



Characterization of biophysical properties of single chloride channel in rat brain mitochondrial inner membrane by channel incorporation into bilayer lipid membrane

Javad Fahanik babaei¹, Afsaneh Eliassi^{1,2*}, Reza Saghiri³

1. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept. Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 1 Aug 2010

Accepted: 24 Nov 2010

Abstract

Introduction: Recent studies have shown the presence of Cl⁻ channels in heart and liver mitochondrial membranes. In this work, we have characterized the functional profile of a Cl⁻ channel from rat brain mitochondria.

Methods: After removing and homogenizing the rat brain, the supernatant was separately centrifuged in MSE-digtonin, H₂O and Na₂CO₃ and mitochondrial inner membrane vesicles were obtained in MSE solution. L- α -Phosphatidylcholine (membrane lipid) was extracted from fresh egg yolk. Bilayer lipid membranes were formed in a 150 μ m diameter hole. All recordings were filtered at 1 kHz and stored at a sampling rate of 10 kHz for offline analysis by PClamp10. Statistical analysis was performed based on Markov noise free single channel analysis.

Results: Brain mitochondrial inner membrane preparations were subjected to SDS-PAGE analysis and channel protein reconstitution into planar lipid bilayers. Western blotting and antibodies directed against various cellular proteins revealed that the mitochondrial inner membrane fractions did not contain specific proteins of the other subcellular compartments except a very small fraction of endoplasmic reticulum. Channel incorporation into the planar lipid bilayers revealed an anion selective channel with a conductance of 301 pS in 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans. The channel open probability appeared to be voltage dependent and the channel was active between the voltages of -40 and +20 mV. Adding 10 μ M DIDS to the side corresponding to the cell internal medium caused a strong inhibition of the channel activity.

Conclusion: This channel is likely to be involved in maintaining proper pH, membrane potential, ATP synthesis, and cell protection.

Key words: mitochondria; chloride channel, Bilayer lipid membrane, DIDS

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

بررسی خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال کلری غشاء داخلی میتوکندری مغز در موش صحرایی به روش الحاق کانال به داخل غشاء لیپیدی دو لایه

جواد فحانیک بابائی^۱، افسانه الیاسی^{۲*}، رضا صغیری^۳

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳. گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۳ آذر ۸۹

دریافت: ۱۰ مرداد ۸۹

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر نشان می دهند که کانالهای کلر در غشاء میتوکندری قلب و کبد وجود دارند. در این مطالعه خصوصیات عملی کانال کلر استخراج شده از میتوکندری مغز موش صحرایی گزارش شده است.

روش ها: بعد از برداشتن و هموژنیزه کردن مغز موش صحرایی، محلول آن در طی مراحل جداگانه ای در MSE-دیژیتونین، آب و کربنات سدیم سانتریفیوژ شد. سپس، وزیکول های غشاء داخلی میتوکندری در محلول MSE بدست آمدند. فسفاتیدیل کولین (لیپید غشایی) از زرده تخم مرغ تازه استخراج گردید. غشاءهای لیپیدی دو لایه در منفذی به قطر 150 μm تشکیل می شدند. تمام ثبتها در 1kHz فیلتر و با سرعت نمونه برداری 10 kHz برای آنالیز افلاین توسط نرم افزار Pclamp 10 ذخیره می گردیدند. آنالیز آماری بر اساس Markov noise free single channel analysis صورت گرفت.

یافته ها: نمونه های غشاء داخلی میتوکندری مغز توسط آنالیز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و پروتئین کانال به داخل غشاء لیپیدی دولایه الحاق شد. وسترن بلات و آنتی بادی هایی که بر علیه پروتئینهای سلولی بکار رفته بود نشان دادند که فراکشنهای غشاء داخلی میتوکندری بجز مقدار بسیار جزئی شبکه آندوپلاسمی، فاقد پروتئینهای اختصاصی دیگری از سایر ارگانلهای سلولی بودند. الحاق کانال به داخل غشاء لیپیدی دولایه حضور کانال انتخابی آنیونی را با کندانسانس 301pS در شرایط غلظت 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans نشان داد. احتمال باز بودن کانال، وابسته به ولتاژ بوده بنحوی که کانال در ولتاژهای بین +20 تا -40 mV فعال بود. افزودن 10 μM داروی DIDS به سمتی که معادل محیط داخل سلولی بود موجب مهار قوی فعالیت کانال گردید. **نتیجه گیری:** این کانال احتمالاً در حفظ pH، پتانسیل غشایی، سنتز ATP و حفاظت سلولی نقش دارد.

واژه های کلیدی: میتوکندری، کانال کلر، غشاء لیپیدی دو لایه، DIDS

مقدمه

است. در این میان کانالهای کلر از اهمیت ویژه ای برخوردارند. این کانالها در تمام سلولهای یوکاریوتی بیان شده اند و نقش بسیار مهمی در سلول ایفاء میکنند. برای مثال درغشاء پلاسمایی در تنظیم حجم سلول، انتقال آب و نمک از عرض غشاء اپیتلیال، بعلاوه در تغییر پتانسیل الکتریکی سلول نقش دارند. در دهه گذشته علی رغم فعالیتهای بسیاری که در زمینه

مطالعات بسیاری در خصوص کانالهای یونی صورت گرفته

afeliassi@sbm.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

با کنداکتانس های متعدد در میتوپلاست های قلب [۴، ۲۵] و نیز در شبکه سارکوپلاسمی قلب و پوشش هسته سلولهای کبد [۷، ۳۹] گزارش شده است. اخیراً نیز عنوان شده است که بعضی از پروتئین های انتقالی میتوکندریائی جدا شده از بافت چربی قهوه ای یا پروتئین پیش آپوپتوتیک Bax بعد از الحاق بداخل غشا لیپیدی دو لایه تشکیل کانال کلر را می دهند [۱۴، ۱۵، ۳۳] کانالهای کلری غشاء داخلی و خارجی میتوکندری، دارای اهمیت بسزایی هستند، چرا که باز شدن کانالهای کلر در طی آسیب بافتهای قلب می تواند موجب دیپلاریزه شدن غشاء داخلی میتوکندری و آزاد شدن سیتوکرم C و متعاقب آن فعال شدن پروتئین کاسپاز و القاء آپوپتوز گردد [۲۸، ۳۵]. کانالهای کلر میتوکندری نه تنها در بافت قلب بلکه در سلولهای مغزی نیز نقش بسیار مهمی را در فرایندهایی همچون انتقال ATP و مرگ سلولی و همچنین حفاظت سلولهای عصبی بر عهده دارند [۴۰]. با این حال در خصوص کینتیک و چگونگی باز و بسته شدن کانالهای کلر میتوکندری مغز مطالعات چندانی وجود ندارد. توسط متدهای پیچ کلمپ و الحاق کانال بداخل غشا لیپیدی دو لایه (BLM) می توان خواص بیوفیزیکی و فارماکولوژیکی کانالهای یونی را در سطح تک کانال مورد بررسی قرار داد. بررسی خصوصیات بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژی کانال در سطح ثبت از تک کانال اطلاعات مفیدی را در زمینه چگونگی باز و بسته شدن کانال و نحوه کنترل آن می دهد. برای همین تلاش ما در این مطالعه بر این بوده که با بررسی خواص بیوفیزیکی تک کانال، جزئیات بیشتری در رابطه با کانال آنیونی غشاء داخلی میتوکندری مغز با استفاده از تکنیک الحاق کانال در غشاء لیپیدی دو لایه ارائه نماییم، تا زمینه ای را جهت بررسی ساختمان و عملکرد کانال در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی فراهم سازیم.

مواد و روش ها

در مواد مورد استفاده شامل: کلرید پتاسیم، دیژیتونین، سوکرز، D-مانیتول، بیکربنات سدیم هیپس، تریس اسیدی،

درک نقش کانالهای کلر در طیف وسیعی از بیماری های همچون دیستروفی عضلانی [۲۴، ۱۳] سیستیک فیبروز [۳۱]، آب مروارید [۴۱] و استئوپتروزیس [۲۰، ۶] صورت گرفته است، اما هنوز عملکرد بیولوژیکی دقیق کانالهای کلر به خوبی مشخص نشده است.

علاوه بر غشاء پلاسمایی، کانالهای کلر در شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی، اندوزوم، لیزوزوم، هسته، میتوکندری و وزیکولهای سلولی وجود دارند [۲۰، ۲۹، ۳۸]. به نظر می رسد که این کانالها دارای نقش مهمی در حفاظت قلبی و آپوپتوز [۲۵] داشته باشند. چندین دسته عمده از کانالهای کلر بر اساس ساختمان و عملکردشان شناسایی شده اند که شامل اعضاء خانواده CICs (کانالهای کلر وابسته به ولتاژ)، کانالهای کلر وابسته به لیگاند، تنظیم کننده کنداکتانس انتقال غشایی سیستیک فیبروزیس (CFTR)، کانالهای کلری درون سلولی (CLIC)، کانالهای کلر حساس به کلسیم (CaCC)، و اخیراً تنظیم کننده pH گلژی (GpHR) است [۵، ۹، ۱۶، ۳۸]. این کانالها نقش مهمی را در فرایندهای چندی همچون تنظیم حجم سلول، پتانسیل غشایی، انتقال اپیتلیالی، ارتباطاتهای سلولی و اسیدی شدن ارگانل دارند [۱۷]. هم چنین عملکرد این کانالها در ارتباط با بیماری هایی مانند صرع، میوتونیا، هیپرپلکسیا، سیستیک فیبروزیس، سنگهای کلیه و استئوپتروزیس مهم هستند [۲۲، ۲۸، ۲۹، ۳۸].

در خصوص فعالیت تک کانال کلری در غشاء ارگانلهای داخل سلولی، اولین بار Sorgato و همکارانش در سال ۱۹۸۷ با استفاده از روش پیچ کلمپ گزارشی مبنی بر حضور یک کانال آنیونی با کنداکتانس 107 pS غیر وابسته به pH را در غشاء داخلی میتوکندری سلول چربی قهوه ای ارائه نمودند [۳۵]. همچنین مطالعات دیگر حضور یک کانال آنیونی 108 pS را در غشا داخلی میتوکندری قلب و چربی قهوه ای نشان دادند [۲، ۳۲]. چندین کانال آنیونی دیگر نیز با کنداکتانس های متفاوت گزارش شده است. برای مثال Kindally و همکاران کانال آنیونی 100 pS را در میتوپلاست های میتوکندری قلب [۱۸، ۱۹] Eliassi و همکارانش در شبکه آندوپلاسمی کبد کانال کلری با کنداکتانس 165 pS و De Marchi و همکاران یک کانال بزرگ کلری در میتوکندری سلولهای سرطانی کولون را اعلام نمودند [۹، ۱۰]. علاوه بر این، حضور کانال های آنیونی

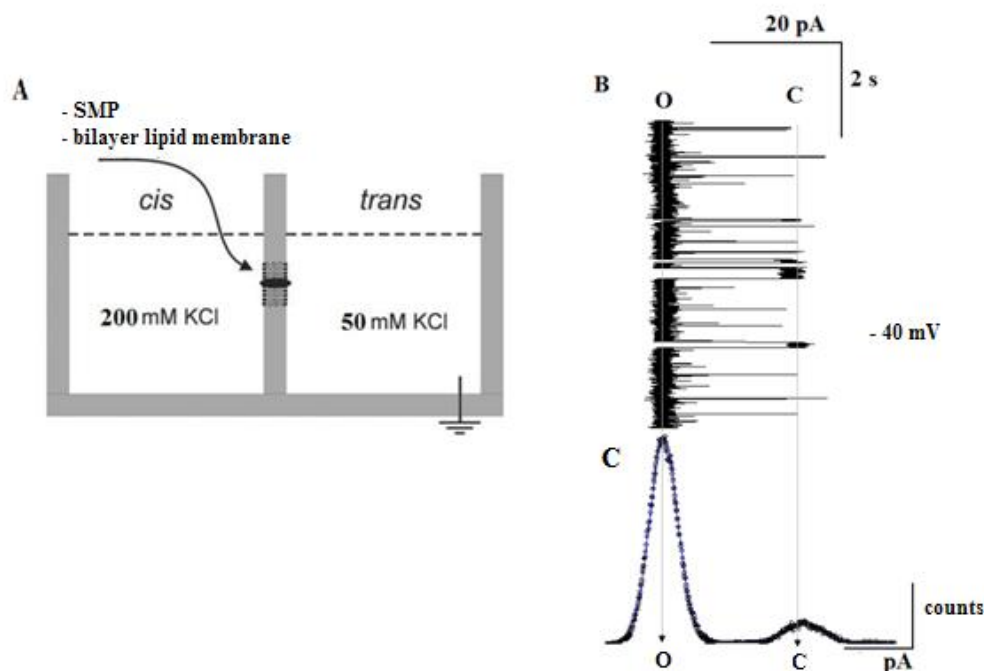
بیکربنات پتاسیم (pH 11.5) در غلظت نهایی 0.5 mg/ml بمدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. غشاء داخلی میتوکندری با سانتریفیوژ در $100,000 \times g$ برای ۳۵ دقیقه به صورت ویزیکول بدست آمد (step 4). نمونه ها جهت بررسی وسترن بلات و الکتروفیزیولوژی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. جهت تعیین خلوص نمونه از وسترن بلات استفاده شد. پس از اندازه گیری غلظت پروتئین غشای داخلی میتوکندری با استفاده از روش برادفورد، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ انکوبه شدند. سپس نمونه ها (۲۵ میکرولیتر) در ژل (SDS-PAGE) run شده و بعد از آن به ممبرنهای نیتروسولوز منتقل گردیدند. ممبرنهای قبل در ترانسفر بافر به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس ممبرنهای در مجاورت آنتی بادی های اولیه شامل: actin برای غشاء پلاسمایی با نسبت 1: 250 ، calnexin 90kDa برای شبکه آندوپلاسمی خشن با نسبت 1: 250 ، 58KGP مارکر دستگاه گلژی با نسبت 1: 5000 و cox1 اختصاصی غشاء داخلی میتوکندری با نسبت 1: 250 بمدت ۲ ساعت تکان داده شدند. پس از آن به مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی بادی ثانویه به نسبت 1: 500 تکان داده شدند. پس از شستشوی نهایی ممبرنهای با استفاده از روش شیمیولومینسانس (ECL-kit) بر روی فیلم عکاسی ظاهر گردیدند. از میکروسکوپ الکترونی بعنوان روش دیگری جهت تعیین خلوص نمونه استفاده شد. نمونه ها به مقدار (1000 μ l) به لوله های 1.5 ml منتقل شده و با دور $14000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل را در محلول فیکساتیو میکروسکوپ الکترونی شامل (0.2 M سدیم در 2.5% گلوترالدئید و بافر پیروفسفات (pH 7.4) قرار داده شدند و پس از 20 دقیقه در دمای اتاق با یک سوزن به قطر 2.5 میلی متر نمونه ها را هم زده و در دمای $4^{\circ}C$ به مدت یک شب نگهداری گردیدند. نمونه ها در 0.2 M بافر سدیم پیروفسفات برای 15 دقیقه سه مرتبه و برای فیکس نهایی در 1% اوسمیوم تتراکسید در درون بافر سدیم پیروفسفات بمدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند، بدنبال آن سه مرتبه هر کدام 15 دقیقه با آب شستشو داده و با استات اوهره 2% برای بلوک گیری و رنگ آمیزی آماده گردیدند. در مرحله بلوک گیری برای آبیگری گریدها در سری الکل اتیلیک (30, 50, 100, 70) هر کدام 20 دقیقه قرار داده شدند و

سرم آلبومین گاوی (BSA^1)، EGTA، DIDS و ناگاریز از شرکت سیگما، n-دکان از شرکت. مرک آنتی بادی های actin (SC-1615)، calnexin, 90kDa (SC-11397) و cox1 (SC-58347) از شرکت سانتاکروز و آنتی بادی 58KGP (AB6284) از شرکت ABCAM خریداری شد.

محلولهای مورد نیاز در استخراج میتوکندری عبارتند از: محلول MSE (225 mM مانیتول، 75 mM سوکرز، 5 mM هیپس، 1 mM EGTA و 1 mg/ml BSA, pH 7.4). محلول MSE-ناگاریز (محلول 0.05% ناگاریز در محلول MSE)، محلول MSE-دیژیتونین (محلول 0.02% دیژیتونین در محلول MSE).

جهت استخراج میتوکندری از مغز موش صحرایی از روش Kuddin و همکارانش (2003) استفاده گردید [۲۱]. دو موش صحرایی (۱۸۰ تا ۲۰۰ گرمی) توسط کلروفرم بیهوش و سر آنها بریده شده، مغز آنها را فوراً خارج و به محلول سرد MSE منتقل و چند مرتبه شستشو داده شدند، پس از اضافه کردن 10 ml محلول MSE-ناگاریز، به آن با هموژنایزر الکتریکی در 600 units/s هموژنیزه شدند (step 1). در ادامه 20 ml محلول سرد MSE به آن اضافه شده و هموژن در $2000 \times g$ برای ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول را برداشته و در $12000 \times g$ برای ۹ دقیقه سانتریفیوژ گردید (step 2). برای بدست آوردن سیناپتوزومها، رسوب حاصل را با 10ml محلول MSE-دیژیتونین سرد حل نموده و محلول را به ظرف هموژنیزه کننده منتقل و ۸-۱۰ مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی بدست آید. سرانجام سوسپانسیون در $12000 \times g$ برای ۱۱ دقیقه سانتریفیوژ و ویزیکولهای حاصل در 300 μ l محلول MSE حل شده تا حدود 20 mg/ml پروتئین بدست آید (step 3). برای جدا سازی غشاء داخلی میتوکندری از روش Da Cruz و همکاران (2003) استفاده شد [۸]. بدین صورت که میتوکندری ها در غلظت 5 mg/ml در آب مقطر سوسپاند شده و برای ۲۰ دقیقه روی یخ تکان داده شدند. این ترکیب ۲۰ مرتبه با هموژنایزر دستی هموژنیزه و دومرتبه در $12000 \times g$ برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای بدست آمده با 0.1M

1. Bowine serum albumin



شکل ۱- شمایی از محل تشکیل غشاء لیپیدی دو لایه و الحاق کانال به داخل آن و نمونه ای از هیستوگرام آمپلیتود. غشاء دولایه لیپیدی بر روی منفذی به قطر $250 \mu\text{m}$ در محفظه سیس تشکیل و وزیکول حاوی یک یا چند کانال (SMP) به داخل آن الحاق گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال و محفظه ترانس گراند می شد (A). نمونه ثبت گرفته شده از کانال کلر غشاء داخلی میتوکندری مغز، الحاق شده در غشاء دولایه لیپیدی در -40 mV (B). هیستوگرام آمپلی تود کانال در دو حالت باز (O) و بسته (C) در مدت زمان ۱۰ ثانیه نشان داده شده است (SMP: submitochondrial particle)

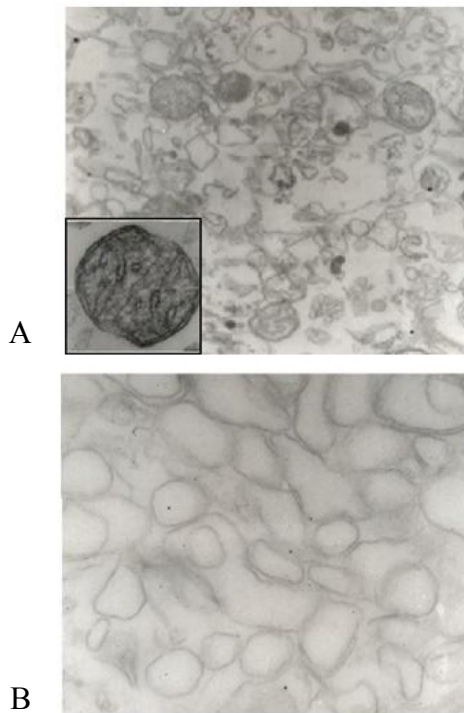
خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC^۱ مورد سنجش قرار گرفت. برای تشکیل غشاء از روش Muller و همکاران استفاده شد [۲۷] در این روش دو محفظه سیس (فضای سیتوپلاسمی) و ترانس (فضای لومنی) از جنس تفلون که دارای محلولهای کلرید پتاسیم (KCl) با غلظتهای (50 mM cis/200 mM trans) بودند، استفاده شد. در دیواره محفظه ترانس منفذی به قطر $250 \mu\text{m}$ تعبیه شده بود. غشاء لیپیدی دو لایه توسط قرار دادن محلول لیپیدی فسفاتیدیل کولین (با غلظت 25 mg/ml در حلال n - دکان) با استفاده از سوزن استیل به قطر $150 \mu\text{m}$ بر روی منفذ تشکیل گردید.

شکل ۱A شمایی از چگونگی تشکیل غشاء و محفظه های سیس و ترانس را نشان می دهد. تشکیل غشاء توسط استرئو میکروسکوپ مشاهده و ظرفیت خازنی آن به طور معمول بین 200 تا 300 pF توسط آمپلی فایر اندازه گیری گردید. جهت تنظیم pH محلولهای کلرید پتاسیم از هیپس (10 mM) و تریسمای بازی استفاده شد. جهت ثبت الکتروفیزیولوژی،

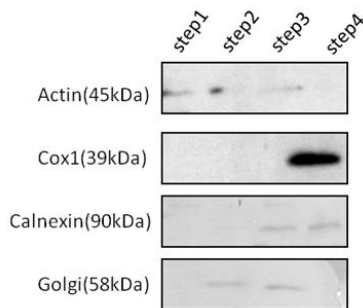
سپس درون اپوکسی رزین جاگذاری گردیدند. برشهای اولترا (~ 100 nm) بر روی اولترا میکروتوم (Leica Microsystems Inc.) گرفته شده و بر روی گریدهای مسی قرار داده شدند. برای رنگ آمیزی برشها، ابتدا با استات اورینیل 5% و بدنبال آن توسط 0.1% سیترات سرب رنگ آمیزی گردیدند و در نهایت با میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل zeiss EM 900 در 80 kV مشاهده و از آنها عکس برداری شد.

جهت تشکیل غشاء لیپیدی دولایه از یک یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می گردد. در این پروژه جهت تشکیل BLM از فسفاتیدیل کولین (PC) استفاده می شود. ماده فوق از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکاران استخراج گردید [۳۴]. به طور خلاصه در مرحله اول فسفولیپیدها با استفاده از حلالهای آلی از سایر ترکیبات همانند پروتئینها، پیگمانهای رنگی، و سایر چربیها جدا شده، سپس فسفاتیدیل کولین از سایر فسفاتیدها با استفاده از ستون کروماتوگرافی که فاز ثابت آن، آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن متانل و کلروفرم بود، جدا گردید.

1. Thin Layer Chromatography



شکل ۲- تعیین خلوص نمونه میتوکندری استخراج شده از مغز. A: تصویر میکروسکوپ الکترونی میتوکندری (magnification $\times 21000$) و B: وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری (magnification $\times 48900$) استخراج شده از مغز رت که توسط ماده تثبیت کننده گلوترالدئید فیکس و رنگ آمیزی شده اند.



شکل ۳- تعیین خلوص نمونه غشاء داخلی میتوکندری مغز با استفاده از روش وسترن بلات. نمونه ها بر روی کاغذ در مجاورت آنتی بادی های Actin (مارکر غشاء پلاسمایی)، Cox-1 (مارکر غشاء داخلی میتوکندری)، پروتئین 58 KDa (مارکر دستگاه گلژی) و Calnexin (مارکر شبکه آندوپلاسمی) قرار گرفتند. نمونه ها ی برداشته شده در مراحل مختلف (Step 1-4) در مواد و روشها توضیح داده شده اند.

شکل ۲ تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره را نشان می دهد. در این تصاویر یک یا گروهی از میتوکندری ها (A) و وزیکولهای میتوپلاست (وزیکولهای حاوی غشاء داخلی جدا شده از میتوکندری) (B) نشان داده شده است. برای تعیین خلوص نمونه ها همچنین از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. با استفاده از آنتی بادی های موجود در غشاء سلول (actin)،

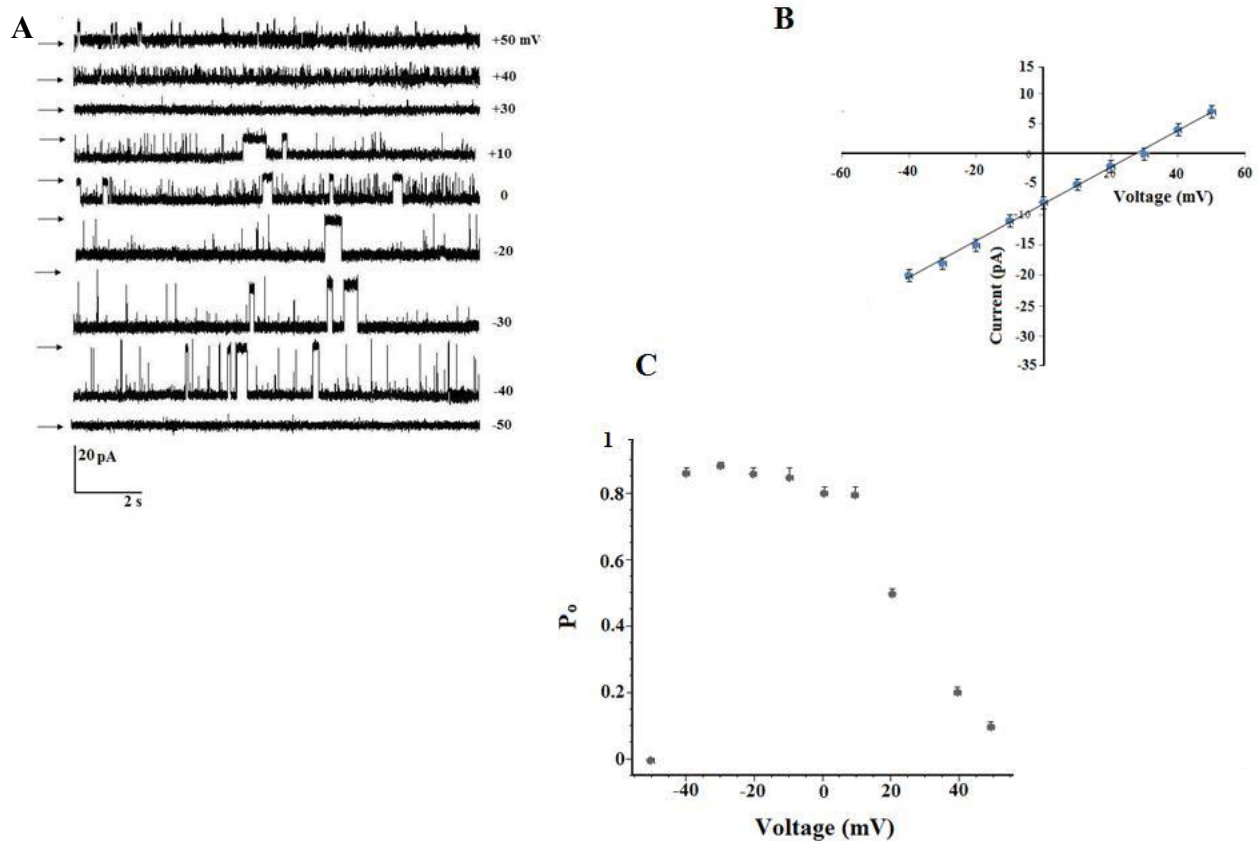
وزیکولهای استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری، توسط سوزن استیل به قطر $150 \mu\text{m}$ با غشاء لیپیدی دولایه جهت الحاق کانال تماس داده می شد. جریان عبوری از تک کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری می گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال می شد و محفظه ترانس گراند می گردید جریان کلر از محفظه سیس به ترانس به صورت جریان رو به پایین (منفی) و از محفظه ترانس به سیس به صورت جریان رو به بالا (مثبت) ثبت گردید. (شکل ۱A). اتصالات الکتریکی دو محفظه توسط الکترودهایی از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمک/آگار (KCl 3M) با دستگاه آمپلی فایر برقرار می گردید. تمام ثبتها در 1 kHz با استفاده از یک فیلتر چهار پل بس فیلتر و با سرعت نمونه برداری 10 kHz نمونه برداری و به کامپیوتر منتقل و ذخیره می گردیدند. جهت آنالیز توسط نرم افزار Pclamp 10 (شرکت Axon) استفاده گردیدند.

در روشهای تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، ساده ترین حالت حضور یک وضعیت بسته و یک وضعیت باز می باشد. ارتفاع یا آمپلی تود بین این دو وضعیت نشان دهنده میزان عبور جریان از درون کانال بر اساس پیکو آمپر (pA) می باشد (شکل ۱B). متوسط میزان جریان عبوری توسط رسم هیستوگرام بیان شد (شکل ۱C). کندانسانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ-جریان محاسبه گردید. احتمال باز بودن کانال (P_o) از طریق به کار گیری الگوریتمهای استاندارد event detection در Pclamp10، بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی صورت گرفت. P_o از روی سگمنتهایی یک دقیقه ای محاسبه گردید. اطلاعات بصورت $\text{mean} \pm \text{sem}$ گزارش گردیدند.

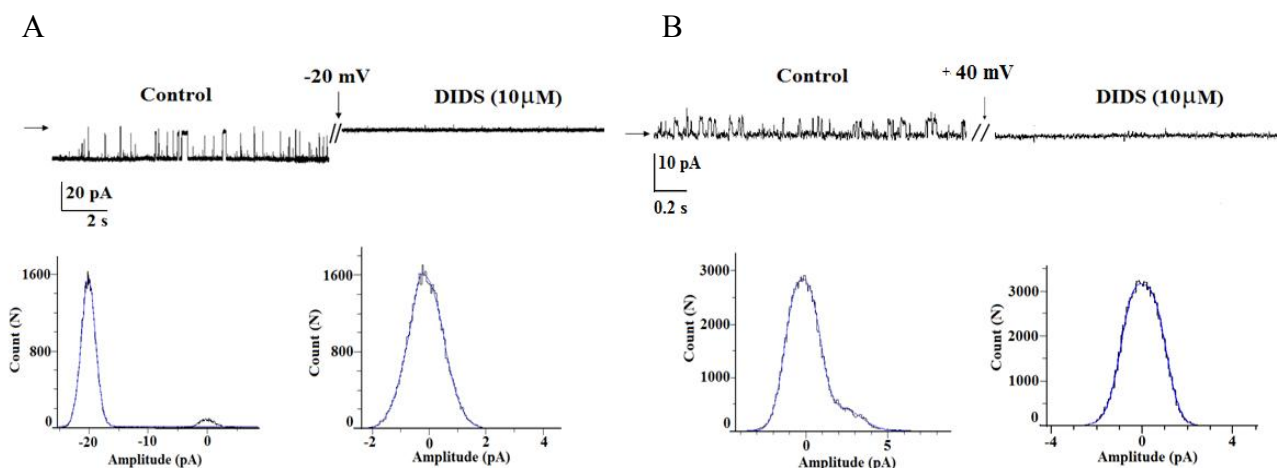
یافته ها

تعیین خلوص نمونه های استخراج شده توسط تکنیک وسترن بلات و تصویر میکروسکوپ الکترونی: جهت تعیین خلوص غشاء داخلی میتوکندری مغز استخراج شده از دو روش وسترن بلات و تصویر میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

2. Open probability



شکل ۴- نمونه ای از جریانهای ثبت شده از تک کانال، منحنی ولتاژ- جریان و احتمال باز بودن کانال به عنوان تابعی از ولتاژ. A: جریانهای تک کانال در شرایط غلظتی 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans در محدوده ولتاژی +50 تا -50 mV ثبت شده اند. پیکانها حالت بسته کانال را نشان می دهند. B: ارتباط جریان- ولتاژ، شیب خط معادل کندانسانس کانال و برابر 301 pS بود. C: احتمال باز بودن کانال در محدوده ولتاژی 50 تا -50 میلی ولت یک منحنی زنگ شکل را نشان می دهد.



شکل ۵- اثر DIDS، مهار کننده کانال کلر، بر روی فعالیت کانال. ثبت از تک کانال تحت شرایط کنترل (200/50 mM KCl; cis/trans) و بلافاصله بعد از افزودن DIDS با غلظت 10 μM در ناحیه سیتوپلاسمی (cis) (n = 4) در ولتاژ -20 mV (A) و +40 mV (B). پیکان حالت بسته کانال را نشان می دهد. در پایین هیستوگرام آمپلی تود نشان داده شده است.

بود (شکل ۳).

خواص الکتروفیزیولوژی کانال کلری غشاء داخلی میتوکندری: بعد از قرار دادن وزیکولهای استخراج شده غشاء داخلی میتوکندری مغز موش به داخل غشاء لیپیدی دو لایه،

شبکه آندوپلاسمی (calnexin 90 kD)، دستگاه گلژی (58 kD) و غشاء داخلی میتوکندری (cox) نشان داده شد که نمونه تهیه شده از غشاء داخلی میتوکندری بجز مقدار بسیار ناچیزی از شبکه آندوپلاسمی فاقد سایر ارگانها و اجزاء سلولی

عملکرد کانالهای آنیونی صورت گرفته است. اولین بار Sergato و همکارانش در سال ۱۹۸۷ حضور کانال آنیونی با کنداکتانس 107 pS را در میتوپلاستها را شناسایی کردند. مطالعات بعدی حضور این کانال را در میتوکندری کبد [۲، ۳۷]، قلب [۱۹، ۱۸، ۲، ۱] و مغز [۳۶] نشان داد. این کانال، یک کانال انتخابی آنیونی ($P_{Cl^-}/P_{K^+} = 4.5$) حساس به ولتاژ بوده و توسط pH تنظیم می گردد [۲]. اخیراً De Marchi و همکارانش کانال آنیونی با کنداکتانس 400 pS را در میتوپلاستهای کبد موش گزارش نمودند [۹]. علاوه بر میتوکندری، Palad و همکارانش در شبکه سارکوپلاسمی عضله، کانال کلر با کنداکتانس 505 pS را نیز گزارش نموده اند [۳۰]. در مطالعه حاضر با استفاده از الحاق کانال جدا شده از غشاء داخلی میتوکندری سلولهای مغز در غشاء لیپیدی دو لایه خواص بیوفیزیکی کانال کلر مغز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان دادند که کنداکتانس کانال کلر غشاء داخلی میتوکندری مغز 301 pS بود که مشابه با کنداکتانس کانال کلر میتوکندری 220 pS قلب موش صحرائی می باشد که توسط Malekova و همکارانش گزارش گردیده است [۲۵].

همچنین در مطالعه دیگری که توسط Tomaskova و Gaburjakova در مورد کانال آنیونی میتوکندری سلولهای قلب موش صحرائی با تکنیک BLM صورت گرفت، کانال کلر با کنداکتانسی متفاوت با نتایج ما گزارش شد [۹]. علاوه بر این آنها نشان دادند که کنداکتانس کانال کلر دارای وابستگی به ولتاژ است به نوعی که میزان آن در ولتاژهای مثبت تر از -20 mV برابر 13 ± 99 pS و در ولتاژهای منفی تر برابر با 4.5 ± 43.6 pS می باشد در حالی که نتایج ما حاکی از رابطه اهمیک (خطی) بین جریان و ولتاژ در محدوده -40 تا +50 mV می باشد. در خصوص چگونگی باز و بسته شدن کانال کلر آزمایشات ما نشان داد که در محدوده ولتاژی -40 تا +10 mV کانال دارای فعالیت بسیار بالایی بوده ($p_0 = 0.8$) و در ولتاژهای مثبت تر از +40 mV و منفی تر از -40 mV احتمال باز بودن کانال نزدیک به صفر بود. نتایج مشابهی توسط Tomaskova و Gaburjakova در مورد کانال کلر میتوکندری قلب گزارش گردیده است [۴۰]. اخیراً نیز De Marchi و همکارانش نیز با استفاده از تکنیک پیچ کلمپ نتایج مشابهی را در خصوص احتمال باز بودن کانال کلر میتوکندری

عبور یک جریان آنیونی از داخل کانال در محلولهای (200 mM/50 mM KCl; cis/trans) مشاهده گردید. شکل A ۴، نمونه ای از ثبتهای تک کانال اندازه گیری شده در محدوده ولتاژی بین -40 تا +50 mV در شرایط کنترل را نشان می دهد. بازشدنهای سریع و کوتاه در ولتاژهای مثبت بعد از پتانسیل معکوس مشاهده گردید، درحالی که بسته شدنهای سریع و باز بودن های طولانی در ولتاژهای قبل از پتانسیل معکوس مشاهده شد. در ولتاژهای منفی تر از -40 mV فعالیت کانال به طور کامل مهار می گشت. شکل B ۴ نشان می دهد که منحنی ولتاژ-جریان (I-V) خطی بوده و هیچ rectification بین ولتاژهای -40 mV تا +50 mV ($n = 30$) وجود نداشت. این کانال کنداکتانسی معادل 301 pS و پتانسیل معکوس آن در ولتاژ +30 mV نشان می دهد که تحت این شرایط، این کانال نسبت به آنیون انتخابی است. در خصوص وابستگی به ولتاژ و احتمال باز بودن کانال (P_0)، شکل C ۴ نشان می دهد که این کانال، یک کانال وابسته به ولتاژ می باشد به نحوی که احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای بین 0 تا -40 mV - بسیار بالا ($P_0 = 0.9$) و در ولتاژهای بین 0 تا +50 mV به طور معنی داری کاهش می یافت. چنانکه احتمال باز بودن کانال در ولتاژ +50 mV به کمتر از 0.2 کاهش یافت.

اثر داروی مهار کننده DIDS بر روی فعالیت باز و بسته شدن کانال: در این مرحله با استفاده از مهار کننده غیر اختصاصی کانالهای آنیونی (DIDS)، فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمایشها در شرایطی انجام شد که محفظه های سیس و ترنس دارای (200 mM/50 mM KCl; cis/trans) بودند و دارو با دوز $10 \mu\text{M}$ در محفظه سیس اضافه گردید. نتایج نشان داد که DIDS با دوز $10 \mu\text{M}$ در ولتاژ منفی و مثبت موجب مهار کامل فعالیت کانال می گردد (شکل A، B 5). ($n = 4$)

بحث

اولین کانالهای آنیونی در غشاء پلاسمایی و غشاء ارگانلهای سلولی تمام سلولهای یوکاریوتی وجود دارند [۲۸]. مطالعات بسیاری با استفاده از روشهای الکتروفیزیولوژی در رابطه با

میتوکندری مغز بررسی نمودیم اثر داروی مهار کننده کانالهای آنیونی بر روی فعالیت کانال بود. بنابراین داروی DIDS با دوز $10 \mu\text{M}$ در سطح سیتوپلاسمی تجویز و موجب مهار کانال گردید که نتیجه مشابه نتایج کانال کلر میتوکندری استخراج شده از بافتهای قلب و کبد بود [۹].

به طور خلاصه در تحقیق حاضر به دنبال الحاق وزیکول غشاء داخلی میتوکندری جدا شده از مغز موش صحرایی به داخل غشاء دو لایه لیپیدی فسفاتیدیل کولین، کانال آنیونی با کدکانانس $301 \pm 1 \text{pS}$ مشاهده شد. رفتار این کانال وابسته به ولتاژ بوده و احتمال باز بودن آن به عنوان تابعی از ولتاژ بصورت نمودار زنگ شکل بود. DIDS به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال آنیونی عمل می کند. مهار کانال توسط DIDS بیانگر کلری بودن کانال آنیونی مشاهده شده است. احتمالاً کانال کلر غشاء داخلی میتوکندری مغز در فرایندهای فیزیولوژیک مانند تنظیم pH تنظیم حجم سلول، فرایند ترشح نمک و تغییر پتانسیل غشاء و در حفاظت سلولی و اپوپتوز [۱۱، ۱۲، ۱۷] نقش داشته باشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه و از آقای دکتر وزیری و انستیتو پاستور ایران جهت انجام آزمایشات مولکولی و آقای سجاد سالاری که در استخراج لیپید مورد نیاز همکاری داشتند، تشکر بعمل می آید.

کبد موش در ولتاژهای مختلف گزارش نمودند [۹].

توکسین ها ابزارهای قوی فارماکولوژیک برای کمک به شناخت عملکرد کانال هستند. دی سولفوناتهای استیلین یکی از مهار کننده های کانالهای آنیونی، اغلب در مطالعات سلولی مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از باز دارنده های قوی آزمایش شده کانالهای آنیونی (DIDS) می باشد. این ترکیب مهار کانال آنیونی را توسط مکانیسم های برگشت پذیر و غیر برگشت پذیر انجام می دهد [۳] همچنین مشخص شده است که با اتصال دارو به درون منفذ کانال آنیونی، از عبور آنیون از کانال بازداری می شود [۳، ۲۳] این نظریه بیان می دارد که گروه سولفونات DIDS بعنوان آنیونهای دو ظرفیتی کاملاً یونیزه شده در pH فیزیولوژیک حضور دارند و این ترکیب از غشاء لیپیدی عبور نمی کند و مانع عبور آنیونها از داخل کانال می شود. همچنین این مسیر مهاری وابسته به غلظت است، و با افزایش غلظت DIDS این اثر تقویت می شود. اثر غیر قابل برگشت آن نتیجه باندهای کووالان تشکیل شده بین گروههای ایزوسیانات DIDS و برخی از ریشه های اسید آمینه کانال است. کانالهای آنیونی میتوکندریایی نیز در مورد مهار توسط DIDS آزمایش شده اند. مطالعات فیزیولوژیک نشان می دهند که DIDS در سطح ارگانل سلولهای عضله قلبی، کبد، چربی قهوه ای و عضله اسکلتی موجب مهار کانالهای آنیونی می گردد [۲۶، ۲۶] نتایج مطالعه در استفاده از مهار کننده کانال آنیونی (DIDS) دلالت بر مهار کانال در سطح سیتوپلاسمی دارد و این مهار با افزایش غلظت تقویت می گردد. یکی از ویژگی هایی که ما نیز در مورد کانال آنیونی غشاء داخلی

References

- [1] Ballarin C, Sorgato MC, An electrophysiological study of yeas mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP. *J Biol Chem* 270 (1995) 19262 – 19268.
- [2] Borecky J, Jezek P, Siemen D, 108-pS channel in brown fat mitochondria might be identical to the inner membrane anion channel. *J Biol Chem* 272 (1997) 19282 – 19289.
- [3] Bridges RJ, Worrell T, Frizzell RA, Benos DJ, Stilbene disulfonate blockade of colonic secretory Cl⁻ channels in planar lipid bilayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 256 (1989) 902 – 912.
- [4] Camoes F, Bonekamp NA, Delille HK, Schrader M, Organelle dynamics and dysfunction: a closer link between peroxisomes and mitochondria. *J Inherit Metab Dis* 32 (2009) 163 – 180.
- [5] Carraro-Lacroix LR, Lessa LMA, Fernandez R, Malnic G, Physiological implications of the regulation of vacuolar H⁺-ATPase by chloride ions. *Braz J Med Biol Res* 42 (2009) 155 – 163.
- [6] Cleiren E, Benichou O, Van Hul E, Gram J, Bollerdlev J, Singer FR, Beaverson K, Aledo A, Whyte MP,

- Yoneyama T, deVernejoul MC, Van Hul W, Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CICN7 chloride channel gene. *Hum Mol Genet* 10 (2001) 2861 – 2867.
- [7] Coronado R, Latorre R, Detection of K⁺ and Cl⁻ channels from calf cardiac sarcolemma in planar lipid bilayer membranes. *Nature* 289 (1982) 849 – 852.
- [8] Da Cruz S, Xenarios I, Langridg J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278 (2003) 1566 – 41571.
- [9] De Marchi U, Szabo I, Cereghetti GM, Hoxha P, Craigen WJ, Zoratti M A, maxi-chloride channel in the inner membrane of mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777 (2008) 1438 – 1448.
- [10] Eliassi A, Garneau L, Roy G, Sauve R, Characterization of a Chloride-Selective Channel from Rough Endoplasmic Reticulum Membranes of Rat Hepatocytes: Evidence for a Block by Phosphate. *J Membrane Biol* 159 (1997) 219 – 229.
- [11] Fernandez-Salas E, Kwang SS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KP, Edwards LE, Hayes DD, Cheng CH, Steven AC, Weinberg WC, Yuspa SH, mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 3610 – 3620.
- [12] Fernandez-Salas E, Sagar M, Cheng C, Yuspa SH, Weinberg WC, p53 and tumor necrosis factor regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem* 274 (1999) 36488 – 36497.
- [13] Franke C, Hatt H, Iaizzo PA, Lehmann-Horn F, Characteristics of Na⁺ Channels and Cl⁻ conductance in resealed muscle fibre segments from patients with myotonic dystrophy. *J Physiol* 425 (1990) 391 – 405.
- [14] Herick K, Kramer R, Luhning H, Patch clamp investigation into the phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1321 (1997) 207 – 220.
- [15] Huang SG, Klingenberg M, Chloride channel properties of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria: a patch-clamp study. *Biochemistry* 35 (1996) 16806 – 16814.
- [16] Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA, Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82 (2002) 503 – 568.
- [17] Kicinska A, Debska G, Kunz W, Szewczyk A, Mitochondrial potassium and chloride channels. *Acta Biochim Polonica* 47 (2000) 541 – 551.
- [18] Kinnally KW, Campo ML, Tedeschi H, Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr* 21 (1989) 497 – 506.
- [19] Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H, Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 90 (1993) 1374–1378.
- [20] Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ, Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteoporosis in mice and man. *Cell* 104 (2001) 205 – 215.
- [21] Kudin AP, Yaw BN, Bimpong B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS, Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279 (2004) 4127 - 4135.
- [22] Lane DP, Worrying about p53. *Curr Biol* 2 (1992) 581 – 583.
- [23] Laver DR, Bradley KM, Disulfonic stilbene permeation and block of anion channel from sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290 (2006) 1666 – 1677.
- [24] Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA, Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *MolCell* 10 (2002) 35 – 44.
- [25] Malekova L, Kominkov, V, Ferk, M, Stefanik P, Krizanova O, Ziegelhoffer A, Szewczyk A, Ondrias A, Bongkrekic acid and atractyloside inhibits chloride channels from mitochondrial membranes of rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1767 (2007) 31 – 44.
- [26] Malekova L, Tomaskova J, Novakova M, Stefanik P, Kopacek J, Lakatos B, Pastorekova S, Krizanova O, Breier A, Ondrias K, Inhibitory effect of DIDS, NPPB, and phloretin on intracellular chloride channels. *Pflugers Arch* 455 (2007) 349 – 357.
- [27] Muller P, Donald O, Rudin B, Tien H, Westcott W C, Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System.

- Circulation* 26 (1962) 1166 – 1171.
- [28] Nilius B, Droogmans G, Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 177 (2003) 119-147.
- [29] O'Rourke B, Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol* 496 (2007)19 - 607.
- [30] Palade P, Dettbarn C, Volpe P, Alderson B, Otero AS, Direct inhibition of inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from brain microsomes by K^+ channel blockers. *Mol Pharmacol* 36 (1989) 664 – 672.
- [31] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Characterization of complementary Identification of the cloning cystic fibrosis gene and DNA. *Science* 245 (1989) 1066 – 1073.
- [32] Schönfeld P, Sayeed I, Bohnensack R, Siemen D, Fatty acids induce chloride permeation in rat liver mitochondria by activation of the inner membrane anion channel (IMAC). *J Bioenerg Biomembr* 36 (2004) 241 – 248.
- [33] Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksma, G, Korsmeyer SJ, Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 94 (1997) 11357 – 11362.
- [34] Singleton WS, Gray MS, Brown MI, White JL, Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chemists Society* 42 (1965) 53 – 42.
- [35] Sorgato MC, Keller BU, Stuhmer W, Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature* 330 (1987) 498 – 500.
- [36] Sergato M C, Lippe G, Keller BU, Stuhmer W, Integration of Mitochondrial Function. *J Bioenerg Biomembr* 21 (1988) 485 – 506.
- [37] Sorgato MC, Moran O, Pinto De Pinto V, Keller BU, Stuehmer W, Further investigation on the high-conductance ion channel of the inner membrane of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 21 (1989) 485 – 496.
- [38] Suh KS, Yuspa SH, Intracellular chloride channels: viability and critical mediators of cell potential targets for cancer thrapy. *Curr Pharm* 11 (2005) 2753 - 2764.
- [39] Tabares L M M, Clapham ED, Chloride channels in nuclear membran. *J Membrane Biol* 123 (1991) 49 - 54.
- [40] Tomaskova Z, Gaburjakova J, Brezova A, Gaburjakova M, Inhibition of membranes of anion channels the rat heart by stilbene disulfonate-DIDS from mitochondrial derived. *J Bioenerg Biomembr* 39 (2207) 301 – 311.
- [41] Young MA, Tunstall MJ, Kistler J, Donaldson PJ, Blocking chloride channels in the rat lens: localized chloride flux. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (2000) 3049 – 3055.