

An evidence for a potassium channel in endoplasmic reticulum based on single channel recording in bilayer lipid membrane

Hamid Sepehri¹, Afsaneh Eliassi^{1*} and Reza Saghiri²

¹*Physiology Dept. & Neurosci. Res. Center, Fac. Med., Shaheed Beheshti Med. Sci. Univ.*

²*Pasteur Institute, Biochemistry Dept.*

Abstract

Introduction Numerous studies have demonstrated the presence of potassium selective channels in membranes of internal organelles. These channels are essential to a large variety of cellular processes including intracellular Ca²⁺ signaling, protein recycling, charge neutralization and cell protection. In contrast to the sarcoplasmic reticulum where potassium channels have been clearly identified, there is little evidence for K⁺ selective channels in RER of hepatocytes. The aim of this study is to find an evidence for presence of potassium channel in endoplasmic reticulum and considering the pharmacological and biophysical properties of this channel.

Methods: Hepatocytes RER vesicles were isolated by homogenizing rat liver followed by several centrifuging steps and then incorporated into the bilayer lipid membrane (BLM). The BLM was formed by painting phosphatidylcholine across the 350 μm aperture separating two chambers (cis chamber containing 200 mM KCl and trans chamber containing 50 mM KCl). Single channel recordings were used to indicate the presence of K⁺ channels.

Results: Single channel recordings revealed the existence of a cation selective channel with high permeability to K⁺ and 599 pS conductance. The current–voltage relation was linear. The open probability was strongly voltage dependent, showing higher values at positive voltages and lower at negative voltages. A subconductance state about 60 % of fully open state was observed at all voltages. The cationic channel showed an inhibition by 4-aminopyridine (non specific K⁺ channel blocker)

Conclusions: In this study we have established an evidence for existence of large conductance K⁺ channel in the hepatocyte ER vesicles.

Keywords: hepatocyte, endoplasmic reticulum, BLM, single channel recording, K⁺ channel.

* Corresponding Author Email: afeliassi@hotmail.com

شاهدی بر وجود کانال پتاسیمی در شبکه اندوپلاسمیک بر اساس ثبت از تک کانال در غشاء دو لایه لیپیدی

حمید سپهری^۱، افسانه الیاسی^{۱*} و رضا صغیری^۲

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب

۲- انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی

دریافت: مرداد ۱۳۸۵ بازبینی: شهریور ۱۳۸۵ پذیرش: شهریور ۱۳۸۵

چکیده

مقدمه: مطالعات زیادی وجود کانال های پتاسیمی را در غشاء ارگانال های داخل سلولی نشان داده است. این کانالها در فرایندهای مختلف سلولی همانند سیگنالینگ کلسیم داخل سلولی، تخریب پروتئینها، خنثی سازی شارژ الکتریکی و محافظت سلولی نقش دارند. بر خلاف شبکه سارکوپلاسمیک که وجود کانال های پتاسیمی بخوبی در آنها شناسائی شده است، اطلاعات کمی در مورد حضور کانال پتاسیمی در شبکه اندو پلاسمیک وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی وجود کانال پتاسیمی در شبکه اندو پلاسمیک و بررسی خصوصیات بیوفیزیک و فارماکولوژیک آن است.

روشها: پس از جدا کردن و هموژنیزاسیون کبد موش صحرائی و مراحل مختلف ساتریفوژ، وزیکولهای شبکه اندوپلاسمیک دانه دار (rough endoplasmic reticulum - RER) تهیه و به داخل غشاء دو لایه لیپیدی (bilayer lipid membrane-BLM) الحاق شد. غشاء دو لایه لیپیدی توسط فسفاتیدیل کولین بر روی منفذی به قطر $350 \mu\text{m}$ که بین دو محفظه تفلونی بنامهای محفظه cis که حاوی کلرور پتاسیم 200mM میلی مولار و محفظه trans که حاوی کلرید پتاسیم 50mM میلی مولار بود تشکیل گردید. سپس با استفاده از روش ثبت از تک کانال (single channel recording)، حضور کانال پتاسیم در شبکه اندوپلاسمیک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: کانال کاتیونی با نفوذ پذیری بالا به پتاسیم، با کندانانس 599pS مشاهده گردید که منحنی جریان - ولتاژ آن خطی بود و احتمال باز بودن کانال وابستگی به ولتاژ داشته بطوریکه در ولتاژهای مثبت بالاتر از 30mV میلی ولت بشدت افزایش می یافت. در تمام ولتاژها یک subconductance state به اندازه 60% وضعیتی که کانال بطور کامل باز بود (fully open state)، مشاهده گردید. کانال کاتیونی با 4 -آمینوپیریدین (مهارکننده غیر اختصاصی کانال پتاسیمی) مهار گردید. **نتیجه گیری:** با استفاده از ثبت از تک کانال شاهدی دال بر حضور کانال پتاسیمی با کندانانس بالا در شبکه اندو پلاسمیک دانه دار هپاتوسیتها به دست آمد.

واژگان کلیدی: شبکه اندوپلاسمیک، هپاتوسیت، غشاء دو لایه لیپیدی، ثبت از تک کانال، کانال پتاسیم.

مقدمه

قلبی و اسکلتی حاوی کانالهای پتاسیمی [۲۰،۱۶،۱۵]، کلری [۲۴،۱۴] و کلسیمی [۱۲،۲] می باشند. کانالهای پتاسیم و کلر در غشاء SR در طول فرآیند آزاد سازی و برداشت کلسیم از نزدیک شدن پتانسیل غشاء SR به پتانسیل تعادلی کلسیم (E_{Ca}) جلوگیری می کنند [۲۱،۵]. در دهه اخیر کانال پتاسیمی وابسته به ATP در غشاء داخلی میتوکندری (mitoK_{ATP}) شناسائی شده است [۱۹،۱۱]. بر اساس اطلاعات موجود این کانال در حفظ همئوستاز پتاسیم در میتوکندری و بنابراین در حفظ شارژ الکتریکی بدنبال فعالیت پمپ هیدروژنی نقش دارد [۳]. همچنین مطالعات اخیر نشان داده اند mitoK_{ATP} در حفاظت سلولهای قلبی در شرایط انفارکتوس دخالت داشته [۸،۷] و محل اثر بسیاری از عوامل

الحاق پروتئین کانال به داخل غشاء دو لایه لیپیدی (bilayer lipid membrane-BLM) تکنیک با ارزشی است که برای آنالیز عمل کانالهای یونی در غشاهای داخل سلولی که با تکنیکهای دیگر قابل دسترسی نیستند به کار می رود. مطالعات زیادی حاکی از حضور کانالهای یونی در غشاء ارگانل های داخل سلولی است. برای مثال، شبکه سارکوپلاسمیک (sarcoplasmic reticulum-SR) عضله

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:

afeliassi@hotmail.com

از زرده تخم مرغ استخراج گردید [۲۶]. برای تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی از روش Muller استفاده شد [۱۸]. فسفاتیدیل کولین با غلظت mg/ml در n -decan حل شده و با استفاده از سوزن فلزی (stainless steel) به قطر $150 \mu m$ با منفذی به قطر $350 \mu m$ که بر روی دیواره ای از جنس تفلون تعبیه شده بود تماس داده شد و غشاء تشکیل گردید. دو طرف منفذ به ترتیب در فضای cis (فضای سیتوپلاسمی) محلول $200 mM$ کلرید پتاسیم و در فضای trans (فضای داخل لومن) محلول $50 mM$ کلرید پتاسیم قرار داشت. محلولهای کلرید پتاسیم حاوی $10 mM$ Hepes بوده و pH آن با استفاده از trizma به 7.4 رسانده شد. تشکیل غشاء با استرئو میکروسکوپ مشاهده می شد. غشائی که در حدود $100 mV$ ولتاژ را تحمل می کرد و فاقد نشست بوده و ظرفیت خازنی آن در حدود 300 الی 400 پیکو فاراد بود، غشاء مناسب بوده و جهت آزمایش استفاده می شد.

استخراج اندوپلاسمیک ریکولوم از هپاتوسیت

در این مرحله موشهای نر نژاد Wistar با وزن تقریبی 180 گرم مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات ۲۴ ساعت قبل از آزمایش گرسنه نگه داشته شده و در روز آزمایش با استفاده از گیوتین کشته می شدند، سپس کبد آنها جدا می شد و پس از هموژناسیون بافت و سانتریفوژ آن در مراحل مختلف، وزیکول های ER استخراج و در محلول سوکروز ایمیدازول در دمای $0^{\circ}C$ -۷۰ نگهداری می شد [۱۲].

ثبت فعالیت کانال (single channel recording)

جهت الحاق کانال به غشاء دو لایه لیپیدی، یک سوزن stainless steel به قطر $100 \mu m$ به وزیکولهای استخراج شده آغشته گردیده و با غشاء دو لایه تماس داده می شد. به این ترتیب، بطور تصادفی یک یا دو کانال وارد غشاء می شد. جهت ثبت از فعالیت کانال از الکترودهای $Ag/AgCl$ استفاده می شد. این الکترودها به وسیله پل نمکی آگار - ۳٪ آگار در محلول سه مولار کلرور پتاسیم - (agar salt bridge) به محفظه های cis و trans متصل می گردید، الکتروده متصل به محفظه cis الکتروده مرجع بوده و الکترودی که به محفظه trans متصل می گردید الکترودی بود که ولتاژ را اعمال می کرد. دامنه ولتاژ به کار رفته بین $30 - 60$ میلی ولت قرار داشته است که با فواصل ده میلی ولتی اعمال می گردید. الکترودها از طریق پری آمپی فایر به دستگاه آمپلی فایر (bilayer clamp -525A- Warner Instruments) متصل می گردیدند و به میزان 20 الی 100 برابر تقویت گردیده و جریان خروجی از آمپلی فایر با فیلتر ۴ pole پایین گذر Bessel به میزان $1 KHz$ فیلتر شده و سپس جریانهای ثبت شده با استفاده از دستگاه ای تودی (analog to digital A/D) دوازده بیتی با دامنه $5 mV \pm$ دیجیتالیته شده و با سرعت نمونه برداری (sampling rate) برابر $5 KHz$ به کامپیوتر منتقل و ذخیره گردیدند. تمام آزمایشات BLM در دمای اطاق (در حدود $22^{\circ}C$) انجام شدند.

فارماکولوژیک نیز هست [۱۳]. به علاوه، اخیراً نشان داده شده است کانال $big K^+$ channel (BK) نیز در غشاء داخلی میتوکندری وجود دارد که در مرگ برنامه ریزی شده سلول (apoptosis) نقش مهمی به عهده دارد [۲۵].

با توجه به اینکه شبکه اندوپلاسمیک (endoplasmic reticulum-ER) در بسیاری از فرآیندهای سلولی همانند سنتز پروتئین و هموستاز کلسیم نقش دارد [۴]، شناخت کانالهای یونی موجود در غشاء شبکه اندوپلاسمیک از اهمیت زیادی برخوردار است. تاکنون وجود کانال های کلر در غشاء ER هپاتوسیت به اثبات رسیده است و پیشنهاد شده که در خنثی سازی شارژ الکتریکی در هنگام خروج کلسیم نقش دارند [۱۷،۶] اما شواهدی حاکی از حضور کانال پتاسیمی در این غشاء گزارش نشده است. یافتن چنین کانالی می تواند در کنار کلر در حفظ خنثی سازی شارژ الکتریکی که در هنگام آزاد شدن کلسیم از اندوپلاسمیک ریکولوم ایجاد می شود نقش داشته باشد و از این طریق بر هموستاز کلسیم تاثیر داشته باشد. در پژوهش حاضر وجود کانال پتاسیمی در شبکه اندوپلاسمیک و خواص الکتروفیزیولوژی آن، بعد از جا گذاری در غشاء مصنوعی (BLM) با استفاده از تکنیک ثبت از تک کانال (single channel recording) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد

در این تحقیق از ۴- آمینوپیریدین (4-aminopyridine; 4-AP) عنوان بلوکر غیر اختصاصی کانال پتاسیمی، تریسما (tris; trizma base) و هپس (Hepes; N-Z-hydroxyethylpiperazine-N-Z-ethanesulfonic acid) که همگی محصول شرکت سیگما بودند و n-decan محصول شرکت مرک استفاده گردید. آب مقطر به کار رفته برای تهیه محلول کلرید پتاسیم دیونیزه بوده است.

روش ها

این تحقیق در سه مرحله مختلف انجام شده است: تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی (BLM)، استخراج شبکه اندوپلاسمیک دانه دار (rough endoplasmic reticulum - RER) به صورت وزیکولهای کوچک از هپاتوسیت و ثبت از تک کانال (single channel recording) جاگذاری شده در BLM.

تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی (BLM)

معمولاً برای تشکیل BLM از یک و یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می گردد. در این پروژه جهت تشکیل BLM از فسفاتیدیل کولین استفاده شده است. ماده فوق بر اساس روش Singleton

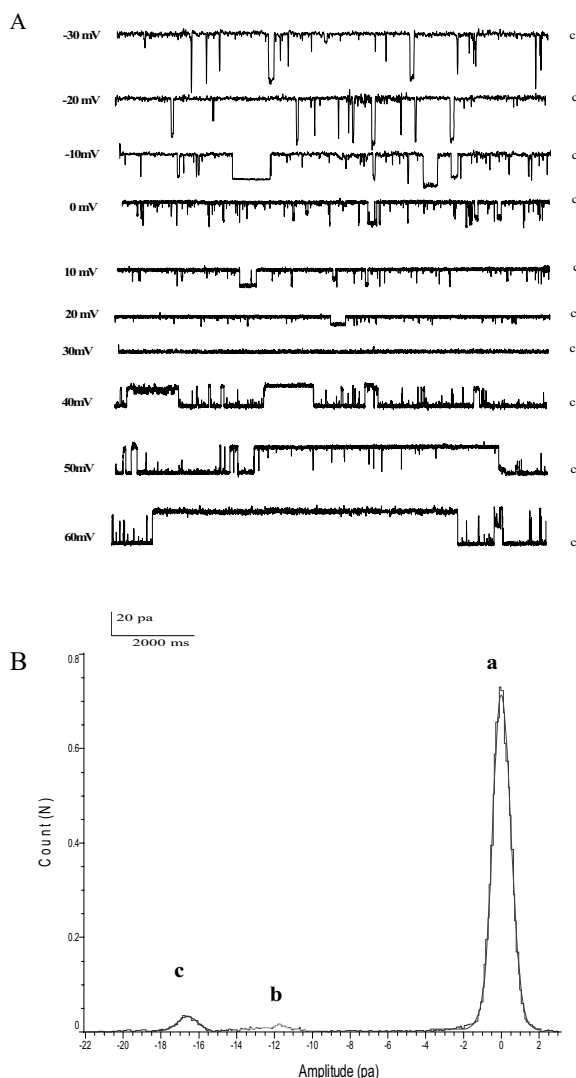
تجزیه و تحلیل داده ها

ثبت های گرفته شده با استفاده از برنامه نرم افزاری clampfit9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جریانهای ثبت شده بسته به میزان نویز پایه به مقدار ۴۰۰-۸۰۰ KHz فیلتر پایین گذر (low pass filter) شدند و جهت به دست آوردن احتمال باز بودن کانال (کسری از زمان که کانال در حالت هدایتی سپری می نماید و از محاسبه نسبت تعداد نقاط ثبت شده در وضعیت هدایتی به کل تعداد نقاط در ثبت بدست می آید) و میانگین جریان در هر ولتاژ، میزان توزیع شدت جریان عبوری (current amplitude histogram) آن با برنامه Clampfit 9 رسم و با استفاده از رابطه Gaussian فیت گردید. منحنی ولتاژ - احتمال باز بودن کانال نیز با برنامه clampfit 9 ترسیم گردید، نقاط آن با استفاده از رابطه Boltzman $P_o = V_{min} + \frac{V_{max} - V_{min}}{1 + e^{\frac{ZdF(V - V_{mid})}{RT}}}$ ($V_{mid} = 37.8 \pm 1.08$, $Zd = -6.66$) منطبق (Fit) گردید و منحنی جریان - ولتاژ با نرم افزار excel رسم شد. در هر ولتاژ ۵ ثبت گرفته شده است و نتایج بصورت $mean \pm SE$ نشان داده شده اند.

نتایج

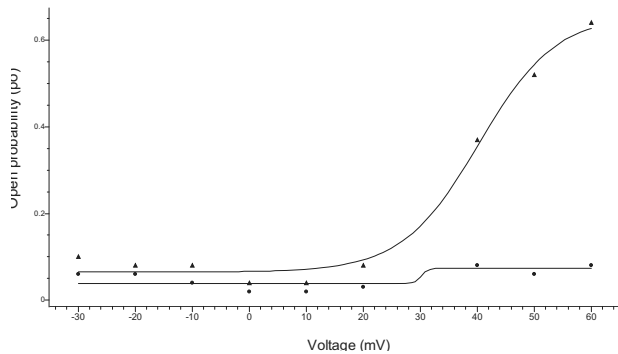
خصوصیات الکترو فیزیولوژیک تک کانال

فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکولهای شبکه اندو پلاسمیک به غشاء مصنوعی در محیط غیر همگون کلرید پتاسیم (۲۰۰ mM KCl cis/۰.۵ mM KCl trans) ثبت گردید. شکل ۱- A جریانهای ثبت شده در ولتاژهای مختلف غشاء را نشان می دهد. در ولتاژ صفر میلی ولت بدون اینکه هیچگونه اختلاف ولتاژی اعمال شده باشد جریان رو به پایین و منفی ثبت گردیده که ناشی از حرکت یونها در جهت گرادینان غلظتی از محفظه سیس به ترانس است. میزان جریان در ولتاژ نزدیک به ۳۰ میلی ولت به شدت کاهش یافته و در ولتاژ ۳۰ میلی ولت به صفر رسیده است، در ولتاژ بیشتر از ۳۰ میلی ولت جریانهای ثبت گرفته شده رو به بالا می باشند. نمودار هیستوگرام آمپلی تود جریان در صفر میلی ولت در شکل ۱- B نمایش داده شده است. بطور آشکار سه پیک جریانی a, b, c مشاهده می گردد. هر یک از پیکهای جریان با استفاده از تابع Gaussian فیت شده و میانگین جریان بدست آمد. میانگین جریان صفر پیکوآمپر (پیک a) معادل جریان پایه بوده که در این وضعیت کانال بسته است و میانگین جریان پیک c، $17/2 \pm 1$ pA است که معادل وضعیتی است که کانال به طور کامل باز است (fully open state) و میانگین جریان پیک b برابر با $11/46 \pm 1/8$ pA است که معادل وضعیت هدایتی ناکامل کانال (subconductance level) می باشد. الگوی کینتیک فعالیت کانال نشان میدهد که کانال در ولتاژهای مثبت و منفی دارای یک subconductance level به اندازه ۶۰٪ وضعیتی که کانال به طور کامل باز است (fully open state) می باشد. شکل ۲ رابطه

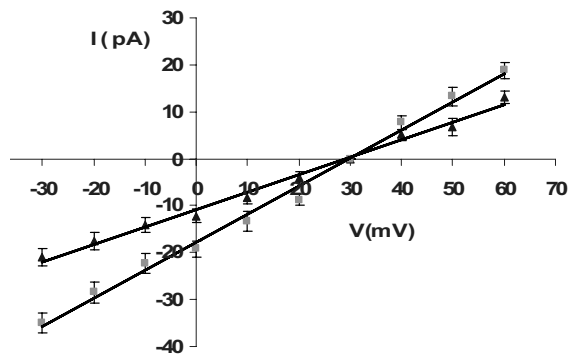


شکل ۱- A: ثبت از تک کانال (single channel recording) در ولتاژهای مختلف در محیط (۲۰۰ mM KCl cis/۰.۵ mM KCl trans). جریانهای ثبت شده بسته به میزان نویز پایه بصورت offline به مقدار ۴۰۰-۸۰۰ KHz فیلتر low pass شده اند. C در سمت راست نشان دهنده وضعیت بسته کانال بوده. B: هیستوگرام آمپلی تود جریان ثبت تک کانال در ولتاژ صفر میلی ولت. پیک a مربوط به جریان پایه و پیک b متعلق به sunconductance state و پیک c ناشی از fully open state است.

جریان - ولتاژ را برای وضعیت کاملاً باز و subconductance level نمایش می دهد. رابطه جریان - ولتاژ در محدوده +۶۰ تا -۳۰ میلی ولت خطی بوده و هیچگونه انحراف جریان در یک جهت (rectification) مشاهده نشد. شیب منحنی که نشان دهنده هدایت کانال است به ترتیب برای وضعیت کاملاً باز برابر با $598 \pm 17/7$ پیکوسیمنس (pS) و برای وضعیت subconductance level برابر با $368 \pm 11/1$ pS است. همچنین در شکل نشان داده شده است که پتانسیل معکوس (reverse potential) برای هر دو وضعیت هدایتی کانال ۳۰ میلی ولت است. با توجه به اینکه میزان پتانسیل معکوس به دست آمده نزدیک به پتانسیل تعادلی پتاسیم $E_{K^+} = 34$ mV در شرایط یونی $\frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} = \frac{200}{50}$ mM است، می

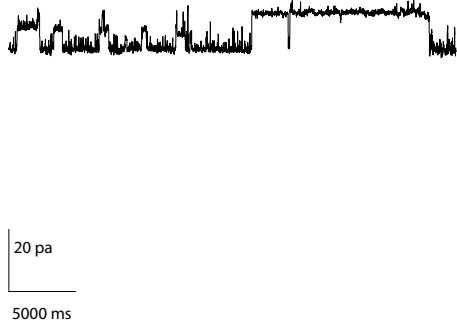


شکل ۳ - منحنی رابطه ولتاژ با احتمال باز بودن کانال. نقاط توسط رابطه Boltzman $Z - \delta$ فیت گردیده است. subconductance level با مربع و fully open state با مثلث نمایش داده شده است.

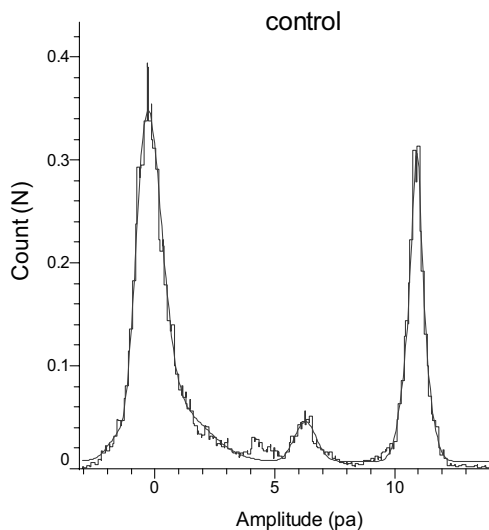


شکل ۲ - منحنی جریان - ولتاژ در محیط 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans با subconductance state و fully open state با مربع و نقاط بصورت $mean \pm SE$ نمایش داده شده است (n=5)

A



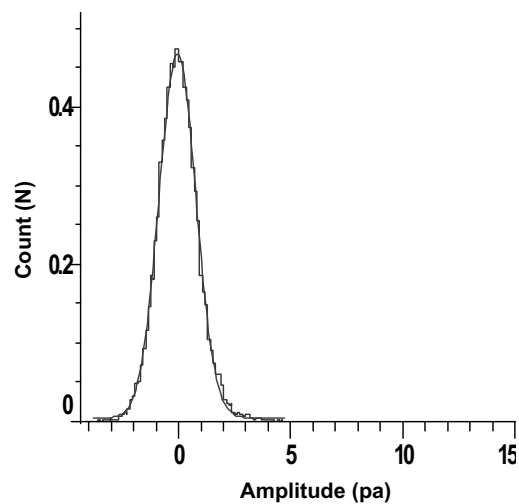
B



C



D



شکل ۴ - ثبت از فعالیت کانال و هیستوگرام آمپلی تود جریان در حضور و غیاب 4-AP (4-AP) در ولتاژ 40 mV در شرایط 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans. A و B: در غیاب 4-AP. C و D: پس از اضافه نمودن 5mM 4-AP به فضای سپس.

همانطور که مشاهده گردید هدایت یا کندانکتانس کانال در حالت کاملاً باز در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) بالا و برابر با 599 pS بود. در بسیاری از موارد جریانی با دامنه معادل 60٪ دامنه کانال در وضعیت کاملاً باز مشاهده شد که هدایت آن 368 pS بود (subconductance level). رابطه جریان - ولتاژ برای هر دو وضعیت کانال اهمیک (خطی) بوده و هیچ گونه rectification در محدوده ولتاژ اعمال شده مشاهده نگردید. کانال مشاهده شده در پاره ای از خصوصیات با کانالهای پتاسیمی گزارش شده در شبکه سارکوپلاسمیک شباهتهایی دارد از جمله اینکه نظیر کانال پتاسیمی SR دارای subconductance بوده [23, 20, 9, 2] و رابطه جریان - ولتاژ آن خطی است [23, 20]. منحنی جریان ولتاژ کانال پتاسیمی که Picher و همکاران در SR عضله دیافراگم گزارش داده اند در محلول سیمتریک 250 mM کلوکونات پتاسیم در دامنه ولتاژی 100 mV ± خطی بوده است [21] اما منحنی جریان - ولتاژ در کانال پتاسیمی گزارش شده توسط Cote و همکاران در شبکه سارکوپلاسمیک عضله دهلیز انسان مقداری rectification در ولتاژهای بالای 20 mV و پایتتر از 40 mV - داشت [2]. کانال پتاسیمی مشاهده شده توسط Picher و همکاران همانند کانال مشاهده شده توسط ما دارای یک subconductance بود اما دامنه آن در حدود 40٪ و وضعیت هدایتی کامل کانال بود [21] و کانال پتاسیمی که Cote و همکاران در SR سلولهای عضله دهلیزی گزارش کردند دارای یک subconductance به اندازه 50٪ وضعیت هدایتی کامل کانال بود [2].

کندانکتانس کانالی که ما مشاهده کردیم (599 pS) بالاتر از میزان هدایت برخی از کانالهای پتاسیمی است که تاکنون در ارگانهای داخل سلولی گزارش شده اند، کندانکتانس کانال پتاسیمی شبکه سارکوپلاسمیک عضله در حدود 255-90 pS [23, 9, 3, 2] و کانال پتاسیم غشاء داخلی میتوکندری سلولهای گلیوما در محیط (50 mM KCl cis/450 mM KCl trans) برابر 320-260 pS بوده است [25]. اما Hordejuk و همکاران با استفاده از تکنیک BLM در غشاء گرانولهای کروموفین آدرنال کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژی را گزارش داده اند که همانند کانال مشاهده شده توسط ما دارای کندانکتانس بالا بوده به طوریکه که در محیط سیمتریک (540 M KCl) دارای هدایت 430 pS بود [10]. آنها همانند ما از فسفاتیدیل کولین به عنوان ترکیب غشاء دو لایه لیپیدی استفاده نموده اند که می تواند یکی از دلایل بالا بودن کندانکتانس کانال باشد چرا که ترکیب غشاء مورد استفاده می تواند بر روی کندانکتانس کانال تاثیر بگذارد [28]. Eliassi و همکاران کندانکتانس کانال کلر RER هیاتوسیت در غشاء دو لایه لیپیدی تشکیل شده از مخلوط فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) را در حد 90 ± 12 pS گزارش کرده اند [6] در حالی که این کانال در موارد نادری که در ثبت های ما مشاهده شد دارای کندانکتانس حدوداً 196 pS بود (اطلاعات نشان

توان گفت کانال نسبت به پتاسیم نفوذ پذیر بوده و کاتیونی است. با جاگذاری پتانسیل معکوس به دست آمده در معادله گولدمن - هوچکین - کتنز
$$m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+] + P_{Cl} [Cl^-]}{P_K [K^+] + P_{Cl} [Cl^-]}$$
 نسبت نفوذ پذیری K^+/Cl^- کانال بیشتر از 10 خواهد بود. در نتیجه کانال مشاهده شده دارای نفوذ پذیری بالائی نسبت به پتاسیم در مقایسه با کلر بوده و کاتیونی است.

وابستگی به ولتاژ احتمال باز بودن کانال

اثر ولتاژ بر روی ویژگیهای باز بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال (open probability - P_o) در ولتاژهای مختلف در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) مورد بررسی قرار گرفت. احتمال باز بودن کانال در وضعیت کاملاً باز (fully open) در ولتاژهای مثبت بالا بوده و با تغییر پتانسیل غشاء به سمت ولتاژهای منفی احتمال باز بودن کانال کاهش پیدا کرد، در نتیجه منحنی ولتاژ - احتمال باز بودن (شکل 3) به شکل سیگموئید در آمده است. ماکزیم احتمال باز بودن کانال در ولتاژ 60 + میلی ولت برابر با 0/67 و در محدوده ولتاژ 20 + تا 30 - میلی ولت برابر با 0/1 تا 0/1 بوده است که نشان می دهد احتمال باز بودن کانال وابسته به ولتاژ است. در وضعیت subconductance state احتمال باز بودن در ولتاژ 30 - میلی ولت 0/06 بوده و در پتانسیل 60 + میلی ولت میزان آن به 0/08 رسیده است که می توان نتیجه گرفت که subconductance state هیچگونه وابستگی به ولتاژ ندارد.

اثر 4-Ap(4-Aminopyridine) بر روی فعالیت کانال

شکل 4 اثر 4-AP را در محفظه cis در غلظت 5 mM بر روی فعالیت کانال در ولتاژ 40 mV + نشان می دهد. میزان جریان قبل از اضافه کردن 4-AP برای subconductance level برابر با 1/2 ± 0/4 پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن 0/11 ± 0/4 و برای fully open state میزان جریان 0/9 ± 0/9 پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن 0/42 بود (شکل 4 - A و B). پس از اضافه کردن 4-AP میزان جریان subconductance level 1/1 ± 0/5 پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن 0/09 بود که تغییر معنی داری در میزان جریان و احتمال باز بودن کانال ایجاد نگردید، در صورتیکه جریان fully open state تقریباً بطور کامل حذف گردید (شکل 4 - C و D).

بحث

در تحقیق حاضر به دنبال الحاق وزیکولهای شبکه آندوپلاسمیک به داخل غشاء دو لایه لیپیدی تنها یک نوع کانال کاتیونی کاتیونی با هدایت بالا مشاهده گردید. آزمایشات ما نشان داد رفتار این کانال وابسته به ولتاژ بوده و احتمال باز بودن آن (P_o) در ولتاژهای مثبت بیشتر است. به علاوه 4-AP که به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال پتاسیم عمل می کند این کانال را مهار کرد که نشان دهنده پتاسیمی بودن کانال است.

- داده نشده است).
 همانطور که مشاهده گردید احتمال باز بودن کانال از ۰/۰۲ در ولتاژ صفر میلی ولت به ۰/۶۷ در ولتاژ +۶۰ mV رسید، به طوریکه منحنی احتمال باز بودن - ولتاژ آن همانند کانالهای پتاسیمی شبکه سارکوپلاسمیک به شکل سیگموئید بوده و با مثبت شدن غشاء احتمال باز بودن کانال افزایش پیدا می کند [۲۳، ۲۲، ۲۰، ۲]. این نتایج مشابه نتایج حاصل از کانال $\text{mito BK}_{\text{Ca}}$ است که قبلاً در میتوکندری سلولهای گلیوما و قلبی گزارش شده است بطوریکه احتمال باز بودن کانال آنها نیز در ولتاژهای بالای ۳۰ mV + افزایش پیدا میکرد [۲۵].
- برای مطالعه خواص فارماکولوژیک کانال اثر 4-AP (مهارکننده جریان transient outward پتاسیمی (IK_{to})) [۱] مورد بررسی قرار گرفت. 4-AP با غلظت ۵ mM در محفظه cis سبب مهار کانال در حالت کاملاً باز گردید. نتیجه بدست آمده مشابه اثر 4-AP بر روی کانال پتاسیمی SR عضله اسکلتی قورباغه است [۲۷] در حالیکه این غلظت از دارو بر روی کانال پتاسیمی SR دهلیزی انسان اثر مهاری نداشته است [۲۰].
- در ارتباط با نقش فیزیولوژیک این کانال میتوان گفت با توجه به اینکه احتمال باز بودن کانال کلر گزارش شده در شبکه اندوپلاسمیک هیپاتوسیت به عکس کانالی که ما مشاهده کردیم در ولتاژهای مثبت کاهش می یابد [۱۷۶]، احتمالاً با مثبت شدن پتانسیل لومن، کلسیم از داخل ER خارج شده و پتاسیم به آن وارد می گردد، در حالیکه با منفی شدن شدن لومن ER، کلسیم و کلر وارد شده و الکترونوترالیتی غشاء ER حفظ می گردد در نتیجه، پتانسیل غشاء ER از پتانسیل تعادلی نرنست برای کلسیم دور نگاه داشته شده و محیط برای آزادسازی و برداشت کلسیم مناسب می شود.
- در تحقیق حاضر برای اولین بار وجود کانال پتاسیمی در غشاء RER هیپاتوسیتها گزارش گردیده است، نتایج ما بیانگر رفتار وابسته به ولتاژ کانال و میزان هدایت بالای آن می باشند. با توجه به شواهدی که برای عملکرد کانالهای پتاسیمی غشاء ارگانها در فرآیندهای فیزیولوژیک وجود دارد شناسایی این کانال مقدمه ای برای انجام تحقیقات گسترده تر به منظور تعیین سایر خصوصیات بیوفیزیکی و فارماکولوژیک کانال و بررسی ساختار مولکولی و نیز شناخت نقش فیزیولوژیک این کانال محسوب می گردد.
- منابع**
- [1] Bowman WC, Savage AO, Pharmacological actions of amonopyridine and related compounds. *Rev Pure Appl Pharmacol Sci* 2(1981) 317-371.
- [2] Cote K, Proteau S, Teijeira J, Rousseau E, Characterization of the sarcoplasmic K^+ and
- [3] Czyz A, Szewczyk A, Nalecz MJ, Wojtczak, The role of mitochondrial potassium fluxes in controlling the protonmotive force in energized mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 210 (1995) 98-104.
- [4] De Martin PE, Novick P, Ferro-Novick S, The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem Cell Biol* 83 (2005) 752-761.
- [5] Decrouy A, Juteau S, Tejeira J, Rouseau E, Biochemical regulation of sarcoplasmic reticulum Cl^- Channel from human atrial myocytes involvement phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 28 (1996) 267-280
- [6] Eliassi A, Garneau L, Roy G, Souve R, Characterization of a chloride - selective channel from rough endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes: evidence for a block by phosphatate. *J Membr Biol* 159 (1997) 219-229.
- [7] Garlid KD, Paucek P, Yarov - Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, grover GJ, Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81(1997)1072-1082.
- [8] Ghosh S, Standen NB, Galinanes M, Evidence for mitochondrial K_{ATP} channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 934-940.
- [9] Hill JA, Coronado R, Struss H C, Open - channel subconductance state of K^+ channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 258 (1990) H159-H164.
- [10] Hordejuk R, Lobanov NA, Kicinska A, Szewczyk A, Dolowy K, pH modulation of large conductance potassium channel from adrenal chromaffin granules. *Mol Membr Biol*

- specific electro – pharmacological profile. *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 1163-1172.
- [21] Picher M, Decrouy A, Rousseau E, Conducting and voltage – dependent behavior of potassium ion channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum : comparison with the cardiac isoform. *Biochimica Biophysica Acta* 1279 (1996) 93-103.
- [22] Picher M, Decrouy A, Proteau S, Rousseau E, Conducting and voltage – dependent behaviors of the native and purified SR Ca²⁺- release channels from the canine diaphragm. *Biochim Biophys Acta* 1328 (1997) 243-260.
- [23] Qi –Yi liu F, Antony L, Win K S , Gerhard M, Harold C, Reconstitution of the solubilized cardiac reticulum potassium channel. *FEBS* 291(1991) 13-16.
- [24] Rousseu E, Single chloride –selective channel from cardiac sarcoplasmic reticulum studied in planar lipid lipid bilayer. *J Membr Biol* 110 (1989) 39-47.
- [25] Siemen D , loupatzis C, Borecky J , Gulbins E , Lang F, Ca²⁺activated K⁺ channel of BK –type in inner mitochondrial membrane of human glioma cell line . *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 549-554.
- [26] Singleton WS, Gray M S, Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids. *Am Oil Chem Society* 42 (1965) 53-63.
- [27] Wang J, Best P M, Characterization of the potassium channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Physiol* 477 (1994) 279-290.
- [28] Yuan C, O'Connell RJ, Feinberg-Zadek PL, Johnston LJ, Treistman SN, Bilayer thickness modulates the conductance of the BK channel in model membranes. *Biophys J* 86(2004) 3620-33.
- 21 (2004) 307– 313.
- [11] Inoue I, Nagase H , Kishi K , Higuti I, ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352 (1991) 244-247.
- [12] Kan F, Jolicoeur WK , Paiment M, Freeze – fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membrane. *J Biochim Biophys Acta* 1107 (1992) 331-341.
- [13] Kicinska A, Debeska G, Kunz W, Szewcyk, Mitochondrial potassium and chloride channels . *Acta Biochim Pol* 47 (2000) 541-551.
- [14] KouriehJI, Chloride channels in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *Prog Biophys Molec Biol* 68 1997) 263-300.
- [15] Mckinley D, Meissner G, Sodium and potassium ion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicle . *FEBS Lett* 82 (1977) 47-50.
- [16] Miller C, Voltage- gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum : steady - state electrical properties. *J Membr Biol* 40 (1978) 1-23.
- [17] Morrier N, Sauve R, Analysis of a novel double – barreled anion channel from rat liver rough endoplasmic reticulum . *Biophys J* 67 (1994) 590 -602
- [18] Muller P, Rudin D, Tien H ,Westcott W, Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro. *Circulation* 26 (1962) 1167-1171.
- [19] Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis A D, Woldegiordis G, Grlid KD, Reconstitution and partial purification of glibanclamide –sensitive , ATP–dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267 (1992) 26062-26069
- [20] Picard L, Cote K, Teijeira J, Greentree D, Rousseau E, Sarcoplasmic reticulum K⁺ channels from human and sheep atrial cells display a