



A molecular study on the endoplasmic reticulum potassium channels in hepatocytes

Maedeh Ghasemi¹, Naser Khodaei ataloo¹, Fariba Khodagholi², Afsaneh Eliassi^{1,3*}

1. Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran

2. Neurobiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran

3. Neurophysiology Research Center and Dept. of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran

Received: 4 May 2014

Accepted: 22 Aug 2014

Abstract

Introduction: It has recently been suggested that the K_{ATP} channel subunits Kir6.x and BK_{Ca} channels exist in the endoplasmic reticulum of cardiomyocytes and neurons. Our previous studies showed the electrophysiological behavior of cation channels in the rough endoplasmic reticulum (RER) of rat hepatocytes. Therefore, we hypothesized that K_{ATP} channels and Ca^{2+} -activated potassium channels may exist in RER of the liver.

Methods: Ion channel incorporation of RER of hepatocytes into the bilayer lipid membrane and western blotting allowed the identification of the $rerK_{ATP}$ and Ca^{2+} -activated potassium channels of intermediate conductance ($rerIK_{Ca}$ channel).

Results: Single channel recordings revealed a 211 pS K channel, which was sensitive to 200 nM charibdotoxin. In addition, adding 2.5 mM ATP, 100 μ M glibenclamide and 400 μ M tolbutamide inhibited a 596 pS potassium channel activity. According to the results of western blot analysis, Kir6.2, SUR1 and/or SUR2B, SUR2A and IK_{Ca} were expressed in the endoplasmic reticulum fractions.

Conclusion: The data obtained in this study demonstrate, in part, the composition of $rerK_{ATP}$ channel and the presence of $rerIK_{Ca}$ in the endoplasmic reticulum of the liver. These results will be useful for further analysis of the composition of $rerK_{ATP}$ and $rerIK_{Ca}$ channels and help to understand the role of these channels in diseases.

Key words: endoplasmic reticulum, K_{ATP} channel, IK_{Ca} channel, hepatocyte

* Corresponding author e-mail: af.eliassi@sbmu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی مولکولی کانال های پتاسیمی اندوپلاسمیک رتیکلوم هیاتوسیت ها

مأنده قاسمی^۱، ناصر خدائی عطالو^۲، فریبا خداقلی^۲، افسانه الیاسی^{۱،۳*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۳۱ مرداد ۹۳

دریافت: ۱۴ اردیبهشت ۹۳

چکیده

مقدمه: اخیراً پیشنهاد شده است زیر واحدهای Kir6.x کانال K_{ATP} و کانال BK_{Ca} در اندوپلاسمیک رتیکلوم نوروها و کاردیومیوسیت ها وجود دارد. مطالعات قبلی ما رفتار الکتروفیزیولوژی کانال های کاتیونی را در اندوپلاسمیک رتیکلوم خشن هیاتوسیت ها نشان داد. بنابراین فرض کردیم کانال های K_{ATP} و کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم در اندوپلاسمیک رتیکلوم هیاتوسیت ها می تواند وجود داشته باشد.

روش ها: از تکنیک های الحاقی کانال ها به غشاء لیپیدی دو لایه و وسترن بلات جهت شناسایی کانال K_{ATP} و IK_{Ca} اندوپلاسمیک رتیکلوم استفاده گردید.

یافته ها: جریان های ثبت شده از فعالیت تک کانال حضور یک کانال پتاسیمی با کدناکتانس ۲۱۱ pS و حساس با کریبدوتوکسین را نشان داد همچنین مشاهده گردید فعالیت کانال پتاسیمی با کدناکتانس ۵۹۶ pS توسط ATP، گلی بن کلامید و تولبوتامید مهار گردید. نتایج آنالیز مولکولی وسترن بلات پیشنهاد می دهد که زیر واحدهای Kir6.2، SUR2A، SUR1/SUR2B و IK_{Ca} در اندوپلاسمیک رتیکلوم بیان می شود.

نتیجه گیری: یافته های مطالعه حاضر حضور زیر واحدهای کانال K_{ATP} و IK_{Ca} را در اندوپلاسمیک رتیکلوم هیاتوسیت ها نشان می دهد. این نتایج جهت آنالیز بیشتر ترکیب مولکولی کانال های K_{ATP} و IK_{Ca} اندوپلاسمیک رتیکلوم و درک نقش کانال ها در بیماری ها مفید خواهد بود.

واژه های کلیدی: اندوپلاسمیک رتیکلوم، کانال K_{ATP} ، کانال IK_{Ca} ، هیاتوسیت ها

مقدمه

یون پتاسیمی از طریق کانال های پتاسیمی موجود در اندوپلاسمیک رتیکلوم می تواند یک مکانیسم مهمی برای کنترل هومئوستاز باشد. به طوریکه مطالعات اخیر نقش فیزیولوژیک کانال های پتاسیمی را در دور نگاه داشتن پتانسیل غشا اندوپلاسمیک رتیکلوم از پتانسیل تعادلی کلسیم و در نتیجه تنظیم آزادسازی و باز جذب کلسیم بیان می کنند [۲۲، ۳۳]. تا کنون مطالعات فارماکولوژیکی حضور کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم (BK_{Ca} ، SK_{Ca}) و مطالعات مولکولی حضور زیر واحد منفذی (Kir6.x) کانال های پتاسیمی حساس به ATP را در رتیکلوم اندو پلاسمیک ($rerK_{ATP}$) بافت های مختلف نشان داده اند [۱۴، ۳۵]. قابل

اندوپلاسمیک رتیکلوم به عنوان مرکز سنتز کننده پروتئین و لیپید نقش مهمی را در تنظیم مرگ یا بقا سلولی بواسطه کنترل هومئوستازی کلسیم درون سلولی یا درون ارگانی ایفا می کند. جریانات یونی از خلال غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم، پایه و اساس این فرآیندها است و کنترل دقیق آن برای حفظ هومئوستازی کلسیم حیاتی است [۸، ۲۵]. در این بین جریان

af.eliassi@sbmu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

تغییرات ولتاژ غیر حساس هستند [۲۴]. شواهد فارماکولوژی نشان می دهد کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم اندوپلاسمیک رتیکولوم نقش بسزائی در تغییر دینامیک کلسیم سلولی دارند [۳۳، ۱۴]. مطالعه در حال انجام ما، با استفاده از روش ثبت فعالیت تک کانال، حضور کانال جدیدی که احتمالاً از خانواده کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کندانکتانس متوسط (rerIK_{Ca}) است را نیز معرفی می نماید. بنابراین، با توجه به اینکه اطلاعات چندانی در خصوص ساختار منفذی و زیر واحدهای تنظیمی کانال rerK_{ATP} کبد و حضور کانال rerIK_{Ca} در اندوپلاسمیک رتیکولوم کبد وجود ندارد و داشتن این اطلاعات کمکی در جهت افزایش دانش ما در چگونگی عملکرد و فعالیت آنها خواهد بود، هدف از مطالعه حاضر بررسی ساختمان مولکولی کانال های rerK_{ATP} و rerIK_{Ca} در اندوپلاسمیک رتیکولوم هیپاتوسیت ها با استفاده از روش وسترن بلات می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر پس از تایید هیات "اخلاق در تحقیق" مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید. تمام پروتکل های آزمایشی مطابق با دستورالعمل های NIH در زمینه مراقبت و استفاده از حیوانات بودند.

کلرید پتاسیم، سوکرز، تریس اسیدی و بازی، سرم آلبومین گاوی^۱ (BSA)، ATP، گلی بن کلامید، تولبوتامید و کریبدوتوکسین از شرکت سیگما، کاغذ نیترو سلولز و کیت لومینسانس (ECL-kit) از شرکت Amersham، n-دکان از شرکت مرک و آنتی بادی های ضد Actin، Calnexin، Cox، شرکت Golgi، Kir6.2، SUR1، SUR2A، SUR2B، IK_{Ca} از شرکت سانتاکروز خریداری شدند.

جهت تعیین خلوص نمونه های اندوپلاسمیک رتیکولوم و بررسی ها زیر واحد ساختمانی کانال های پتاسیمی غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم با استفاده از روش مولکولی وسترن بلات نیاز به جداسازی غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم سلول های

ذکر است که مطالعات اخیر ما نیز رفتار الکتروفارماکولوژی کانال rerK_{ATP} را در سطح تک کانال مورد بررسی قرار داد [۲۶].

از لحاظ ساختاری کانال های K_{ATP} از به هم پیوستن زیر واحدهای Kir6.x (Kir6.1، Kir6.2) و سولفونیل اوره SURx (SUR1، SUR2A، SUR2B) تشکیل می شوند. زیر واحدهای Kir6.x منفذ را کانال ساخته و زیر واحدهای SUR نقش تنظیمی دارند. ترکیب متنوع ایزو فرم Kir6 و SUR ها منجر به تشکیل کانال های K_{ATP} با خصوصیات عملکردی مجزا و اختصاصی در بافت ها می شود [۱۱، ۱۶، ۳۱]. این اختلاف ایزو فرم در ساختار کانال ها، توضیح مکانیسمی قوی برای اختلافات کینتیکی و فارماکولوژی مشاهده شده در سطح بافت را ارائه می دهد. به عنوان مثال، کانال های K_{ATP} سلول های β پانکراس با ترکیب Kir6.2/SUR1 و کندانکتانس ۷۶ pS میل ترکیبی بالائی نسبت به مهار کننده تولبوتامید نشان داده و در محدوده وسیعی از شرایط متابولیکی فعالیت می کند، در حالیکه کانال های K_{ATP} قلب با ترکیب Kir6.2/SUR2A و کندانکتانس ۸۰-۵۰ pS نسبت به داروی تولبوتامید بی پاسخ است و در شرایط طبیعی غیر فعال بوده و تحت مهار شدید متابولیکی سلول (کاهش شدید ATP مانند ایسکمی)، فعال می گردد [۱، ۱۵]. با وجود اینکه مطالعات وسیعی در مورد ساختمان مولکولی و فعالیت الکتروفارماکولوژی کانال های پتاسیمی حساس به ATP غشا داخلی میتوکندری ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) صورت گرفته است [۲۸]. اما هم چنانکه در بالا ذکر شد ولی تنها اطلاعات اندکی در مورد کانال های K_{ATP} اندوپلاسمیک رتیکولوم وجود دارد که صرفاً حضور زیر واحد Kir6.2 را در این کانال نشان داده اند [۳۰، ۳۵] و این در حالی است که در مورد زیر واحدهای SUR و ترکیب آنها در ساختمان کانال rerK_{ATP} سلول ها از جمله هیپاتوسیت ها اطلاعات دقیقی در دست نیست.

در خصوص کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم بر اساس وابستگی به ولتاژ و کندانکتانس تک کانال به سه گروه IK_{Ca} ، BK_{Ca} و SK_{Ca} تقسیم می شوند [۲]. ساختمان کانال های IK_{Ca} به صورت تترامری از زیر واحدهای α بوده و توسط اتصال کلسیم-کالمودولین به کانال فعال می شوند و به

1. Bowine serum albumin

(Cruz, غشاء پلاسمائی (actin, SC-1615, Santa Cruz) گلژی (Golgi protein, abcam, ab6284) و اندوپلاسمیک رتیکولوم (calnexin, SC-11397, Santa Cruz) استفاده گردید. جهت بررسی نوع زیر واحدهای کانال K_{ATP} از آنتی بادی‌های اولیه ضد زیر واحد منفذ - (anti-Kir6.2, SC-11228; Santa Cruz) (anti-SUR1 (Santa Cruz, SC-5789), anti-SUR2A (and SUR2B Santa Cruz, SC-32462, SC-5793) جهت تعیین حضور کانال IK_{Ca} از آنتی بادی اولیه ضد SK4 یا anti-KCNN4 IK_{Ca} استفاده گردید. پس از مرحله آنتی بادی‌های اولیه غشاء نیتروسولوزی در مجاورت آنتی بادی‌های ثانویه قرار گرفتند و در نهایت باندهای پروتئینی با کمک کیت ECL (Amersham) بر روی فیلم عکاسی ظاهر گردیدند.

یافته‌ها

خصوصیات الکتروفارماکولوژی کانال

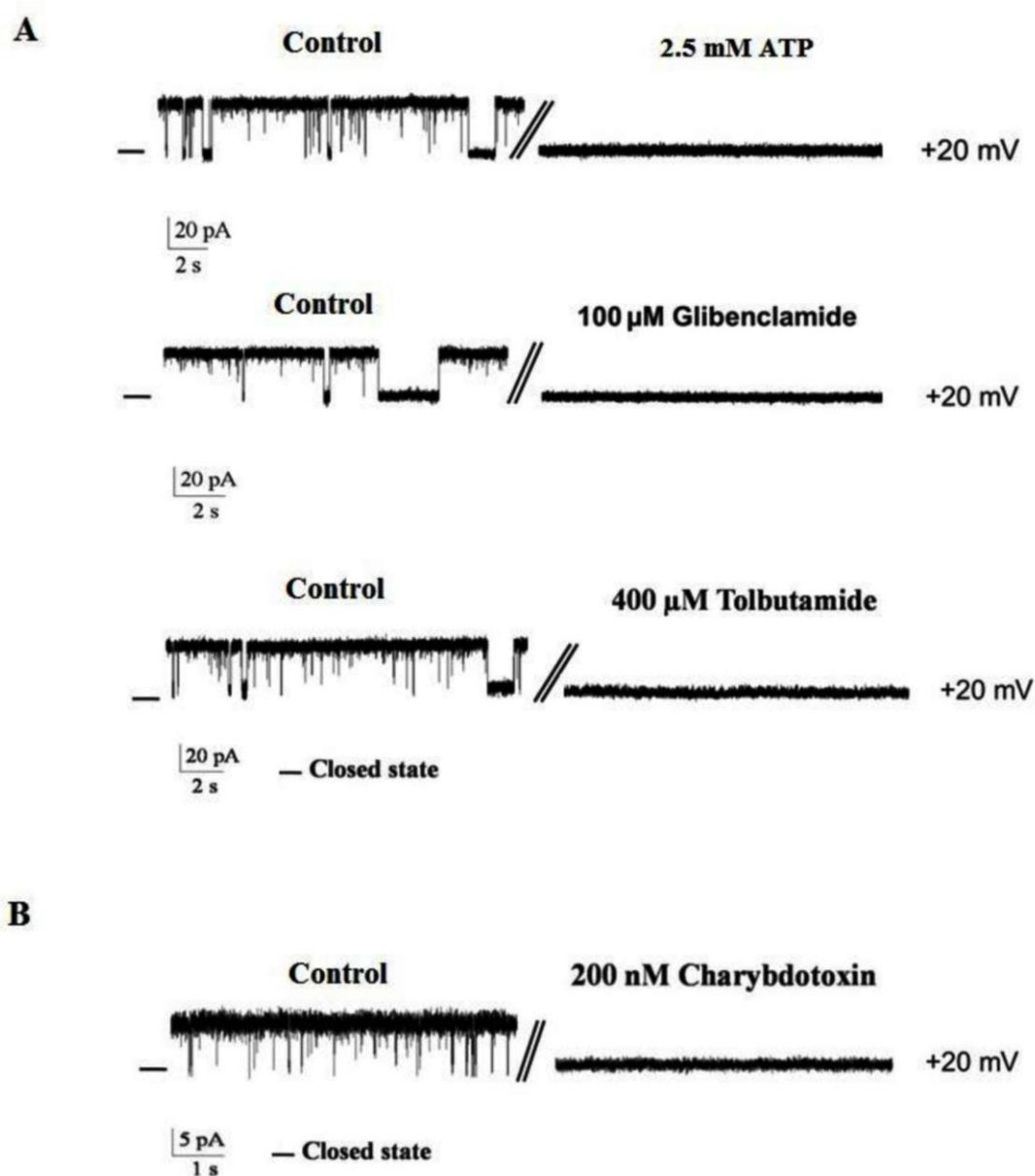
پتاسیمی K_{ATP} و IK_{Ca} :

در مطالعه الکتروفارماکولوژی دو نوع کانال پتاسیمی با کنداکتانس‌های ۵۹۶ pS و ۲۱۱ pS در غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم مشاهده گردید. بررسی فارماکولوژی این دو کانال نشان داد فعالیت کانال ۵۹۶ pS با داروهای ATP، گلی بن کلامید و تولبوتامید مهار می‌گردد (شکل 1A) که نشان دهنده تعلق آن به خانواده کانال‌های K_{ATP} است. کانال ۲۱۱ pS با کریبدوتوکسین مهار گردید (شکل 1B)، حالیکه به ایبریوتوکسین غیر حساس بود (داده نشان داده نشد). احتمالاً این کانال متعلق به خانواده کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم از نوع کنداکتانس متوسط (IK_{Ca}) است. بنابراین جهت بررسی بیشتر و تعیین ساختار مولکولی کانال‌های مذکور از روش وسترن بلات استفاده گردید.

تعیین خلوص نمونه:

جهت تعیین زیر واحدهای کانال K_{ATP} و IK_{Ca} با استفاده از روش وسترن بلات، در ابتدا خلوص نمونه‌های اندوپلاسمیک رتیکولوم مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از مراحل مختلف استخراج غشای اندوپلاسمیک رتیکولوم نمونه برداری صورت گرفت: ۱- مرحله هموژنیزاسیون (step 1)، ۲-

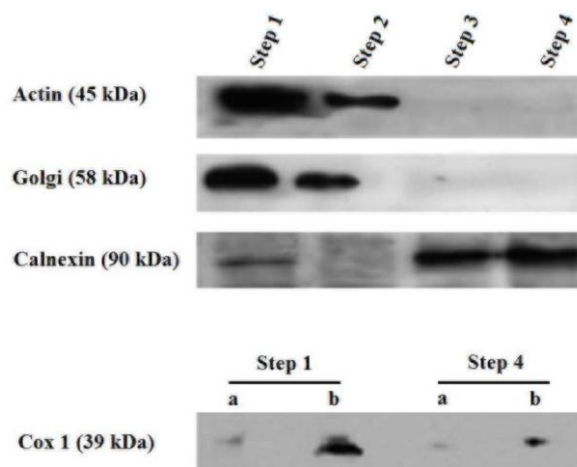
هپاتوسیت‌ها از سایر ارگانل‌های سلولی بود. بدین منظور از دستورالعمل Kan و همکاران استفاده شد [۱۲]. در این روش موش‌های نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۲۰ گرم، ۱۸-۱۶ ساعت قبل از جداسازی کبد ناشتا نگه داشته می‌شدند (دسترسی به آب آزاد بود). بعد از کشتن حیوان و خارج نمودن کبد، بافت هموژنیزه شده (مرحله ۱ تخلیص) و طی ۷ مرحله سانتریفیوژ با دور بالا غشاء سلولی، میتوکندری و سایر ارگانل‌ها جدا شده و در نهایت رسوب حاوی وزیکول‌های اندوپلاسمیک رتیکولوم بدست آمده که در یک میلی لیتر سوکروز ایمیدازول هموژنیزه می‌شد. همچنین از مراحل ۲ و مرحله ۳ یا به عبارتی مرحله گرادیان سوکروز و مرحله پایانی سانتریفیوژ جهت تعیین خلوص نمونه‌هایی برداشته می‌شد و نمونه‌ها در دمای 4°C -۷۰ نگهداری می‌شدند. جهت انجام ثبت از فعالیت تک کانال از روش الحاق کانال بداخل غشاء لیپیدی دو لایه (BLM) استفاده گردید [۱۸]. در این روش وزیکول‌های استخراج شده اندوپلاسمیک رتیکولوم توسط سوزن استیل با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می‌شد. ولتاژ در محفظه سیس (سطح سیتوپلاسمی) اعمال و محفظه ترانس (سطح لومنی اندوپلاسمیک رتیکولوم) گراند می‌شد. جریان عبوری از تک کانال توسط آمپلی‌فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری می‌گردید. تمام ثبت‌ها در 1 kHz با استفاده از یک فیلتر 4 پل بسل و با سرعت نمونه برداری 10 kHz توسط دستگاه ثبت به کامپیوتر منتقل و ذخیره می‌گردید. جهت آنالیز از نرم افزار Pclamp 9 (شرکت Axon) استفاده گردید. جهت انجام کار مولکولی، غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از تکنیک برادفورد تعیین و مقدار یکسانی از هر نمونه جهت الکتروفورز SDS-PAGE استفاده می‌شد [۳]. پس از جدا سازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی، پروتئین‌ها با استفاده از بلات کردن به روش نیمه مرطوب بر روی غشاء نیتروسولوزی منتقل شده و پس از انتقال، جهت پیشگیری از اتصال آنتی بادی‌ها به نواحی غیراختصاصی، غشاءها در ظرف حاوی بافر بلاکینگ (شیر خشک، گلیسرول و TBS) تا روز بعد، غوطه در دمای 4°C می‌شدند. سپس این غشاءها در مجاورت با آنتی بادی اولیه قرار می‌گرفتند. جهت تایید خلوص وزیکول‌های اندوپلاسمیک رتیکولوم از نشانگر میتوکندری (cox1, SC-58347, Santa



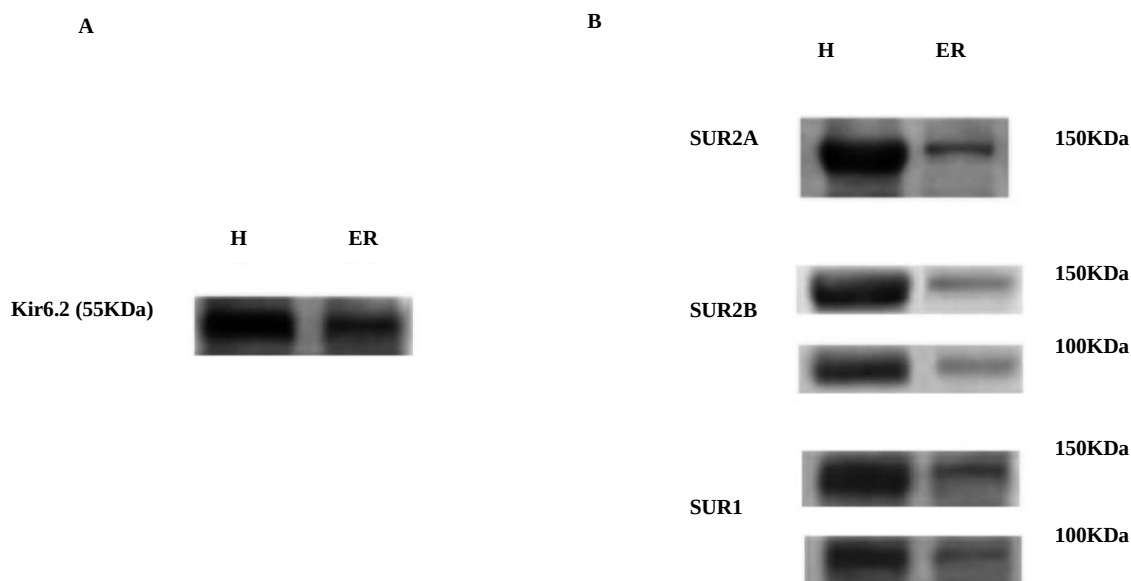
شکل ۱- ثبت از فعالیت کانال K_{ATP} و IK_{Ca} در ولتاژ +20 mV (در شرایط 50 mM کلرید پتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلرید پتاسیم در فضای سیس) قبل و بعد از اضافه کردن داروها. **A-** ثبت از فعالیت کانال K_{ATP} در ولتاژ +20 mV در حضور داروهای ATP با غلظت 2/5 mM، گلی بن کلامید با غلظت 100 μ M، تولبوتامید با غلظت 400 μ M در فضای سیس. اضافه کردن ATP، گلی بن کلامید و تولبوتامید باعث مهار کامل فعالیت کانال گردید (n=5). **B-** ثبت از فعالیت کانال IK_{Ca} در ولتاژ +20 mV در حضور کریبدوتوکسین با غلظت 200 nM در فضای سیس. اضافه کردن کریبدوتوکسین باعث مهار کامل فعالیت کانال گردید (n=5).

کدام از نمونه‌ها باند مربوط به غشاء داخلی میتوکندری مشاهده نشد. از آنجائی که در استخراج غشاء داخلی میتوکندری، میتوکندری‌های استخراج شده باید در آب دیونیزه قرار بگیرند تا غشا داخلی در دسترس قرار گیرد و این مرحله در پروتکل استخراج اندوپلاسمیک رتیکولوم وجود ندارد، این احتمال وجود داشت که بعلت سالم بودن میتوکندری‌ها، غشاء داخلی میتوکندری برای آنتی بادی نشانگر که اختصاص به

اولین مرحله سانتریفیوژ بکمن (step 2)، ۳- مرحله گرادیان سوکروز (step 3) و ۴- آخرین مرحله استخراج (step 4). غشاءها در مجاورت آنتی بادی‌های نشانگر غشاء پلاسمائی (Actin)، اندوپلاسمیک رتیکولوم (Calnexin)، گلژی (Golgi) و غشاء داخلی میتوکندری (COX1) قرار داده شد (شکل ۲). نتایج حاکی از عدم حضور معنی داری حضور غشا سلولی و یا غشا گلژی است. در مورد میتوکندری، در هیچ



شکل ۲- تعیین خلوص نمونه اندوپلاسمیک رتیکولوم با استفاده از وسترن بلات. از نمونه‌های پس از مرحله هموژنیزاسیون (step 1)، اولین مرحله سانتریفیوژ بکمن (step 2)، مرحله گرادیان سوکروز (step 3) و آخرین مرحله رسوب حاصل از سانتریفیوژ بکمن (step 4) جهت وسترن بلات استفاده شد. آنتی بادی‌های نشانگر غشاء پلاسمائی (Actin)، گلژی (Golgi 58kDa)، اندوپلاسمیک رتیکولوم (Calnexin) و غشاء داخلی میتوکندری (Cox1) مورد استفاده قرار گرفت.



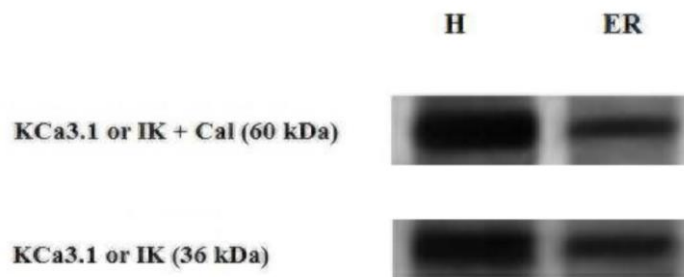
شکل ۳- بیان زیر واحدهای کانال K_{ATP} در پروتئینهای غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم هیپاتوسیت‌ها با روش وسترن بلات را نشان می‌دهد. A: باند زیر واحد (55 kDa) Kir6.2; B: باند زیر واحدهای SUR2A SUR1 و SUR2B را در غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم هیپاتوسیت‌ها نشان می‌دهد. H: نمونه هموژنیزه بافت کبد به عنوان کنترل مثبت، ER: میکروزوم‌های خالص اندوپلاسمیک رتیکولوم هیپاتوسیت‌ها

غشا داخلی دارد غیر قابل دسترس باشد. لذا نمونه‌ها در دو حالت سوسپانسیون شده درون آب (باند b از شکل ۲) و دست نخورده (باند a از شکل ۲) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود مقدار بسیار جزیی میتوکندری سالم و عدم حضور غشا داخلی جدا شده از آن در نمونه اندوپلاسمیک رتیکولوم بود (لازم به ذکر است غشا داخلی میتوکندری حاوی کانال‌های پتاسیمی است). در نهایت، هم‌چنانکه شکل نشان می‌دهد باند قوی کالکسین در مرحله ۴ نشان دهنده حضور

غلظت بالای غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم خشن می‌باشد. به طور کلی نتایج نشان داد که نمونه اندوپلاسمیک رتیکولوم خالص بوده است.

بررسی بیان زیرواحدهای کانال پتاسیمی K_{ATP} و IK_{Ca} :

پس از استخراج غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم و تأیید خلوص آن، شناسائی زیرواحدهای کانال پتاسیمی K_{ATP} و IK_{Ca} با بکارگیری آنتی بادی نشانگر آنها مورد بررسی قرار



شکل ۴- بیان پروتئین کانال IK_{Ca} در پروتئین های غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم هیپاتوسیت ها با روش وسترن بلات را نشان می دهد. باند ۶۰ مربوط به کمپلکس پروتئین-کالمودولین و باند ۳۶ مربوط پروتئین کانال به تنهایی است. H: نمونه هموژنیزه بافت کبد به عنوان کنترل مثبت، ER: میکروزوم های خالص اندوپلاسمیک رتیکلوم هیپاتوسیت ها

گرفت.

بحث

در این مطالعه، ساختار مولکولی کانال های پتاسیمی K_{ATP} و IK_{Ca} اندوپلاسمیک رتیکلوم بررسی گردید. درک ساختار مولکولی اطلاعات با ارزشی از ارتباط بین ساختار و عملکرد کانال ها ارائه می دهد.

کانال های K_{ATP} غشا سلولی، اولین بار در میوسیت های قلب [۲۳] و سپس در بافتهای دیگر از جمله سلولهای β پانکراس، عضله اسکلتی، عضله صاف عروق و نورون ها گزارش گردیدند [۳۶، ۹، ۵]. کانال های K_{ATP} همچنین در ساختارهای غشائی درون سلولی بویژه میتوکندری نیز وجود دارند [۲۹]. کانال های K_{ATP} متابولیسم سلول را با تحریک پذیری غشاء مرتبط می کنند. این کانال ها با افزایش ATP داخل سلولی مهار و با کاهش آن تحریک می شوند [۲۱]. از لحاظ ساختاری، کانال های K_{ATP} کمپلکس اکتامری متشکل از زیر واحدهای Kir6.x و SURs می باشند. زیر واحد تشکیل دهنده منفذ کانال (Kir6.x) با دو ایزوفرم Kir6.1 و Kir6.2 و زیر واحد تنظیمی SUR با سه ایزوفرم SUR1، SUR2A و SUR2B ترکیب مولکولی مختلفی را بوجود آورده که سبب تنظیم متفاوت عملکرد کانال در بافتهای مختلف شده است [۱۱، ۱۳].

در این مطالعه جهت بدست آوردن ویژگی های مولکولی کانال های اختصاصی اندوپلاسمیک رتیکلوم و جهت رفع هر نوع احتمال از حضور زیرواحدهای کانال های مورد نظر از سایر غشاهای سلولی، با استفاده آنتی بادی های اختصاصی

جهت تعیین زیرواحد منفذ کانال K_{ATP} از آنتی بادی نشانگر Kir6.2 (Anti-KCNJ11 antibody) استفاده شد (شکل ۳A). باند پروتئینی ۵۵ kDa نمایانگر حضور این ایزوفرم از زیرواحد منفذ کانال در غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم می باشد.

جهت تعیین زیر واحدهای تنظیمی کانال از آنتی بادی های نشانگر پپتیدهای SUR1، SUR2A و SUR2B استفاده شد. آنتی بادی SUR2A یک باند ۱۵۰ kDa، آنتی بادی SUR2B دو باند ۱۵۰ kDa و ۱۰۰ kDa و همچنین آنتی بادی SUR1 دو باند ۱۵۰ kDa و ۱۰۰ kDa را در میکروزوم های شناسائی کردند (شکل ۳B). این نتایج نشان می دهد تمامی SUR ها و زیر واحد Kir6.2 در تشکیل کانال K_{ATP} در اندوپلاسمیک رتیکلوم هیپاتوسیت ها دخالت دارند.

بررسی بیان زیرواحد کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس متوسط ($SK4$ or $rerIK_{Ca}$):

جهت بررسی حضور زیرواحد کانال $SK4$ یا $rerIK_{Ca}$ از آنتی بادی نشانگر ناحیه C-ترمینال پروتئین کانال (Anti-KCNN4 antibody)، استفاده گردید (شکل ۴). از طریق مجاورت با آنتی بادی اختصاصی، دو باند با وزن مولکولی ۳۶ kDa و ۶۰ kDa برای این کانال شناسایی شد. باند ۳۶ kDa پروتئین کانال و باند ۶۰ kDa کمپلکس کانال-کالمودولین را نشان می دهد [۱۷]. نتایج حضور کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس متوسط را نشان می دهد.

اندامک‌های داخل سلولی، خلوص نمونه اندوپلاسمیک رتیکولوم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج، خلوص بالای نمونه اندوپلاسمیک رتیکولوم استخراج شده را نشان دادند. مطابق با نتایج بدست آمده از آنالیز مولکولی، در اندوپلاسمیک رتیکولوم هپاتوسیت‌ها زیر واحدهای Kir6.2، SUR1، SUR2A و SUR2B بیان می‌شود. مطالعه ما حضور Kir6.2 در اندوپلاسمیک رتیکولوم هپاتوسیت‌ها و مطالعه دیگران نیز همین ایزوفرم را در اندوپلاسمیک رتیکولوم سلولهای نورون‌ها و کاردیومیوسیت‌ها نشان دادند [۱۴، ۳۵]، بعلاوه مطالعه حاضر اولین گزارش از شناسایی زیر واحدهای تنظیمی در اندوپلاسمیک رتیکولوم هپاتوسیت‌ها می‌باشد و نکته حائز اهمیت همراهی زیر واحد منفذی Kir6.2 با هر سه نوع ایزوفرم SURs (SUR1، SUR2A و SUR2B) می‌باشد.

Kir6.x به عنوان منفذ کانال جهت عبور یون عمل کرده که بر اساس ویژگی‌های ساختمانی ایزوفرم‌های آن، کندانسانس کانال تعیین می‌شود. بطوریکه کانال‌های دارای زیر واحد منفذی Kir6.1 کندانسانس کمتری نسبت به Kir6.2 نشان می‌دهند. جالب است که بیان شود احتمال تلفیق دو زیر واحد Kir6.1 و Kir6.2 در تشکیل کمپلکس تترامری منفذ کانال وجود دارد، چنانچه مطالعه Cui و همکاران (۲۰۰۱) حضور کانالی با کندانسانس حد واسط را پیشنهاد نمودند [۶].

حضور SUR ها سبب تنظیم رفتار بیوفیزیکی و فارماکولوژی کانال می‌گردد. با توجه به اینکه کندانسانس کانال K_{ATP} غشاء اندوپلاسمیک رتیکولوم (596 pS) از کندانسانس کانال‌های K_{ATP} غشاء پلاسمائی (200-300pS) متفاوت است، و هم چنین احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای منفی ولتاژهای نسبتاً مثبت پایین، بسیار بالاست این احتمال وجود دارد که علاوه بر اثر ترکیب غشاء لیپیدی دو لایه (فسفاتیدیل کولین) و نبود سیتواسکلتون‌ها [۴]، نوع SUR می‌تواند بر این خصوصیات تأثیر بگذارد. بطوریکه حضور SUR1 به همراه Kir6.2 احتمال باز بودن کانال را تقریباً از ۰٫۱ به ۰٫۴ افزایش می‌دهد و حضور ایزوفرمهای مختلف SUR کندانسانس کانال را ۲ تا ۳ برابر افزایش می‌دهد [۳۱]. لازم به ذکر است نتایج آزمایشات ما حضور هر دو نوع زیر واحد SUR2A و SUR2B را نشان

می‌دهد و این احتمال را پیشنهاد می‌کند که کانال K_{ATP} اندوپلاسمیک رتیکولوم متفاوت از کانال K_{ATP} سایر سلولها بوده و ساختار آن تلفیقی از هر دو نوع زیر واحد SUR1 و SUR2 می‌باشد که احتمالاً می‌تواند یکی از دلایل بالا بودن کندانسانس کانال باشد. نتیجه مشابهی نیز در مورد کانال K_{ATP} سارکوپلاسمیک قلب مشاهده شده است [۳۴]. علاوه بر این، SUR ها مهمترین ویژگی کانال یعنی حساسیت متابولیکی کانال را تعیین می‌کنند. به عبارت دیگر ATP بدون حضور زیر واحدهای تنظیمی اثر مهاری خود را بر Kir6.x اعمال می‌کند و حساسیت متابولیکی هر یک از زیر واحدهای Kir6.1 و Kir6.2 به ATP مشابه بوده اما حضور SUR1 موجب افزایش ۱۰ برابری حساسیت Kir6.2 به ATP می‌شود و در خصوص مابقی زیر واحدها بصورت الگوی حساسیت متابولیکی

$SUR1 > SUR1 + SUR2B > SUR1 + SUR2A > SUR2B > SUR2A + SUR2B > SUR2A$

می‌باشد. بدین ترتیب بر اساس شواهد می‌توان حساسیت کانال‌های مختلف K_{ATP} به تخلیه انرژی را بدین ترتیب بیان کرد:

$SUR1_Kir6.2 >>> SUR2B_Kir6.2 > SUR2A_Kir6.2$

[۷، ۱۵]. از طرفی الگوی فارماکولوژی کانال به داروهای درمانی مانند سولفونیل اوره‌ها بر اساس ایزوفرم SUR تعیین می‌گردد [۲۷] برای مثال فعالیت کانالی با ترکیب ساختاری Kir6.2-SUR1 با میل ترکیبی بالائی توسط تولبوتامید مهار می‌گردد در حالی که این دارو بر روی فعالیت کانال با ترکیب ساختاری Kir6.2-SUR2A مری ندارد [۱۰، ۲۰]. این در حالی است که گلی بن کلامید بر روی فعالیت کانال با هر دو ساختار فوق اثر گذار است، البته میل ترکیبی بالاتری نسبت به SUR1 نشان می‌دهد. بطوریکه هم بیانی Kir6.2-SUR2A در سارکولمای سلول‌های قلبی تمایل کمی به گلی بن کلامید نشان می‌دهند. بنابراین نتایج مولکولی ما دال بر حضور زیر واحد های تنظیمی SUR ها و مهار کانال توسط هم گلی بن کلامید و هم تولبوتامید (شکل ۱A) احتمال تلفیق زیرواحدهای SUR با kir6.2 را در اندوپلاسمیک رتیکولوم بالا می‌برد و تأکیدی بر تفاوت ساختمانی کانال K_{ATP} اندوپلاسمیک رتیکولوم و کانال K_{ATP} غشائی است و این

است بر اساس شواهد مولکولی باند پروتئین ۶۰ کیلو دالتونی معرف کمپلکس کانال-کالمودولین و باند ۳۶ کیلو دالتونی معرف پپتید کانال به تنهایی می‌باشد [۱۷].

به طور خلاصه مطالعه حاضر حضور و ساختار مولکولی کانال های K_{ATP} و IK_{Ca} را در اندوپلاسمیک رتیکلوم هپاتوسیت ها نشان می‌دهد. با توجه به نقش کانال های پتاسیمی اندوپلاسمیک رتیکلوم در ارتباط با اعمالی مانند جذب و آزادسازی کلسیم، جبران بار الکتریکی غشا، تغییر پتانسیل عرض غشای اندوپلاسمیک رتیکلوم و دور نگه داشتن پتانسیل غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم از پتانسیل تعادلی کلسیم، دستیابی به عملکرد کانال مستلزم یافتن دانش ساختاری و ویژگی های رفتاری کانال می‌باشد. بنابراین شناخت ساختار مولکولی و بررسی نقش فیزیولوژیک آنها از اهمیت بسزائی برخوردار است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه و آقای دکتر رضا صغیری از انستیتو پاستور ایران جهت همکاری های ارزنده در قسمت استخراج اندوپلاسمیک رتیکلوم، تشکر به عمل می‌آید.

احتمال را نیز مطرح می‌کند که ممکن است این کانال محل اثری برای داروهای سولفونیل اوره باشد.

دومین یافته مهم مطالعه این است که کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم از نوع کنداکتانس متوسط (IK_{Ca}) یا (SK_4) در غشاء ER حضور دارند. کانال IK_{Ca} غشا پلاسمایی توسط کلسیم داخل سلولی فعال و توسط کریبدوتوکسین و TRAM-34 مهار می‌گردد [۲، ۳۲]. مطالعات مولکولی و فارماکولوژی حضور BK_{Ca} و SK_{Ca} را در اندوپلاسمیک رتیکلوم نورون ها و قلب گزارش داده و جذب و آزادسازی کلسیم را مستلزم حضور این نوع کانال پتاسیمی گزارش کرده‌اند [۱۴، ۳۳]. نتایج ما حضور یک کانال کاتیونی با کنداکتانس ۲۱۱ pS و پتانسیل معکوس 30 mV- را نشان داد از آنجائیکه کانال کاتیونی توسط کریبدو توکسین (شکل 1B) مهار گردید و ایرووتوکسین بر روی آن اثری نداشت (اطلاعات در دست ارائه) بنظر می‌رسد احتمالاً کانال کاتیونی متعلق به خانواده کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم از نوع کنداکتانس متوسط در اندوپلاسمیک رتیکلوم هپاتوسیت ها باشد جهت تائید این احتمال مطالعه مولکولی ما با استفاده از آنتی بادی نشانگر پپتید کانال IK_{Ca} حضور این کانال را تائید کرد و حضور دو باند پروتئینی با وزن مولکولی ۶۰ و ۳۶ کیلو دالتون را نشان داد. با توجه به اینک بخش C- ترمینال کانال های IK_{Ca} به پروتئین درون سلولی کالمودولین متصل

References

- [1] Ashcroft FM, Gribble FM, Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K (ATP) channels. *J Diabetes Complications* 14 (2000) 192-196.
- [2] Berkefeld H, Fakler B, Schulte U, Ca-Activated K Channels: From protein complex to function. *Physiol Rev* 90 (2010) 1437-1459.
- [3] Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- [4] Brady PA, Alekseev AE, Aleksandrova LA, Gomez LA, Terzic A, A disrupter of actin microfilaments impairs sulfonylurea-inhibitory gating of cardiac K_{ATP} channels. *Am J Physiol* 271 (1996) 2710-2716.
- [5] Cook DL, Hales CN, Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311 (1984) 271-273.
- [6] Cote K, Proteau S, Teijeira J, Rousseau E, Characterization of the sarcoplasmic reticulum $k(+)$ and $Ca(2+)$ -release channel-ryanodine receptor-in human atrial cells. *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000) 2051-2063.
- [7] Cui Y, Giblin JP, Clapp LH, Tinker A, A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. *PNAS* 98 (2001) 729-734.
- [8] Dabrowski M, Larsen T, Ashcroft FM, Bondo Hansen J, Wahl P, Potent and selective activation of the pancreatic

- beta-cell type KATP channel by two novel diazoxide analogues. *Diabetologia* 46 (2003) 1375-1382.
- [9] English AR, Zurek N, Voeltz GK, Peripheral ER structure to function. *Curr Opin Cell Biol* 21 (2009) 596-602.
- [10] Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG, Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 90 (2010) 799-829.
- [11] Gribble FM, Tucker SJ, Seino S, Ashcroft FM, Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K (ATP) channels. *Diabetes* 47 (1998) 1412-1418.
- [12] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y, Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90 (2010) 291-366.
- [13] Kan FW, Jolicœur M, Paiement J, Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *Biochim Biophys Acta* 1107 (1992) 331-341.
- [14] Kefaloyianni E, Lyssand JS, Moreno C, Delaroche D, Hong M, Fenyő D, Mobbs CV, Neubert TA, Coetzee WA, A Comparative Proteomic Analysis of the K_{ATP} channel Complex in Different Tissue Types. *Proteomics* 13 (2013) 368-378.
- [15] Kuum M, Veksler V, Liiv J, Ventura-Clapier R, Kaasik A, Endoplasmic reticulum potassium-hydrogen exchanger and small conductance calcium-activated potassium channel activities are essential for ER calcium uptake in neurons and cardiomyocytes. *J Cell Sci* 125 (2012) 625-633.
- [16] Masia R, Enkvetchakul D, Nichols CG, Differential nucleotide regulation of K(ATP) channels by SUR1 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol* 39 (2005) 491-501.
- [17] Mikhailov M, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC, Ashcroft FM, 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* 24 (2005) 4166-4175.
- [18] Morales P, Garneau L, Klein H, Lavoie MF, Parent L, Sauvé R, Contribution of the KCa3.1 channel-calmodulin interactions to the regulation of the KCa3.1 gating process. *J Gen Physiol* 142 (2012) 37-60.
- [19] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194 (1962) 979-980.
- [20] Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res Clin Pract* 66 (2004) 75-78.
- [21] Nichols CG, KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440 (2006) 470-476.
- [22] Ng KE, Schwarzer S, Duchen MR, Tinker A, The intracellular localization and function of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit Kir6.1. *Membrane Biol* 234 (2010) 137-147.
- [23] Noma A, ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305 (1983) 147-148.
- [24] Pedarzani P, Stocker M, Molecular and cellular basis of small--and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65 (2008) 3196-3217.
- [25] Pitt SJ, Park KH, Nishi M, Charade of the SR K-Channel: Two Ion-Channels, TRIC-A and TRIC-B, Masquerade as a Single K-Channel. *Biophysical J* 99 (2010) 417-426.
- [26] Salari S, *Characterization of electropharmacological properties of single K⁺ channel on rough endoplasmic reticulum in rat hepatocytes by channel incorporation into bilayer lipid membrane* [dissertation]: Shahid Beheshti Univ Med Sci; 2011.
- [27] Shi NQ, Ye B, Makielski JC, Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *J Mol Cell Cardiol* 39 (2005) 51-60.
- [28] Szabó I, Leanza L, Gulbins E, Zoratti M, Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. *Pflugers Arch* 463 (2012) 231-246.
- [29] Szweczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels. *IUBMB life* 61 (2009) 134-143.
- [30] Varadi A, Grant A, McCormack M, Intracellular ATP-sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic beta cells: against a role in organelle cation homeostasis. *Diabetologia* 49 (2006) 1567-1577.
- [31] Wheeler A, Wang Ch, Yang K, Coassembly of different sulfonylurea receptor subtypes extends the phenotypic diversity of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels.

- Mol Pharmacol** 74 (2008) 1333–1344.
- [32] Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG, Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1 : a potential immunosuppressant. **Proc Natl Acad Sci** 97 (2000) 8151-8156.
- [33] Yamashita M, Sugioka M, Ogawa Y, Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release. **FEBS J** 273 (2006) 3585–3597.
- [34] Zhou M, He HJ, Suzuki R, Localization of Sulfonylurea Receptor Subunits, SUR2A and SUR2B, in Rat Heart. **J Histochem Cytochem** 55 (2007) 795-804.
- [35] Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, ATP-sensitive K^{+} -channel subunits on the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. **J Histochem Cytochem** 53 (2005) 1491–1500.
- [36] Zoga V, Kawano T, Liang MY, Bienengraeber M, Weihrauch D, McCallum B, Gemes G, Hogan Q, Sarantopoulos C. KATP channel subunits in rat dorsal root ganglia: alterations by painful axotomy. **Mol Pain** 6 (2010) 6.