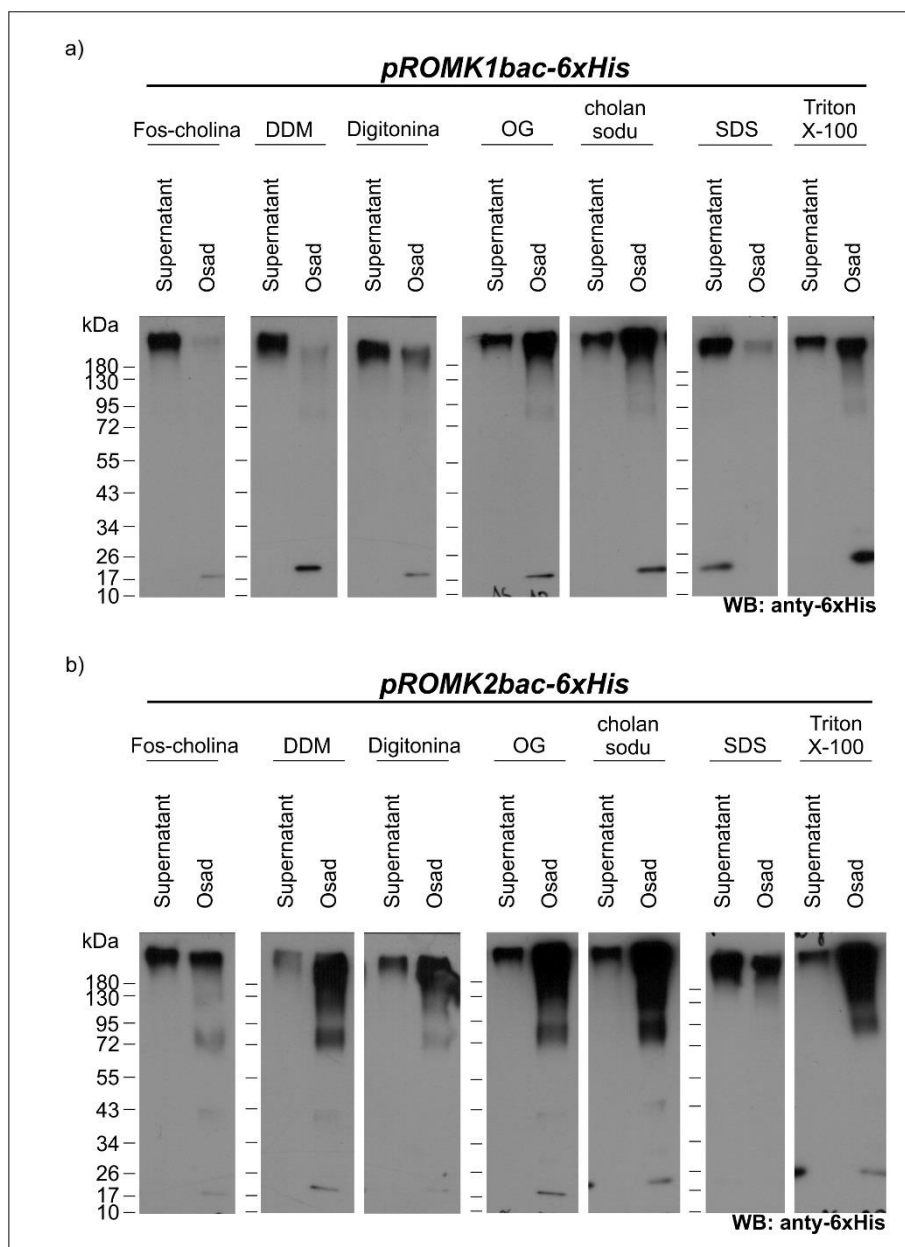
6.3.2. Ekstrakcja białek ROMK z błon bakteryjnych za pomocą detergentów

W następnym etapie badań błony bakteryjne zawierające fuzje białkowe MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis, MISTIC-ROMK1-6xHis, ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis solubilizowano za pomocą detergentów o różnych właściwościach fizykochemicznych. Do ekstrakcji zastosowano: digitoninę, n-dodecylo- β -maltozyd (DDM), β -oktyloglukozyd (OG), cholan sodu, dodecylosiarczan sodu (SDS), a w przypadku białek ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis również fos-cholinę oraz Triton X-100. Po inkubacji błon z detergentem próbki wirowano, rozdzielano na frakcję rozpuszczaną (supernatant) i nierozpuszczalną (osad), które analizowano za pomocą metody Western Blot. Zaobserwowano, że białka MISTIC-ROMK1-6xHis oraz MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis nie ulegały wydajnej solubilizacji, gdyż znajdowały się głównie we frakcji nierozpuszczalnej podczas ekstrakcji za pomocą większości badanych detergentów. Oprócz silnie denaturującego SDS, jedynie wykorzystanie digitoniny pozwalało na wyekstrahowanie części białka MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis do frakcji rozpuszczalnej (Rycina 31).



Rycina 31. Ekstrakcja białek MISTIC-ROMK1-6xHis oraz MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis z błon bakteryjnych za pomocą detergentów: 1% digitonina, 2% n-dodecylo- β -maltozyd (DDM), 0,5% oktylo- β -D-glukozyd (OG), 1% cholan sodu, 0,25% dodecylosiarczan sodu (SDS). Białka wykrywano za pomocą przeciwciała anti-6xHis (1:1000, Thermo Scientific).

Białko ROMK1-6xHis ekstrahowano z błon bakteryjnych do frakcji rozpuszczalnej przez wszystkie testowane detergenty (*Rycina 32a*). Białko ROMK2-6xHis również było ekstrahowane, jednakże z mniejszą wydajnością (*Rycina 32b*). Ponad 90% białka ROMK1-6xHis solubilizowano przez fos-cholinę oraz DDM, jednak tylko około 55% białka ROMK2-6xHis było solubilizowane przez fos-cholinę, a jeszcze mniej za pomocą DDM (*Rycina 32*).



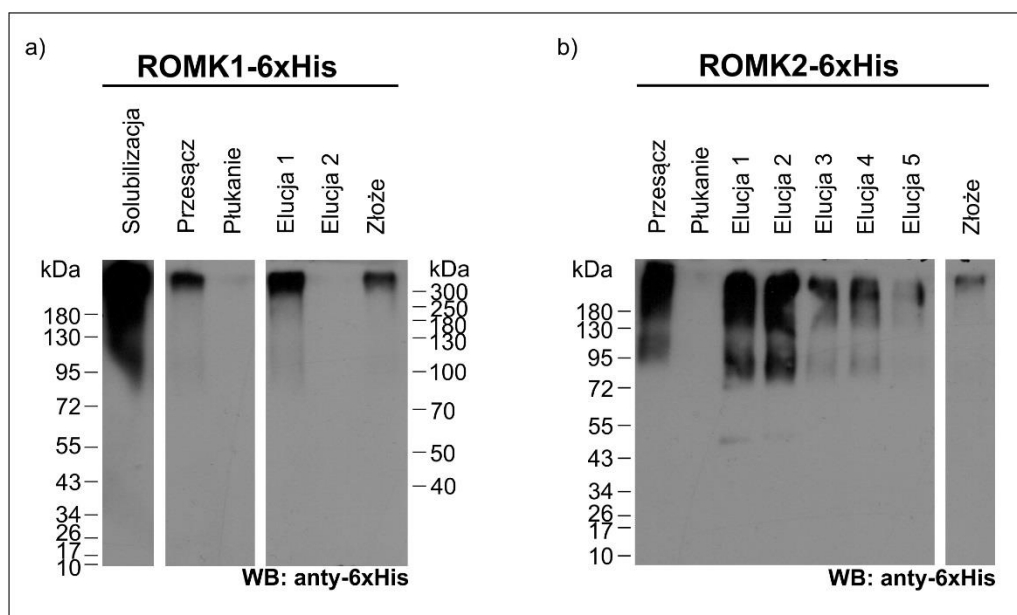
Rycina 32. Ekstrakcja białek a) ROMK1-6xHis oraz b) ROMK2-6xHis z błon bakteryjnych za pomocą detergentów: 1% fos-cholina, 2% n-dodecylo- β -maltozyd (DDM), 1% digitonina, 0,5% oktylo- β -D-glukozyd (OG), 1% cholansodu, 0,25% dodecylosiarczan sodu (SDS) oraz 2% Triton X-100. Białka wykrywano za pomocą przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

6.3.3. Ekstrakcja i oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis z błon bakteryjnych solubilizowanych DDM

Solubilizację i oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis zdecydowano się prowadzić w obecności DDM, mimo że ekstrakcja białka tym deterгентem nie wykazała największej wydajności (*Rycina 32*). Jednakże DDM jest łagodnym deterгентem, który w trakcie solubilizacji nie zmienia struktury białka i został on z powodzeniem wykorzystany wcześniej do oczyszczania innych kanałów potasowych produkowanych w komórkach bakteryjnych (Voges i wsp., 1998, Tilegenova i wsp., 2016).

Białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis, które z błon bakteryjnych solubilizowano za pomocą DDM, oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa wobec jonów niklu. Obecność znacznika 6xHis pozwoliło na zatrzymanie białka w niskim (40 mM) i skuteczną elucję za pomocą wysokiego (250 mM) stężenia imidazolu (*Rycina 33*).

W przypadku białka ROMK1-6xHis we frakcji elucji obserwujemy formę o masie cząsteczkowej powyżej 300 kDa, mimo iż podjednostka białka ROMK charakteryzuje się masą około 45 kDa, więc białko to występuje w stabilnej postaci oligomerów lub agregatów (*Rycina 33a*). W przypadku białka ROMK2-6xHis również obserwujemy formę o masie powyżej 300 kDa, jednakże w tym przypadku wykryto również takie o mniejszych masach. Obserwowany jest m.in. produkt o masie pomiędzy 43-55 kDa, co odpowiada masie monomeru białka ROMK2-6xHis. Inne widoczne formy o masie cząsteczkowej poniżej 95 kDa i 180 kDa można powiązać z dimerycznymi oraz tetramerycznymi formami białka (*Rycina 33b*).

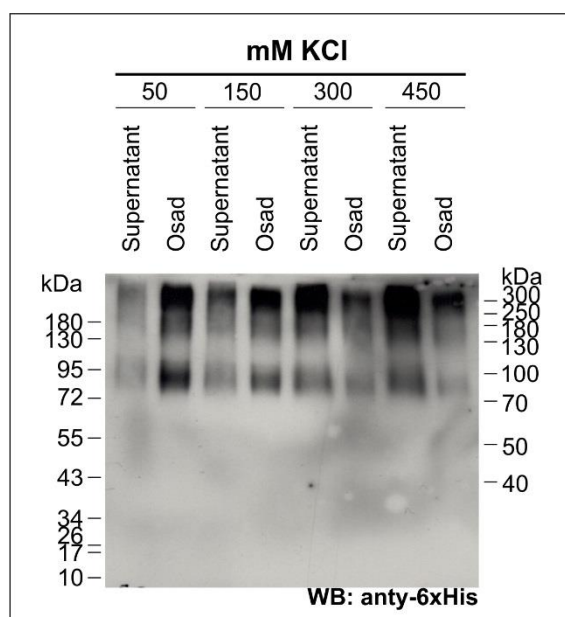


Rycina 33. Solubilizacja i oczyszczanie białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa a) Wyizolowane błony bakteryjne zawierające białko ROMK1-6xHis solubilizowano w 2% DDM ("solubilizacja"), następnie aplikowano na złoże, a niezwiązane białko zbierano ("przesącz"), złoże przepłukiwano buforem zawierającym 40 mM imidazol ("płukanie"), a częściowo oczyszczone białko wymywano buforem zawierającym 250 mM imidazolu ("elucja 1") oraz 500 mM imidazolu ("elucja 2"). Ostatecznie złoże zgrzewano z buforem Leammliego w celu oceny ilości białka niewymytego przez bufor z imidazolem ("złoże"); b) Białko ROMK2-6xHis solubilizowano z wykorzystaniem 2,5% DDM ("solubilizacja"), i oczyszczano jak wyżej. Częściowo oczyszczone białko eluowano za pomocą 250 mM imidazolu ("elucje 1–5"). Białko ROMK-6xHis wykrywano za pomocą przeciwciała anti-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

6.3.3.1. Rekonstytucja białka ROMK2-6xHis do liposomów

Po częściowym oczyszczeniu uzyskano białko ROMK2-6xHis w buforze zawierającym wysokie stężenie imidazolu (250 mM). Jednakże takie stężenie imidazolu mogłoby interferować z planowanymi badaniami, dlatego też postanowiono zastąpić imidazol przez KCl. Sprawdzono stabilność białka ROMK2-6xHis w zależności od stężenia KCl (Rycina 34). Białko rozcieńczano w buforze do rekonstytucji (PRB) zawierającym różne stężenie KCl, a następnie przez wirowanie rozdzielono frakcję rozpuszczalną („supernatant”) od nierozpuszczalnej („osad”), które analizowano za pomocą metody Western Blot. W obecności 50 oraz 150 mM KCl białko ROMK2-6xHis wytrącało się z roztworu, a zwiększenie stężenia KCl do 300 mM skutkowało znacznym zwiększeniem stabilności białka ROMK2-6xHis w nieobecności imidazolu. Zwiększenie stężenia chlorku potasu do 450 mM nie miało dalszego wpływu na poprawę stabilności białka ROMK2bac-6xHis, dlatego

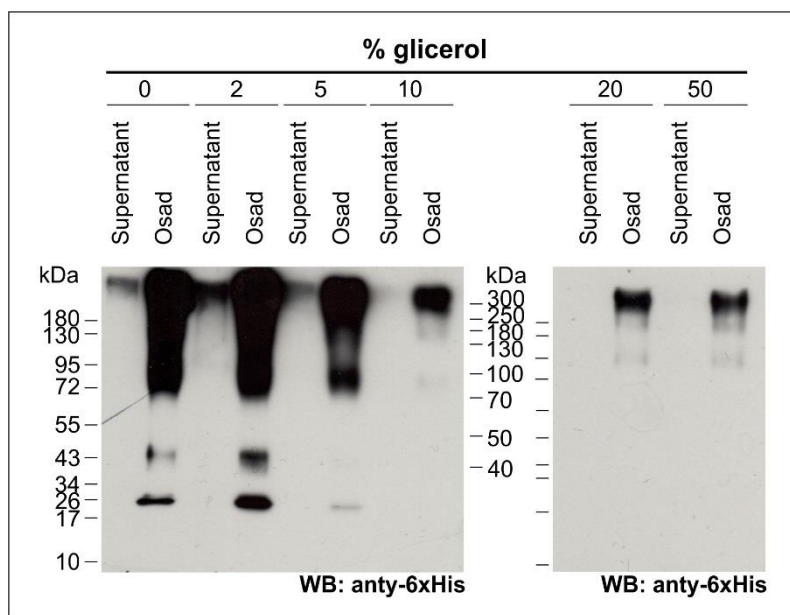
też w dalszych etapach tworzenia proteoliposomów wykorzystano bufor zawierający 300 mM KCl.



Rycina 34. Stabilność białka ROMK2-6xHis w zależności od stężenia KCl (50, 150, 300 oraz 450 mM). Białko ROMK2-6xHis wykrywano za pomocą przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

W kolejnym kroku sprawdzono wpływ glicerolu na stabilność oczyszczonego z wykorzystaniem detergentu białka ROMK2-6xHis w buforze niezawierającym imidazolu (Rycina 35). Białko inkubowano w buforach zawierających różne stężenia glicerolu, tj. 2%, 5%, 10%, 20% lub 50%, wirowano w celu rozdzielenia frakcji rozpuszczalnej („supernatant”) i nierozpuszczalnej („osad”), a następnie analizowano za pomocą metody Western Blot. Jako kontrolę zastosowano bufor bez dodatku glicerolu. Analiza wyników wykazała, iż dodatek niewielkiego stężenia glicerolu, tj. 2% do buforu do rekonstrukcji powoduje zwiększenie stabilności białka ROMK2-6xHis w nieobecności imidazolu. Zwiększenie stężenia glicerolu do 5% natomiast spowodowało zmniejszenie ilości białka ROMK2-6xHis we frakcji supernatantu w porównaniu do kontroli. Dalsze zwiększanie stężenia glicerolu mogło również zwiększać wydajność solubilizacji białka, co możemy obserwować przez zmniejszenie zawartości białka w osadach. Nie obserwujemy jednakże zwiększenia zawartości białka w supernatancie, prawdopodobnie z powodu niekompatybilności glicerolu z wykorzystywanym w tym doświadczeniu zestawem do zagęszczania białek. Niestety eksperymenty przeprowadzane bez użycia zestawu nie pozwoliły na detekcję białka metodą Western Blot. Wyniki przedstawione na Rycina 35 wskazują, że dodatek 2% glicerolu zwiększa

stabilność białka, dlatego też w etapie tworzenia proteoliposomów postanowiono go zastosować.



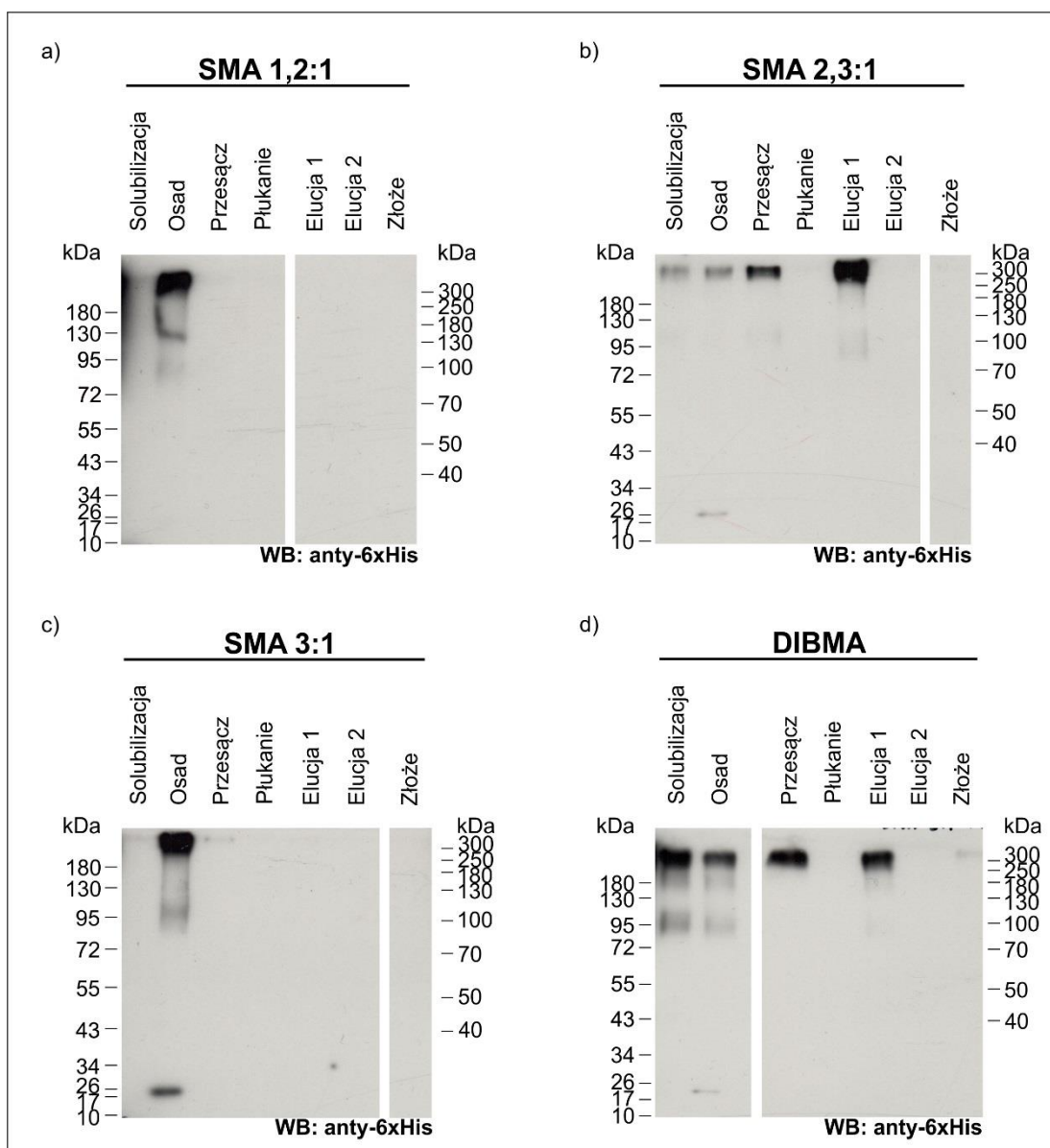
Rycina 35. Stabilność białka ROMK2-6xHis w zależności od stężenia glicerolu (2%, 5%, 10%, 20% oraz 50%). Białko ROMK2-6xHis wykrywano za pomocą przeciwciała anti-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

6.3.4. Solubilizacja błon *E. coli* i oczyszczanie białek ROMK1/2-6xHis z błon bakteryjnych w obecności kopolimerów DIBMA oraz SMA

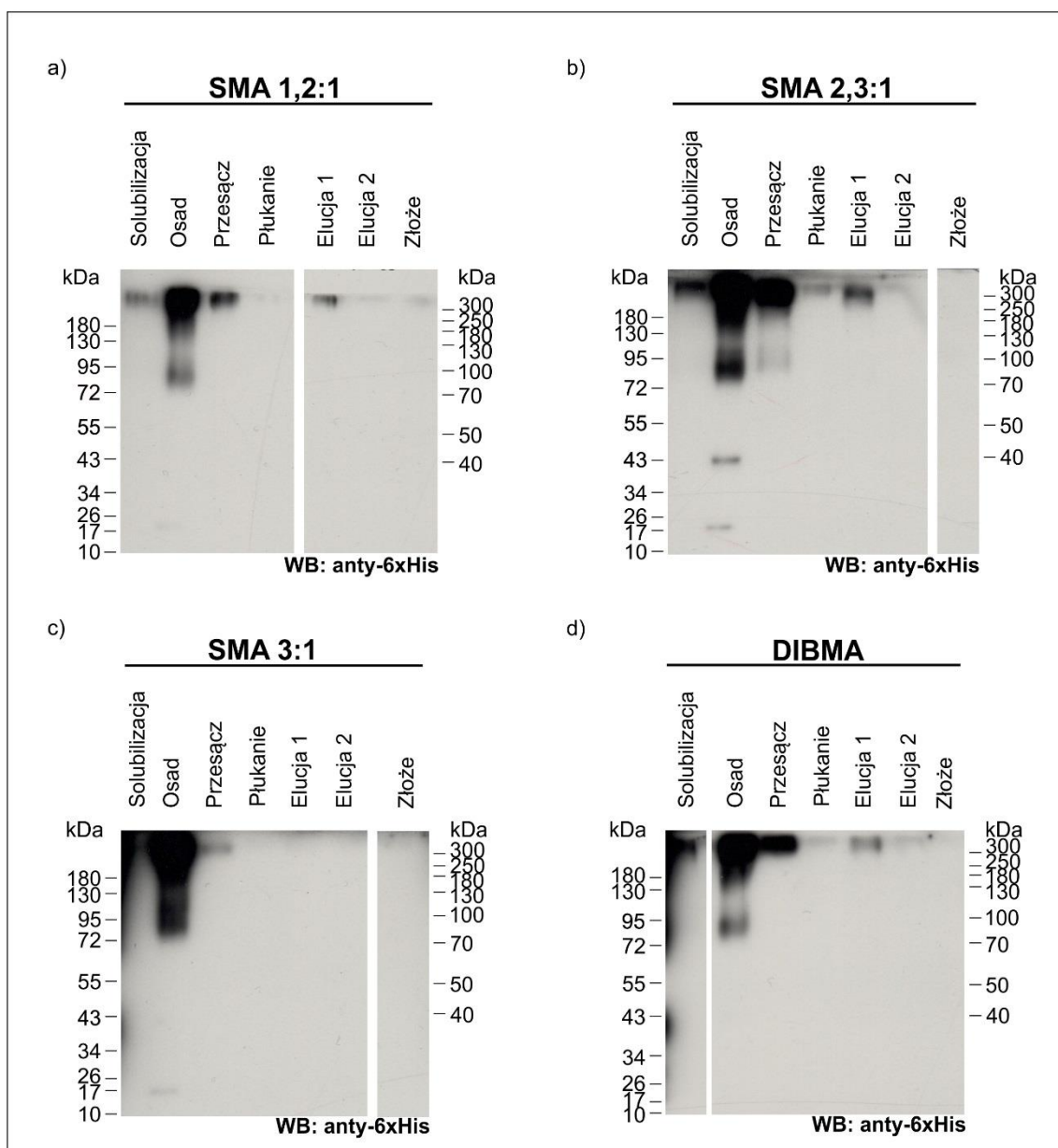
Amfipatyczne kopolimery SMA o różnej stechiometrii, tj. 1,2:1, 2,3:1 oraz 3:1 oraz kopolimer DIBMA zastosowano jako alternatywną strategię solubilizacji błon bakteryjnych zawierających białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis, ponieważ wcześniej zostało pokazane, że są one zdolne do ekstrakcji białek kanałowych (Raja and Vales, 2011, Tilegenova i wsp., 2016, Dörr i wsp., 2014). Solubilizację prowadzono przez noc w 25°C, a następnie oddzielono frakcję rozpuszczalną („solubilizacja”) i nierozpuszczalną („osad”) poprzez wirowanie. Do oczyszczenia wyekstrahowanego białka wykorzystano chromatografię metalopowinowactwa.

Zaobserwowano, że zarówno białko ROMK1-6xHis, jak i białko ROMK2-6xHis oczyszczone w obecności kopolimerów, podobnie do tych oczyszczanych w obecności DDM, migrują po rozdiale w żelach SDS-PAGE jako oligomery o masie powyżej 180 kDa (Rycina 36 i Rycina 37). Kopolimery SMA 1,2:1 oraz SMA 3:1 nie solubilizowały ROMK1-6xHis z błon bakteryjnych (Rycina 36a i Rycina 36c). Natomiast zastosowanie

kopolimerów SMA 2,3:1 oraz DIBMA pozwoliło na solubilizację i oczyszczenie ROMK1-6xHis (*Rycina 36b* i *Rycina 36d*). W przypadku białka ROMK2-6xHis specyficzność solubilizacji i oczyszczania była podobna, jednak wydajności były niższe niż w przypadku ROMK1-6xHis (*Rycina 37* vs *Rycina 36*). Stosunek ilości solubilizowanego białka uzyskanego przed i po oczyszczeniu wykazał, że kopolimer SMA 2,3:1 jest bardziej wydajny niż kopolimer DIBMA (*Rycina 36* i *Rycina 37*).



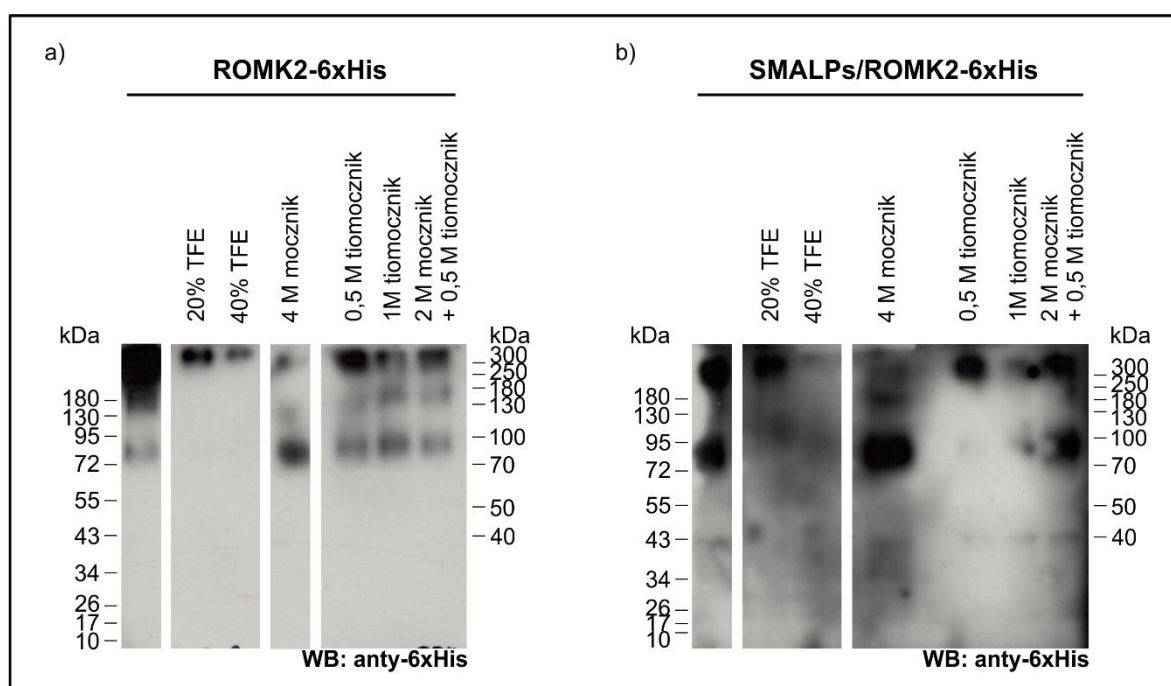
Rycina 36. Solubilizacja i oczyszczanie białka ROMK1-6xHis z błon *E. coli* w obecności kopolimerów: 2,5% SMA o różnych stechiometriach (SMA 1,2:1, SMA 2,3:1 i SMA 3:1) lub 2,5% DIBMA. Frakcje rozpuszczalną zawierającą natywne nanodyski („solubilizacja”) i nierozpuszczalną („osad”) rozdzielono przez wirowanie. Nanodyski polimerowe zawierające białko ROMK1-6xHis oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa wobec jonów metalu na złożu Ni^{2+} -NTA. Frakcje z oczyszczania: przesącz, płukanie (40 mM imidazol) i elucje (elucja 1 – 250 mM imidazol i elucja 2 – 500 mM imidazol) analizowano metodą Western Blot. Białko wykryto za pomocą przeciwciała anti-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific). Frakcje solubilizacji oraz osadu nakładano proporcjonalnie. Frakcje przesączu i elucji nie były nakładane proporcjonalnie – trzykrotnie więcej niż frakcji supernatantu i osadu.



Rycina 37. Solubilizacja i oczyszczanie białka ROMK2-6xHis z błon *E. coli* z zastosowaniem 2,5% kopolimerów SMA o różnych stechiometriach (SMA 1,2:1, SMA 2,3:1 i SMA 3:1) lub 2,5% DIBMA. Frakcje rozpuszczalną zawierającą natywne nanodyski („solubilizacja”) i nierozpuszczalną („osad”) rozdzielono przez wirowanie. Następnie nanodyski polimerowe zawierające białko ROMK1-6xHis oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa wobec jonów metalu na złożu Ni²⁺-NTA. Frakcje oczyszczania: przesącz, płukanie (40 mM imidazol) i elucje (elucja 1–250 mM imidazol i elucja 2–500 mM imidazol) analizowano metodą Western Blot. Białko wykryto za pomocą przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific). Frakcje solubilizacji oraz osadu nakładano proporcjonalnie. Frakcje przesączu i elucji nie były nakładane proporcjonalnie – trzykrotnie więcej niż frakcji supernatantu i osadu.

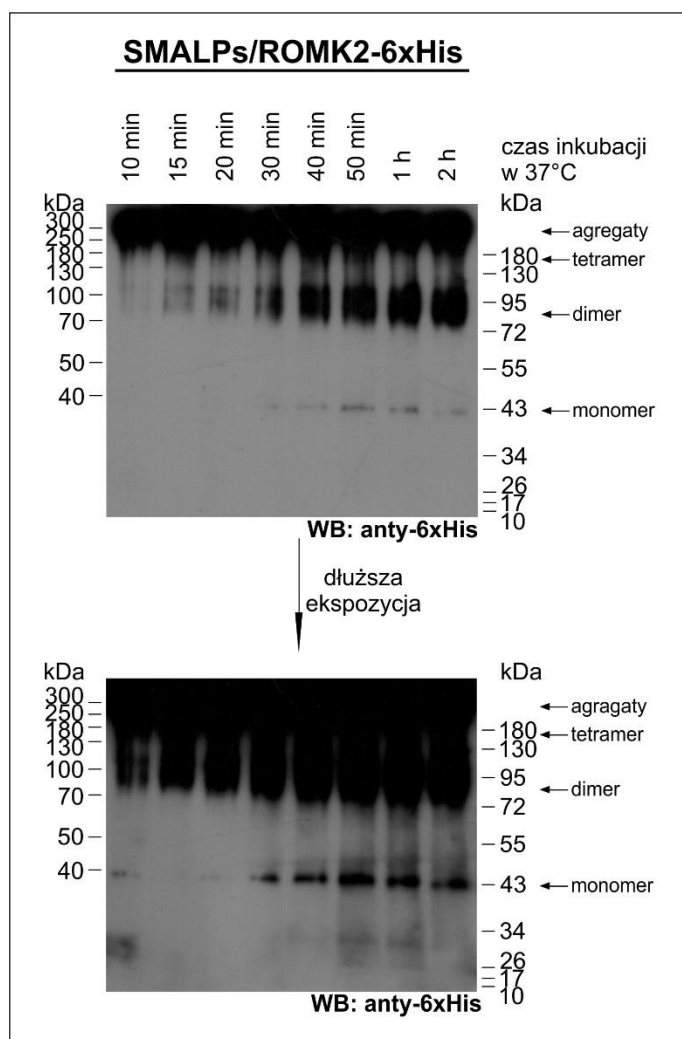
6.3.5. Dysocjacja agregatów białka ROMK2-6xHis do niższych form oligomerycznych

W pewnych warunkach po rozdziale przez SDS-PAGE wykrywano nie tylko agregaty ROMK1/2-6xHis o masie powyżej 180 kDa, ale też formy odpowiadające masom około 43 kDa, 95 kDa, 130 kDa oraz 180 kDa, korespondujące z monomerami, dimerami, trimerami oraz tetramerami ROMK (*Rycina 33*, *Rycina 35*, *Rycina 37*). W związku z tym podjęto próbę dysocjacji agregatów do monomerów białka ROMK2-6xHis oczyszczanych zarówno w detergencie (DDM), jak również w obecności kopolimerów. W tym celu próbki białka inkubowano w dwóch różnych stężeniach trifluoroetanolu (TFE) (20% oraz 40%), mocznika (4 M), tiomocznika (0,5 M oraz 1 M), a także w mieszaninie mocznika (2 M) i tiomocznika (0,5 M). Jednakże, zarówno w przypadku białka oczyszczanego z wykorzystaniem DDM, jak i SMA 2,3:1 zastosowanie tych związków nie pozwoliło na uzyskanie dysocjacji do monomerycznej formy białka ROMK2-6xHis. Zaobserwowano jednakże wydajną dysocjację do formy dimerycznej w 4 M moczniku (*Rycina 38*).



Rycina 38. Chemiczna dysocjacja agregatów białka ROMK2-6xHis. Białko ROMK2-6xHis po solubilizacji oczyszczane z wykorzystaniem: a) DDM oraz b) kopolimeru SMA 2,3:1 inkubowano z następującymi związkami: 20% TFE, 40% TFE, 4 M mocznikiem, 0,5 M tiomocznikiem, 1 M tiomocznikiem oraz mieszaniną 2 M mocznika oraz 0,5 M tiomocznik. Po rozdziale przez SDS-PAGE wykonano analizę Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

W kolejnym etapie podjęto próbę dysocjacji termicznej agregatów białka ROMK2-6xHis. W tym celu próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez różne okresy czasu (Rycina 39). Wraz z wydłużaniem czasu inkubacji próbki znacznie wzrastała ilość dimerycznej formy białka ROMK2-6xHis. Zaobserwowano również dysocjację do monomerycznej postaci białka, choć jej ilość była niewielka.

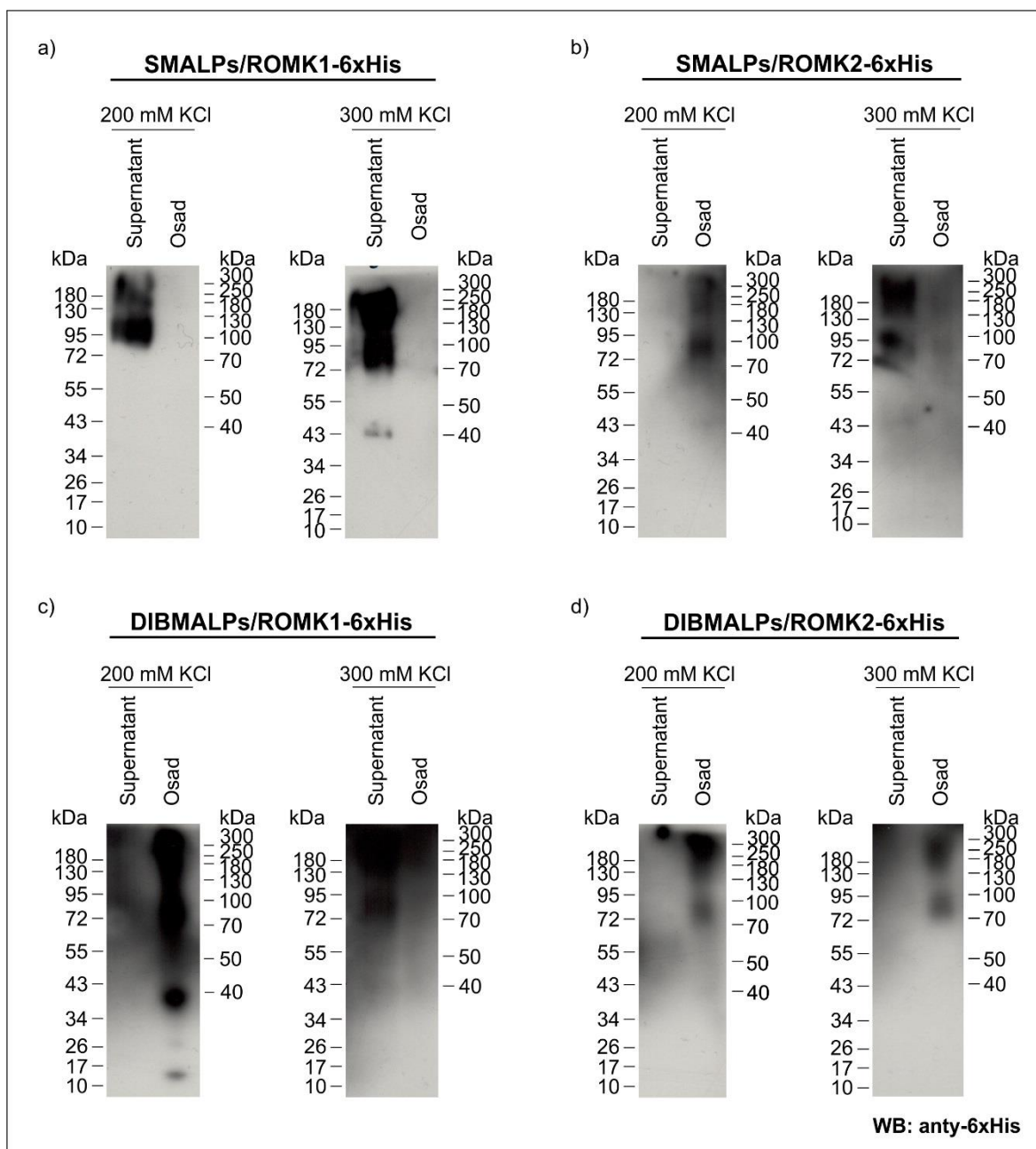


Rycina 39. Dysocjacja termiczna agregatów białka ROMK2-6xHis. Próbki natywnych nanodysków zawierających białko ROMK2-6xHis inkubowano w temperaturze 37°C przez różne okresy czasu, po czym przeprowadzono analizę Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała anty-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

6.3.6. Optymalizacja warunków dializy polimerowych nanodysków

W celu wykorzystania polimerowych nanodysków do inkorporacji białka do dwuwarstwy lipidowej z próbki postanowiono usunąć imidazol, dlatego też zoptymalizowano warunki dializy polimerowych nanodysków. W tym celu zastosowano bufor o dwóch różnych zawartościach KCl – 200 mM oraz 300 mM (Rycina 40). Białko

ROMK1-6xHis rekonstruowane do SMALPs było rozpuszczalne po usunięciu imidazolu zarówno w 200 mM, jak i 300 mM KCl (*Rycina 40a*), natomiast białko ROMK2-6xHis rekonstruowane do natywnych nanodysków było rozpuszczalne wyłącznie w 300 mM KCl, a w 200 mM KCl strącało się (*Rycina 40b*). W przypadku kopolimeru DIMBA wyłącznie białko ROMK1-6xHis dializowane do 300 mM KCl charakteryzowało się rozpuszczalnością (*Rycina 40c, prawy panel*).



Rycina 40. Optymalizacja dializy próbek SMALPs oraz DIBMALPs zawierających białka ROMK1-6xHis oraz ROMK2-6xHis do buforów zawierających 200 mM lub 300 mM KCl. Białka wykrywano z wykorzystaniem przeciwciała anti-6xHis (1:1 000, Thermo Scientific).

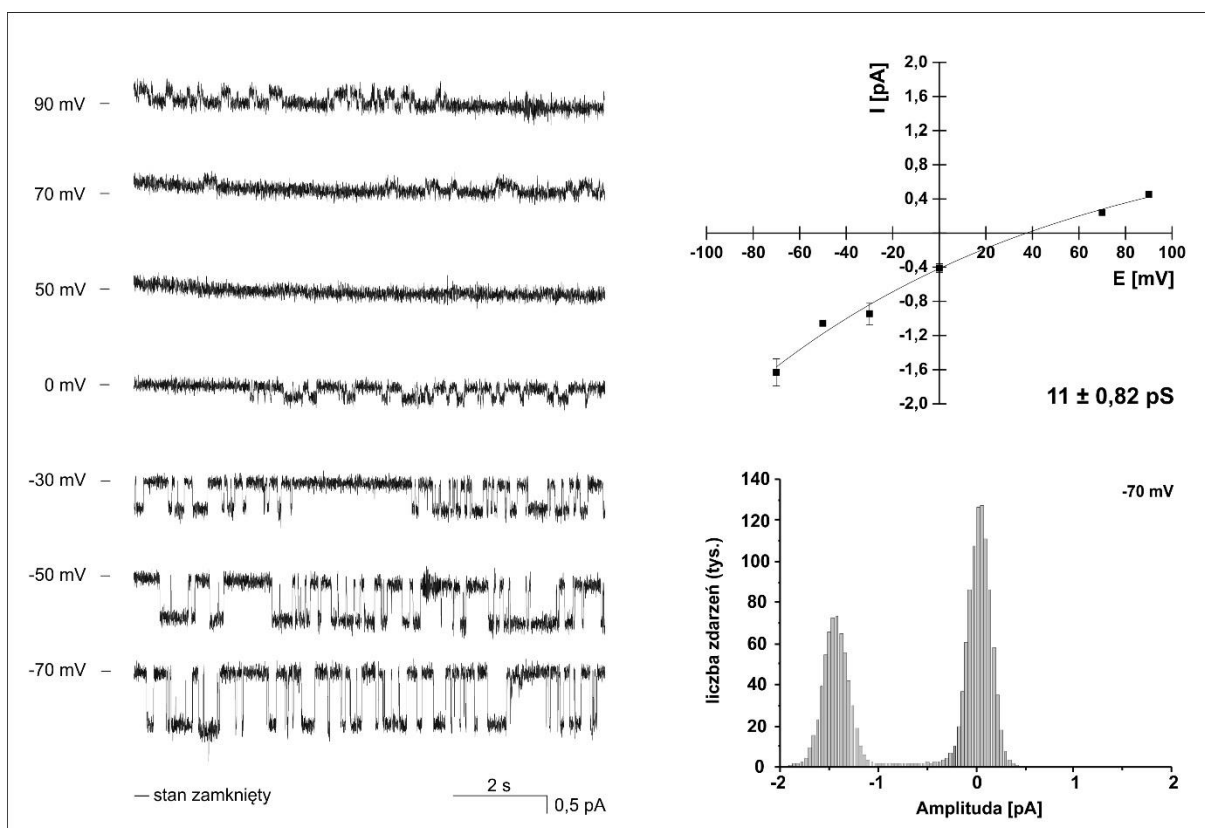
6.4. BADANIA FUNKCJONALNE BIAŁKA ROMK2-6xHis PRODUKOWANEGO W BAKTERIACH

Aktywność oczyszczonego białka kanałowego ROMK2-6xHis charakteryzowano na poziomie pojedynczych cząsteczek poprzez rejestracji ich aktywności elektrycznej w planarnych dwuwarstwach lipidowych (PLB, z ang. *planar lipid bilayer*).

Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis solubilizowanego w DDM i rekonstruowanego do liposomów porównano z aktywnością białka ROMK2-6xHis solubilizowanego w natywnych nanodyskach. W obu metodach białka inkorporowane były do PLB uformowanych z azolektyny poprzez spontaniczną fuzję proteoliposomów lub nanodysków dodawanych do komory *trans* utworzonej z naczynka teflonowego posiadającego otwór zamknięty uformowaną dwuwarstwą lipidową.

6.4.1. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego do PLB z proteoliposomów

Przeprowadzono 36 prób rejestracji aktywności kanałowej białka ROMK2-6xHis po dodaniu proteoliposomów do układu pomiarowego, jednak tylko w trakcie 4 eksperymentów zaobserwowano aktywność kanałową (11%). Rejestracje prowadzono w warunkach gradientu stężenia KCl (50 mM/150 mM). Średni potencjał odwrócenia, wyznaczony poprzez dopasowanie krzywej do danych eksperymentalnych, wynosił $40 \text{ mV} \pm 12 \text{ mV}$, co potwierdziło kationo-selektywność badanego kanału ROMK2-6xHis (*Rycina 41*). Zaobserwowano rektyfikację zależności prądowo-napięciowej. Z prostoliniowego odcinka przy ujemnych wartościach napięcia wyznaczono przewodność jednostkową kanału, która wynosiła $11 \text{ pS} \pm 0,82 \text{ pS}$.



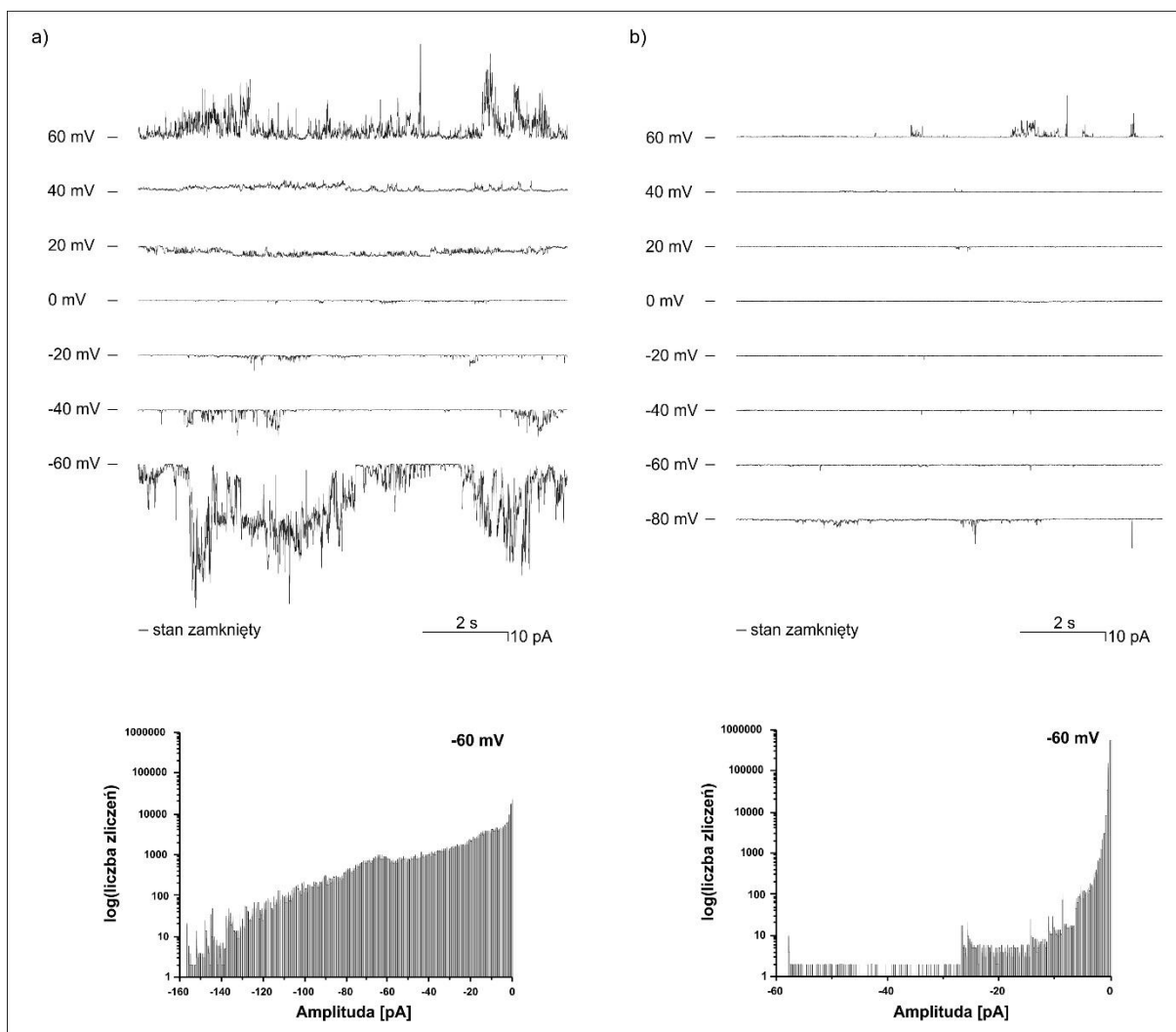
Rycina 41. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego do PLB z proteoliposomów. Lewy panel: Reprezentatywna aktywność pojedynczego kanału zarejestrowana przy różnych napięciach. Prawy górny panel: Charakterystyka prądowo - napięciowa aktywności pojedynczych kanałów ROMK2-6xHis ($n = 4$). Prawy dolny panel: Histogram amplitudowy kanału otwartego i zamkniętego przy napięciu -70 mV.

6.4.2. Wpływ polimerów SMA i DIBMA na stabilność planarnych błon lipidowych uformowanych z azolektyny

Wiadomo, że polimery amfipatyczne SMA i DIBMA wykazują własności solubilizujące błony biologiczne, dlatego też przed inkorporacją białka ROMK2-6xHis z natywnych nanodysków do dwuwarstwy lipidowej sprawdzono wpływ kopolimerów SMA 2,3:1 oraz DIBMA na stabilność błony.

Badania wykazały, że dodatek polimeru do 0,0025% skutkuje zwiększeniem przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej, co obserwowano jako nieregularny wzrost natężenia prądu. Prądy te szczególnie widoczne były w przypadku kopolimeru SMA 2,3:1 i charakteryzowały się wyższą amplitudą przy potencjałach ujemnych, co wskazało na preferencje względem kationów zgodną z tworzeniem porów przez ujemnie naładowany polimer (Rycina 42). Bardziej intensywne piki przewodnictwa widoczne były w przypadku kopolimeru SMA 2,3:1, niż w przypadku DIBMA, co mogło być spowodowane mniejszą masą tego polimeru. Wcześniej już wykazano, że polimery o niskiej masie cząsteczkowej są bardziej

wydajne w inkorporacji w błony i ich solubilizacji (Domínguez Pardo i wsp., 2018). Takie nieregularne przewodnictwo mogłoby utrudnić obserwację i analizę aktywności białek kanałowych, jednakże jak pokazano poniżej nie zaobserwowano destabilizującego wpływu polimerów dodanych w formie nanodysków polimerowych.

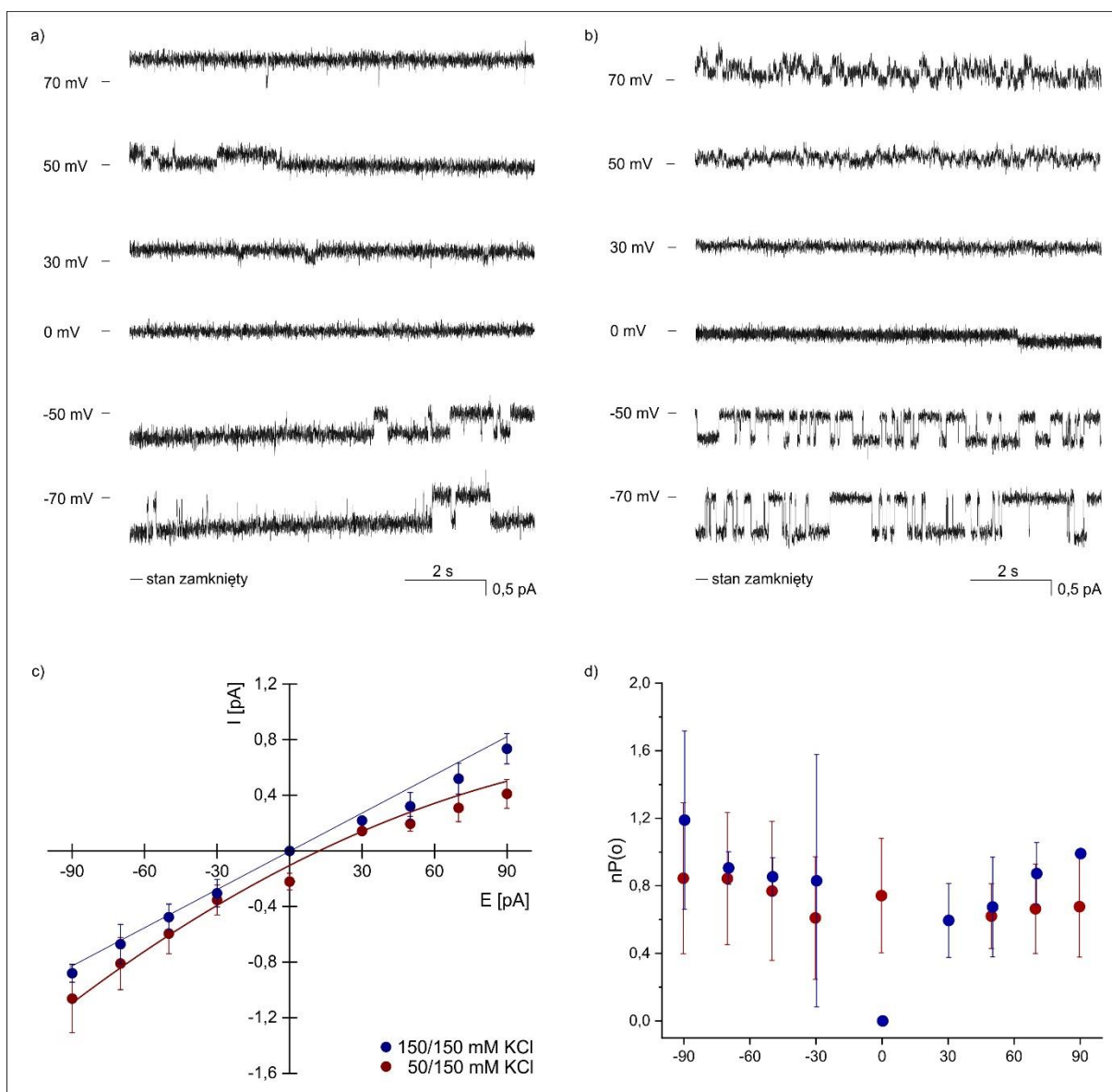


Rycina 42. Niestabilność elektryczna dwuwarstw lipidowych w obecności wolnych kopolimerów: a) SMA 2,3:1 oraz b) DIBMA. Górne panele: Reprezentatywne zapisy aktywności elektrycznej w obecności wolnych kopolimerów: a) SMA 2,3:1 oraz b) DIBMA przy różnych napięciach. Dolne panele: Histogramy amplitudowe aktywności zarejestrowanych przy napięciu -60 mV prezentowanych na górnych panelach.

6.4.3. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego z polimerowych nanodysków

Do rejestracji aktywności białka ROMK2-6xHis wykorzystano nanodyski SMALP, ponieważ jak wykazano wcześniej (punkt 6.3.6) charakteryzują się one większą stabilnością niż nanodyski DIBMALP.

W przypadku natywnych nanodysków SMALP aktywność białka ROMK2-6xHis zaobserwowano 177 razy na 577 prób (31%). Przewodność jednostkowa kanału ROMK2-6xHis inkorporowanego z natywnych nanodysków w warunkach symetrycznych (150 mM KCl) wynosiła $11 \text{ pS} \pm 0,44 \text{ pS}$ ($n = 5$). Przy ujemnych wartościach napięcia w warunkach gradientowych (50 mM/ 150 mM KCl) przewodność jednostkowa kanału wynosiła $9,0 \text{ pS} \pm 0,92 \text{ pS}$ ($n = 48$). Średni potencjał odwrócenia w tych warunkach, wyznaczony poprzez dopasowanie krzywej do danych eksperymentalnych przy ujemnych wartościach napięcia, wynosił $16 \text{ mV} \pm 5,3 \text{ mV}$, co potwierdza że kanał ten jest kationo-selektywny (*Rycina 43*).



Rycina 43. Aktywność białka kanałowego ROMK2-6xHis inkorporowanego do PLB z natywnych nanodysków w: a) układzie symetrycznym ($n = 5$), b) układzie gradientowym ($n = 48$). Przedstawione zostały reprezentatywne aktywności pojedynczych kanałów zarejestrowane przy różnych napięciach. c) Charakterystyka prądowo - napięciowa pojedynczych kanałów ROMK2-6xHis w obu z badanych warunkach. d) Zmiana $nP(o)$ w zależności od napięcia w układzie symetrycznym (granatowy) i gradientowym (bordowy).

Kanały rekonstruowane za pomocą obu metod (proteoliposomów oraz natywnych nanodysków SMALPs) charakteryzowały się zbliżonym przewodnictwem. Jednakże znacznie częściej obserwowano aktywność ROMK2-6xHis inkorporowanego z natywnych nanodysków, dlatego też ten system wykorzystano do badań farmakologii tego kanału.

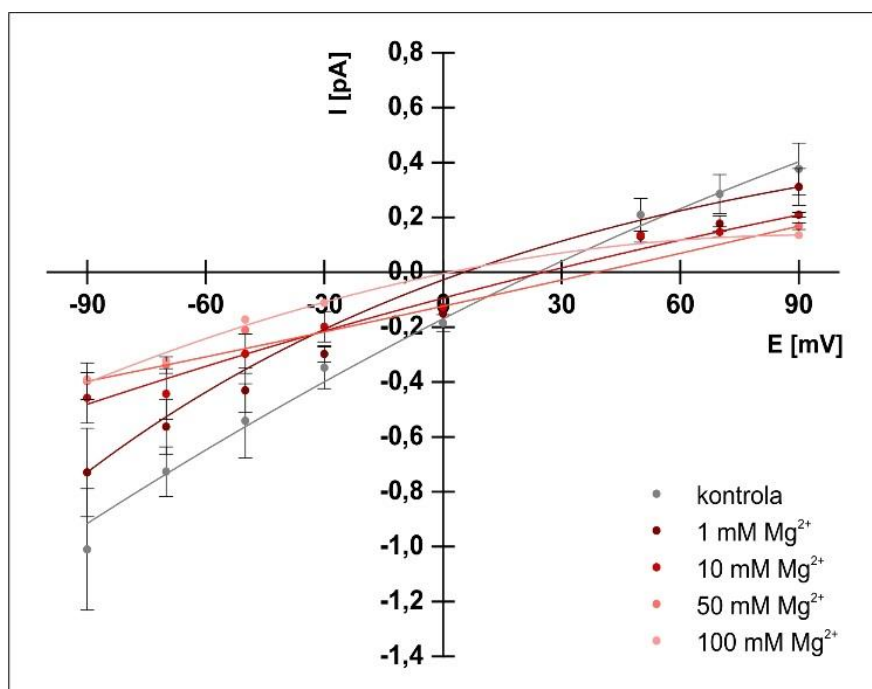
6.4.4. Charakterystyka aktywności białka ROMK2-6xHis

W celu potwierdzenia molekularnego pochodzenia obserwowanej aktywności kanałowej zastosowano znane modulatory białka ROMK.

6.4.4.1. Wpływ jonów magnezu na aktywność białka ROMK2-6xHis

Wcześniejsze prace naukowe wykazały, że jony magnezu zmniejszają jednostkową przewodność białka ROMK (Yang i wsp., 2010b) i wraz z poliaminami są głównym czynnikiem powodujących dokomórkową rektyfikację tych kanałów.

Przeprowadzone badania wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia jonów magnezu maleje współczynnik nachylenia krzywej zależności natężenia od napięcia. Świadczy to o zmianie wartości amplitudy pojedynczego kanału po dodaniu jonów Mg^{2+} w sposób zależny od stężenia (Rycina 44). W warunkach kontrolnych (przy napięciu -70 mV) przewodnictwo to wynosiło $7,7$ pS \pm $0,67$ pS ($n = 4$), przy 1 mM Mg^{2+} natomiast $5,5$ pS \pm $0,32$ pS, a stężenie 10 mM powodował zmniejszenie przewodnictwa kanału do $3,7$ pS \pm $0,37$ pS ($n = 4$). Przy niższych stężeniach wartości przewodnictwa obarczone były bardzo dużym błędem, gdyż w ich przypadku nie udało się wykonać wystarczającej liczby powtórzeń eksperymentu.

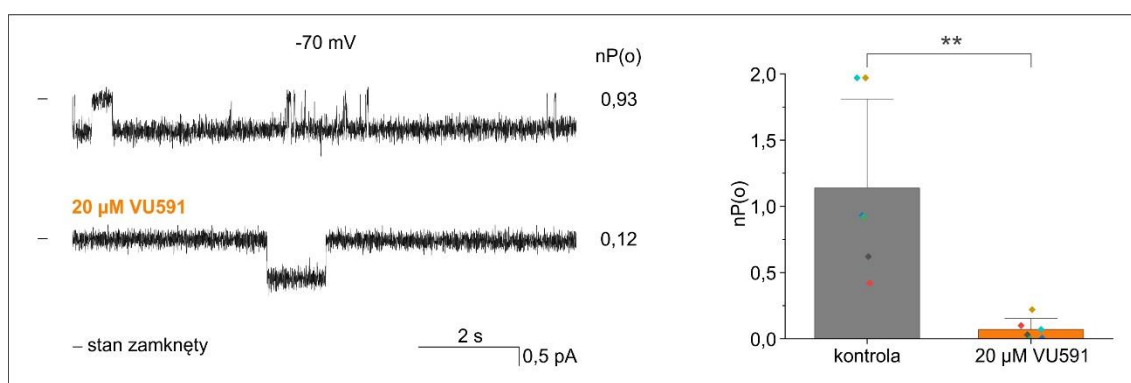


Rycina 44. Charakterystyka prądowo - napięciowa pojedynczego kanału ROMK2-6xHis w warunkach kontrolnych ($n = 4$), a także w obecności różnych stężeń jonów magnezu: 1 mM ($n = 4$), 10 mM ($n = 4$), 50 mM ($n = 2$) i 100 mM ($n = 1$).

6.4.4.2. VU591 hamuje aktywność kanału ROMK2-6xHis

VU591 jest najbardziej specyficznym znanym syntetycznym związkiem drobnocząsteczkowym blokującym aktywność kanałów ROMK (Bhave i wsp., 2011; Swale i wsp., 2015).

Dodatek 20 μM VU591 z dwóch stron (*cis* i *trans*) dwuwarstwy lipidowej spowodował spadek prawdopodobieństwa otwarcia kanałów z $1,14 \pm 0,67$ do $0,07 \pm 0,08$ ($n = 6$) (Rycina 45).

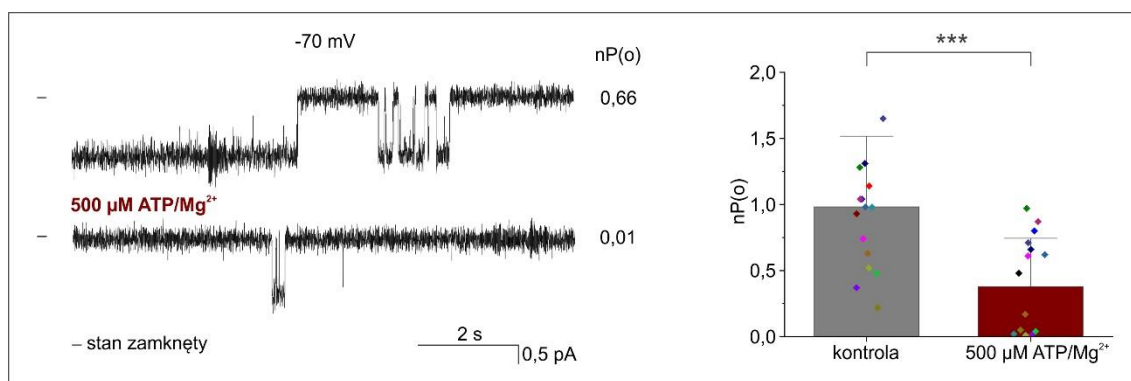


Rycina 45. VU591, znany inhibitor kanałów ROMK, hamuje rejestrowane aktywności kanałowe. Lewy panel: reprezentatywna aktywność pojedynczego kanału obserwowana po inkorporacji SMALPs zawierających ROMK2-6xHis przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 20 μM VU591. Prawy panel: prawdopodobieństwo otwarcia kanału $nP(o)$ w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 20 μM VU591 ($n = 6$).

6.4.4.3. Wpływ kompleksu ATP/Mg^{2+} na aktywność kanału ROMK2-6xHis

Aktywność kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ hamowana jest przez ATP (Kicinska i wsp., 2007; Bednarczyk i wsp., 2018), jednak dotychczasowe badania nie pozwalały na wykazanie bezpośredniej wrażliwości kanałów ROMK na ATP, gdyż wszystkie badania przeprowadzane były w natywnym otoczeniu ROMK2 mogącym zawierać białka regulatorowe (McNicholas i wsp., 1996; Laskowski i wsp., 2019).

Dodanie 500 μM kompleksu ATP/Mg^{2+} powodowało zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć kanałów ROMK2-6xHis z $0,98 \pm 0,53$ do $0,38 \pm 0,36$ ($n = 16$) (Rycina 46). Wskazuje to na bezpośrednie działanie ATP na aktywność białka ROMK2-6xHis.

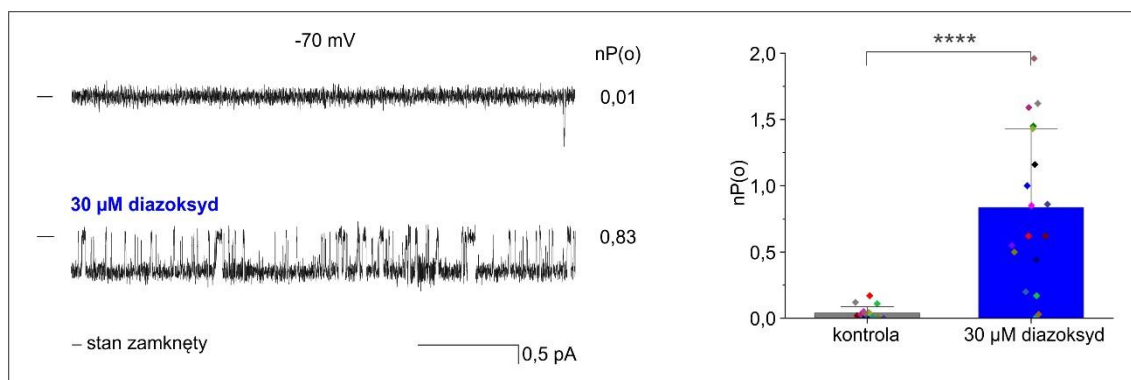


Rycina 46. ATP, znany inhibitor kanałów K_{ATP} , hamuje aktywność ROMK2-6xHis. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu ATP/Mg $^{2+}$ (500 μ M). Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 500 μ M ATP/Mg $^{2+}$ ($n = 16$).

6.4.4.4. Wpływ diazoksydu na aktywność kanału ROMK2-x6His

Diazoksyd jest znanym aktywatorem mitoK_{ATP} (Garlid i wsp., 1996). Na podstawie testów biochemicznych sugerowano, że aktywuje również kanał ROMK2 (Foster i wsp., 2012). Jednakże brak było dowodów elektrofizjologicznych na bezpośrednie działanie diazoksydu na aktywność białka ROMK2.

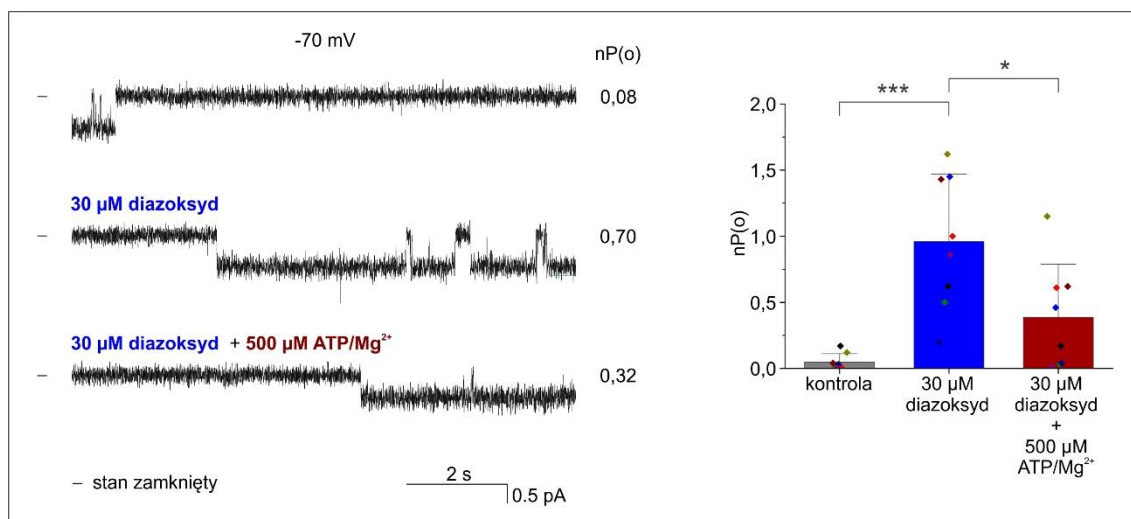
W prezentowanych badaniach zaobserwowano, że 30 μ M diazoksyd powoduje znaczny wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanałów ROMK2-6xHis z $0,04 \pm 0,05$ do $0,84 \pm 0,59$ ($n = 18$) (Rycina 47).



Rycina 47. Diazoksyd powoduje wzrost aktywności kanałowej białka ROMK2-6xHis. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 30 μ M diazoksydu. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 30 μ M diazoksydu ($n = 18$).

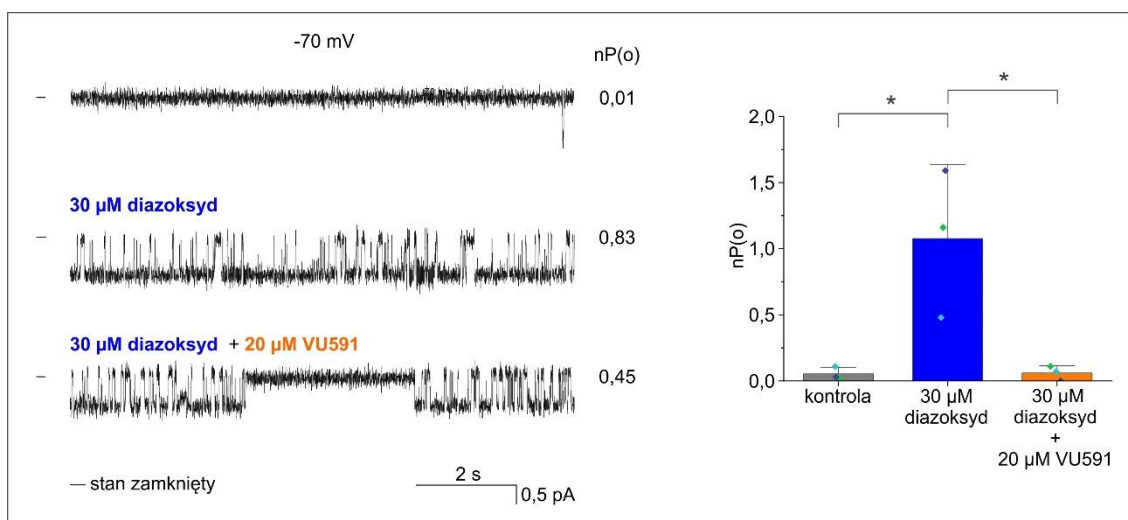
W niektórych eksperymentach kanały aktywowane przy pomocy diazoksydu traktowano inhibitorami VU591 oraz ATP/Mg²⁺.

Zaobserwowano, że kanały aktywowane 30 μM diazoksydem (wzrost prawdopodobieństwa otwarć kanału z 0,05 ± 0,06 do 0,96 ± 0,51) są blokowane przez dodatek 500 μM ATP/Mg²⁺ - obniżenie prawdopodobieństwa otwarć do 0,39 ± 0,40 (n = 8) (Rycina 48).



Rycina 48. Aktywacja kanału ROMK2-6xHis przez 30 μM diazoksyd, a następnie inhibicja przez dodany 500 μM ATP/Mg²⁺. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych, po dodaniu 30 μM diazoksydu oraz po dodaniu 500 μM ATP/Mg²⁺. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów (nP(o)) w warunkach kontrolnych, po dodaniu 30 μM diazoksydu i 500 μM ATP/Mg²⁺ (n = 8).

Również VU591 blokował kanał aktywowany za pomocą 30 μM diazoksydu. Diazoksyd zwiększał prawdopodobieństwo otwarcia kanałów z 0,05 ± 0,05 do 1,08 ± 0,56, natomiast dodanie VU591 powodowało zablokowanie aktywności kanałów do nP(o) wynoszącego 0,06 ± 0,06 (n = 3) (Rycina 49).

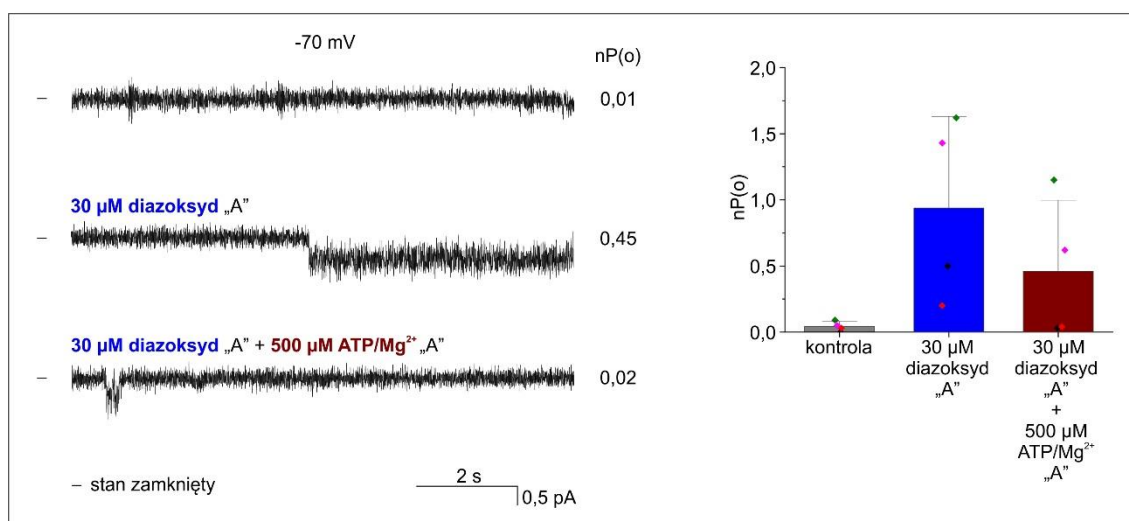


Rycina 49. Aktywacja kanału ROMK2-6xHis poprzez 30 μM diazoksyd, a następnie inhibicja przez podany dodatkowo 20 μM VU591. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych, w obecności 30 μM diazoksydu, a następnie po dodaniu 20 μM VU591. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych, po dodaniu 30 μM diazoksydu i 20 μM VU591 ($n = 3$).

6.4.4.5. Polarność efektów diazoksydu i ATP/Mg^{2+} na aktywność kanału ROMK2-6xHis

W kolejnym etapie badań podjęto próbę określenia polarności działania diazoksydu. W tym celu diazoksyd podawano kolejno do kompartmentów *cis* i *trans*, a następnie podawano kompleks ATP/Mg^{2+} . O miejscu wiązania ATP w ROMK2 można wnioskować na podstawie homologii z innymi kanałami K_{ir} (McNicholas i wsp., 1996; MacGregor i wsp., 2002; Laskowski i wsp., 2019), dlatego porównanie efektów obu substancji określiłoby stronę kanału, po której wiąże się diazoksyd.

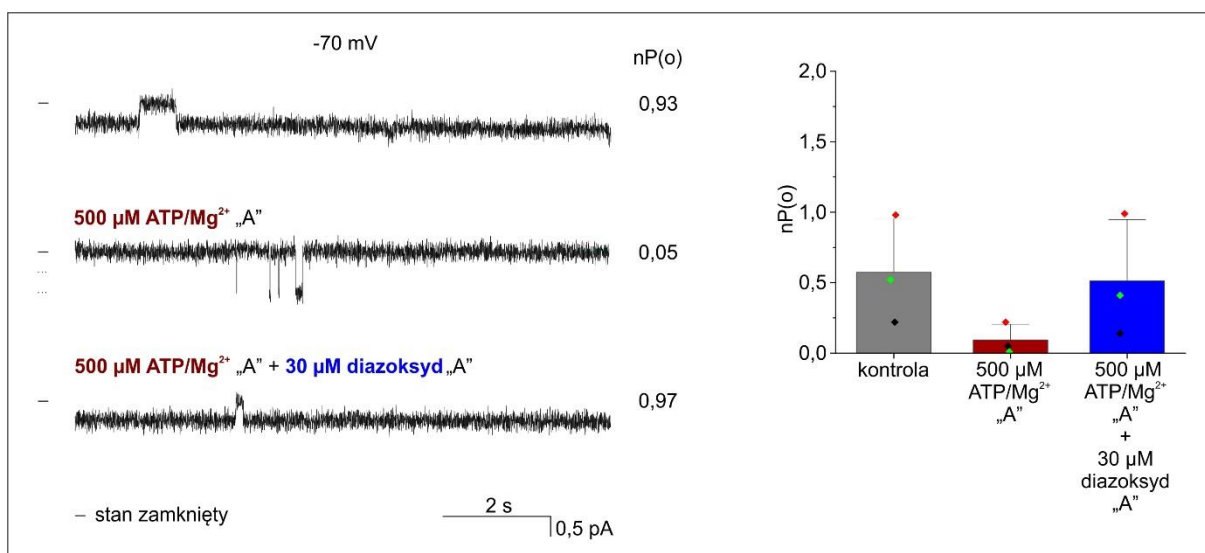
Przeprowadzone badania (4 z 5 powtórzeń) wykazały, że dodanie 30 μM diazoksydu z jednej ze stron układu powoduje aktywację kanału (z $nP(o)$ wynoszącego $0,04 \pm 0,04$ do $0,94 \pm 0,69$), a następnie dodatek 500 μM kompleksu ATP/Mg^{2+} z tej samej strony powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału ROMK2 do $0,46 \pm 0,54$, co sugerowałoby iż diazoksyd i ATP/Mg^{2+} działają z tej samej strony (Rycina 50).



Rycina 50. Polarność działania kolejno podawanego diazoksydu i kompleksu ATP/Mg^{2+} . Lewy panel: Reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu $30 \mu M$ diazoksydu z jednej strony, a następnie $500 \mu M$ ATP/Mg^{2+} z tej samej strony. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanału ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych, po dodaniu $30 \mu M$ diazoksydu z jednej strony, a następnie $500 \mu M$ ATP/Mg^{2+} z tej samej strony ($n = 4$).

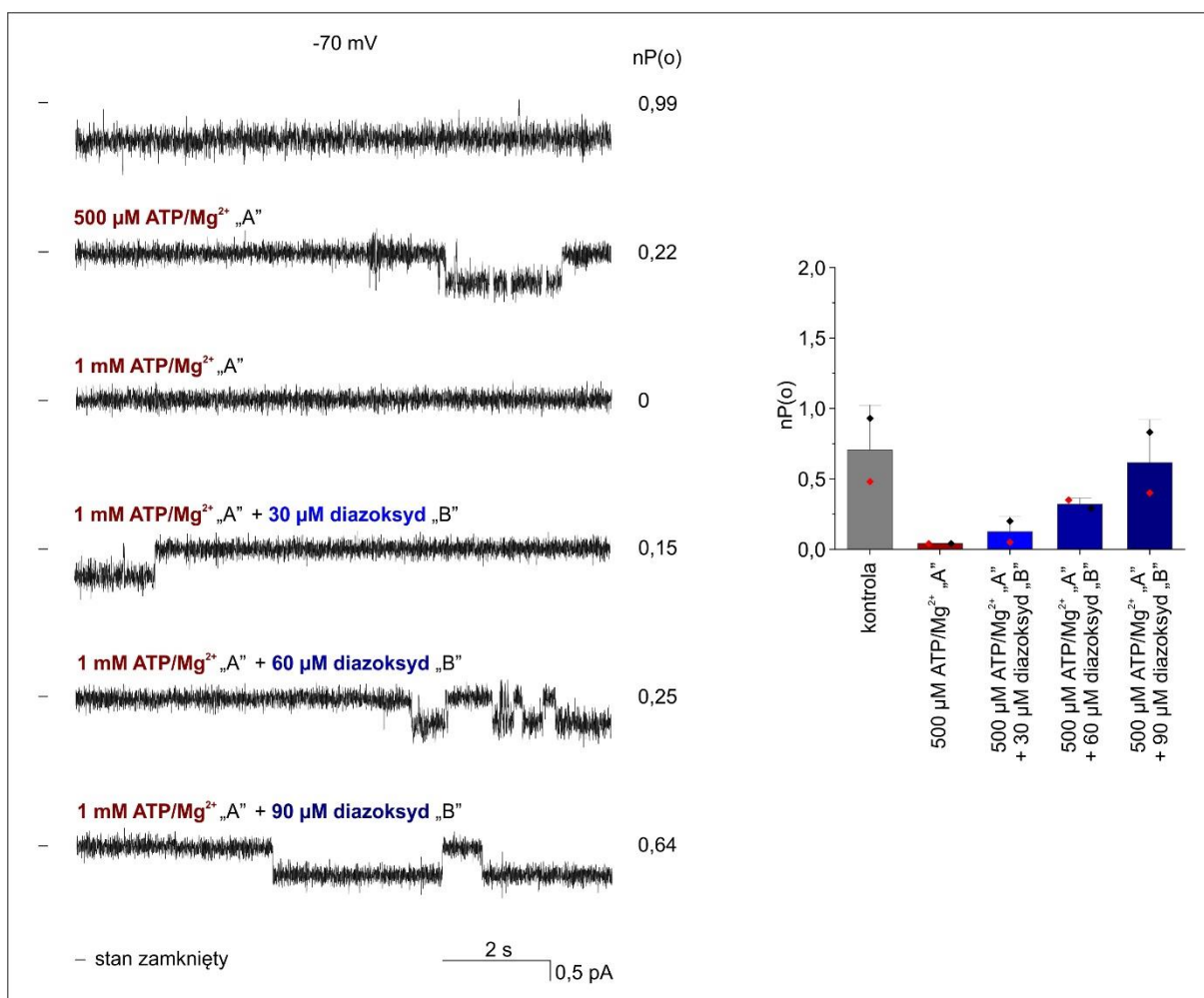
W dalszym etapie określania polarności działania kompleksu ATP/Mg^{2+} oraz diazoksydu eksperymenty rozpoczęto od dodawania ATP/Mg^{2+} .

W 3 z 5 eksperymentów efekt diazoksydu obserwowano, gdy podawany był z tej samej strony co ATP/Mg^{2+} . Dodatek $500 \mu M$ ATP/Mg^{2+} z strony „A” skutkowało obniżeniem prawdopodobieństwa otwarć z $0,57 \pm 0,38$ do $0,09 \pm 0,11$, a następnie dodatek $30 \mu M$ diazoksydu z tej samej strony powodował wzrost prawdopodobieństwa kanału ROMK2-6xHis do $0,51 \pm 0,43$ (Rycina 51).



Rycina 51. Polarność działania kolejno podawanego ATP/Mg²⁺ i diazoksydu. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 500 μM ATP/Mg²⁺ z jednej strony, a następnie 30 μM diazoksydu z tej samej strony. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów (nP(o)) w warunkach kontrolnych, po dodaniu 500 μM ATP/Mg²⁺ ze strony "A", a następnie 30 μM diazoksydu z tej samej strony (n = 3).

W pozostałych dwóch przypadkach zauważono działanie diazoksydu ze strony przeciwnej niż ATP/Mg²⁺, jednakże działanie to było w znacznej mierze opóźnione. Dodanie 500 μM ATP/Mg²⁺ blokowało aktywność kanałów ROMK2-6xHis z $0,71 \pm 0,32$ do $0,04 \pm 0,00$, a kolejne stężenia diazoksydu dodawane z drugiej strony powodowały nieznaczne wzrosty prawdopodobieństwa otwarcia kanału: 30 μM diazoksyd powodował wzrost do $0,13 \pm 0,11$, a 60 μM do $0,32 \pm 0,04$. Dopiero 90 μM diazoksyd powodował znaczny wzrost aktywności ($0,62 \pm 0,30$) (Rycina 52).



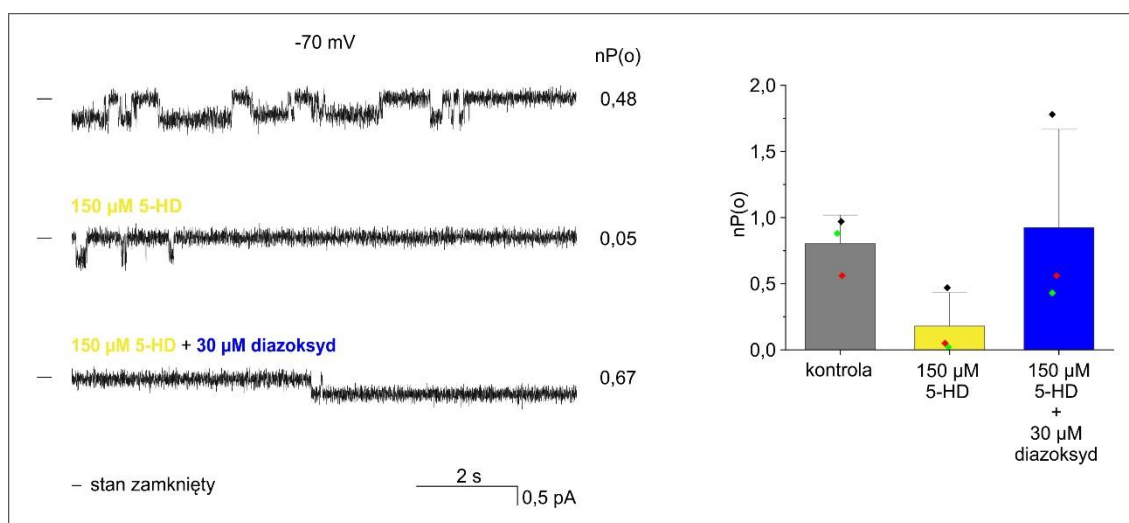
Rycina 52. Działanie kompleksu ATP/Mg^{2+} i diazoksydu z dwóch różnych stron. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu $500 \mu M$ ATP/Mg^{2+} z jednej strony, a następnie kolejnych stężeń diazoksydu ($30 \mu M$, $60 \mu M$ oraz $90 \mu M$) z drugiej strony. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanału ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych, po dodaniu $500 \mu M$ ATP/Mg^{2+} z jednej strony, a następnie kolejnych stężeń diazoksydu ($30 \mu M$, $60 \mu M$ oraz $90 \mu M$) z drugiej strony ($n = 2$).

6.4.4.6. Wpływ 5-HD na aktywność kanału ROMK2-6xHis

5-HD jest inhibitorem kanałów K_{ATP} (Liu i wsp., 1999) i sugerowano większą wrażliwość $mitoK_{ATP}$, niż kanałów K_{ATP} z plazmalemy na ten związek (Light i wsp., 2001; Liu i wsp., 1999). Wydaje się również, że kanał ROMK2 obecny w mitochondriach jest wrażliwy na 5-HD (Foster i wsp., 2012, Laskowski i wsp., 2019), dlatego sprawdzono jego wpływ na aktywność oczyszczonego białka ROMK2-6xHis.

Podanie $150 \mu M$ 5-HD spowodowało zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć kanałów z $0,80 \pm 0,22$ do $0,18 \pm 0,25$. Dodatkowo stwierdzono, że efekt 5-HD odwracany

jest przez podanie 30 μM diazoksydu, który spowodował wzrost prawdopodobieństwa otwarcia do wartości $0,92 \pm 0,74$ ($n = 3$) (Rycina 53).

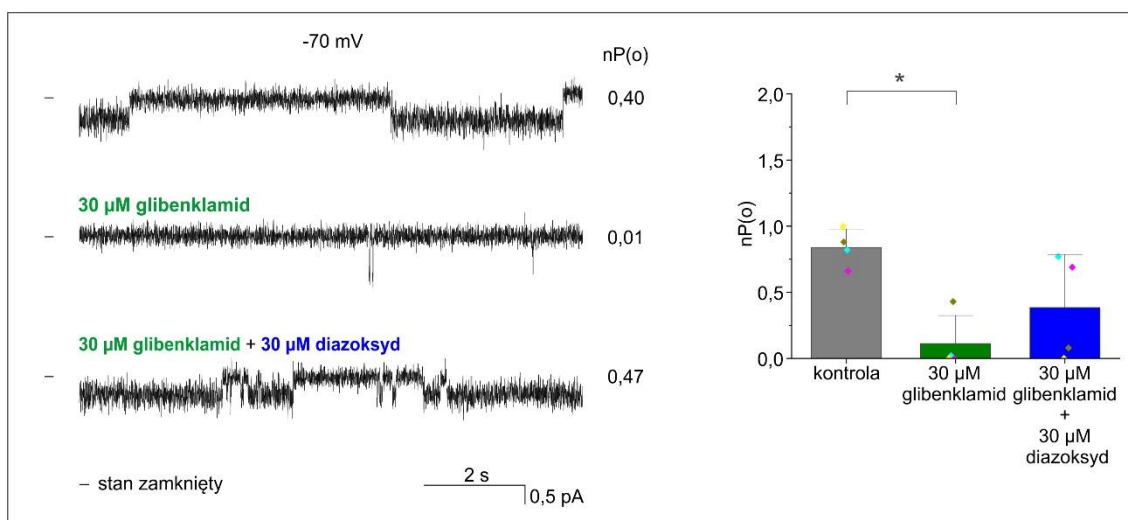


Rycina 53. 5-HD blokuje aktywność białka ROMK2-6xHis. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych, po dodaniu 150 μM 5-HD oraz po dodaniu 30 μM diazoksydu. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów ($nP(o)$) w warunkach kontrolnych, po 150 μM 5-HD oraz po dodaniu 30 μM diazoksydu ($n = 3$).

6.4.4.7. Wpływ glibenklamidu na aktywność kanału ROMK2-6xHis

Glibenklamid jest kolejnym z regulatorów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Paucek i wsp., 1992), a także jak wykazano białka ROMK2 (Foster i wsp., 2012). Jednakże, w przypadku działania tego modulatora istnieją kontrowersję, ponieważ jedne dane literaturowe pokazują, że działanie glibenklamidu jest zależne od obecności dodatkowej podjednostki regulatorowej SUR (Lu i wsp., 2006), a inne pokazują iż nie jest ono od nich zależne (Konstas i wsp., 2002).

Badanie aktywności białka ROMK2-6xHis produkowanego heterologicznie w *E. coli* pozwoliło na sprawdzenie wpływu glibenklamidu wyłącznie na jego aktywność z wykluczeniem wątpliwości dotyczących udziału natywnych dla ROMK2 białek regulatorowych. W warunkach kontrolnych prawdopodobieństwo otwarcia kanałów wynosiło $0,84 \pm 0,14$, a po dodaniu 30 μM glibenklamidu zmniejszyło się do $0,11 \pm 0,21$. Kanały blokowane przez glibenklamid aktywowane były przez 30 μM diazoksydu, który spowodował wzrost prawdopodobieństwa ich otwarcia do $0,39 \pm 0,40$ ($n = 4$) (Rycina 54).



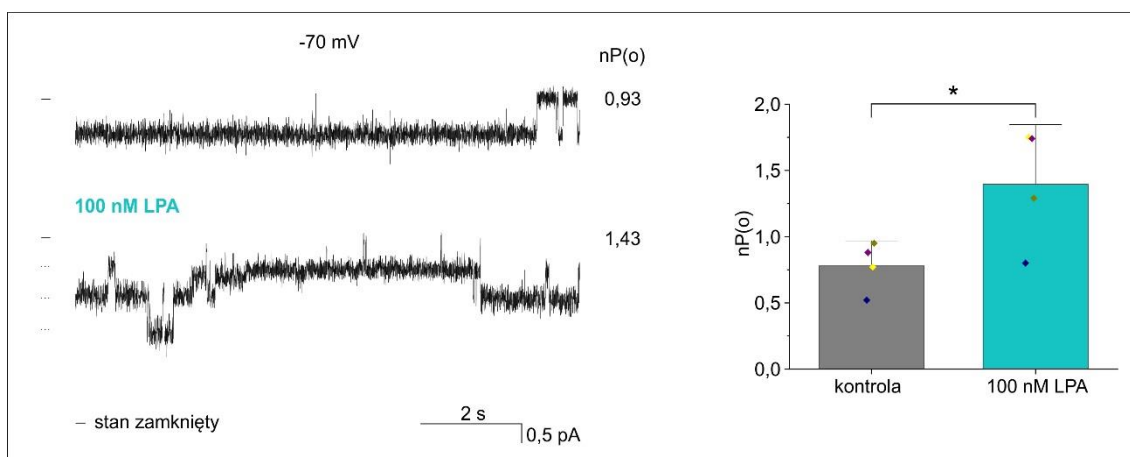
Rycina 54. Glibenklamid blokuje aktywność białka ROMK2-6xHis. Lewy panel: reprezentatywna rejestracja aktywności pojedynczego kanału przy -70 mV w warunkach kontrolnych, po dodaniu 30 μM glibenklamid oraz 30 μM diazoksyzdu. Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów (nP(o)) w warunkach kontrolnych, po dodaniu 30 μM glibenklamid oraz 30 μM diazoksyzdu (n = 4).

6.5. BADANIE WPLYWU PRODUKTÓW AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ BIAŁKA AGK NA AKTYWNOŚĆ KANAŁU ROMK2-6xHis

Doświadczenia typu TurboID i Co-IP sugerowały fizyczne oddziaływanie między kinazą acyloglicerolową (AGK), a kanałem ROMK2. Wiadomo, że AGK fosforyluje monoacyloglicerole i diacyloglicerole tworząc odpowiednio kwas lizofosfatydowy (LPA, ang. *lysophosphatidic acid*) i kwas fosfatydowy (PA, ang. *phosphatidic acid*) (Bektas i wsp., 2005), dlatego też postanowiono sprawdzić wpływ LPA oraz PA na aktywność kanału ROMK2-6xHis.

6.5.1. Wpływ kwas lizofosfatydowego na aktywność kanału ROMK2-6xHis

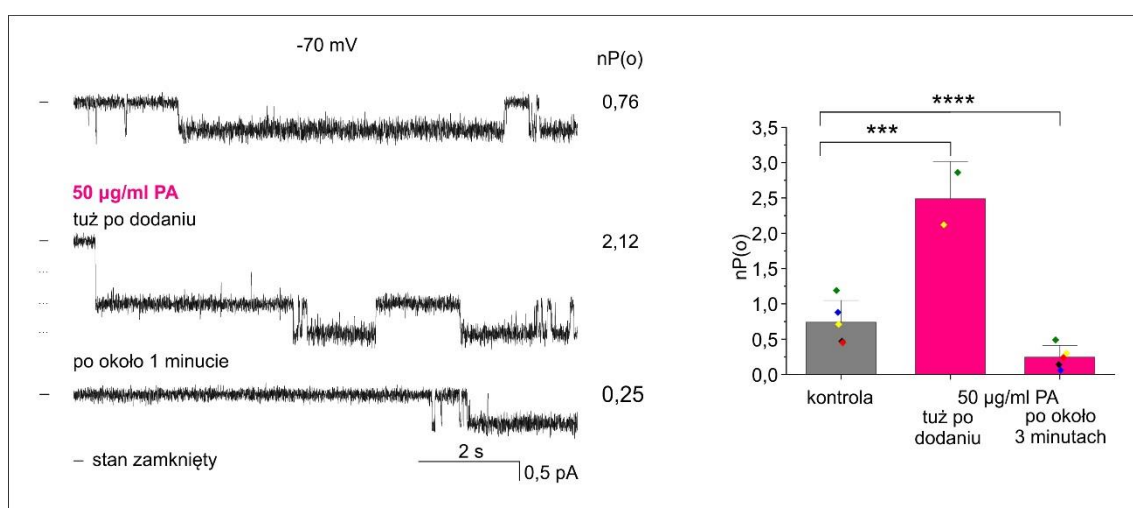
Rycina 55 przedstawia reprezentatywne rejestracje aktywności kanału ROMK2-6xHis w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 100 nM kwas lizofosfatydowego (LPA) (lewy panel), oraz analizę statystyczną efektów LPA w niezależnych eksperymentach (n = 4). Dodanie 100 nM LPA powodowało wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanału z $0,79 \pm 0,09$ do $1,40 \pm 0,45$.



Rycina 55. Aktywacja kanału ROMK2-6xHis przez kwas lizofosfatydowy (LPA). Lewy panel: Reprezentatywne zapisy aktywności białka ROMK2-6xHis przy -70 mV w warunkach kontrolnych i po dodaniu 100 nM LPA. Panel prawy: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów, $nP(o)$, w warunkach kontrolnych i po dodaniu 100 nM LPA ($n = 4$).

6.5.2. Wpływ kwasu fosfatydowego na aktywność kanału ROMK2-6xHis

Zaobserwowano modulacje aktywności kanału ROMK2-6xHis przez kwas fosfatydowy (PA) (Rycina 56). Dodanie 50 $\mu\text{g/ml}$ PA skutkowało przejściowym zwiększeniem prawdopodobieństwa otwarcia z $0,74 \pm 0,31$ do $2,49 \pm 0,52$ ($n = 2$), a następnie zmniejszeniem prawdopodobieństwa otwarcia kanałów do $0,25 \pm 0,16$ po upływie około 3 minut od podania związku ($n = 5$).



Rycina 56. Modulacja aktywności kanału ROMK2-6xHis przez PA. Lewy panel: Reprezentatywny zapis aktywności pojedynczych kanałów ROMK2-6xHis przy -70 mV w warunkach kontrolnych i po dodaniu PA (50 $\mu\text{g/ml}$). Prawy panel: Prawdopodobieństwo otwarcia kanałów, $nP(o)$, w warunkach kontrolnych i po dodaniu 50 $\mu\text{g/ml}$ PA – tuż po dodaniu ($n=2$) oraz po upływie około 3 min od dodania ($n = 5$).

7. DYSKUSJA

Mitochondria odgrywają ważną rolę w metabolizmie energetycznym komórki. Oprócz tej podstawowej funkcji, biorą również udział w regulacji śmierci i życia komórek, co związane jest m. in. z przenikaniem jonów przez błonę mitochondrialną dzięki obecności kanałów jonowych. Jednym z nich jest mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, mitoK_{ATP}, który został zidentyfikowany w mitochondriach z różnych tkanek (Augustynek i wsp., 2017). Białko ROMK2, powstałe w wyniku alternatywnego składania transkryptu genu KCNJ1, zostało zidentyfikowane jako potencjalna podjednostka kanału mitoK_{ATP} (Foster i wsp., 2012). Wiadomo, że izoforma ROMK1 znajdująca się w błonie komórkowej oddziałuje z białkami, które regulują ich aktywność i wrażliwość na ligandy (Yoo i wsp., 2004; Lu i wsp., 2006; Ruknudin i wsp.; 1998, Zeng i wsp.; 2002, Simon i wsp., 1996). Natomiast nic nie wiadomo było o białkach oddziałujących z kanałem mitoK_{ATP}. Postawiono zatem hipotezę, że mitochondrialne białko kanałowe ROMK2 również wiąże się ze specyficznymi partnerami białkowymi, które mogą wpływać na jego funkcje. W związku z tym głównym celem prezentowanej rozprawy doktorskiej było zidentyfikowanie partnerów białkowych wchodzących w interakcje z białkiem ROMK2. Interakcje białko-białko charakteryzują się różnym powinowactwem. Białka tworzą stabilne kompleksy białkowe, bądź też oddziałują w sposób przejściowy (Peng i wsp., 2016). Szczególny przypadek stanowią białka błonowe, w przypadku których formowanie kompleksów białkowych może zależeć od interakcji z określonymi lipidami (Corradi i wsp., 2019; Jodaitis i wsp., 2021).

Jedną z metod pozwalającą na identyfikację słabych i przejściowych interakcji *in situ* jest metoda biotynylacji białek przyległych – BioID (Sears i wsp., 2019; Roux i wsp., 2013; Varnaite i wsp., 2016). Najnowszą iteracją tej metody jest tzw. TurboID (Branon i wsp., 2018).

Prezentowane badania TurboID przeprowadzane były na linii komórkowej HEK 293T. ROMK2 występuje fizjologicznie w kardiomioblastach - linii komórkowej H9c2 (Foster i wsp., 2012), jednak nie udało się przeprowadzić nadekspresji białka ROMK2 na satysfakcjonującym poziomie w tej linii komórkowej. W związku z tym uzyskany proksysom białka ROMK2 może być tylko częściowo fizjologiczny. Należy zatem mieć na uwadze, że pewne podjednostki regulatorowe białka ROMK2 mogły nie zostać wykryte w prezentowanych badaniach. Dla przykładu, proponowana podjednostka regulatorowa kanału mitoK_{ATP} - białko SUR endogennie nie występuje w komórkach HEK293T (www.proteinatlas.org/ENSG00000069431-ABCC9/cell+line).

Biotynylacji przez ROMK2-TurboID-3xHA ulegała duża liczba białek (753). Jednakże, można przypuszczać, że wiele białek znajdowało się w pobliżu nie z powodu specyficznego

oddziaływania, a jedynie z powodu zatłoczenia molekularnego (ang. *molecular crowding*) w czasie podstawowych procesów komórkowych jak transkrypcja, czy translacja. W związku z tym, aby zwiększyć prawdopodobieństwo identyfikacji specyficznych białek otoczenia mitochondrialnego zastosowano dodatkowe kontrole - fuzje TurboID do sekwencji kierującej białka OTC determinującego lokalizację TurboID w macierzy mitochondrialnej oraz białka SMAC, które determinuje lokalizację w przestrzeni międzybłonowej. W przypadku OTC-TurboID-3xHA po oczyszczeniu białek biotynylowanych zidentyfikowano 890 białek. Natomiast w przypadku SMAC-TurboID-3xHA po oczyszczeniu białek biotynylowanych zidentyfikowano 860 białek. Poza zastosowaniem kontrolnych fuzji TurboID wykonano serię powtórzeń eksperymentów, co pozwoliło na identyfikację i wyselekcjonowanie białek pojawiających się najczęściej. Uznano je za potencjalne białka oddziałujące ROMK2 i poddano bardziej szczegółowej analizie. Do takich białek zaliczono szereg niemitochondrialnych białek, które nie były obecne w próbkach pochodzących z komórek kontrolnych transfekowanych wektorem *pcDNA3.1/Hygro(+)*. Wśród białek zidentyfikowanych w proksysomie ROMK2 znalazły się białka znajdujące się w wielu kompartmentach komórkowych, a tylko niewielka część zidentyfikowanych białek – 3,7% miała lokalizację mitochondrialną. Uzyskane wyniki są zgodne z analizą zdjęć mikroskopii immunofluorescencyjnej, w której wykazano niewielką kolokalizację białka ROMK2 z markerami/ białkami mitochondrialnymi. Największą grupę zidentyfikowanych białek (26,6%) stanowiły białka zlokalizowane w jądrze komórkowym. ROMK2 jest m.in. syntetyzowany w siateczce śródplazmatycznej, która zintegrowana jest z otoczką jądrową. Otoczka ta ulega dezintegracji, a następnie odtworzenia w trakcie podziałów komórkowych. Być może subpopulacja ROMK2 zlokalizowana jest w otoczce jądrowej odtwarzającej się z siateczki śródplazmatycznej (English i wsp., 2013). Weryfikacja takich oddziaływań byłaby możliwa dzięki zastosowaniu plazmidów kodujących fuzje TurboID z sekwencjami kierującymi do poszczególnych kompartmentów komórkowych, tak jak zrobiono to specyficznie dla mitochondriów.

Wśród zidentyfikowanych białek znaleziono jednak takie białka niemitochondrialne, z którymi oddziaływania kanału ROMK2 zostały już wcześniej opisane w literaturze, co może świadczyć o prawidłowości uzyskanych w tej pracy wyników.

Jedną z funkcjonalnych grup białek wykrywanych tylko w proksysomie ROMK2-TurboID-3xHA, a nie w kontrolach stanowiły białka zaangażowane w endocytozę zależną od klatryny: PICALM, NOTCH1, NUMB, EPN3, CLTC, SCYL2 oraz PIK3C2A. Zależna od klatryny endocytoza białka ROMK2 została już opisana w oocytach oraz komórkach psiej nerki Madin-Darby'ego (ang. *Madin Darby Canine Kidney cells*) (Zeng

i wsp., 2002). Odkryto, że wraz z białkiem ROMK koimmunoprecypitowana jest α -adaptyna (AP-2), ciężki łańcuch klatryny (CLTC) (Zeng i wsp., 2002) oraz białko ARH (Fang i wsp., 2009). Potwierdzenie, zidentyfikowanie znanej już wcześniej interakcji z CLTC przemawia za specyficznością uzyskanych wyników i wskazuje, zgodnie z obserwacjami mikroskopowymi i wcześniejszymi badaniami, że izoforma ROMK2 zlokalizowana jest nie tylko w mitochondriach (Foster i wsp., 2012), ale jest również transportowana do błony plazmatycznej (Zeng i wsp., 2002).

O cytoplazmatycznym transporcie ROMK2 świadczy również fakt, że wśród zidentyfikowanych białek znalazły się również miozyny: MYO1D, MYH9 oraz miozyna VI (MYO6). MYO6 bierze udział we wczesnych etapach endocytozy zależnej od klatryny w spolaryzowanych komórkach nabłonka (Buss i wsp., 2001). Dla MYH9 wykryto specyficzną lokalizację w grubym ramieniu wstępującym pętli Henlego (Otterpohl i wsp., 2017), która jest zgodna z lokalizacją kanału ROMK (Ecelbarger i wsp., 2001). Co ciekawe mutacje MYH9 skutkują szeregiem schorzeń (Ma i wsp., 2014).

Przeprowadzone badania pozwoliły również na zidentyfikowanie dziewięciu białek z rodziny tubulin: TUBB, TUBA1B, TUBB4B, TUBB4A, TUBA4A, TUBAL3, TUBA1A, TUBB2B oraz TUBA1C. Dotychczas nie było doniesień o interakcji białka ROMK z tubulinami, jednakże znane są interakcje pomiędzy tubulinami, a innymi kanałami kationowymi, takimi jak: TRPV1 (Goswami i wsp., 2004), EAG (Bracey i wsp., 2008) oraz TRESK (Enyedi i wsp., 2014). Obecność tubulin może świadczyć o ich udziale w pęcherzykowym transporcie ROMK2 (Hamm-Alvarez i wsp., 1998)

Ponadto wykryto również cztery białka SRP (ang. *Signal Recording Particles*): SRP54, SRPRA, SRPRB oraz SRP68, które są zaangażowane w kotranslacyjny transport białek do retikulum endoplazmatycznego (Costa i wsp., 2018).

Wyżej opisane grupy białek lokalizują się w cytoplazmie i uczestniczą w różnych etapach życia białka błonowego - począwszy od insercji białka do błon siateczki śródplazmatycznej poprzez transport pęcherzykowy aż do endocytozy pęcherzyków otoczonych klatryną.

Oprócz białek strukturalnych determinujących transport i lokalizację w potencjalnym proksysomie zidentyfikowano również takie, które mogą regulować pośrednio lub bezpośrednio aktywność ROMK2.

Stwierdzono obecność dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu 2 (IMPDH2). IMPDH2 katalizuje zależne od NAD utlenianie monofosforanu inozyny (IMP) do 5'-monofosforanu ksantozyny (XMP), który jest metabolitem pośrednim w produkcji

trifosforanu guanozyny (GTP). IMP jest również substratem do syntezy ATP. Można zatem wnioskować, że IMPDH reguluje produkcję nie tylko GTP, ale także ilość wytwarzanego ATP (Hedstrom, 2009). Oba te nukleotydy są niezbędnymi prekursorami syntezy DNA i RNA, a także są fundamentalne dla metabolizmu energetycznego (Naffouje i wsp., 2019). Jak potwierdzono w badaniach opisywanych w niniejszej rozprawie aktywność kanału ROMK2 jest bezpośrednio hamowana przez ATP. IMPDH2 może zatem w sposób pośredni wpływać na aktywność białka ROMK2.

Innym zidentyfikowanym z mniejszą częstotliwością potencjalnym interaktantem będącym białkiem mitochondrialnym jest peroksyredoksyna 1 (PRDX1). Analiza sieci powiązań między białkami w bazie STRING wskazała na związek PRDX1 z apoptotycznymi białkami p53. Zbadane środowisko białkowe białka ROMK2 obejmowało również białko p53, a także zależne od niego białka, m.in. polimerazę ADP-rybozy (PARP1), która również znalazła się w próbkach ROMK2-TurboID-3xHA, jednak występowała ona znacznie rzadziej. Kanał ROMK2 może być zatem bezpośrednio powiązany ze szlakami sygnałowymi związanymi z uszkodzeniem DNA, apoptozą lub stresem oksydacyjnym. Białka p53 i PARP1 mogą być aktywnie transportowane do mitochondriów pod wpływem stresu oksydacyjnego (Noda i wsp., 2017; Zhao i wsp., 2005; Bai i wsp., 2015), dlatego też pojawia się pytanie, czy białko ROMK2 może być z nimi funkcjonalnie powiązane.

Co ciekawe, wśród białek sąsiadujących z ROMK2 znajduje się również kinaza epsilon diacyloglicerolu (DGKE), która przeprowadza reakcję fosforylacji diacyloglicerolu (DAG) do kwasu fosfatydowego (PA) w błonie siateczki śródplazmatycznej oraz błonie komórkowej (Fazio i wsp., 2020). Zarówno PA, jak i LPA pełnią ważne role sygnalizacyjne w stanach zapalnych, czy też w nowotworach (Bektas i wsp., 2005).


Omówione wyżej białka wskazują na nowe hipotetyczne mechanizmy regulacji aktywności białka ROMK2 w błonie komórkowej. Jednak głównym celem eksperymentów typu TurboID było znalezienie białek z mitochondrialnego otoczenia ROMK2, gdyż dowody na rolę tego białka w mitochondriach są bardzo ograniczone (Foster i wsp., 2012; Laskowski i wsp., 2019), a nawet kwestionowane (Papanicolaou i wsp., 2020; Paggio i wsp., 2019).

Analizując białka biotynyłowane w komórkach transfekowanych *pROMK2-TurboID* zidentyfikowano również te zaangażowane w import białek mitochondrialnych. Wiadomo, że podczas importu białek do macierzy mitochondrialnej białka transportowane są przez kompleksy translokaz: translokazę błony zewnętrznej (TOM), a następnie przez translokazy błony wewnętrznej (TIM) - kompleks TIM23 i TIM22 (Kang i wsp., 2018). Więcej białek z tych kompleksów zidentyfikowanych było w preparatach pochodzących z komórek

transfekowanych *pSMAC-TurboID* i *pOTC-TurboID*. Wyniki te zgodne są z lokalizacją subkomórkową obserwowaną w preparatach mikroskopowych. Sygnał pochodzący od SMAC-TurboID-3xHA i OTC-TurboID-3xHA obserwowano głównie jako kolokalizujący się z mitochondriami, podczas gdy tylko marginalny sygnał ROMK2-TurboID-3xHA pokrywał się z markerami mitochondrialnymi. W przypadku SMAC-TurboID-3xHA i OTC-TurboID-3xHA zidentyfikowano następujące białka kompleksu TOM: TOM5, TOM20, TOM22, TOM40 oraz TOM70. Natomiast dla ROMK2-TurboID-3xHA znaleziono wyłącznie TOM40 - białko tworzące kanał translokazy (Wang i wsp., 2020). W żadnym przypadku nie zidentyfikowano dwóch pozostałych białek kompleksu, tj. białka TOM6 oraz TOM7 (Wang i wsp., 2020).

Biotynylacja TOM40 wskazuje na translokację ROMK2-TurboID-3xHA do wnętrza mitochondriów. Jednakże nie można wykluczyć znakowania tego białka od strony cytoplazmatycznej przez białko ROMK2-TurboID-3xHA znajdujące się w błonie siateczki śródplazmatycznej w pobliżu mitochondriów, w tzw. MAMs (ang. *mitochondrial associated membranes*), dlatego istotne było wykrycie wśród białek biotynylowanych w obecności ROMK2-TurboID-3xHA dwóch białek kompleksu translokazy TIM23 z wewnętrznej błony mitochondrialnej - TIM50 i TIM44. Oba są białkami peryferyjnymi zasocjowanymi z TIM23 tworzącym kanał translokazy. TIM50 znajduje się w przestrzeni międzybłonowej, zaś TIM44 znajduje się w macierzy mitochondrialnej (Callegari i wsp., 2020). Biotynylacja tego ostatniego może sugerować, że nie tylko ROMK2-TurboID-3xHA jest wbudowany do wewnętrznej błony mitochondrialnej, ale C-koniec ROMK2 znajduje się w macierzy. W przypadku SMAC-TurboID-3xHA i OTC-TurboID-3xHA białka TIM50 i TIM44 wykrywane były częściej, a dodatkowo rozpoznano białka TIM16 i TIM21, co jest zgodne z przeważającą mitochondrialną lokalizacją SMAC-TurboID-3xHA i OTC-TurboID-3xHA. Translokaza TIM23 uczestniczy w imporcie białek zarówno rozpuszczalnych, jak i transbłonowych posiadających dodatkowo naładowane sekwencje kierujące, które są następnie odcinane przez proteazę MPP (ang. *mitochondrial processing peptidase*) (Pfanner i wsp., 2019). Mimo, że przeprowadzona analiza informatyczna (BaCelLo, <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello>) (Pierleoni i wsp., 2006) ROMK2 sugeruje lokalizację mitochondrialną (nie pokazano), to obecność odcinanej sekwencji kierującej wymaganej do transportu przez translokazę TIM23 nie jest jasna (*Rycina 57* i *Rycina 58*). Obecność dodatnio naładowanej (+7) sekwencji kierującej z motywem rozpoznawanym przez TOM20 została przewidziana przez serwis MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>) (Fukasawa i wsp., 2015), jednakże PSORT (<http://psort1.hgc.jp/>) takiej sekwencji nie rozpoznaje. Wcześniej Foster i wsp.

udowodnili, że sekwencja kierująca ROMK2 MFKHLRKWVVTRFFGHRSRQRARL kieruje białko GFP do mitochondriów (Foster i wsp., 2012). Nie jest jednak wiadomo, czy sekwencja ta jest odcinana przez proteazę MPP.



MitoFates

A prediction tool for identifying putative mitochondrial presequences and cleavage sites

Results

Prediction settings
Used model: metazoa

Presequence


- Possessing mitochondrial presequence (Precision:0.83, Recall:0.73)
- Possessing mitochondrial presequence (Precision:0.79, Recall:0.80)
- No mitochondrial presequence

Cleavage site

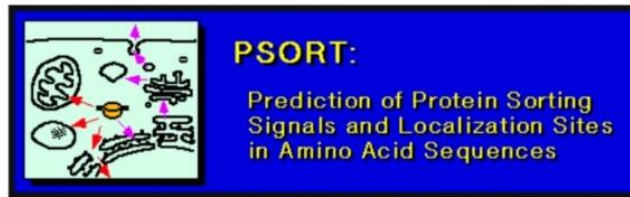
- MPP cleavage site
- Oct1 cleavage site
- Icp55 cleavage site

Motif

- TOM20 recognition motif ($\Phi\chi\beta\Phi\Phi$)
- Max positively charged amphiphilicity (PA) score region (high)
- Max positively charged amphiphilicity (PA) score region (low)
- $\Phi\beta\sigma\gamma$ Reduced letters composing statistically significant 6mer in presequence Φ (hydrophobic), β (basic), σ (polar), γ (secondary structure breaker)

Sequence ID	Probability of presequence	Cleavage site (processing enzyme)	Net charge	Sequence (100 amino acids from N terminal)
ROMK2	0.729	23 MPP	0.304	<div style="font-family: monospace; font-size: x-small; border: 1px solid #ccc; padding: 2px;"> MFKHLRKWVVTRFFGHRSRQRARLVSKDGRCNIEFGNVEAQSRIFFVDIW...  ...TTVLDLKWRYKMTIFITAFLGSWFFFGLLWYAVAYIHKDLPEFHPSANHT </div>

Rycina 57. Sekwencja kierująca ROMK z motywem rozpoznawanym przez TOM20 w serwisie MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>)



Input Sequence

QUERY (372 aa)
 MFKHLRKWVY TRFFGHSRQR ARLVSKDGRG NIEFGNVEAQ SRFFVFDIWW TTVDLKWRY KMTIFITAFLL GSWFFFGLLW YAVAYIHKDL PEFHPSANHT
 PCVENINGLT SAFLFSLETQ VTIGYGFRCV TEQCATAIFL LIFQSILGVI INSMCGAIL AKISRPKKRA KTITFSKNAV ISKRGGKLLCL LIRVANLRKS
 LLIGSHIYGK LLKTTVTPEG ETIILDQINI NFVVDAGNEN LFFISPLTIY HVIDHNSPFF HMAAETLLQQ DFELVWLDG TVESTSATCQ VRTSYVPEEV
 LWGYRFAPIV SKTKEGKYRV DFHNFSTVE VETPHCAMCL YNEKDVRRARM KRGYDNPFI LSEVNETDDT KM

Results of Subprograms

PSG: a new signal peptide prediction method N-region: length 7; pos.chg 3; neg.chg 0 H-region: length 4; peak value 2.30 PSG score: -2.10	SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none VAC: possible vacuolar targeting motif: none RNA-binding motif: none Actinin-type actin-binding motif: type 1: none type 2: none NMYR: N-myristoylation pattern : none Prenylation motif: none memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none Tyrosines in the tail: none Dileucine motif in the tail: none checking 63 PROSITE DNA binding motifs: none checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination Prediction: cytoplasmic Reliability: 94.1 COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions total: 0 residues Results of the k-NN Prediction k = 9/23 39.1 %: endoplasmic reticulum 30.4 %: mitochondrial 17.4 %: plasma membrane 4.3 %: cytoplasmic 4.3 %: extracellular, including cell wall 4.3 %: vesicles of secretory system >> prediction for QUERY is end (k=23)
GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition GvH score (threshold: -2.1): -9.86 possible cleavage site: between 19 and 20 >>> Seems to have no N-terminal signal peptide	
ALOM: Klein et al's method for TM region allocation Init position for calculation: 1 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 2 INTEGRAL Likelihood = -2.87 Transmembrane 63 - 79 INTEGRAL Likelihood = -7.96 Transmembrane 135 - 151 PERIPHERAL Likelihood = 2.23 (at 188) ALOM score: -7.96 (number of TMSs: 2)	
MTOP: Prediction of membrane topology (Hartmann et al.) Center position for calculation: 70 Charge difference: -0.5 C(0.5) - N(1.0) N >= C: N-terminal side will be inside >>> membrane topology: type 3a	
MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq R content: 5 Hyd Moment(75): 6.66 Hyd Moment(95): 14.38 G content: 1 D/E content: 1 S/T content: 3 Score: 1.04	
Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq R-2 motif at 32 ARL VS	
NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals pat4: RPKK (4) at 165 pat4: PKKR (4) at 166 pat7: PKKRAKT (5) at 166 bipartite: RKWVYTRFFGHSRQRAR at 6 content of basic residues: 11.6% NLS Score: 0.95	
KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none ER Membrane Retention Signals: KXXX-like motif in the C-terminus: DDTK	

Rycina 58. Sekwencja kierującej ROMK z motywem rozpoznawanym przez TOM20 w serwisie PSTOR (<http://psort1.hgc.jp/>)

Pomimo identyfikacji białek kompleksu TIM23 nie jest więc jasne, w jaki sposób białko ROMK2 jest translokowane do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Tym bardziej, że wśród białek specyficznych dla proksysomu ROMK2 wykryto również mitochondrialną kinazę acyloglicerolową (AGK) (Kang i wsp., 2017) będącą podjednostką kompleksu TIM22 (Vukotic i wsp., 2017) zaangażowanego w alternatywną ścieżkę importu białek politopowych (Jackson i wsp., 2021), a w szczególności tych zawierających nieparzystą liczbę helis transbłonowych

(Yamano i wsp., 2005). Potencjalnie ROMK2 może być transportowane przez kompleks TIM23 i alternatywnie przez kompleks TIM22 - podobnie jak transportowany jest drożdżowy transporter fosforanu (Yamano i wsp., 2005).

Kinaza acyloglicerolu (AGK) pierwotnie została zidentyfikowana jako mitochondrialny enzym fosforylujący monoacyloglicerole do kwasów lizofosfatydowych (LPA) i diacylogliceroli (DAG) do kwasów fosfatydowych (PA) (Bektas i wsp., 2005). Można zatem postawić dwie niewykluczające się hipotezy. Po pierwsze: substraty lub produkty enzymatycznej aktywności AGK regulują aktywność kanału ROMK2; po drugie: kompleks białkowy TIM22 zawierający AGK przeprowadza import ROMK2 do mitochondriów.

Import ROMK2 do mitochondriów przez kompleks TIM22 zawierający AGK implikuje ich fizyczne (pośrednie lub bezpośrednie) oddziaływanie, dlatego też wykonano eksperymenty koimmunoprecypitacji (Co-IP) między białkami AGK-Myc-FLAG oraz ROMK2-V5. Dodatkowo do analogicznych badań wybrano kilka innych białek z proksysomu ROMK2, które mogły być potencjalnie transportowane do mitochondriów (PARP1, GPATCH8, TP53, PRDX1). Wybrano także IMPDH2 jako enzym pośrednio regulujący stężenie ATP - bloker aktywności kanału ROMK2. Okazało się, że ROMK2-V5 było koimmunoprecypitowane przez przeciwciała anti-FLAG wyłącznie w obecności AGK-Myc-FLAG spośród wszystkich testowanych białek. Jednakże nie obserwowano wzajemnej koimmunoprecypitacji, tzn. przeciwciała anti-V5 nie koimmunoprecypitowały AGK-Myc-FLAG w obecności ROMK2-V5. Może to sugerować, że epitop V5 nie jest dostępny dla przeciwciała anti-V5, gdy ROMK2-V5 jest w kompleksie z AGK-Myc-FLAG. W celu wykluczenia wpływu warunków solubilizacji na otrzymane wyniki wykonano koimmunoprecypitację białek solubilizowanych z błon za pomocą amfipatycznego kopolimeru DIBMA. Tak solubilizowane błony tworzą tzw. natywne nanodyski, w których zamknięte są nanometrowej wielkości fragmenty zawierające białka otoczone przez natywne lipidy (Voskoboynikova i wsp., 2021, Angelisová i wsp., 2019). W ten sposób, z wykorzystaniem kopolimeru SMA, wyizolowano natywne nanodyski zawierające drożdżowy kompleks IV oksydazy cytochromu c (Smirnova i wsp., 2016). W opisanych w rozprawie doświadczeniach po solubilizacji za pomocą DIBMA błon zawierających ROMK2-V5 i AGK-Myc-FLAG okazało się, że tak jak w przypadku błon solubilizowanych w detergencie, ROMK2-V5 było koimmunoprecypitowane przez przeciwciała anti-FLAG, a nie obserwowano koimmunoprecypitacji AGK-Myc-FLAG przez przeciwciała anti-V5. Należy mimo wszystko mieć jednak na uwadze, że prezentowane wyniki przeprowadzane były w warunkach nadekspresji białek, co może prowadzić do нефizjologicznej lokalizacji białek (Kintaka i wsp., 2016).

Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom potwierdzono fizyczną interakcję pomiędzy białkiem kanałowym ROMK2 oraz AGK, jednakże nadal niewyjaśnione pozostało pytanie: czy AGK uczestniczy w imporcie ROMK2 do mitochondriów, czy też reguluje jego aktywność w tym kompartmentcie.

Jedną z możliwości regulacji aktywności ROMK2 przez AGK jest obecność produktów enzymatycznej aktywności AGK tj. LPA i PA. Aby odpowiedzieć na to pytanie postanowiono zatem sprawdzić poprzez badania elektrofizjologiczne czy LPA oraz PA bezpośrednio modulują aktywność ROMK2. Jednakże w mitochondriach niezwykle trudno jest zarejestrować aktywność kanału ROMK2, co więcej ROMK2 może tworzyć również kompleksy z innymi białkami modyfikującymi jego aktywność. Ponadto aktywność ta - typu $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ - może pochodzić od innych białek mitochondrialnych (Liu i wsp., 2001; Ardehali i wsp., 2004; Paggio i wsp., 2019). W celu zbadania właściwości białka ROMK2 w bardziej zdefiniowanym środowisku, tj. w sztucznych dwuwarstwach lipidowych (PLB) (Zakharian, 2021) zdecydowano się na jego heterologiczną produkcję i oczyszczenie. Heterologiczna ekspresja kanałów ssaków w bakteriach może być korzystna ze względu na niezwiązane środowisko białkowe oraz brak ryzyka współczyszczania endogennych białek, np. podjednostek pomocniczych kanałów. Jednakże heterologiczna ekspresja białek eukariotycznych, zwłaszcza błonowych transporterów i kanałów jonowych, w *E. coli* często napotyka na szereg problemów, takich jak: brak ekspresji, nieefektywna insercja białek do błony oraz formowanie nieaktywnych agregatów (Smith, 2011). Problematiczna może być również solubilizacja białek błonowych oraz utrata specyficznej aktywności (Seddon i wsp., 2004; Raynal i wsp., 2014), dlatego też aby uzyskać funkcjonalne kanały ROMK w *E. coli* zastosowano systematyczne podejście pozwalające na zminimalizowanie niepowodzenia projektu. W związku z tym, aby zwiększyć ekspresję zoptymalizowano otwarte ramki odczytu ROMK1 (Kudła i wsp., 2009) (www.genscript.com/codon-optimization-for-increased-protein-expression.html). W celu zwiększenia prawdopodobieństwa prawidłowej insercji białka eukariotycznego do błon bakteryjnych zastąpiono helisy transbłonowe ROMK1 przez helisy prokariotycznego kanału KirBac1.3 (Nishida i wsp., 2007). Natomiast, aby zwiększyć prawdopodobieństwo prawidłowego fałdowania i insercji ROMK1 skonstruowano jego N-końcowe fuzje do liderów OmpF (Su i wsp., 2013; Visudtiphole i wsp., 2005), SUMO (Zuo i wsp., 2005; Zhang i wsp., 2017) lub MISTIC (Deniaud i wsp., 2011), które we wcześniejszych badaniach zwiększały produkcję aktywnych białek błonowych. W pierwszym etapie skonstruowano jedynie fuzje wariantu ROMK1, który jest dłuższy o 19 aminokwasową sekwencję kodującą na N-końcu białka w porównaniu do ROMK2. Następnie wykonano badanie przesiewowe pod kątem

optymalnego wbudowania białka w błonę oraz sprawdzono wydajność solubilizacji. Jednakże żaden z przygotowanych konstruktów fuzyjnych zawierających OmpF, SUMO lub MISTIC, a także kanał chimeryczny KirBac1.3-ROMK1-6xHis nie pozwalał na znaczne zwiększenie wydajności produkcji białka ROMK1 w porównaniu z produkcją konstruktu ROMK1-6xHis. Dodatkowo MISTIC-ROMK1-6xHis oraz MISTIC-KirBac1.3-ROMK1-6xHis, które również charakteryzowały się dość dobrą wydajnością ekspresji białka ROMK1, po ekstrakcji z błon bakteryjnych za pomocą detergentów znajdowały się głównie we frakcji nierozpuszczalnej. W związku z tym, w dalszych etapach badań wykorzystywano konstrukty ROMK1 oraz ROMK2 zawierające jedynie znacznik 6xHis na ich na C-końcu ułatwiający oczyszczanie białka. Zwykle do izolacji i charakterystyki białek błonowych stosuje się detergenty, jednak różne detergenty mogą być optymalne dla różnych metod eksperymentalnych w zależności od białka (Seddon i wsp., 2004). Przetestowano różne detergenty i solubilizowano białka ROMK1-6xHis i ROMK2-6xHis z błon bakteryjnych z ich wykorzystaniem z różną wydajnością, jednak do oczyszczania białek ROMK zdecydowano się wykorzystać DDM, mimo że nie był najskuteczniejszy w solubilizacji białka kanałowego ROMK. Jednakże jest on niedenaturującym detergentem, który został uprzednio z powodzeniem zastosowany do oczyszczania innych białek kanałów potasowych (Voges i wsp., 1998; Tilegenova i wsp., 2016). W ostatnich latach zastosowanie amfipatycznych kopolimerów SMA oraz DIBMA do ekstrakcji i oczyszczania białek stało się popularną alternatywą dla detergentów (Dörr i wsp., 2016; Esmaili i wsp., 2018; Ravula i wsp., 2019b; Bada Juarez i wsp., 2019). Zastosowanie tych kopolimerów pozwala na solubilizację, oczyszczanie i analizę funkcjonalną białka błonowego bez konieczności usuwania środka solubilizującego i rekonstrukcji do lipidów, gdyż białka błonowe ekstrahowane są z błon jako tzw. natywne nanodyski (Dörr i wsp., 2014; Dörr i wsp., 2016). Pokazano również, na przykładzie kanału KcsA, że natywne nanodyski mogą zostać wykorzystane do bezpośredniej rekonstrukcji białka kanałowego do sztucznej dwuwarstwy lipidowej w celu jego elektrofizjologicznej charakterystyki (Dörr i wsp., 2014). Ze względu na przeważające zalety kopolimerów SMA oraz DIBMA nad detergentami w badaniach funkcjonalnych białka zdecydowano się również na użycie polimerów SMA oraz DIBMA do ekstrakcji i oczyszczania białek kanałowych ROMK1-6xHis i ROMK2-6xHis z błon *E. coli*. W pierwszym etapie przebadano kopolimer DIBMA oraz trzy kopolimery SMA o wzrastającym ładunku ujemnym (1,2:1, 2,3:1 oraz 3:1). Wyniki uzyskane podczas badań przesiewowych solubilizacji i oczyszczania białek ROMK wykazały, że najlepsze właściwości solubilizujące wykazuje kopolimer SMA 2,3:1. Kopolimer DIBMA również ekstrahował białka kanałowe, jednak wydajność oczyszczania była niższa niż w przypadku SMA 2,3:1. Natomiast

kopolimery SMA 3:1 i SMA 1,2:1 nie ekstrahowały białka ROMK z błon bakteryjnych. Uzyskane wyniki są zgodne z poprzednimi doniesieniami, które wykazały, że kopolimer SMA 2,3:1 jest najbardziej efektywny w solubilizacji kilku białek błonowych produkowanych w komórkach *E. coli* (Dörr i wsp., 2014; Scheidelaar i wsp., 2016; Grethen i wsp., 2017). Zaobserwowano odmienne zachowania SMA 2,3:1 i SMA 3:1 w czasie symulacji (dynamika molekularna) (Orekhov i wsp., 2019). W opisanych eksperymentach zarówno ekstrakcja białek ROMK za pomocą DDM, jak i kopolimerów była czynnikiem ograniczającym wydajność otrzymywania białka ROMK. Ponadto w obu przypadkach znaczna część wyekstrahowanych białek nie była zatrzymywana na złożu chromatograficznym. Jak już poprzednie badania wykazały powinowactwo między białkiem ze znacznikiem 6xHis znajdującym się w natywnych nanodyskach, a złożem Ni²⁺-NTA może być niskie (Dörr i wsp., 2016). Dodatkowym czynnikiem obniżającym wydajność solubilizacji i wiązania do złoża może być agregacja białka. Wykazano, że białka kanałowe ROMK, podobnie jak inne kanały potasowe, tworzą tetrametry (Koster i wsp., 1998), jednak białka eluowane ze złoża niklowego wykazują wyższe form oligomeryczne. Takie klastry obserwowano już wcześniej w przypadku innych białek tworzących kanały potasowe (Krishnan i wsp., 2005; Pagliuca i wsp., 2007). Tworzenie klastrów bakteryjnego kanału potasowego KcsA zależne było od obecności ujemnie naładowanych lipidów (Renart i wsp., 2020). W przypadku KcsA klastry były labilne i ulegały dysocjacji w obecności detergentów (Giudici i wsp., 2013). W przypadku ROMK agregaty czy też klastry były stabilne w warunkach elektroforezy w warunkach denaturujących w obecności SDS. Agregaty dysocjowały na dimery w czasie przedłużonej inkubacji w 37°C, a użycie nawet silnych związków denaturujących, jak na przykład mocznik pozwoliło jedynie na dysocjację białka ROMK2 do dimerów i niewielkich ilości monomerów. Tworzenie agregatów może być spowodowane nienatywnymi interakcjami między białkami (Drew i wsp., 2003), które mogą wystąpić na skutek oddziaływań hydrofobowych i wiązań wodorowych utworzonych między odsłoniętymi hydrofobowymi regionami białka (Mogk i wsp., 2018). Zaobserwowano pewne różnice w oczyszczaniu pomiędzy białkami ROMK1 oraz ROMK2. Białko ROMK1 było solubilizowane w większym stopniu niż białko ROMK2, co może wynikać z obecności w białku ROMK1 hydrofilowego, dłuższego o 19 aminokwasów N-końca, który może zapobiegać hydrofobowym oddziaływaniom międzycząsteczkowym.

W 2014 roku Dörra i wsp. (Dörr i wsp., 2014) pokazali, że możliwe jest użycie natywnych nanodysków utworzonych z pomocą kopolimerów SMA do bezpośredniej inkorporacji białek kanałowych do sztucznych dwuwarstw lipidowych w celu rejestracji ich aktywności. Jednakże kopolimery amfipatyczne SMA lub DIBMA mają właściwości

membranolityczne. W obecności SMA obserwowano na przykład wyciek barwników fluorescencyjnych z liposomów (Orwick Rydmark i wsp., 2019), dlatego też w tych badaniach w pierwszym kroku sprawdzono wpływ kopolimerów na stabilność elektryczną dwuwarstwy lipidowej. Wykazano, że kopolimery SMA 2,3:1 oraz DIBMA destabilizują własności elektryczne dwuwarstwy lipidowej najprawdopodobniej na skutek inkorporacji do niej polimerów (Xue i wsp., 2018). Jednak po dodaniu nanodysków zawierających białko ROMK te charakterystyczne prądy były rzadko widoczne i łatwe do odróżnienia od aktywności kanałowej. Głównie rejestrowane były wówczas aktywności specyficzne dla kanału ROMK2.

Przewodnictwo jednostkowe białka ROMK2 oczyszczanego z wykorzystaniem detergentu i rekonstruowanego do proteoliposomów, a także rekonstruowanego do polimerowych nanodysków było podobne i wynosiło około 10 pS. Aktywność białka ROMK rejestrowanego z błony komórkowej oocytów *Xenopus laevis* oraz komórek ssaczy obserwowano jako kanał o przewodnictwie około 35 pS (Welling i wsp., 2009; Nichols i wsp., 1994; Palmer i wsp., 1997; Ho i wsp., 1993). Natomiast przewodnictwo jednostkowe przypisywane aktywności szczurzego ROMK2 nadprodukowanego w komórkach H9c2 wynosiła aż około 94 pS. Obserwowane różnice w przewodnictwie jednostkowym kanałów mogą wynikać z obecności lub braku białek akcesorycznych, modyfikacji potranslacyjnych lub z różnic w składzie lipidowym. Wcześniejsze badania wykazały, że w przypadku kanałów Kir aktywność zależy w sposób specyficzny od PIP₂ (Liou i wsp., 1999; Huang i wsp., 1998) oraz w niespecyficzny od anionowych fosfolipidów (Heginbotham i wsp., 1998; Cheng i wsp., 2011; Lee i wsp., 2013). Badania przeprowadzone w 2011 roku wykazały, że zwiększenie stężenia anionowych fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej skutkuje zwiększeniem przewodnictwa jednostkowego kanału Kir2.1, ale także ma wpływ na prawdopodobieństwo otwarcia kanału (Cheng i wsp., 2011).

Uzyskane zależności prądowo-napięciowo sugerują różnice w wartości potencjału odwrócenia pomiędzy kanałami uzyskanymi przez dwie badane metody rekonstrukcji białka. W przypadku proteoliposomów wynosił on $40 \text{ mV} \pm 12 \text{ mV}$, a w przypadku polimerowych nanodysków $16 \text{ mV} \pm 5,3 \text{ mV}$. Należy jednak zwrócić w tym miejscu uwagę, że częstotliwość inkorporacji białka kanałowego z preparatów detergentowych/proteoliposomowych w porównaniu z nanodyskami była znacznie niższa (11% vs. 33%). W rezultacie liczba powtórzeń i danych statystycznych uzyskanych dla detergentu/proteoliposomów może być niewystarczająca do dokładnego oszacowania potencjalnej wartości potencjału odwrócenia dla białka kanałowego inkorporowanego z tego preparatu. Polimerowe nanodyski były wydajniejsze niż detergenty/proteoliposomy do funkcjonalnej rekonstrukcji białka

ROMK2 do sztucznych błon lipidowych, dlatego w dalszych etapach wykorzystywano rekonstrukcję białka do dwuwarstwy lipidowej za pomocą polimerowych nanodysków.

W celu potwierdzenia tożsamości molekularnej obserwowanej aktywności zastosowano znane modulatory białka ROMK. Jony Mg^{2+} zmniejszały wartość przewodnictwa jednostkowego ROMK2. Obserwowany wpływ jonów magnezu na aktywność kanału ROMK2 był zgodny z tym co pokazano wcześniej (Yang i wsp., 2010b). Uważa się, że nieprzewodzone jony Mg^{2+} zajmują z niskim powinowactwem miejsce wiązania znajdujące się w porze kanału konkurując z przepływem jonów potasu przez kanał, co obserwowane jest jako zmniejszenie jego amplitudy (Lu, 2004).

Obecnie najbardziej specyficznym inhibitorem aktywności ROMK jest VU591 (Bhave i wsp., 2011; Swale i wsp., 2015). Hamowanie obserwowanych aktywności jednokanałowych przez ten związek z wysokim prawdopodobieństwem może świadczyć, że pochodzą one od rekonstruowanego białka ROMK2-6xHis. W związku z tym następnie badano wpływ znanych modulatorów $mitoK_{ATP}$ w celu potwierdzenia hipotezy o tożsamości aktywności ROMK2 z wcześniej rejestrowanymi aktywnościami identyfikowanymi jako $mitoK_{ATP}$.

Innym znanym inhibitorem kanału ROMK jest ATP (McNicholas i wsp., 1996; Laskowski i wsp., 2019). Regulacja aktywności plazmatycznego kanału ROMK przez ATP jest skomplikowana w komórce i bierze w niej udział CFTR (Lu i wsp., 2006) oraz kinaza PKA zależna od cAMP, która fosforyluje kanał ROMK2, a także PIP_2 (Liou i wsp., 1999). Jednakże praca McNicholas (McNicholas i wsp., 1996), w której badano wpływ mutacji w przewidywanym motywie Walkera (motyw wiążący ATP) na hamowanie przez ATP, wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie tego nukleotydu z kanałem. Zgodnie z tym w prezentowanych tu doświadczeniach aktywność ROMK2-6xHis hamowana była przez ATP, co potwierdza bezpośrednie jego działanie.

Diazoksyd jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwcukrzycowym (Doyle i wsp. 2003), a także stosowany jest również w leczeniu nadciśnienia (van Hamersvelt i wsp., 1996). Znane są również własności kardioprotekcyjne diazoksydu (Garlid i wsp., 1997), które przypisywane są jego własności bycia specyficznym aktywatorem kanałów $mitoK_{ATP}$ zawierających podjednostkę regulatorową SUR (Bezerra Palácio i wsp., 2021). Jednakże diazoksyd może mieć wiele celów molekularnych (Coetzee, 2013), a w mitochondriach oprócz $mitoK_{ATP}$ może być to syntaza ATP (Contessi i wsp., 2004). Wcześniej zaobserwowano aktywujący wpływ diazoksydu na kanał ROMK2 rejestrowany metodą *patch-clamp* z mitoplastów izolowanych z komórek H9c2 (Laskowski i wsp., 2019). Jednakże tamte wyniki nie odpowiadały na pytanie czy wpływ diazoksydu był bezpośredni, czy też związany

z endogennym białkiem regulatorowym, np. SUR. Prezentowane w niniejszej rozprawie badania wykazały, że diazoksyd zwiększa prawdopodobieństwo otwarć kanału ROMK2-6xHis bez udziału podjednostek regulatorowych.

Ponadto wykazano, że diazoksyd i ATP najprawdopodobniej regulują kanał ROMK2 z tej samej strony. Wiadomo, że miejsce wiązania ATP znajduje się w macierzy mitochondrialnej (Laskowski i wsp., 2019), co sugeruje, że jego efekt związany jest z dyfuzją do wnętrza mitochondriów. Obliczony współczynnik podziału oktanol/woda ($\log P$) dla diazoksydu wynosi 1,2 (XLogP3 3.0), co sugeruje dużą przenikalności tego związku przez błony lipidowe. Co ciekawe, zaobserwowano również wpływ diazoksydu na aktywność kanału podawanego od strony przeciwnej niż strona, po której działał ATP. Wówczas jednak znaczący efekt diazoksydu był widoczny dopiero przy znacznie wyższych stężeniach diazoksydu i w dodatku po upływie dłuższego czasu. Hipotetycznie może być to spowodowane przenikaniem diazoksydu na drugą stronę błony lipidowej. Badania te wymagałyby wykonania większej liczby powtórzeń i zaplanowania dodatkowych eksperymentów, które pozwoliłyby na dokładne określenie miejsca wiązania diazoksydu, jednakże w niniejszej rozprawie nie podjęto dalszej analizy tego zagadnienia.

Obserwowana aktywność hamowana była również przez 5-HD - znany inhibitor kanału mitoK_{ATP} (Szabo i wsp., 2014; Jabůrek i wsp., 1998; Sato i wsp., 2004), co potwierdziło wcześniejsze obserwacje wpływu 5-HD na aktywność ROMK2 rejestrowaną metodą *patch-clamp* z mitoplastów izolowanych z komórek H9c2 (Laskowski i wsp., 2019).

Farmakologiczne profilowanie kanału mitoK_{ATP} obejmuje zwykle badanie wpływu inhibitora kanałów K_{ATP} - glibenklamidu. Przyjęte jest, że glibenklamid w niskich stężeniach (nM) blokuje kanały K_{ATP} z błony plazmatycznej złożone z Kir6.2 i SUR1/SUR2B poprzez wiązanie się do podjednostki SUR2B (Hambrock i wsp., 2002a). Wyższe stężenia glibenklamidu (μM) hamują aktywność ROMK. Jednakże do tej pory nie było wiadomo, czy działanie tego związku wymaga obecności podjednostki typu SUR. Lu i wsp. sugerują, że działanie glibenklamidu jest zależne od obecności białka CFTR (Lu i wsp., 2006), natomiast Konstans i wsp. uważają, że podjednostki typu SUR nie są niezbędne (Konstans i wsp., 2002). Wyniki prezentowane w tej rozprawie wydają się potwierdzać tą ostatnią hipotezę. Ponadto zaobserwowano, że efekt hamowania aktywności przez glibenklamid był odwracalny przez znany aktywator - diazoksyd.

Scharakteryzowanie białka ROMK2 za pomocą dobrze znanych jego modulatorów pozwoliło w dalszych badaniach na sprawdzenie funkcjonalnej zależności pomiędzy białkiem ROMK2 oraz AGK. Wiadomo, że kinaza acyloglicerolowa (AGK) fosforyluje

monoacyloglicerol i diacyloglicerol, tworząc odpowiednio kwas lizofosfatydowy (LPA) i kwas fosfatydowy (PA) (Bektas i wsp., 2005). Kwas lizofosfatydowy (LPA) jest bioaktywnym fosfolipidem znanym jako czynnik regulacyjny funkcji innych kanałów jonowych, takich jak: Kir2.1 (Muessel i wsp., 2013), IKCa (Schilling i wsp., 2004) oraz BK_{Ca} (Choi i wsp., 2013). Odkryto, że aktywność kanału ROMK2 wzrasta po dodaniu LPA. Wzrost obserwowanego prądu kanałowego był ewidentnie spowodowany znacznym wzrostem liczby aktywnych kanałów. Natomiast kwas fosfatydowy (PA) powodował wzrost aktywności kanału tuż po jego dodaniu, jednak po dłuższej chwili obserwowano blokowanie kanału. Wcześniej w literaturze wykazano, że PA aktywuje natywny kanał K_{ATP}, jednakże zjawisko to obserwowane było również tuż po dodaniu PA (Fan i wsp., 2003). Wiadomo, że anionowe fosfolipidy modulują aktywność kanałów poprzez bezpośrednie oddziaływanie (Fan i wsp., 1997; Huang i wsp., 1998; MacGregor i wsp., 2002). Wcześniejsze badania wykazały, że kanały Kir2.1 oraz Kir2.2 są aktywowane nie tylko przez PIP₂, ale również przez inne anionowe lipidy takie jak PG, czy PA (Cheng i wsp., 2011). Metodami dokowania *in silico* zaproponowano dwa miejsca wiązania lipidów w kanałach Kir2.1. Pierwsze miejsce odpowiada miejscu wiązania PIP₂. Drugie natomiast sąsiaduje z miejscem wiązania PIP₂ i jest tworzone przez dwie reszty lizyny z sąsiednich podjednostek. Obserwowano, że mutacja tych lizyn powoduje znaczne zmniejszenie aktywności kanału zarówno w komórkach, jak i po rekonstytucji w liposomach. Ponadto zauważono, że oddziaływanie anionowych fosfolipidów z odrębnym miejscem wiązania skutkuje zmianą konformacyjną kanału, która stabilizuje miejsce o wysokim powinowactwie wobec PIP₂ (Lee i wsp., 2013). Badania przeprowadzone na kanale TRPV1 wykazały, że LPA oddziałuje z miejscem na wewnątrzkomórkowym C-końcu TRPV1, które częściowo zachodzi na miejsce wiązania PIP₂, a także jest regulowane allosterycznie przez PIP₂ (Tigyi, 2012; Nieto-Posadas i wsp., 2012). LPA aktywuje również kanały potasowe K_{2P}, które są regulowane m.in. przez ATP (Chemin i wsp., 2005), a także bezpośrednio poprzez wiązanie w znanym miejscu wiązania PIP₂ LPA reguluje kanał potasowy typu M tworzony przez heterotetrameryczne zespoły podjednostek K_v7.2 i K_v7.3 (Telezhkin i wsp., 2012). Co ciekawe, wśród kanałów regulowanych przez PA duża część wiąże również PIP₂, a wiązanie to zazwyczaj ma działanie antagonizujące. Na przykład PIP₂ hamuje TREK1, podczas gdy PA go aktywuje (Cabanos i wsp., 2017), a w przypadku kanałów Kir2.x PA hamuje ich aktywność, podczas gdy PIP₂ ją aktywuje (Hansen i wsp., 2011). Robinson i wsp. (Robinson i wsp., 2019) zaproponowali, że w przypadku kanałów obserwowane antagonizujące zachowanie może być związane z lokalną konkurencją PA z PIP₂. Również w przypadku ROMK2 obserwujemy tę zależność, gdyż uważa się, że ROMK2 jest aktywowany przez PIP₂,

a z przeprowadzonych badań wynika, iż jest hamowany przez PA. Można zatem spekulować, że w przypadku białka ROMK2 możliwe jest również istnienie mechanizmu współzawodnictwa pomiędzy PIP₂, a LPA, jak i PA o interakcję ze znanym miejscem wiązania PIP₂. W wyniku zajęcia przez LPA lub PA tego miejsca dochodzi do regulacji aktywności kanału ROMK2.

Ponadto należy mieć również na uwadze, że za wiązanie anionowych lipidów LPA oraz PA może być także odpowiedzialny dodatnio naładowany N-końcowy fragment białka ROMK2, który również może oddziaływać z ujemnie naładowanymi grupami lipidów.

Interakcje AGK w mitochondriach i z DGKE w błonie komórkowej z ROMK2 mogą skutkować regulacją aktywności tego kanału przez lokalną syntezę PA, czy LPA. Analogiczny model został zaproponowany ostatnio dla kanału TREK-1 oddziałującego z fosfolipazą D2 (PLD2), której produktem aktywności jest PA (Robinson i wsp. 2019).

Ponadto wiadomo, że kinaza AGK do syntezy LPA i PA zużywa ATP. Hipotetycznie więc można sądzić, że regulacja ROMK2 może być wynikiem nie tylko wzrostu stężenia LPA lub PA, ale też lokalnego spadku stężenia ATP.

Podsumowując, właściwości biofizyczne i profil farmakologiczny kanału ROMK2 produkowanego w bakteriach są zbliżone do właściwości biofizycznych i profilu farmakologicznego kanałów ROMK2 i mitoK_{ATP} opisanych wcześniej dla komórek ssaczy. Wszystkie przedstawione wyniki wspierają hipotezę mówiącą, że białko ROMK2 jest potencjalnym składnikiem kanału mitoK_{ATP} (Foster i wsp., 2012), jednakże należy pamiętać, że również inne białko (CCDC51) może tworzyć ten typ kanału w mitochondriach (Paggio i wsp., 2019).

8. PODSUMOWANIE

W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki badań nad interakcjami białko-białko oraz białko-drobnocząsteczkowy modulator dla kanału ROMK2.

W pierwszym etapie badań przy użyciu metody biotynylacji białek sąsiadujących zidentyfikowano białka wchodzące w skład najbliższego otoczenia ROMK2. Wśród nich znalazły się m.in. białka cytoplazmatyczne biorące udział w wielu procesach komórkowych (tj. egzocytoza, transport pęcherzykowy, synteza nukleotydów czy też metabolizm lipidów). Wśród białek biotynylowanych zidentyfikowano również białka kompleksów translokaz z zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej - w tym kinazę acyloglicerolową (AGK), która oprócz importu polipolipowych białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej uczestniczy w syntezie lipidów: kwasu lizofosfatydowego (LPA) oraz kwasu fosfatydowego (PA).

Po raz pierwszy, dzięki zastosowaniu metody koimmunoprecypitacji, wykazano obecność kompleksu zawierającego białko ROMK2 oraz AGK.

Zastosowanie heterologicznej ekspresji ROMK2 w celu zbadania funkcjonalnych relacji pomiędzy białkiem ROMK2, a AGK pozwoliło na dodatkowe obserwacje. Wykazano, że polimerowe nanodyski są wydajną metodą oczyszczania i rekonstrukcji białka ROMK2 produkowanego w bakterii *Escherichia coli*. Ponadto nanodyski polimerowe okazały się wydajniejsze niż detergenty/liposomy do funkcjonalnej rekonstrukcji białka do planarnych dwuwarstw lipidowych (PLB), co z sukcesem wykorzystano do scharakteryzowania farmakologii kanału ROMK2.

Wykazano, że aktywność białka ROMK2 jest regulowana przez znane modulatory kanału mitoK_{ATP}, tj. ATP/Mg²⁺, glibenklamid, 5-HD czy też diazoksyd. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że białko ROMK2 może być podstawową jednostką budującą mitoK_{ATP}. Dodatkowo badania te wykazały, że wpływ modulatorów jest bezpośredni, a nie związany z obecnością białek akcesoryjnych.

Poprzez zbadanie wpływu produktów aktywności enzymatycznej AGK, tj. kwasu lizofosfatydowego (LPA) i kwasu fosfatydowego (PA), wykazano ponadto funkcjonalną zależność zidentyfikowanej interakcji pomiędzy białkiem ROMK2 i AGK.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Akao, M., Ohler, A., O'Rourke, B., Marbán, E. 2001. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res*, 88, 1267-75.
2. Akopova, O. V., Nosar, V. I., Bouryi, V. A., Mankovskaya, I. N., Sagach, V. F. 2010. Influence of ATP-dependent K(+)-channel opener on K(+)-cycle and oxygen consumption in rat liver mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*, 75, 1139-1147.
3. Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A. 2011. Ion Channels. *British Journal of Pharmacology*, 164, S137-S174.
4. Anastacio, M. M., Kanter, E. M., Keith, A. D., Schuessler, R. B., Nichols, C. G., Lawton, J. S. 2013a. Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Diazoxide Is Independent of the ATP-Sensitive Potassium Channel Subunit Sulfonylurea Type 1 Receptor. *J Am Coll Surg*, 216, 1144-1149.
5. Anastacio, M. M., Kanter, E. M., Makepeace, C., Keith, A. D., Zhang, H., Schuessler, R. B., Nichols, C. G., Lawton, J. S. 2013b. Cardioprotective mechanism of diazoxide involves the inhibition of succinate dehydrogenase. *The Annals of thoracic surgery*, 95, 2042-2050.
6. Angelisová, P., Ballek, O., Sýkora, J., Benada, O., Čajka, T., Pokorná, J., Pinkas, D., Hořejší, V. 2019. The use of styrene-maleic acid copolymer (SMA) for studies on T cell membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861, 130-141.
7. Ardehali, H., Chen, Z., Ko, Y., Mejía-Alvarez, R., Marbán, E. 2004. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11880-11885.
8. Arenas Jiménez, M. D., Navarro Tellez, P. 2018. Use of diazoxide in hypoglycemia with hyperinsulinemia in hemodialysis. *Nefrologia (Engl Ed)*, 38, 220-221.
9. Århem, P. 2004. Voltage sensing in ion channels: a 50-year-old mystery resolved? *The Lancet*, 363, 1221-1223.
10. Aryal, P., Sansom, M. S., Tucker, S. J. 2015. Hydrophobic gating in ion channels. *J Mol Biol*, 427, 121-30.

11. Augustynek, B., Kunz, W. S., Szewczyk, A. 2017. Guide to the Pharmacology of Mitochondrial Potassium Channels. *Handb Exp Pharmacol*, 240, 103-127.
12. Babenko, A. P., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. 1998. A view of sur/KIR6.X, K(ATP) channels. *Annu Rev Physiol*, 60, 667-687.
13. Bachmann, M., Li, W., Edwards, M. J., Ahmad, S. A., Patel, S., Szabo, I., Gulbins, E. 2020. Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death. *Front Cell Dev Biol*, 8, 611853.
14. Bada Juarez, J. F., Harper, A. J., Judge, P. J., Tonge, S. R., Watts, A. 2019. From polymer chemistry to structural biology: The development of SMA and related amphipathic polymers for membrane protein extraction and solubilisation. *Chem Phys Lipids*, 221, 167-175.
15. Baeta, T., Giandoreggio-Barranco, K., Ayala, I., Moura, E. C. C. M., Sperandeo, P., Polissi, A., Simorre, J.-P., Laguri, C. 2021. LptB2FG is an ABC transporter with Adenylate Kinase activity regulated by LptC/A recruitment. *bioRxiv*, (preprint) 2021.07.08.451440.
16. Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liaudet, L., Pacher, P. 2015. Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends Endocrinol Metab*, 26, 75-83.
17. Bajgar, R., Seetharaman, S., Kowaltowski, A. J., Garlid, K. D., Paucek, P. 2001. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem*, 276, 33369-33374.
18. Bao, L., Rapin, A. M., Holmstrand, E. C., Cox, D. H. 2002. Elimination of the BK(Ca) channel's high-affinity Ca(2+) sensitivity. *J Gen Physiol*, 120, 173-89.
19. Baronas, V. A., Kurata, H. T. 2014. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Frontiers in Physiology*, 5, 352.
20. Beckett, D., Kovaleva, E., Schatz, P. J. 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*, 8, 921-929.
21. Bednarczyk, P., Dolowy, K., Szewczyk, A. 2005. Matrix Mg(2+) regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett*, 579, 1625-1632.

22. Bednarczyk, P., Kicinska, A., Kominkova, V., Ondrias, K., Dolowy, K., Szewczyk, A. 2004. Quinine inhibits mitochondrial ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J Membr Biol*, 199, 63-72.
23. Bednarczyk, P., Kicinska, A., Laskowski, M., Kulawiak, B., Kampa, R., Walewska, A., Krajewska, M., Jarmuszkiewicz, W., Szewczyk, A. 2018. Evidence for a mitochondrial ATP-regulated potassium channel in human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859, 309-318.
24. Bednarczyk, P., Wieckowski, M. R., Broszkiewicz, M., Skowronek, K., Siemen, D., Szewczyk, A. 2013. Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BKCa Channel to the Respiratory Chain. *PLoS One*, 8, e68125.
25. Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschütz, R., Pongs, O. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett*, 474, 99-106.
26. Bektas, M., Payne, S. G., Liu, H., Goparaju, S., Milstien, S., Spiegel, S. 2005. A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J Cell Biol*, 169, 801-11.
27. Bezerra Palácio, P., Brito Lucas, A. M., Varlla De Lacerda Alexandre, J., Oliveira Cunha, P. L., Ponte Viana, Y. I., Albuquerque, A. C., Nunes Varela, A. L., Facundo, H. T. 2021. Pharmacological and molecular docking studies reveal that glibenclamide competitively inhibits diazoxide-induced mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation and pharmacological preconditioning. *European Journal of Pharmacology*, 908, 174379.
28. Bhave, G., Chauder, B. A., Liu, W., Dawson, E. S., Kadakia, R., Nguyen, T. T., Lewis, L. M., Meiler, J., Weaver, C. D., Satlin, L. M., Lindsley, C. W., Denton, J. S. 2011. Development of a selective small-molecule inhibitor of Kir1.1, the renal outer medullary potassium channel. *Mol Pharmacol*, 79, 42-50.
29. Boim, M. A., Ho, K., Shuck, M. E., Bienkowski, M. J., Block, J. H., Slightom, J. L., Yang, Y., Brenner, B. M., Hebert, S. C. 1995. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol*, 268, F1132-1140.

30. Bonifacino, J. S., Gershlick, D. C., Dell'Angelica, E. C. 2016. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol*, 71:7.2.1-7.2.24.
31. Bracey, K., Ju, M., Tian, C., Stevens, L., Wray, D. 2008. Tubulin as a binding partner of the heag2 voltage-gated potassium channel. *J Membr Biol*, 222, 115-25.
32. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
33. Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., Ting, A. Y. 2018. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, 36, 880-887.
34. Buckingham, S. D., Kidd, J. F., Law, R. J., Franks, C. J., Sattelle, D. B. 2005. Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 361-367.
35. Buss, F., Arden, S. D., Lindsay, M., Luzio, J. P., Kendrick-Jones, J. 2001. Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J*, 20, 3676-84.
36. Cabanos, C., Wang, M., Han, X., Hansen, S. B. 2017. A Soluble Fluorescent Binding Assay Reveals PIP(2) Antagonism of TREK-1 Channels. *Cell Rep*, 20, 1287-1294.
37. Callegari, S., Cruz-Zaragoza, L. D., Rehling, P. 2020. From TOM to the TIM23 complex – handing over of a precursor. *Biological Chemistry*, 401, 709-721.
38. Cancherini, D. V., Trabuco, L. G., Reboucas, N. A., Kowaltowski, A. J. 2003. ATP-sensitive K(+) channels in renal mitochondria. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F1291-F1296.
39. Chapman-Smith, A., Cronan, J. E. 1999. The enzymatic biotinylation of proteins a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochemical Science*, 24, 359-363.
40. Checchetto, V., Leanza, L., De Stefani, D., Rizzuto, R., Gulbins, E., Szabo, I. 2021. Mitochondrial K(+) channels and their implications for disease mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 227, 107874.

41. Chemin, J., Patel, A., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M., Honoré, E. 2005. Lysophosphatidic acid-operated K(+) channels. *J Biol Chem*, 280, 4415-21.
42. Chen, X., Feng, L., Yao, H., Yang, L., Qin, Y. 2021. Efficacy and safety of diazoxide for treating hyperinsulinemic hypoglycemia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 16, e0246463.
43. Cheng, W. W. L., D'Avanzo, N., Doyle, D. A., Nichols, C. G. 2011. Dual-mode phospholipid regulation of human inward rectifying potassium channels. *Biophys J*, 100, 620-628.
44. Choe, H., Zhou, H., Palmer, L. G., Sackin, H. 1997. A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol*, 273, F516-29.
45. Choi-Rhee, E., Schulman, H., Cronan, J. E. 2004. Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Sci*, 13, 3043-50.
46. Choi, S. H., Lee, B. H., Kim, H. J., Hwang, S. H., Lee, S. M., Nah, S. Y. 2013. Activation of lysophosphatidic Acid receptor is coupled to enhancement of Ca(2+)-activated potassium channel currents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 17, 223-228.
47. Choma, K., Bednarczyk, P., Koszela-Piotrowska, I., Kulawiak, B., Kudin, A., Kunz, W. S., Dolowy, K., Szewczyk, A. 2009. Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 41, 323-334.
48. Coetzee, W. A. 2013. Multiplicity of effectors of the cardioprotective agent, diazoxide. *Pharmacol Ther*, 140, 167-75.
49. Comelli, M., Metelli, G., Mavelli, I. 2007. Downmodulation of mitochondrial F0F1 ATP synthase by diazoxide in cardiac myoblasts: a dual effect of the drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H820-829.
50. Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., Kofuji, P. 2004. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem*, 279, 28387-28392.
51. Contessi, S., Metelli, G., Mavelli, I., Lippe, G. 2004. Diazoxide affects the IF1 inhibitor protein binding to F1 sector of beef heart F0F1ATP-synthase. *Biochem Pharmacol*, 67, 1843-1851.

52. Corradi, V., Sejdiu, B. I., Mesa-Galloso, H., Abdizadeh, H., Noskov, S. Y., Marrink, S. J., Tieleman, D. P. 2019. Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions. *Chemical reviews*, 119, 5775-5848.
53. Costa, A. D., Quinlan, C. L., Andrukhiv, A., West, I. C., Jabůrek, M., Garlid, K. D. 2006. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H406-415.
54. Costa, E. A., Subramanian, K., Nunnari, J., Weissman, J. S. 2018. Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science*, 359, 689-692.
55. Cuong, D. V., Kim, N., Joo, H., Youm, J. B., Chung, J.-Y., Lee, Y., Park, W. S., Kim, E., Park, Y. S., Han, J. 2005. Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts. *Mitochondrion*, 5, 121-133.
56. D'Alonzo, A. J., Darbenzio, R. B., Sewter, J. C., Hess, T. A., Grover, G. J., Sleph, P. G., Normandin, D. E., Lodge, N. J. 1995. A comparison between the effects of BMS-180448, a novel K(+) channel opener, and cromakalim in rat and dog. *European Journal of Pharmacology*, 294, 271-280.
57. D'Alonzo, A. J., Grover, G. J., Darbenzio, R. B., Sewter, J. C., Hess, T. A., Dzwonczyk, S., Sleph, P. G. 1996. Hemodynamic and Cardiac Effects of BMS-180448, a Novel K(+)ATP Opener, in Anesthetized Dogs and Isolated Rat Hearts. *Pharmacology*, 52, 101-112.
58. Dahlem, Y. A., Horn, T. F., 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.
59. Das, D. K., Maulik, N., Sato, M., Ray, P. S. 1999. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem*, 196, 59-67.
60. Dascal, N., Kahanovitch, U. 2015. Chapter Two - The Roles of G $\beta\gamma$ and G α in Gating and Regulation of GIRK Channels. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press, Slesinger, P. A. & Wickman, K. (eds.), 123, pp. 27-85.
61. De Boer, T. P., Nalos, L., Stary, A., Kok, B., Houtman, M. J., Antoons, G., Van Veen, T. A., Beekman, J. D., De Groot, B. L., Ophhof, T., Rook, M. B., Vos, M. A., Van Der

- Heyden, M. A. 2010. The anti-protozoal drug pentamidine blocks KIR2.x-mediated inward rectifier current by entering the cytoplasmic pore region of the channel. *Br J Pharmacol*, 159, 1532-1541.
62. Debska, G., Kicinska, A., Skalska, J., Szewczyk, A., May, R., Elger, C. E., Kunz, W. S. 2002. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1556, 97-105.
63. Debska, G., May, R., Kicinska, A., Szewczyk, A., Elger, C. E., Kunz, W. S. 2001. Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res*, 892, 42-50.
64. Decher, N., Rinné, S., Bedoya, M., Gonzalez, W., Kiper, A. K. 2021. Molecular Pharmacology of K(2P) Potassium Channels. *Cell Physiol Biochem*, 55, 87-107.
65. Deniaud, A., Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Juillan-Binard, C., Vernet, T., Rolland, N., Pebay-Peyroula, E. 2011. Expression of a chloroplast ATP/ADP transporter in *E. coli* membranes: Behind the Mistic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 2059-2066.
66. Desrames, A., Genetet, S., Delcourt, M. P., Goossens, D., Mouro-Chanteloup, I. 2020. Detergent-free isolation of native red blood cell membrane complexes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862, 183126.
67. Dilworth, M. V., Findlay, H. E., Booth, P. J. 2021. Detergent-free purification and reconstitution of functional human serotonin transporter (SERT) using diisobutylene maleic acid (DIBMA) copolymer. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1863, 183602.
68. Domínguez Pardo, J. J., Koorengel, M. C., Uwugiaren, N., Weijers, J., Kopf, A. H., Jahn, H., Van Walree, C. A., Van Steenberg, M. J., Killian, J. A. 2018. Membrane Solubilization by Styrene-Maleic Acid Copolymers: Delineating the Role of Polymer Length. *Biophys J*, 115, 129-138.
69. Dong, K., Tang, L., Macgregor, G. G., Hebert, S. C. 2002. Localization of the ATP/phosphatidylinositol 4,5 diphosphate-binding site to a 39-amino acid region of the carboxyl terminus of the ATP-regulated K(+) channel Kir1.1. *J Biol Chem*, 277, 49366-49373.
70. Döring, F., Derst, C., Wischmeyer, E., Karschin, C., Schneggenburger, R., Daut, J., Karschin, A. 1998. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K(+)

permeation properties. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18, 8625-8636.

71. Dörr, J. M., Koorengel, M. C., Schafer, M., Prokofyev, A. V., Scheidelaar, S., Van Der Crujisen, E. A., Dafforn, T. R., Baldus, M. & Killian, J. A. 2014. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K(+) channel: the power of native nanodiscs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 18607-12.
72. Dörr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengel, M. C., Dominguez, J. J., Schäfer, M., Van Walree, C. A., Killian, J. A. 2016. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur Biophys J*, 45, 3-21.
73. Dos Santos, P., Kowaltowski, A. J., Laclau, M. N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J. B., Tariosse, L., Garlid, K. D. 2002. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283, H284-H295.
74. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Mackinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K(+) conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
75. Doyle, M. E., Egan, J. M. 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev*, 55, 105-31.
76. Drew, D., Fröderberg, L., Baars, L., De Gier, J.-W. L. 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610, 3-10.
77. Dreyer, I., Uozumi, N. 2011. Potassium channels in plant cells. *FEBS J*, 278, 4293-303.
78. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating iap inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
79. Ecelbarger, C. A., Kim, G. H., Knepper, M. A., Liu, J., Tate, M., Welling, P. A., Wade, J. B. 2001. Regulation of potassium channel Kir 1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's loop. *J Am Soc Nephrol*, 12, 10-18.
80. Eells, J. T., Henry, M. M., Gross, G. J., Baker, J. E. 2000. Increased Mitochondrial K(ATP) Channel Activity During Chronic Myocardial Hypoxia. *Circ Res*, 87, 915-921.

81. Engbersen, R., Masereeuw, R., Van Gestel, M. A., Van Der Logt, E. M., Smits, P., Russel, F. G. 2005. Glibenclamide depletes ATP in renal proximal tubular cells by interfering with mitochondrial metabolism. *Br J Pharmacol*, 145, 1069-1075.
82. English, A. R., Voeltz, G. K. 2013. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a013227.
83. Enyedi, P., Czirják, G. 2010. Molecular background of leak K(+) currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90, 559-605.
84. Enyedi, P., Veres, I., Braun, G., Czirjak, G. 2014. Tubulin binds to the cytoplasmic loop of TRESK background K(+) channel in vitro. *PLoS One*, 9, e97854.
85. Esmaili, M., Overduin, M. 2018. Membrane biology visualized in nanometer-sized discs formed by styrene maleic acid polymers. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860, 257-263.
86. Facundo, H. T., Fornazari, M., Kowaltowski, A. J. 2006. Tissue protection mediated by mitochondrial K(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 202-212.
87. Fahanik-Babaei, J., Eliassi, A., Saghiri, R. 2012. Biophysical and electropharmacological properties of single mitoKATP channel in rat brain mitochondrial inner membrane. *Physiol Pharmacol*, 16, 283-299.
88. Fan, Z., Gao, L., Wang, W. 2003. Phosphatidic acid stimulates cardiac K(ATP) channels like phosphatidylinositols, but with novel gating kinetics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C94-C102.
89. Fan, Z., Makielski, J. C. 1997. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem*, 272, 5388-5395.
90. Fang, L., Garuti, R., Kim, B. Y., Wade, J. B., Welling, P. A. 2009. The ARH adaptor protein regulates endocytosis of the ROMK potassium secretory channel in mouse kidney. *J Clin Invest*, 119, 3278-3289.
91. Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K. G., Cahalan, M. D., Aiyar, J. 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem*, 274, 5746-54.

92. Fazio, A., Owusu Obeng, E., Rusciano, I., Marvi, M. V., Zoli, M., Mongiorgi, S., Ramazzotti, G., Follo, M. Y., Mccubrey, J. A., Cocco, L., Manzoli, L., Ratti, S. 2020. Subcellular Localization Relevance and Cancer-Associated Mechanisms of Diacylglycerol Kinases. *Int J Mol Sci*, 21, 5297.
93. Felix, J. P., Liu, J., Schmalhofer, W. A., Bailey, T., Bednarek, M. A., Kinkel, S., Weinglass, A. B., Kohler, M., Kaczorowski, G. J., Priest, B. T., Garcia, M. L. 2006. Characterization of Kir1.1 Channels with the Use of a Radiolabeled Derivative of Tertiapin. *Biochemistry*, 45, 10129-10139.
94. Forbes, R. A., Steenbergen, C., Murphy, E. 2001a. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res*, 88, 802-809.
95. Foster, B. D., Rucker, J. J., Marbán, E. 2008. Is Kir6.1 a subunit of mitoK(ATP)? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 649-656.
96. Foster, D. B., Ho, A. S., Rucker, J., Garlid, A. O., Chen, L., Sidor, A., Garlid, K. D. & O'Rourke, B. 2012. Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res*, 111, 446-54.
97. Franchini, L., Levi, G., Visentin, S. 2004. Inwardly rectifying K(+) channels influence Ca(2+) entry due to nucleotide receptor activation in microglia. *Cell Calcium*, 35, 449-59.
98. Fu, J., Jin, Y., Arend, L. J. 2003. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem*, 278, 52660-52672.
99. Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.-C., Tomii, K., Horton, P., Imai, K. 2015. MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 14, 1113-1126.
100. Garcia, M. L., Priest, B. T., Alonso-Galicia, M., Zhou, X., Felix, J. P., Brochu, R. M., Bailey, T., Thomas-Fowlkes, B., Liu, J., Swensen, A., Pai, L.-Y., Xiao, J., Hernandez, M., Hoagland, K., Owens, K., Tang, H., De Jesus, R. K., Roy, S., Kaczorowski, G. J., Pasternak, A. 2014. Pharmacologic Inhibition of the Renal Outer Medullary Potassium Channel Causes Diuresis and Natriuresis in the Absence of Kaliuresis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348, 153.

101. Garlid, K. D. 2000. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart – what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol*, 95, 275-279.
102. Garlid, K. D., Paucek, P. 2001. The Mitochondrial Potassium Cycle. *IUBMB Life*, 52, 153-158.
103. Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D'Alonzo, A. J., Lodge, N. J., Smith, M. A., Grover, G. J. 1997. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 81, 1072-82.
104. Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., Schindler, P. A. 1996. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*, 271, 8796-8799.
105. Giebisch, G. 1998. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol*, 274, F817-F833.
106. Giudici, A. M., Molina, M. L., Ayala, J. L., Montoya, E., Renart, M. L., Fernández, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Poveda, J. A. & González-Ros, J. M. 2013. Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 193-200.
107. Gonzalez-Perez, V., Lingle, C. J. 2019. Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits. *Annu Rev Physiol*, 81, 113-137.
108. González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., Latorre, R. 2012. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol*, 2, 2087-2149.
109. Goswami, C., Dreger, M., Janel, R., Bogen, O., Gillen, C., Hucho, F. 2004. Identification and characterization of a Ca(2+)-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem*, 91, 1092-1103.
110. Grethen, A., Oluwole, A. O., Danielczak, B., Vargas, C., Keller, S. 2017. Thermodynamics of nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid (2:1) copolymer. *Scientific Reports*, 7, 11517.
111. Grover, G. J., McCullough, J. R., Henry, D. E., Conder, M. L., Sleph, P. G. 1989. Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and

- the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther.*, 251, 98-104.
112. Grover, G. J., Parham, C. S., Whigan, D. B., Mitroka, J. G. 1996. BMS-180448, a novel glyburide-reversible cardioprotective agent, enhances postischemic recovery of contractile function in dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276, 380-387.
 113. Guettier, J.-M., Gorden, P. 2010. Insulin secretion and insulin-producing tumors. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 5, 217-227.
 114. Gulamhussein, A. A., Meah, D., Soja, D. D., Fenner, S., Saidani, Z., Akram, A., Lallie, S., Mathews, A., Painter, C., Liddar, M. K., Mohammed, Z., Chiu, L. K., Sumar, S. S., Healy, H., Hussain, N., Patel, J. H., Hall, S. C. L., Dafforn, T. R., Rothnie, A. J. 2019. Examining the stability of membrane proteins within SMALPs. *European Polymer Journal*, 112, 120-125.
 115. Gulamhussein, A. A., Uddin, R., Tighe, B. J., Poyner, D. R., Rothnie, A. J. 2020. A comparison of SMA (styrene maleic acid) and DIBMA (di-isobutylene maleic acid) for membrane protein purification. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862, 183281.
 116. Gulati, S., Jamshad, M., Knowles, T. J., Morrison, K. A., Downing, R., Cant, N., Collins, R., Koenderink, J. B., Ford, R. C., Overduin, M., Kerr, I. D., Dafforn, T. R., Rothnie, A. J. 2014. Detergent-free purification of ABC (ATP-binding-cassette) transporters. *Biochem J*, 461, 269-278.
 117. Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., Wang, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57, 473.
 118. Hambrook, A., Löffler-Walz, C. & Quast, U. 2002a. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British journal of pharmacology*, 136, 995-1004.
 119. Hambrook, A., Preisig-Müller, R., Russ, U., Piehl, A., Hanley, P. J., Ray, J., Daut, J., Quast, U. & Derst, C. 2002b. Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C587-C598.

120. Hamm-Alvarez, S. F., Sheetz, M. P. 1998. Microtubule-Dependent Vesicle Transport: Modulation of Channel and Transporter Activity in Liver and Kidney. *Physiological Reviews*, 78, 1109-1129.
121. Hansen, S. B., Tao, X., Mackinnon, R. 2011. Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K(+) channel Kir2.2. *Nature*, 477, 495-498.
122. Hebert, S. C., Desir, G., Giebisch, G., Wang, W. 2005. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev*, 85, 319-371.
123. Hedstrom, L. 2009. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chemical reviews*, 109, 2903-2928.
124. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., Miller, C. 1998. Functional reconstitution of a prokaryotic K(+) channel. *J Gen Physiol*, 111, 741-749.
125. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., Mackinnon, R. 1994. Mutations in the K(+) channel signature sequence. *Biophysical journal*, 66, 1061-1067.
126. Henry, P., Pearson, W. L., Nichols, C. G. 1996. Protein kinase C inhibition of cloned inward rectifier (HRK1/KIR2.3) K(+) channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 495, 681-688.
127. Hibino, H., Fujita, A., Iwai, K., Yamada, M. & Kurachi, Y. 2004. Differential assembly of inwardly rectifying K+ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem*, 279, 44065-73.
128. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. 2010a. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90, 291-366.
129. Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., Kurachi, Y. 2010b. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch*, 459, 521-533.
130. Hilgemann, D. W., Ball, R. 1996. Regulation of cardiac Na(+), Ca(2+) exchange and K(ATP) potassium channels by PIP2. *Science*, 273, 956-599.
131. Hilgemann, D. W., Feng, S., Nasuhoglu, C. 2001. The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE*, 2001, re19.

132. Hirschberg, B., Maylie, J., Adelman, J. P., Marrion, N. V. 1999. Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys J*, 77, 1905-1913.
133. Ho, I. H., Murrell-Lagnado, R. D. 1999. Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K(+) channels. *J Biol Chem*, 274, 8639-8648.
134. Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V., Hebert, S. C. 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*, 363, 31-38.
135. Holmuhamedov, E. L., Wang, L., Terzic, A. 1999. ATP-sensitive K(+) channel openers prevent Ca(2+) overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*, 519, 347-360.
136. Home, P. 2013. Insulin Therapy and Cancer. *Diabetes Care*, 36, S240.
137. Horsey, A. J., Briggs, D. A., Holliday, N. D., Briddon, S. J., Kerr, I. D. 2020. Application of fluorescence correlation spectroscopy to study substrate binding in styrene maleic acid lipid copolymer encapsulated ABCG2. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862, 183218.
138. Horwich, A. L., Kalousek, F., Fenton, W. A., Pollock, R. A., Rosenberg, L. E. 1986. Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: Definition of critical regions and residues in the leader peptide. *Cell*, 44, 451-459.
139. Horwich, A. L., Kalousek, F., Rosenberg, L. E. 1985. Arginine in the leader peptide is required for both import and proteolytic cleavage of a mitochondrial precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4930-4933.
140. Huang, C. L., Feng, S., Hilgemann, D. W. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbg. *Nature*, 391, 803-806.
141. Hughes, B. A., Kumar, G., Yuan, Y., Swaminathan, A., Yan, D., Sharma, A., Plumley, L., Yang-Feng, T. L., Swaroop, A. 2000. Cloning and functional expression of human retinal kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K(+) channel. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C771-C784.
142. Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. 1995. Reconstitution of IK(ATP): an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270, 1166-1170.

143. Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., Higuti, T. 1991. ATP-sensitive K(+) channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 352, 244-247.
144. Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., Maylie, J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 11651.
145. Isomoto, S., Kondo, C., Kurachi, Y. 1997. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol*, 47, 11-39.
146. Iwai, T., Tanonaka, K., Koshimizu, M., Takeo, S. 2000. Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *British Journal of Pharmacology*, 129, 1219-1227.
147. Jabůrek, M., Yarov-Yarovoy, V., Paucek, P., Garlid, K. D. 1998. State-dependent inhibition of the mitochondrial K(ATP) channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem*, 273, 13578-13582.
148. Jackson, T. D., Hock, D. H., Fujihara, K. M., Palmer, C. S., Frazier, A. E., Low, Y. C., Kang, Y., Ang, C. S., Clemons, N. J., Thorburn, D. R., Stroud, D. A., Stojanovski, D. 2021. The TIM22 complex mediates the import of sideroflexins and is required for efficient mitochondrial one-carbon metabolism. *Mol Biol Cell*, 32, 475-491.
149. Jamshad, M., Charlton, J., Lin, Y. P., Routledge, S. J., Bawa, Z., Knowles, T. J., Overduin, M., Dekker, N., Dafforn, T. R., Bill, R. M., Poyner, D. R., Wheatley, M. 2015. G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent. *Biosci Rep*, 35, e00188.
150. Ji, W., Foo, J. N., O'Roak, B. J., Zhao, H., Larson, M. G., Simon, D. B., Newton-Cheh, C., State, M. W., Levy, D., Lifton, R. P. 2008. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet*, 40, 592-599.
151. Jiang, M. T., Ljubkovic, M., Nakae, Y., Shi, Y., Kwok, W. M., Stowe, D. F., Bosnjak, Z. J. 2006. Characterization of human cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel and its regulation by phorbol ester in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H1770-H1776.
152. Jin, W., Klem, A. M., Lewis, J. H., Lu, Z. 1999. Mechanisms of Inward-Rectifier K(+) Channel Inhibition by Tertiapin-Q. *Biochemistry*, 38, 14294-14301.

153. Jin, W., Lu, Z. 1998. A Novel High-Affinity Inhibitor for Inward-Rectifier K(+) Channels. *Biochemistry*, 37, 13291-13299.
154. Jodaitis, L., Van Oene, T., Martens, C. 2021. Assessing the Role of Lipids in the Molecular Mechanism of Membrane Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7267.
155. Kaneko, H., Kitoh, H., Matsuura, T., Masuda, A., Ito, M., Mottes, M., Rauch, F., Ishiguro, N., Ohno, K. 2011. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in GPATCH8. *Human Genetics*, 130, 671-683.
156. Kang, Y., Fielden, L. F. & Stojanovski, D. 2018. Mitochondrial protein transport in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 76, 142-153.
157. Kang, Y., Stroud, D. A., Baker, M. J., De Souza, D. P., Frazier, A. E., Liem, M., Tull, D., Mathivanan, S., Mcconville, M. J., Thorburn, D. R., Ryan, M. T., Stojanovski, D. 2017. Sengers Syndrome-Associated Mitochondrial Acylglycerol Kinase Is a Subunit of the Human TIM22 Protein Import Complex. *Mol Cell*, 67, 457-470e5.
158. Kanjhan, R., Coulson, E. J., Adams, D. J., Bellingham, M. C. 2005. Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther*, 314, 1353-1361.
159. Karle, C. A., Zitron, E., Zhang, W., Wendt-Nordahl, G., Kathöfer, S., Thomas, D., Gut, B., Scholz, E., Vahl, C. F., Katus, H. A., Kiehn, J. 2002. Human cardiac inwardly-rectifying K(+) channel Kir(2.1b) is inhibited by direct protein kinase C-dependent regulation in human isolated cardiomyocytes and in an expression system. *Circulation*, 106, 1493-1499.
160. Károlyi, L., Konrad, M., Köckerling, A., Ziegler, A., Zimmermann, D. K., Roth, B., Wieg, C., Grzeschik, K. H., Koch, M. C., Seyberth, H. W., i wsp. 1997. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes. *Hum Mol Genet*, 6, 17-26.
161. Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., Goldstein, S. A. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376, 690-695.

162. Kicinska, A., Swida, A., Bednarczyk, P., Koszela-Piotrowska, I., Choma, K., Dolowy, K., Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W. 2007. ATP-sensitive potassium channel in mitochondria of the eukaryotic microorganism *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*, 282, 17433-17441.
163. Kim, D. I., Birendra, K. C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., Roux, K. J. 2014. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E2453-E2461.
164. Kintaka, R., Makanae, K., Moriya, H. 2016. Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. *Scientific Reports*, 6, 31774.
165. Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., Adelman, J. P. 1996. Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Mammalian Brain. *Science*, 273, 1709.
166. Konstas, A. A., Dabrowski, M., Korbmacher, C., Tucker, S. J. 2002. Intrinsic sensitivity of Kir1.1 (ROMK) to glibenclamide in the absence of SUR2B. Implications for the identity of the renal ATP-regulated secretory K(+) channel. *J Biol Chem*, 277, 21346-21351.
167. Kopf, A. H., Dörr, J. M., Koorengel, M. C., Antoniciello, F., Jahn, H., Killian, J. A. 2020. Factors influencing the solubilization of membrane proteins from *Escherichia coli* membranes by styrene-maleic acid copolymers. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862, 183125.
168. Koster, J. C., Bente, K. A., Nichols, C. G., Ho, K. 1998. Assembly of ROMK1 (Kir 1.1a) inward rectifier K⁺ channel subunits involves multiple interaction sites. *Biophys J*, 74, 1821-1829.
169. Krajewska, M., Koprowski, P. 2021. Solubilization, purification, and functional reconstitution of human ROMK potassium channel in copolymer styrene-maleic acid (SMA) nanodiscs. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1863, 183555.
170. Krapivinsky, G., Medina, I., Eng, L., Krapivinsky, L., Yang, Y. & Clapham, D. E. 1998. A novel inward rectifier K(+) channel with unique pore properties. *Neuron*, 20, 995-1005.

171. Kravenska, Y., Checchetto, V., Szabo, I. 2021. Routes for Potassium Ions across Mitochondrial Membranes: A Biophysical Point of View with Special Focus on the ATP-Sensitive K(+) Channel. *Biomolecules*, 11, 1172.
172. Krenz, M., Oldenburg, O., Wimpee, H., Cohen, M. V., Garlid, K. D., Critz, S. D., Downey, J. M., Benoit, J. N. 2002. Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 97, 365-373.
173. Krishnan, M. N., Bingham, J. P., Lee, S. H., Trombley, P., Moczydlowski, E. 2005. Functional role and affinity of inorganic cations in stabilizing the tetrameric structure of the KcsA K(+) channel. *J Gen Physiol*, 126, 271-283.
174. Kshatri, A. S., Gonzalez-Hernandez, A., Giraldez, T. 2018. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca(2+) Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front Mol Neurosci*, 11, 258.
175. Kuang, Q., Purhonen, P., Hebert, H. 2015. Structure of potassium channels. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72, 3677-3693.
176. Kubo, Y., Fau, B. T., Jan, Y. N., Jan, L. Y. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362, 127-133.
177. Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y., Vielhaber, S., Elger, C. E., Kunz, W. S. 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 4127-4135.
178. Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D., Plotkin, J. B. 2009. Coding-sequence determinants of gene expression in Escherichia coli. *Science*, 324, 255-258.
179. Kumar, P., Cymes, G. D., Grosman, C. 2021. Structure and function at the lipid-protein interface of a pentameric ligand-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2100164118.
180. Kuniyasu, A., Kaneko, K., Kawahara, K., Nakayama, H. 2003. Molecular assembly and subcellular distribution of ATP-sensitive potassium channel proteins in rat hearts. *FEBS Letters*, 552, 259-263.
181. Kurata, H. T., Marton, L. J., Nichols, C. G. 2006. The polyamine binding site in inward rectifier K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 127, 467-480.

182. Kwon, K., Beckett, D. 2000. Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Sci*, 9, 1530-1539.
183. Lacza, Z., Snipes, J. A., Kis, B., Szabó, C., Grover, G., Busija, D. W. 2003a. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel in the brain. *Brain Research*, 994, 27-36.
184. Lacza, Z., Snipes, J. A., Miller, A. W., Szabó, C., Grover, G., Busija, D. W. 2003b. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35, 1339-1347.
185. Larochelle, M., Bergeron, D., Arcand, B., Bachand, F. 2019. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. *J Cell Sci*, 132, jcs232249.
186. Laskowski, M., Augustynek, B., Bednarczyk, P., Zochowska, M., Kalisz, J., O'rourke, B., Szewczyk, A., Kulawiak, B. 2019. Single-Channel Properties of the ROMK-Pore-Forming Subunit of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel. *Int J Mol Sci*, 20, 5323.
187. Latorre, R., Castillo, K., Carrasquel-Ursulaez, W., Sepulveda, R. V., Gonzalez-Nilo, F., Gonzalez, C., Alvarez, O. 2017. Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol Rev*, 97, 39-87.
188. Leal-Pinto, E., Gómez-Llorente, Y., Sundaram, S., Tang, Q. Y., Ivanova-Nikolova, T., Mahajan, R., Baki, L., Zhang, Z., Chavez, J., Ubarretxena-Belandia, I., Logothetis, D. E. 2010. Gating of a G protein-sensitive mammalian Kir3.1 prokaryotic Kir channel chimera in planar lipid bilayers. *J Biol Chem*, 285, 39790-39800.
189. Lee, J. H., Jung, I. S., Lee, S. H., Yang, M. K., Hwang, J. H., Lee, H. D., Cho, Y. S., Song, M. J., Yi, K. Y., Yoo, K. Y., Kwon, S. H., Kim, B., Lee, C. S., Shin, H. S. 2007. Cardioprotective effects of BMS-180448, a prototype mitoK(ATP) channel opener, and the role of salvage kinases, in the rat model of global ischemia and reperfusion heart injury. *Arch Pharm Res*, 30, 634-640.
190. Lee, S. C., Collins, R., Lin, Y. P., Jamshad, M., Broughton, C., Harris, S. A., Hanson, B. S., Tognoloni, C., Parslow, R. A., Terry, A. E., Rodger, A., Smith, C. J., Edler, K. J., Ford, R., Roper, D. I., Dafforn, T. R. 2019. Nano-encapsulated Escherichia coli Divisome Anchor ZipA, and in Complex with FtsZ. *Sci Rep*, 9, 18712.

191. Lee, S. C., Knowles, T. J., Postis, V. L., Jamshad, M., Parslow, R. A., Lin, Y. P., Goldman, A., Sridhar, P., Overduin, M., Muench, S. P., Dafforn, T. R. 2016. A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat Protoc*, 11, 1149-1162.
192. Lee, S. J., Wang, S., Borschel, W., Heyman, S., Gyore, J., Nichols, C. G. 2013. Secondary anionic phospholipid binding site and gating mechanism in Kir2.1 inward rectifier channels. *Nat Commun*, 4, 2786.
193. Leipziger, J., Macgregor, G. G., Cooper, G. J., Xu, J., Hebert, S. C., Giebisch, G. 2000. PKA site mutations of ROMK2 channels shift the pH dependence to more alkaline values. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279, F919-F926.
194. Lesage, F., Lauritzen, I., Duprat, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., Lazdunski, M. 1997. The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K(+) channel. *FEBS Letters*, 402, 28-32.
195. Li, X., Rapedius, M., Baukowitz, T., Liu, G. X., Srivastava, D. K., Daut, J., Hanley, P. J. 2010. 5-Hydroxydecanoate and coenzyme A are inhibitors of native sarcolemmal K(ATP) channels in inside-out patches. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 385-391.
196. Light, P. E., Kanji, H. D., Fox, J. E., French, R. J. 2001. Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial KATP channels during metabolic inhibition and recovery. *FASEB J*, 15, 2586-2594.
197. Liou, H. H., Zhou, S. S., Huang, C. L. 1999. Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5820-5825.
198. Liu, Y., Ren, G., Rourke, B., Marbán, E., Seharaseyon, J. 2001. Pharmacological Comparison of Native Mitochondrial KATP Channels with Molecularly Defined Surface K(ATP) Channels. *Molecular Pharmacology*, 59, 225.
199. Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B., Marban, E. 1998. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*, 97, 2463-2469.
200. Liu, Y., Sato, T., Seharaseyon, J., Szewczyk, A., O'Rourke, B., Marban, E. 1999. Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels. Viable Candidate Effectors of Ischemic Preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*, 874, 27-37.

201. Long, A. R., O'Brien, C. C., Malhotra, K., Schwall, C. T., Albert, A. D., Watts, A., Alder, N. N. 2013. A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnol*, 13, 41.
202. Lopatin, A. N., Makhina, E. N. & Nichols, C. G. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372, 366-369.
203. Lopatin, A. N., Nichols, C. G. 1996. [K⁺] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophys J*, 71, 682-694.
204. Lu, M., Leng, Q., Egan, M. E., Caplan, M. J., Boulpaep, E. L., Giebisch, G. H., Hebert, S. C. 2006. CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest*, 116, 797-807.
205. Lu, Z. 2004. Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁽⁺⁾ channels. *Annu Rev Physiol*, 66, 103-29.
206. Lu, Z., MacKinnon, R. 1994. Electrostatic tuning of Mg⁽²⁺⁾ affinity in an inward-rectifier K⁽⁺⁾ channel. *Nature*, 371, 243-246.
207. Lund, A. H., Duch, M., Pedersen, F. S. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Research*, 24, 800-801.
208. Luzi, L., Pozza, G. 1997. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? *Acta Diabetol*, 34, 239-244.
209. Ma, X., Adelstein, R. S. 2014. The role of vertebrate nonmuscle Myosin II in development and human disease. *Bioarchitecture*, 4, 88-102.
210. Macgregor, G. G., Dong, K., Vanoye, C. G., Tang, L., Giebisch, G., Hebert, S. C. 2002. Nucleotides and phospholipids compete for binding to the C terminus of K(ATP) channels. *PNAS*, 99, 2726-2731.
211. Macica, C. M., Yang, Y., Lerea, K., Hebert, S. C., Wang, W. 1998. Role of the NH₂ terminus of the cloned renal K⁺ channel, ROMK1, in arachidonic acid-mediated inhibition. *Am J Physiol*, 274, F175-F181.
212. MacKinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, 350, 232-235.

213. MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., Chait, B. T. 1998. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, 280, 106-109.
214. Mair, A., Xu, S. L., Branon, T. C., Ting, A. Y., Bergmann, D. C. 2019. Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. *Elife*, 8, e47864.
215. Mall, M. A., Hartl, D. 2014. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *European Respiratory Journal*, 44, 1042.
216. Marmolejo-Murillo, L. G., Aréchiga-Figueroa, I. A., Moreno-Galindo, E. G., Ferrer, T., Zamora-Cárdenas, R., Navarro-Polanco, R. A., Sánchez-Chapula, J. A., Rodríguez-Menchaca, A. A. 2021. Kir4.1/Kir5.1 channels possess strong intrinsic inward rectification determined by a voltage-dependent K(+)-flux gating mechanism. *J Gen Physiol*, 153, e201912540.
217. May, D. G., Scott, K. L., Campos, A. R., Roux, K. J. 2020. Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation. *Cells*, 9, 1070.
218. McLean, J. E., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S. E., Stanton, M., Hedstrom, L. 2004. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo. *Biochem J*, 379, 243-251.
219. McNicholas, C. M., Macgregor, G. G., Islas, L. D., Yang, Y., Hebert, S. C., Giebisch, G. 1998. pH-dependent modulation of the cloned renal K(+) channel, ROMK. *Am J Physiol*, 275, F972-F981.
220. McNicholas, C. M., Wang, W., Ho, K., Hebert, S. C., Giebisch, G. 1994. Regulation of ROMK1 K(+) channel activity involves phosphorylation processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8077-8081.
221. McNicholas, C. M., Yang, Y., Giebisch, G., Hebert, S. C. 1996. Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K(+) channel (ROMK2). *Am J Physiol*, 271, F275-F285.
222. Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H., Seino, S. 2002. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.*, 8, 466-472.
223. Miller, A. N., Long, S. B. 2012. Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*, 335, 432-436.

224. Miller, C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1, reviews0004.
225. Mironova, G. D., Grigoriev, S. M., Skarga, Y., Negoda, A. E., Kolomytkin, O. V. 1997. ATP-dependent potassium channel from rat liver mitochondria: inhibitory analysis, channel clusterization. *Membrane Cell Biol.*, 10, 583-591.
226. Mironova, G. D., Skarga, Y. Y., Grigoriev, S. M., Negoda, A. E., Kolomytkin, O. V., Marinov, B. S. 1999. Reconstitution of the Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channel into Bilayer Lipid Membrane1. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31, 159-163.
227. Mogk, A., Bukau, B., Kampinga, H. H. 2018. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol Cell*, 69, 214-226.
228. Montoya-Pérez, R., Saavedra-Molina, A., Trujillo, X., Huerta, M., Andrade, F., Sánchez-Pastor, E., Ortiz, M. 2010. Inhibition of oxygen consumption in skeletal muscle-derived mitochondria by pinacidil, diazoxide, and glibenclamide, but not by 5-hydroxydecanoate. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42, 21-27.
229. Morrison, K. A., Akram, A., Mathews, A., Khan, Z. A., Patel, J. H., Zhou, C., Hardy, D. J., Moore-Kelly, C., Patel, R., Odiba, V., Knowles, T. J., Javed, M. U., Chmel, N. P., Dafforn, T. R., Rothnie, A. J. 2016. Membrane protein extraction and purification using styrene-maleic acid (SMA) copolymer: effect of variations in polymer structure. *Biochem J*, 473, 4349-4360.
230. Moulton, G., Attwood, T. K., Parry-Smith, D. J., Packer, J. C. 2003. Phylogenomic analysis and evolution of the potassium channel gene family. *Recept Channels*, 9, 363-377.
231. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., Wescott, W. C. 1962. Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature*, 194, 979-980.
232. Muessel, M. J., Harry, G. J., Armstrong, D. L., Storey, N. M. 2013. SDF-1alpha and LPA modulate microglia potassium channels through rho gtpases to regulate cell morphology. *Glia*, 61, 1620-1628.

233. Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B., Marban, E. 2001. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 89, 891-898.
234. Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
235. Naffouje, R., Grover, P., Yu, H., Sendilnathan, A., Wolfe, K., Majd, N., Smith, E. P., Takeuchi, K., Senda, T., Kofuji, S., Sasaki, A. T. 2019. Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers (Basel)*, 11, 1346.
236. Nichols, C. G., Ho, K., Hebert, S. 1994. Mg(2+)-dependent inward rectification of ROMK1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 476, 399-409.
237. Nichols, C. G., Shyng, S. L., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement, J. P. T., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M. A., Bryan, J. 1996. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*, 272, 1785-1787.
238. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L. D., Rosenbaum, T. 2012. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature Chemical Biology*, 8, 78-85.
239. Nishida, M., Cadene, M., Chait, B. T., Mackinnon, R. 2007. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J*, 26, 4005-4015.
240. Noda, N., Awais, R., Sutton, R., Awais, M. & Ozawa, T. 2017. Dynamic monitoring of p53 translocation to mitochondria for the analysis of specific inhibitors using luciferase-fragment complementation. *Biotechnol Bioeng*, 114, 2818-2827.
241. O'Rourke, B. 2004. Evidence for mitochondrial K(+) channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*, 94, 420-432.
242. O'Rourke, B. 2007. Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol*, 69, 19-49.
243. Obata, T., Yamanaka, Y. 2000. Block of cardiac ATP-sensitive K(+) channels reduces hydroxyl radicals in the rat myocardium. *Arch Biochem Biophys*, 378, 195-200.
244. Ohno, Y., Hibino, H., Lossin, C., Inanobe, A., Kurachi, Y. 2007. Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Research*, 1178, 44-51.

245. Oldenburg, O., Cohen, M. V., Yellon, D. M., Downey, J. M. 2002. Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 55, 429-437.
246. Oliver, D., Hahn, H., Antz, C., Ruppertsberg, J. P., Fakler, B. 1998. Interaction of permeant and blocking ions in cloned inward-rectifier K⁺ channels. *Biophys J*, 74, 2318-2326.
247. Oluwole, A. O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J. O., Vargas, C., Keller, S. 2017a. Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 1919-1924.
248. Oluwole, A. O., Klingler, J., Danielczak, B., Babalola, J. O., Vargas, C., Pabst, G., Keller, S. 2017b. Formation of Lipid-Bilayer Nanodiscs by Diisobutylene/Maleic Acid (DIBMA) Copolymer. *Langmuir*, 33, 14378-14388.
249. Orekhov, P. S., Bozdaganyan, M. E., Voskoboynikova, N., Mulkidjanian, A. Y., Steinhoff, H. J., Shaitan, K. V. 2019. Styrene/Maleic Acid Copolymers Form SMALPs by Pulling Lipid Patches out of the Lipid Bilayer. *Langmuir*, 35, 3748-3758.
250. Orwick Rydmark, M., Christensen, M. K., Köksal, E. S., Kantarci, I., Kustanovich, K., Yantchev, V., Jesorka, A., Gözen, I. 2019. Styrene maleic acid copolymer induces pores in biomembranes. *Soft Matter*, 15, 7934-7944.
251. Otterpohl, K. L., Hart, R. G., Evans, C., Surendran, K. & Chandrasekar, I. 2017. Nonmuscle myosin 2 proteins encoded by Myh9, Myh10, and Myh14 are uniquely distributed in the tubular segments of murine kidney. *Physiol Rep*, 5 e13513.
252. Paggio, A., Checchetto, V., Campo, A., Menabo, R., Di Marco, G., Di Lisa, F., Szabo, I., Rizzuto, R., De Stefani, D. 2019. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature*, 572, 609-613.
253. Pagliuca, C., Goetze, T. A., Wagner, R., Thiel, G., Moroni, A., Parcej, D. 2007. Molecular properties of Kcv, a virus encoded K(+) channel. *Biochemistry*, 46, 1079-1090.
254. Pain, T., Yang, X. M., Critz, S. D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G. S., Heusch, G., Cohen, M. V., Downey, J. M. 2000. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*, 87, 460-466.
255. Palmer, L. G., Choe, H., Frindt, G. 1997. Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am J Physiol*, 273, F404-F410.

256. Palsdottir, H., Hunte, C. 2004. Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 2-18.
257. Papanicolaou, K. N., Ashok, D., Liu, T., Bauer, T. M., Sun, J., Li, Z., Da Costa, E., D'Orleans, C. C., Nathan, S., Lefer, D. J., Murphy, E., Paolocci, N., Foster, D. B., O'Rourke, B. 2020. Global knockout of ROMK potassium channel worsens cardiac ischemia-reperfusion injury but cardiomyocyte-specific knockout does not: Implications for the identity of mitoK(ATP). *J Mol Cell Cardiol*, 139, 176-189.
258. Paucek, P., Mironova, G., Mahdi, F., Beavis, A. D., Woldegiorgis, G., Garlid, K. D. 1992. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K(+) channel from rat liver and beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 26062-26069.
259. Paulin, S., Jamshad, M., Dafforn, T. R., Garcia-Lara, J., Foster, S. J., Galley, N. F., Roper, D. I., Rosado, H., Taylor, P. W. 2014. Surfactant-free purification of membrane protein complexes from bacteria: application to the staphylococcal penicillin-binding protein complex PBP2/PBP2a. *Nanotechnology*, 25, 285101.
260. Pazour, G. J. 2009. Immunoprecipitation to Examine Protein Complexes. *Methods Cell Biol.*, 91, 135-142.
261. Peng, K., Hu, J., Xiao, J., Dan, G., Yang, L., Ye, F., Zou, Z., Cao, J., Sai, Y. 2018. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel regulates mitochondrial dynamics to participate in neurodegeneration of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864, 1086-1103.
262. Peng, X., Wang, J., Peng, W., Wu, F. X., Pan, Y. 2016. Protein-protein interactions: detection, reliability assessment and applications. *Briefings in Bioinformatics*, 18, 798-819.
263. Périer, F., Radeke, C. M., Vandenberg, C. A. 1994. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6240-6244.
264. Pessia, M., Imbrici, P., D'adamo, M. C., Salvatore, L., Tucker, S. J. 2001. Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J Physiol*, 532, 359-367.

265. Peters, M., Jeck, N., Reinalter, S., Leonhardt, A., Tönshoff, B., Klaus, G. G., Konrad, M., Seyberth, H. W. 2002. Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med*, 112, 183-190.
266. Petkov, G. V. 2009. Chapter 16 - Ion Channels. *In*: Hacker, M., Messer, W. Bachmann, K. (eds.) *Pharmacology*. San Diego: Academic Press, pp. 387-427.
267. Pfanner, N., Warscheid, B., Wiedemann, N. 2019. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 267-284.
268. Pierleoni, A., Martelli, P. L., Fariselli, P., Casadio, R. 2006. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22, e408-e416.
269. Preisig-Müller, R., Schlichthörl, G., Goerge, T., Heinen, S., Brüggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R. W. & Daut, J. 2002. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7774-7779.
270. Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., Ashcroft, F. 2002. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S368-S376.
271. Qu, Z., Yang, Z., Cui, N., Zhu, G., Liu, C., Xu, H., Chanchevalap, S., Shen, W., Wu, J., Li, Y., Jiang, C. 2000. Gating of inward rectifier K(+) channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J Biol Chem*, 275, 31573-31580.
272. Raja, M., Vales, E. 2011. Improved technique for reconstituting incredibly high and soluble amounts of tetrameric K(+) channel in natural membranes. *J Membr Biol*, 241, 141-144.
273. Ramadugu, V. S. K., Di Mauro, G. M., Ravula, T., Ramamoorthy, A. 2017. Polymer nanodiscs and macro-nanodiscs of a varying lipid composition. *Chem Commun (Camb)*, 53, 10824-10826.
274. Ravula, T., Hardin, N. Z., Ramadugu, S. K., Cox, S. J., Ramamoorthy, A. 2019a. Formation of pH-Resistant Monodispersed Polymer-Lipid Bilayer Nanodiscs. *Angew Chem Int Ed Engl*, 58, 13185.
275. Ravula, T., Hardin, N. Z., Ramamoorthy, A. 2019b. Polymer nanodiscs: Advantages and limitations. *Chem Phys Lipids*, 219, 45-49.

276. Ravula, T., Ramadugu, S. K., Di Mauro, G., Ramamoorthy, A. 2017. Bioinspired, Size-Tunable Self-Assembly of Polymer-Lipid Bilayer Nanodiscs. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56, 11466-11470.
277. Raynal, B., Lenormand, P., Baron, B., Hoos, S., England, P. 2014. Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how? *Microbial Cell Factories*, 13, 180.
278. Rehan, S., Paavilainen, V. O., Jaakola, V. P. 2017. Functional reconstitution of human equilibrative nucleoside transporter-1 into styrene maleic acid co-polymer lipid particles. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859, 1059-1065.
279. Renart, M. L., Giudici, A. M., Díaz-García, C., Molina, M. L., Morales, A., González-Ros, J. M. & Poveda, J. A. 2020. Modulation of Function, Structure and Clustering of K(+) Channels by Lipids: Lessons Learnt from KcsA. *Int J Mol Sci*, 21, 2554.
280. Renart, M. L., Giudici, A. M., Poveda, J. A., Fedorov, A., Berberan-Santos, M. N., Prieto, M., Díaz-García, C., González-Ros, J. M. & Coutinho, A. 2019. Conformational plasticity in the KcsA potassium channel pore helix revealed by homo-FRET studies. *Scientific Reports*, 9, 6215.
281. Robinson, C. V., Rohacs, T., Hansen, S. B. 2019. Tools for Understanding Nanoscale Lipid Regulation of Ion Channels. *Trends in biochemical sciences*, 44, 795-806.
282. Roseborough, G., Gao, D., Chen, L., Trush, M. A., Zhou, S., Williams, G. M., Wei, C. 2006. The mitochondrial K(ATP) channel opener, diazoxide, prevents ischemia-reperfusion injury in the rabbit spinal cord. *Am J Pathol*, 168, 1443-1451.
283. Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B. 2013. BioID: a screen for protein-protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci*, 74, 19.23.1-19.23.14.
284. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., Burke, B. 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 196, 801-810.
285. Ruknudin, A., Schulze, D. H., Sullivan, S. K., Lederer, W. J., Welling, P. A. 1998. Novel subunit composition of a renal epithelial K(ATP) channel. *J Biol Chem*, 273, 14165-14171.

286. Sammons, M. F., Kharade, S. V., Filipski, K. J., Boehm, M., Smith, A. C., Shavnya, A., Fernando, D. P., Dowling, M. S., Carpino, P. A., Castle, N. A., Zellmer, S. G., Antonio, B. M., Gosset, J. R., Carlo, A. & Denton, J. S. 2018. Discovery and in Vitro Optimization of 3-Sulfamoylbenzamides as ROMK Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 9, 125-130.
287. Sarkar, G., Sommer, S. S. 1990. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 8, 404-407.
288. Sato, T., Li, Y., Saito, T., Nakaya, H. 2004. Minoxidil opens mitochondrial K(ATP) channels and confers cardioprotection. *Br J Pharmacol*, 141, 360-366.
289. Scheidelaar, S., Koorengel, M. C., Van Walree, C. A., Dominguez, J. J., Dörr, J. M., Killian, J. A. 2016. Effect of Polymer Composition and pH on Membrane Solubilization by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophys J*, 111, 1974-1986.
290. Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., Eder, C. 2004. Functional importance of Ca(2+)-activated K(+) channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci*, 19, 1469-1474.
291. Schreiber, M., Salkoff, L. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, 73, 1355-1363.
292. Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., Salkoff, L. 1998. Slo3, a novel pH-sensitive K(+) channel from mammalian spermatocytes. *J Biol Chem*, 273, 3509-3516.
293. Scorziello, A. 2009. Sulfonylurea Receptor. In: Enna, S. J. & Bylund, D. B. (eds.) *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. New York: Elsevier, pp. 1-24.
294. Sears, R. M., May, D. G., Roux, K. J. 2019. BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods Mol Biol*, 2012, 299-313.
295. Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 105-117.
296. Shi, J., Krishnamoorthy, G., Yang, Y., Hu, L., Chaturvedi, N., Harilal, D., Qin, J., Cui, J. 2002. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*, 418, 876-880.

297. Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Kock, Z., Daley, D. O. 2020. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Commun Biol*, 3, 214.
298. Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., Dipietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A., Lifton, R. P. 1996. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K(+) channel, ROMK. *Nat Genet*, 14, 152-156.
299. Singh, H., Hudman, D., Lawrence, C. L., Rainbow, R. D., Lodwick, D., Norman, R. I. 2003. Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35, 445-459.
300. Singh, H., Li, M., Hall, L., Chen, S., Sukur, S., Lu, R., Caputo, A., Meredith, A. L., Stefani, E., Toro, L. 2016. MaxiK channel interactome reveals its interaction with GABA transporter 3 and heat shock protein 60 in the mammalian brain. *Neuroscience*, 317, 76-107.
301. Smirnova, I. A., Sjostrand, D., Li, F., Bjorck, M., Schafer, J., Ostbye, H., Hogbom, M., Von Ballmoos, C., Lander, G. C., Adelroth, P., Brzezinski, P. 2016. Isolation of yeast complex IV in native lipid nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*, 1858, 2984-2992.
302. Smith, S. M. 2011. Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods Mol Biol*, 681, 485-496.
303. Sokolowski, B., Orchard, S., Harvey, M., Sridhar, S. & Sakai, Y. 2011. Conserved BK channel-protein interactions reveal signals relevant to cell death and survival. *PLoS One*, 6, e28532.
304. Sokolowski, S., Harvey, M., Sakai, Y., Jordan, A. & Sokolowski, B. 2012. The large conductance calcium-activated K(+) channel interacts with the small GTPase Rab11b. *Biochem Biophys Res Commun*, 426, 221-225.
305. Soom, M., Schönherr, R., Kubo, Y., Kirsch, C., Klinger, R. & Heinemann, S. H. 2001. Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Letters*, 490, 49-53.
306. Stanfield, P. R., Davies, N. W., Shelton, P. A., Sutcliffe, M. J., Khan, I. A., Brammar, W. J., Conley, E. C. 1994. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg(2+) of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol*, 478, 1-6.

307. Stansfeld, P. J., Hopkinson, R., Ashcroft, F. M., Sansom, M. S. P. 2009. PIP(2)-binding site in Kir channels: definition by multiscale biomolecular simulations. *Biochemistry*, 48, 10926-10933.
308. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods in Enzymology*, 185, 60-89.
309. Su, P. C., Si, W., Baker, D. L., Berger, B. W. 2013. High-yield membrane protein expression from *E. coli* using an engineered outer membrane protein F fusion. *Protein Sci*, 22, 434-443.
310. Su, S., Ohno, Y., Lossin, C., Hibino, H., Inanobe, A., Kurachi, Y. 2007. Inhibition of Astroglial Inwardly Rectifying Kir4.1 Channels by a Tricyclic Antidepressant, Nortriptyline. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320, 573.
311. Sun, C., Benlekbir, S., Venkatakrishnan, P., Wang, Y., Hong, S., Hosler, J., Tajkhorshid, E., Rubinstein, J. L., Gennis, R. B. 2018. Structure of the alternative complex III in a supercomplex with cytochrome oxidase. *Nature*, 557, 123-126.
312. Suzuki, M., Kotake, K., Fujikura, K., Inagaki, N., Suzuki, T., Gono, T., Seino, S., Takata, K. 1997. Kir6.1: A Possible Subunit of ATP-Sensitive K(+)Channels in Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241, 693-697.
313. Swainsbury, D. J. K., Proctor, M. S., Hitchcock, A., Cartron, M. L., Qian, P., Martin, E. C., Jackson, P. J., Madsen, J., Armes, S. P., Hunter, C. N. 2018. Probing the local lipid environment of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc1 and *Synechocystis* sp. PCC 6803 cytochrome b6/f complexes with styrene maleic acid. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859, 215-225.
314. Swale, D. R., Sheehan, J. H., Banerjee, S., Husni, A. S., Nguyen, T. T., Meiler, J., Denton, J. S. 2015. Computational and functional analyses of a small-molecule binding site in ROMK. *Biophys J*, 108, 1094-1103.
315. Szabò, I., Leanza, L., Gulbins, E. & Zoratti, M. 2012. Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. *Pflügers Arch*, 463, 231-246.
316. Szabo, I., Zoratti, M. 2014. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*, 94, 519-608.

317. Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W., Kunz, W. S. 2009. Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life*, 61, 134-143.
318. Szewczyk, A., Skalska, J., Głab, M., Kulawiak, B., Malińska, D., Koszela-Piotrowska, I., Kunz, W. S. 2006. Mitochondrial potassium channels: From pharmacology to function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757, 715-720.
319. Szundi, I., Pitch, S. G., Chen, E., Farrens, D. L., Kliger, D. S. 2021. Styrene-maleic acid copolymer effects on the function of the GPCR rhodopsin in lipid nanoparticles. *Biophysical Journal*, 120, 4337-4348.
320. Tait, S. W., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Munoz-Pinedo, C., Green, D. R. 2010. Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev Cell*, 18, 802-813.
321. Tanemoto, M., Kittaka, N., Inanobe, A., Kurachi, Y. 2000. In vivo formation of a proton-sensitive K(+) channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol*, 525, 587-592.
322. Tang, H., Zhu, Y., Teumelsan, N., Walsh, S. P., Shahripour, A., Priest, B. T., Swensen, A. M., Felix, J. P., Brochu, R. M., Bailey, T., Thomas-Fowlkes, B., Pai, L. Y., Hampton, C., Corona, A., Hernandez, M., Metzger, J., Forrest, M., Zhou, X., Owens, K., Tong, V., Parmee, E., Roy, S., Kaczorowski, G. J., Yang, L., Alonso-Galicia, M., Garcia, M. L., Pasternak, A. 2016. Discovery of MK-7145, an Oral Small Molecule ROMK Inhibitor for the Treatment of Hypertension and Heart Failure. *ACS Med Chem Lett*, 7, 697-701.
323. Tedesco, D., Maj, M., Malarczyk, P., Cingolani, A., Zaffagnini, M., Wnorowski, A., Czapiński, J., Benelli, T., Mazzoni, R., Bartolini, M., Józwiak, K. 2021. Application of the SMALP technology to the isolation of GPCRs from low-yielding cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863, 183641.
324. Telezhkin, V., Reilly, J. M., Thomas, A. M., Tinker, A., Brown, D. A. 2012. Structural requirements of membrane phospholipids for M-type potassium channel activation and binding. *J Biol Chem*, 287, 10001-10012.
325. Tian, J., Liu, J., Garlid, K. D., Shapiro, J. I., Xie, Z. 2003. Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial K(ATP) channels. *Mol Cell Biochem*, 242, 181-187.

326. Tigyi, G. 2012. LPA activates TRPV1—and it hurts. *Nature Chemical Biology*, 8, 22-23.
327. Tikhonov, D. B., Zhorov, B. S. 2018. Chapter: 3D Structures and Molecular Evolution of Ion Channels. In: *Evolutionary Physiology and Biochemistry - Advances and Perspectives*.
328. Tilegenova, C., Vemulapally, S., Cortes, D. M., Cuello, L. G. 2016. An improved method for the cost-effective expression and purification of large quantities of KcsA. *Protein Expression and Purification*, 127, 53-60.
329. Tinker, A., Jan, Y. N., Jan, L. Y. 1996. Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell*, 87, 857-868.
330. Tipps, M. E., Buck, K. J. 2015. GIRK Channels: A Potential Link Between Learning and Addiction. *Int Rev Neurobiol*, 123, 239-277.
331. Van Hamersvelt, H. W., Kloke, H. J., De Jong, D. J., Koene, R. A., Huysmans, F. T. 1996. Oedema formation with the vasodilators nifedipine and diazoxide: direct local effect or sodium retention? *J Hypertens*, 14, 1041-1045.
332. Vanoye, C. G., Macgregor, G. G., Dong, K., Tang, L., Buschmann, A. S., Hall, A. E., Lu, M., Giebisch, G., Hebert, S. C. 2002. The carboxyl termini of K(ATP) channels bind nucleotides. *J Biol Chem*, 277, 23260-23270.
333. Varnaite, R., Macneill, S. A. 2016. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics*, 16, 2503-2518.
334. Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., Moll, U. M. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149, 1536-1548.
335. Visudtiphole, V., Thomas, M. B., Chalton, D. A., Lakey, J. H. 2005. Refolding of Escherichia coli outer membrane protein F in detergent creates LPS-free trimers and asymmetric dimers. *Biochem J*, 392, 375-381.
336. Voges, D., Jap, B. K. 1998. Recombinant expression, purification and characterization of Kch, a putative Escherichia coli potassium channel protein. *FEBS Lett*, 429, 104-108.
337. Vollmer, B., Schooley, A., Sachdev, R., Eisenhardt, N., Schneider, A. M., Sieverding, C., Madlung, J., Gerken, U., Macek, B., Antonin, W. 2012. Dimerization and direct

- membrane interaction of Nup53 contribute to nuclear pore complex assembly. *EMBO J*, 31, 4072-4084.
338. Voskoboynikova, N., Orekhov, P., Bozdaganyan, M., Kodde, F., Rademacher, M., Schowe, M., Budke-Giesecking, A., Brickwedde, B., Psathaki, O. E., Mulkidjanian, A. Y., Cosentino, K., Shaitan, K. V., Steinhoff, H. J. 2021. Lipid Dynamics in Diisobutylene-Maleic Acid (DIBMA) Lipid Particles in Presence of Sensory Rhodopsin II. *Int J Mol Sci*, 22, 2548.
339. Vucic, E., Alfadda, T., Macgregor, G. G., Dong, K., Wang, T., Geibel, J. P. 2015. Kir1.1 (ROMK) and Kv7.1 (KCNQ1/KvLQT1) are essential for normal gastric acid secretion: importance of functional Kir1.1. *Pflugers Arch*, 467, 1457-1468.
340. Vukotic, M., Nolte, H., König, T., Saita, S., Ananjew, M., Krüger, M., Tatsuta, T., Langer, T. 2017. Acylglycerol Kinase Mutated in Sengers Syndrome Is a Subunit of the TIM22 Protein Translocase in Mitochondria. *Molecular Cell*, 67, 471-483.e7.
341. Wang, H. R., Wu, M., Yu, H., Long, S., Stevens, A., Engers, D. W., Sackin, H., Daniels, J. S., Dawson, E. S., Hopkins, C. R., Lindsley, C. W., Li, M. & McManus, O. B. 2011a. Selective Inhibition of the Kir2 Family of Inward Rectifier Potassium Channels by a Small Molecule Probe: The Discovery, SAR, and Pharmacological Characterization of ML133. *ACS Chemical Biology*, 6, 845-856.
342. Wang, L., Zhu, Q. L., Wang, G. Z., Deng, T. Z., Chen, R., Liu, M. H., Wang, S. W. 2011b. The protective roles of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during hypoxia-ischemia-reperfusion in brain. *Neurosci Lett*, 491, 63-67.
343. Wang, R. Y., Wilcox, W. R., Cederbaum, S. D. 2013. Chapter 92 - Amino Acid Metabolism. In: RIMOIN, D., PYERITZ, R. & KORF, B. (eds.) *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Oxford: Academic Press.
344. Wang, W., Chen, X., Zhang, L., Yi, J., Ma, Q., Yin, J., Zhuo, W., Gu, J., Yang, M. 2020. Atomic structure of human TOM core complex. *Cell Discovery*, 6, 67.
345. Wang, W. H., Giebisch, G. 2009. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch*, 458, 157-168.
346. Weaver, C. D., Denton, J. S. 2021. Next-generation inward rectifier potassium channel modulators: discovery and molecular pharmacology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 320, C1125-C1140.

347. Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wulff, H. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 463-472.
348. Welling, P. A., Ho, K. 2009. A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297, F849-F863.
349. Wible, B. A., Tagliatela, M., Ficker, E., Brown, A. M. 1994. Gating of inwardly rectifying K(+) channels localized to a single negatively charged residue. *Nature*, 371, 246-249.
350. Wojtovich, A. P., Urciuoli, W. R., Chatterjee, S., Fisher, A. B., Nehrke, K., Brookes, P. S. 2013. Kir6.2 is not the mitochondrial KATP channel but is required for cardioprotection by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, H1439-H1445.
351. Xia, X. M., Ding, J. P., Zeng, X. H., Duan, K. L., Lingle, C. J. 2000. Rectification and rapid activation at low Ca(2+) of Ca(2+)-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J Neurosci*, 20, 4890-4903.
352. Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J. P. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395, 503-507.
353. Xu, W., Liu, Y., Wang, S., McDonald, T., Eyk, J. E. V., Sidor, A., O'Rourke, B. 2002. Cytoprotective Role of Ca(2+)-activated K(+) Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane. *Science*, 298, 1029-1033.
354. Xu, Z. C., Yang, Y., Hebert, S. C. 1996. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K(+) channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 271, 9313-9319.
355. Xue, M., Cheng, L., Faustino, I., Guo, W., Marrink, S. J. 2018. Molecular Mechanism of Lipid Nanodisk Formation by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophys J*, 115, 494-502.
356. Yamano, K., Ishikawa, D., Esaki, M., Endo, T. 2005. The phosphate carrier has an ability to be sorted to either the TIM22 pathway or the TIM23 pathway for its import into yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 280, 10011-10017.

357. Yang, J., Chi, Y., Burkhardt, B. R., Guan, Y., Wolf, B. A. 2010a. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutrition reviews*, 68, 270-279.
358. Yang, L., Frindt, G., Palmer, L. G. 2010b. Magnesium modulates ROMK channel-mediated potassium secretion. *J Am Soc Nephrol*, 21, 2109-2116.
359. Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., Welling, P. A. 2004. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem*, 279, 6863-6873.
360. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., Catterall, W. A. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57, 387-395.
361. Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z.-W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C. M., Salkoff, L. 2003. The Sodium-Activated Potassium Channel Is Encoded by a Member of the Slo Gene Family. *Neuron*, 37, 765-773.
362. Zakharian, E. 2021. Ion channel reconstitution in lipid bilayers. *Methods Enzymol*, 652, 273-291.
363. Zeng, W. Z., Babich, V., Ortega, B., Quigley, R., White, S. J., Welling, P. A., Huang, C. L. 2002. Evidence for endocytosis of ROMK potassium channel via clathrin-coated vesicles. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283, F630-F639.
364. Zeng, W. Z., Li, X. J., Hilgemann, D. W., Huang, C. L. 2003. Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 278, 16852-16856.
365. Zhang, D. X., Chen, Y. F., Campbell, W. B., Zou, A. P., Gross, G. J., Li, P. L. 2001. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 89, 1177-1183.
366. Zhang, Y., Fan, Y. 2017. A Mutant Sumo Facilitates Quick Plasmid Construction for Expressing Proteins with Native N-termini After Tag Removal. *Mol Biotechnol*, 59, 159-167.
367. Zhao, Q., Wang, J., Levivhkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., Hoogenraad, N. J. 2002. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 21, 4411-4419.

368. Zhao, Y., Chaiswing, L., Velez, J. M., Batinic-Haberle, I., Colburn, N. H., Oberley, T. D., Clair, D. K. S. 2005. p53 Translocation to Mitochondria Precedes Its Nuclear Translocation and Targets Mitochondrial Oxidative Defense Protein-Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res*, 65, 3745-3750.
369. Zhu, G., Chanchevalap, S., Cui, N., Jiang, C. 1999. Effects of intra- and extracellular acidifications on single channel Kir2.3 currents. *J Physiol*, 516, 699-710.
370. Zitron, E., Günth, M., Scherer, D., Kiesecker, C., Kulzer, M., Bloehs, R., Scholz, E. P., Thomas, D., Weidenhammer, C., Kathöfer, S., Bauer, A., Katus, H. A., Karle, C. A. 2008. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic alpha1A receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 44, 84-94.
371. Zoratti, M., De Marchi, U., Gulbins, E., Szabo, I. 2009. Novel channels of the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 351-363.
372. Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M. R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S. R., Butt, T. R. 2005. Enhanced Expression and Purification of Membrane Proteins by SUMO Fusion in Escherichia coli. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 6, 103-111.

10. LISTA PUBLIKACJI

Publikacje obejmujące tematykę niniejszej rozprawy:

1. **Krajewska M.**, Koprowski P. „Solubilization, purification, and functional reconstitution of human ROMK potassium channel in copolymer styrene-maleic acid (SMA) nanodiscs” BBA - Biomembranes 2021 April 1863(4): 183555; doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183555
2. Szewczyk A., Bednarczyk P., Jędraszko J., Kampa R.P., Koprowski P., **Krajewska M.**, Kucman S., Kulawiak B., Laskowski M., Rotko D., Sęk A., Walewska A., Żochowska M., Wrzosek A. “Mitochondrial potassium channels - an overview”. Postępy Biochem. 2018 Oct 25;64(3):196-212. doi: 10.18388/pb.2018_132. Review

Pozostałe publikacje:

1. Bednarczyk P., Kicinska A., Laskowski M., Kulawiak B., Kampa R., Walewska A., **Krajewska M.**, Jarmuszkiewicz W., Szewczyk A. „Evidence for a mitochondrial ATP-regulated potassium channel in human dermal fibroblasts.”. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2018 May; 1859(5):309-318. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.02.005. Epub 2018 Feb 16
2. Fronczak M., **Krajewska M.**, Demby K., Bystrzejewski M., „Extraordinary Adsorption of Methyl Blue onto Sodium- Doped Graphitic Carbon Nitride” J. Phys. Chem. C 2017 July, 121 (29): 15756–15766; doi: 10.1021/acs.jpcc.7b03674