



Evidences on the existence of a new potassium channel in the rough endoplasmic reticulum (RER) of rat hepatocytes

Sajjad Salari¹, Afsaneh Eliassi^{1*}, Reza Saghiri²

1. Neuroscience Research Center and Dept. Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

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

Received: 22 Dec 2010

Accepted: 24 Nov 2010

Abstract

Introduction: we have recently reported the presence of two potassium currents with 598 and 368 pS conductance in the rough endoplasmic reticulum (RER) membrane. The 598 pS channel was voltage dependent and ATP sensitive. However, the 368 pS channel was rarely observed and its identity remained obscure. Since cationic channels in intracellular organelles such as mitochondria and RER play important roles in intracellular signaling and cellular protection, studying their biophysical and pharmacological properties is important.

Methods: we used channel incorporation into bilayer lipid membrane method. L- α -Phosphatidylcholine (PC), a membrane lipid, was extracted from fresh egg yolk. Bilayer lipid membrane was formed in a 150 μ m diameter hole. Rough endoplasmic reticulum vesicles were obtained from liver after homogenization and several centrifugations. All recordings were filtered at 1 kHz and stored at a sampling rate of 10 kHz for offline analysis by PClamp9. Statistical analysis was performed based on Markov noise free single channel analysis.

Results: A 364 pS potassium channel was identified which was voltage independent in +50 to -50 mV voltages. In all voltages, open probability (P_o) was over 0.9. Nonspecific inhibitor of K^+ channels, 4-aminopyridine (4-AP, 20 mM), inhibited the channel activity. However, intracellular nucleotide like ATP had no effect on channel gating.

Conclusion: We observed a new potassium channel with 346 pS conductance in RER membrane that unlike the 598 pS K channel was not ATP sensitive. This channel may play an important role in Ca^{2+} homeostasis and cell protection.

Key words: BLM, endoplasmic reticulum, potassium channel

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

شواهدی مبنی بر حضور یک کانال پتاسیمی جدید در رتیکولوم آندوپلاسمیک دانه دار (RER) هپاتوسیت‌های موش صحرایی

سجاد سالاری^۱، افسانه الیاسی^{۱*}، رضا صغیری^۲

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

۲. گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۱ دی ۸۹

دریافت: ۲۰ مرداد ۸۹

چکیده

مقدمه: در مطالعات قبلی ما، دو جریان پتاسیمی با کنداکتانسهای ۵۹۸ pS و ۳۶۸ pS در غشاء آندوپلاسمیک رتیکولوم (RER)، مشاهده گردید. جریان ۵۹۸ pS از یک کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ که به صورت حساس به ATP عمل می کرد، ناشی می شد. ولی از آنجائی که جریان ۳۶۸ pS بندرت مشاهده می گردید، ماهیت آن در حاله ای از ابهام باقی ماند. از آنجائی که کانالهای کاتیونی ارگانل‌های داخل سلولی همچون میتوکندری و RER نقش مهمی در سیگنالینگ داخل سلولی و حفاظت سلولی ایفا می کنند، تعیین خصوصیات بیوفیزیک و فارماکولوژیک این کانالها اهمیت دارد.

روش‌ها: از روش ثبت تک کانال متعاقب الحاق آن در غشاء لیپیدی دو لایه استفاده شد. فسفاتیدیل کولین (لیپید غشا؛ PC) از از زرده تخم مرغ تازه استخراج گردید، غشا لیپیدی دو لایه (BLM) در منفذ ۱۵۰ میکرون تشکیل شد. آندوپلاسمیک رتیکولوم دانه دار توسط هموژنیزاسیون و چندین مرحله اولتراسانتریفیوژ از کبد بدست آمد. تمام ثبت‌ها در ۱ kHz فیلتر و با سرعت نمونه برداری ۱۰ kHz جهت آنالیز توسط clampfit9 ذخیره می گردید. آنالیز اماری بر اساس متد Markov's noise free single channel analysis صورت گرفت.

یافته‌ها: یک کانال پتاسیمی با کنداکتانس ۳۴۶ pS مشاهده شد که در محدوده ولتاژی mV +۵۰ تا -۵۰ به صورت غیر وابسته به ولتاژ عمل می کرد و در کلیه ولتاژها P_o بالاتر از ۰/۹ را نشان می داد. مهارکننده‌های غیر اختصاصی کانالهای پتاسیمی همچون 4-AP در دوز ۲۰ mM فعالیت کانال را مهار می کرد این در حالی است که نوکلئوتیدهای داخل سلولی همچون ATP تأثیری بر فعالیت کانال نداشت.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه یک کانال پتاسیمی جدید با کنداکتانس ۳۴۶ pS مشاهده شد که بر خلاف کانال ۵۹۸ pS مشاهده شده در تحقیق قبلی، حساس به ATP نمی باشد. این کانال احتمالاً در حفظ هوموستاز کلسیم و حفاظت سلولی نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: رتیکولوم آندوپلاسمیک، کانال پتاسیمی، BLM

مقدمه

سلول‌های غیر تحریک پذیر یافت می‌شوند و نقش حیاتی در روندهای پیام رسانی، تنظیم کننده رهایش نوروترانسمیتر، تعداد ضربان قلب، ترشح انسولین، تحریک پذیری عصبی، انتقال الکترولیت‌ها، انقباض عضله صاف و تنظیم حجم سلول ایفاء می کنند [۲۱]. کانالهای پتاسیمی علاوه بر غشاء پلاسمائی، در ارگانل‌های داخل سلولی نیز یافت می‌شوند که از جمله آنها می‌توان کانالهای پتاسیمی غلاف هسته [۲۲]، رتیکولوم

کانال‌های پتاسیمی خانواده مهم و گسترده‌ای از پروتئین-های غشایی هستند که هم در سلول‌های تحریک پذیر و هم در

afeliassi@sbm.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

^۱ نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

یک کانال احتمالی معرفی شد [۲۵]. با توجه به ناکامل بودن اطلاعات ما در مورد این جریان پتاسیمی، تحقیق حاضر به منظور بررسی ویژگیهای بیوفیزیک و فارماکولوژی آن انجام گردید.

مواد و روش ها

در این تحقیق از تریسمای بازی، هیپس^۱، ۴-آمینوپیریدین^۲ و ATP، که همگی محصول شرکت سیگما بودند و n - دکان محصول شرکت مرک استفاده شد.

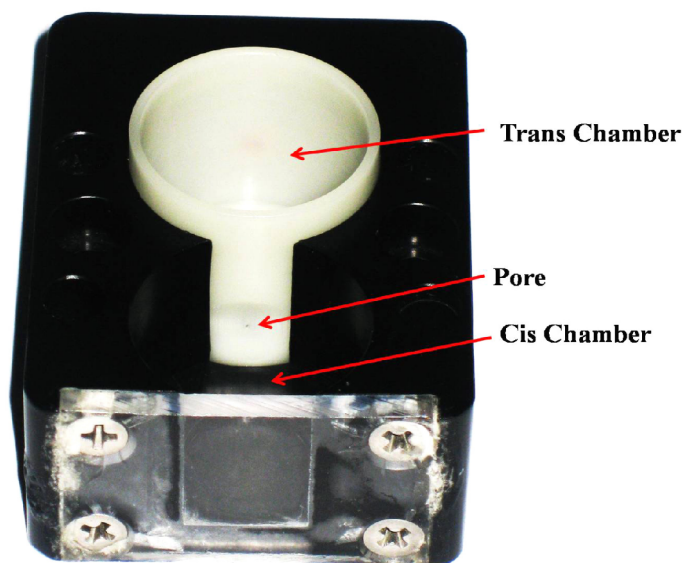
جهت تشکیل غشاء لیپیدی دولایه^۳ (BLM) از فسفاتیدیل کولین استفاده شد. فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ، بر اساس روش Singleton و همکاران [۲۶] استخراج گردید. به این ترتیب که در مرحله اول فسفولیپیدها با استفاده از حلالهای آلی از سایر ترکیبات همانند پروتئینها، پیگمانهای رنگی و سایر چربیها جدا شد سپس فسفاتیدیل 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. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC (thin layer chromatography) مورد آزمایش قرار می گرفت.

برای انجام این تحقیق از موشهای نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم که از ۲۴ ساعت قبل از آزمایش از غذا محروم نگاه داشته شده بودند، استفاده شد. جهت جاگذاری کانال، باید ER به صورت وزیکولهای کوچک حاوی یک یا دو کانال استخراج گردد. برای این منظور از پروتکل Kan و همکاران استفاده شد [۱۲]. در این متد، از طریق هموژنیزاسیون بافت کبد بصورت سوسپانسیون یکنواخت درآمده و سپس با یک مرحله سانتریفیوژ سرعت بالا، رسوب حاوی غشا سلول، میتوکندری، و سایر ارگانل ها از محلول حاوی ER جدا گردید. آنگاه وزیکولهای ER طی چندین مرحله اولتراسانتریفیوژ استخراج شد.

جهت تشکیل غشاء لیپیدی دولایه از روش Muller

سارکوپلاسمیک (SR) [۱۹، ۷]، میتوکندری [۱۳، ۱۱، ۸، ۵] و رتیکلوم آندوپلاسمیک (ER) [۲۵، ۱] را نام برد. این کانالها عملکردهای متنوعی در سلول دارند به عنوان مثال مهار کانالهای پتاسیمی حساس به ATP (K_{ATP}) غلاف هسته باعث دپولاریزه شدن غشاء هسته و فعال شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می شود که این امر باعث تغییر غلظت کلسیم داخل هسته، تغییر فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی و تغییر بیان ژن می شود [۲۲]. کانالهای پتاسیمی غشاء SR با عبور دادن یونهای پتاسیم در خلاف جهت حرکت کلسیم، پتانسیل غشاء SR را از $E_{Ca^{2+}}$ دور نگاه می دارند. این عمل باعث می شود که در هنگام انقباض عضله، یون کلسیم بیشتری از SR آزاد شود و در هنگام استراحت عضله، به SR اجازه می دهد مقدار بیشتری یون کلسیم را در خود ذخیره کند [۲۰، ۱۹، ۷]. در غشاء داخلی میتوکندری نیز چندین نوع کانال پتاسیمی گزارش شده است. مطالعات نشان می دهند که کانالهای $mitoK_{ATP}$ نورونهای عصبی در طی دوره ایسکمی باز شده و بدین وسیله از این سلولها در برابر ایسکمی حفاظتی می کنند [۳۰، ۳]. کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ میتوکندری نیز نقشی کلیدی در سیگنالینگ آپتوز بازی می کنند [۲۸]. با وجود مطالعات پیشرونده ای که در مورد غشاء داخلی میتوکندری انجام می شود در مورد کانالهای پتاسیمی ER اطلاعات اندکی وجود دارد. مطالعات قبلی ما نشان داد که در غشاء RER نیز یک نوع کانال پتاسیمی وجود دارد. این کانال که کندانسانسی در حدود $598 \pm 17/7$ پیکوسیمنس (pS) داشت، به صورت وابسته به ولتاژ فعالیت می کرد، به این صورت که امکان باز بودن کانال (P_o) در ولتاژهای بالای ۳۰ میلی ولت به شدت افزایش می یافت [۲۵]. ATP و آنالوگ غیر قابل هیدرولیز ATP (γ S) در دوز ۲/۵ میلی مولار به طور کامل فعالیت این کانال را مهار می کرد. ADP به تنهایی اثر معنی داری بر فعالیت کانال اعمال نمی کرد ولی Mg-ADP به طور معنی داری باعث باز شدن کانال می شد [۱]. در حین بررسی این کانال یک جریان پتاسیمی $11/1$ pS ± 368 نیز مشاهده شد که در محدوده ولتاژی $+60$ mV تا -30 رفتار خطی (اهمیک) را نشان می داد. این جریان پتاسیمی بندرت ظاهر می شد و همراه با کانال حساس به ATP مشاهده می گردید. لذا به عنوان ساب کندانسانس برای این کانال و یا

1. N-Z-hydroxyethylpiperazine-N-Z-ethanesulfonic acid
2. 4-Aminopyridine
3. Bilayer Lipid Membrane _ BLM



شکل ۱- نمائی از محفظه سیس و ترانس و مکان قرارگیری منفذ بین این دو محفظه

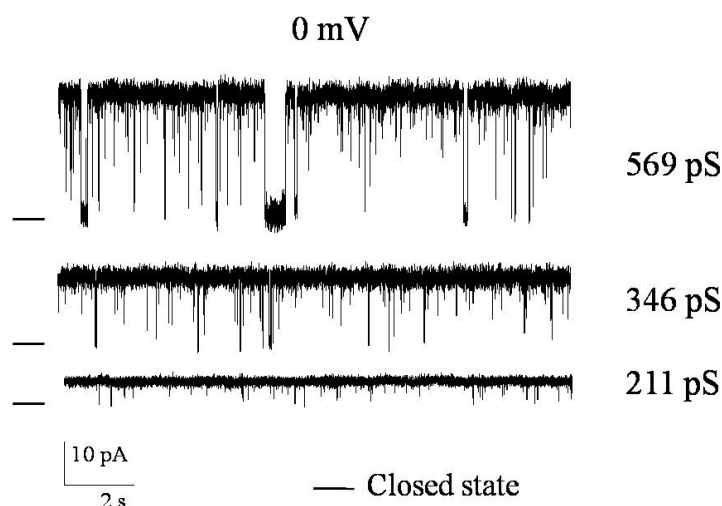
استفاده شد [۱۶]. فسفاتیدیل کولین با غلظت 25 mg/ml در - n دکان حل شده و توسط سوزن استیل به قطر $150 \mu\text{m}$ با منفذ 150 میکرونی محفظه تفلونی تماس داده می شد تا غشاء تشکیل شود. دو طرف منفذ به ترتیب در فضای سیس (cis; فضای سیتوپلاسمی) محلول کلرید پتاسیم با غلظت 200 mM و در فضای ترانس (trans; فضای لومنی) محلول کلرید پتاسیم با غلظت 50 mM قرار داشت. محلولهای کلرید پتاسیم حاوی 10 mM هیپس بود و pH آنها با تریسمای بازی به $7/4$ رسانده شد. شکل ۱ نمائی از محفظه های سیس و ترانس و محل قرار گیری منفذ را نشان می دهد. با توجه به این که در شرایط آزمایش ما که در محفظه سیس غلظت 200 mM KCl و در محفظه ترانس 50 mM KCl با غلظت 50 mM استفاده شد، در محدوده ولتاژ $+30$ تا -30 mV جهت جریان پتاسیمی از سیس به ترانس و رو به بالا و کلر رو به پایین می باشد.

وزیکولهای رتیکلوم آندوپلاسمیک استخراج شده، توسط سوزن استیل به قطر $10 \mu\text{m}$ با غشاء لیپیدی دولایه تماس داده می شد تا بطور تصادفی یک یا دو کانال وارد غشاء شود. جهت ثبت از فعالیت کانال از الکتروود نقره/ کلرور نقره استفاده شد که از یک طرف توسط پل آگار با محفظه های سیس و ترانس و از طرف دیگر با آمپلی فایر در ارتباط قرار می گرفت. الکتروود مورد استفاده جهت کلمپ ولتاژ در محفظه سیس و الکتروود رفرانس در محفظه ترانس قرار داشت. جریانهای اندازه گیری شده توسط آمپلی فایر تقویت شده و پس از فیلتر شدن

خصوصیات الکتروفیزیولوژیک تک کانال پتاسیم: بعد از الحاق وزیکولهای رتیکلوم آندوپلاسمیک به غشاء دو لایه در محیط غیر همگن کلرید پتاسیم $200 \text{ mM KCl cis}/50$ (trans) mM KCl فعالیت سه کانال پتاسیمی شناسائی شد که به ترتیب کنداکتانس هائی در حدود 569 ، 346 و 211 pS داشتند. شکل ۲ فعالیت این کانالها را در ولتاژ صفر میلی ولت نشان می دهد. در این مقاله خصوصیات الکتروفیزیولوژیک کانال پتاسیمی 346 pS مورد بررسی قرار می گیرد. شکل ۳ جریانهای ثبت شده از این کانال را در پتانسیلهای نگهدارنده $+50$ تا -50 mV نشان می دهد. در پتانسیل معکوس (mV -30) که گرادینانهای شیمیائی و الکتریکی همدیگر را خنثی

جدول ۱- میانگین احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف. نتایج، $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ مربوط به $n = 5$ را در هر ولتاژ نشان می دهد.

Voltage (mV)	Open Probability (P_o)
+50	0.97 ± 0.02
+40	0.95 ± 0.018
+30	0.92 ± 0.038
+20	0.97 ± 0.013
+10	0.93 ± 0.056
0	0.95 ± 0.023
-10	0.94 ± 0.045
-20	0.92 ± 0.03
-30	-----
-40	0.95 ± 0.48
-50	0.93 ± 0.02

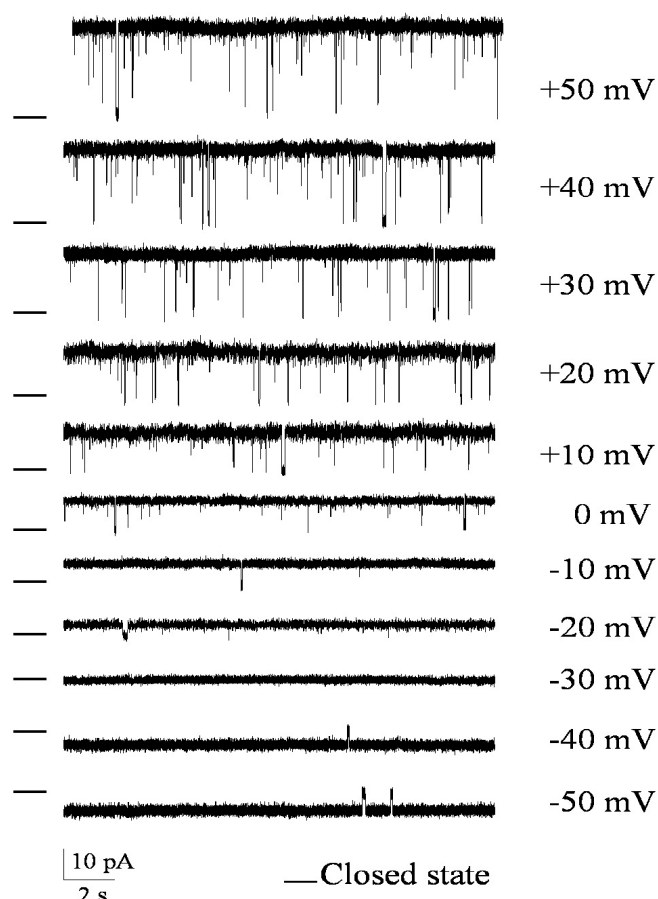


شکل ۲- ثبت تک کانال از فعالیت کانالهای کاتیونی رتیکلوم آندوپلاسمیک در ولتاژ صفر میلی ولت در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans).

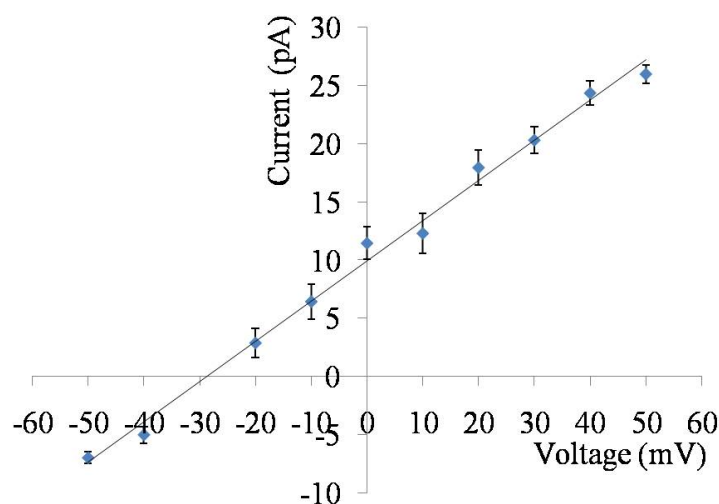
مقدار $92/346 \pm 9$ pS را نشان می داد.

وابستگی به ولتاژ احتمال باز بودن کانال: اثر ولتاژ بر روی ویژگیهای باز و بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که جدول ۱ نشان می دهد احتمال باز بودن کانال در محدوده ولتاژی mV +50 تا -50، بالای ۰/۹ بوده و کانال در این محدوده ولتاژی به صورت غیر وابسته به ولتاژ عمل می کرد. اگرچه غشاهای دو لایه کنترل می توانست ولتاژهای mV ± 100 را تحمل نماید، اما بعد از الحاق کانال به داخل غشاء، ولتاژهای مثبت تر از mV +50 و منفی تر از mV -50 سبب پاره شدن غشاء می شد، لذا ثبت گرفتن در این ولتاژها امکان پذیر نبود. این مسئله پیشنهاد می کند که

می کنند، هیچ گونه جریانی مشاهده نمی شد، این در حالی است که در پتانسیلهای مثبت تر از پتانسیل معکوس، جریان رو به خارج (outward) و در ولتاژهای منفی تر از پتانسیل معکوس، جریان رو به داخل (inward) ظاهر می شد. دامنه این جریانهها با فاصله گرفتن از پتانسیل معکوس بلندتر می شد. کانال در ولتاژهای مثبت، رفتاری با باز شدن نسبتاً طولانی و بسته شدنهای سریع (flickering) نشان می داد این در حالی است که در ولتاژهای منفی، به صورت حالتیهای باز طولانی و حالتیهای بسته کوتاه مدت عمل می کرد. شکل ۴، رابطه جریان- ولتاژ مربوط به ۵ ثبت از فعالیت کانال را در محدوده ولتاژی mV +50 تا -50 نشان می دهد. رابطه جریان- ولتاژ کانال در این محدوده ولتاژی رابطه خطی (اهمیک) را نشان می داد. شیب منحنی که نشان دهنده کنداکنانس کانال است



شکل ۳- ثبت تک کانال از فعالیت کانال ۳۴۶ pS در ولتاژهای مختلف در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans). جریانهای ثبت شده بسته به میزان نویز پایه به صورت offline به مقدار ۷۰۰-۹۰۰ Hz فیلتر شده اند.



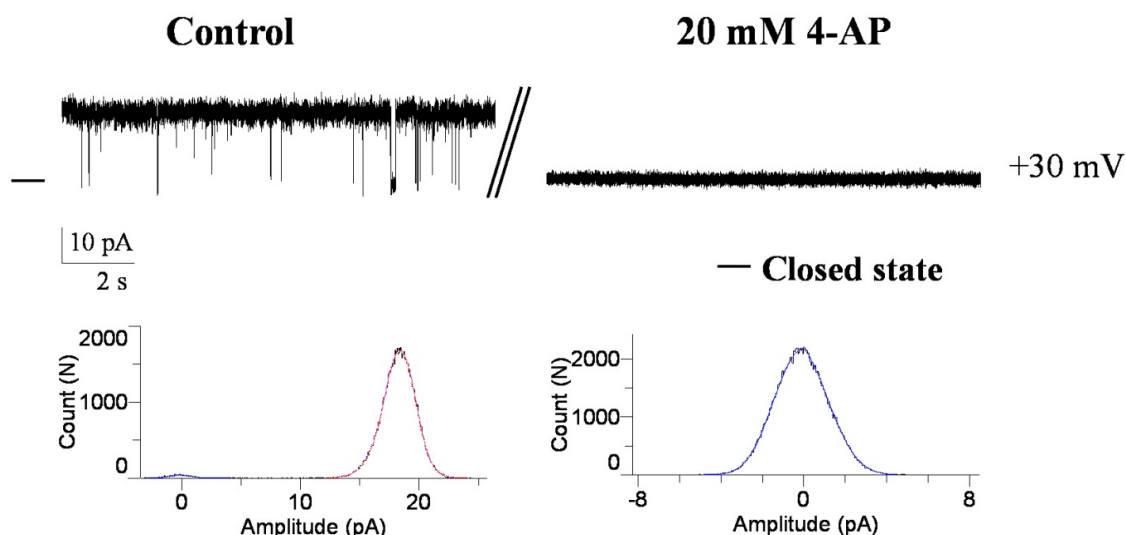
شکل ۴- منحنی رابطه جریان-ولتاژ در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans). نقاط، Mean $\pm$ SEM مربوط به $n = 5$ را در هر ولتاژ نشان می دهد.

فعالیت کانال در ولتاژ +۳۰ mV نشان می دهد. قبل از اضافه کردن 4-AP میزان جریان، $18/47 \pm 1/91$ pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۹۷ بود، پس از اضافه کردن 4-AP فعالیت کانال بطور کامل مهار گردید.

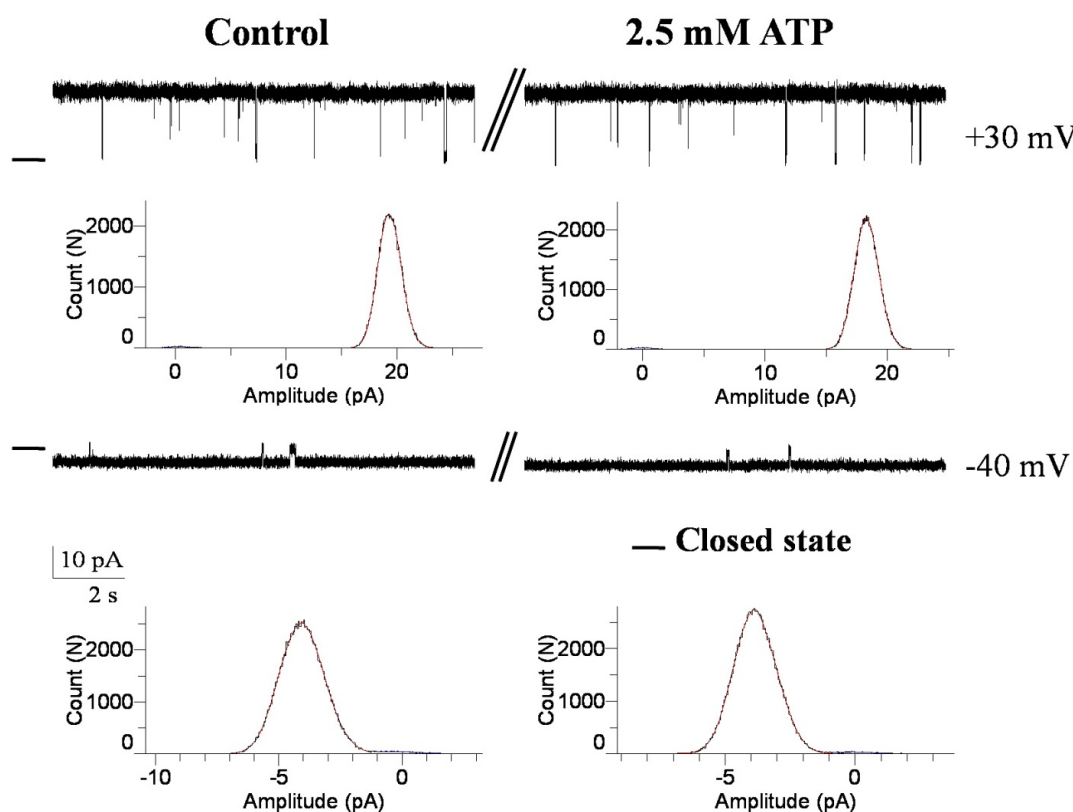
اثر ATP بر فعالیت کانال: برای بررسی توانایی نوکلئوتیدها

الحاق پروتئینهای کانال سبب ناپایداری غشاء می شود.

اثر ۴-آمینوپیریدین (4-AP) بر روی فعالیت کانال: اثر 4-AP به عنوان مهارکننده غیر اختصاصی کانالهای پتاسیمی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ اثر اضافه کردن 4-AP با غلظت ۲۰ mM در محفظه سیس را بر روی



شکل ۵- ثبت از فعالیت کانال و هیستوگرام آمپلی تود جریان در ولتاژ +۳۰ mV در شرایط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) قبل و بعد از اضافه کردن 4-AP با غلظت ۲۰ mM به فضای سپس.



شکل ۶- ثبت از فعالیت کانال و هیستوگرام آمپلی تود جریان در ولتاژهای +۳۰ و -۴۰ mV در شرایط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) قبل و بعد از اضافه کردن ATP با غلظت ۲/۵ mM به فضای سپس.

۱۷/۴۴ و احتمال باز بودن کانال ۰/۹۸ شد. در این ولتاژ تغییر معنی داری در میزان جریان و احتمال باز بودن کانال مشاهده نشد. در ولتاژ -۴۰ mV قبل از اضافه کردن ATP میزان جریان 0.32 ± 0.24 pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۹۷ بود. بعد از اضافه کردن ATP میزان جریان 0.68 ± 0.32 pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۹۸ شد. در این ولتاژ نیز

در تنظیم فعالیت کانال، اثر ATP بر فعالیت کانال بررسی شد. شکل ۶ اثر اضافه کردن ATP با غلظت ۲/۵ mM در محفظه سپس را بر روی فعالیت کانال در ولتاژهای +۳۰ و -۴۰ mV نشان می دهد. در ولتاژ +۳۰ mV قبل از اضافه کردن ATP میزان جریان 0.32 ± 0.24 pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۹۸ بود. بعد از اضافه کردن ATP میزان جریان 0.68 ± 0.32 pA

تغییر معنی داری در میزان جریان و احتمال باز بودن کانال مشاهده نشد.

بحث

در تحقیق حاضر، ما موفق به شناسایی و تعیین هویت بیوفیزیکی یک کانال پتاسیمی جدید در غشاء رتیکولوم اندوپلاسمیک سلولهای کبدی شدیم. این کانال دارای کندانسانس $9/9 \pm 346$ pS بوده و در محدوده ولتاژی mV 50 تا -50 بصورت غیر وابسته به ولتاژ عمل می کرد. این کانال توسط ۴-آمینوپیریدین (4-AP) مهار می شد، در حالی که ATP تأثیری بر فعالیت آن نداشت.

تکنیکهای الکتروفیزیولوژی حضور کانال های پتاسیمی را در غشاء ارگانل های سلولی مانند غشاء هسته [۲۲]، سارکوپلاسمیک رتیکولوم عضله مخطط اسکلتی [۶]، قلبی [۱۹]، غشاء داخلی میتوکندری [۲۷] و گرانولهای کرومافینی [۹] نشان می دهد. این کانالها برای انجام فرایندهای مختلف سلولی ضروری هستند. برای مثال، در میتوکندری کانال پتاسیمی حساس به ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) سبب حفاظت میتوکندری و سلول در شرایط ایسکمی می گردد [۲۹]. همچنین کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم با کندانسانس بالا (کانال BK_{Ca}) در غشاء داخلی میتوکندری قلب [۲۳، ۱۸] و مغز [۲۷] شناسایی شده که احتمالاً در طول اپوپتوز دارای نقش حیاتی است [۲۳]. نتایج ما یک کانال پتاسیمی با منحنی ولتاژ - جریان خطی در محدوده ولتاژی mV 50 تا -50 میلی ولت را نشان می دهد که شیب منحنی حاکی از کندانسانس pS $9/9 \pm 346$ می باشد. تصاویر مشابهی برای کانالهای پتاسیمی موجود در غشاء داخلی میتوکندری توسط تکنیک پیچ کلمپ [۴] و توسط تکنیک الحاق کانال در غشاء لیپیدی دو لایه گزارش شده است [۲۷، ۲]. هم چنین، کانال پتاسیمی با کندانسانس مشابه با تجربیات ما، در غشاء سارکوپلاسمیک رتیکولوم دهلیز انسان [۷] و سارکوپلاسمیک رتیکولوم دیافراگم سگ [۲۰] گزارش شده است. در نهایت منحنی جریان - ولتاژ بدست آمده از تجربیات ما، نشان دهنده پتانسیل معکوس شدن mV -27 است که بسیار نزدیک به پتانسیل تعادلی نرنست برای پتاسیم ($E_K = -34$ mV) می باشد. این مشاهده بوضوح نشان

می دهد که فعالیت کانال مشاهده شده (شکل ۲) مربوط به یک کانال نفوذ پذیر به کاتیون می باشد (پتانسیل تعادلی نست برای یون کلر برابر با mV 34 است).

در آزمایش های ما تأثیر ولتاژ برروی احتمال باز بودن کانال نیز مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش های ما نشان دادند که ولتاژ در محدوده mV $50 \pm$ تأثیری بر نحوه باز و بسته شدن کانال ندارد. ما احتمال اینکه ولتاژهای مثبت تر و یا منفی تر از mV 50 قادر به تغییر نحوه باز و بسته شده کانال باشد را رد نمی کنیم اما در آزمایش های ما بررسی اثر ولتاژ در محدوده فراتر mV $50 \pm$ به دلیل ناپایداری غشاء لیپیدی دو لایه امکان پذیر نبود. علاوه بر آن، فاکتور های دیگری نیز می توانند مسئول رفتار باز و بسته شدن کانال باشند (مانند عناصر سایتواسکلتون) که در زمان کار با تکنیک الحاق کانال به داخل غشاء لیپیدی دو لایه از دست می روند.

در قسمت دیگر از مطالعات خواص فارماکولوژیک کانال توسط بررسی اثر عواملی مانند ۴-آمینوپیریدین و ATP بر روی فعالیت کانال مورد مطالعه قرار گرفت. 4-AP یک مهار کننده غیر انتخابی کانالهای پتاسیمی است. که با غلظت mM 20 سبب مهار کانال مورد مطالعه ما گردید. گزارش های قبلی حاکی از آن است که حضور mM 5 از ۴-آمینوپیریدین در سطح سیتوپلاسمی سبب مهار کانال پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری سلولهای کبدی می گردد [۱۱]. همچنین کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ با کندانسانس بالا نیز در سلولهای دهلیزی [۱۹] و بافت بطنی [۱۴] توسط ۴-آمینوپیریدین مهار می گردند. قابل ذکر است کانالهای مطالعه شده در گزارش - های فوق توسط یک ساب کندانسانس همراهی می شدند. این کانالها حساس به کلسیم نبوده و حضور یک کانال پتاسیمی حساس به کلسیم را رد می نمودند. اما در مطالعه حاضر بدلیل عدم وجود EGTA در محیط، احتمال اینکه کانال حاضر در خانواده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم قرار گیرد وجود دارد و نیاز به مطالعه بیشتر است. حساسیت کانالهای پتاسیمی در غشاء ارگانل های سلولی به 4-AP متفاوت است. چنانکه کانالهای موجود در غشاء سارکوپلاسمیک رتیکولوم بافتهای بطنی قلب می توانند توسط 4-AP بطور وابسته به ولتاژ مهار شوند، در حالیکه کانالهای پتاسیمی سارکوپلاسمیک رتیکولوم سلولهای دهلیزی قلب به 4-AP غیر حساس هستند. بنابراین

هیپاتوسیت‌های موش صحرایی شناسایی شده است. هم چنین، کانالهای K_{ATP} در غشاء میتوکندری شناسایی گردیده است [۲۹]. این کانالها توسط ATP مهار می شوند. علی رغم اینکه در مطالعه قبلی نشان دادیم کانال پتاسیمی 596 pS حساس به ATP است، مطالعه حاضر حضور کانال جدید پتاسیمی با کنداكتانس 346 pS و غیر حساس به ATP را نشان می دهد. لازم به ذکر است که در ادامه مطالعات اثر گلی بنکلامید و تولبوتامید بعنوان مهارکننده های اختصاصی کانال K_{ATP} بر روی کانال پتاسیمی حساس به ATP مورد بررسی قرار گرفت و اثر مهاري آنها مشاهده شد (مقاله در دست تهیه است). بنابراین به نظر می رسد که کانال پتاسیمی 596 pS مشاهده شده در خانواده کانالهای پتاسیمی K_{ATP} قرار دارد در حالیکه کانالهای پتاسیمی 346 pS شناسایی شده در مطالعه حاضر در خانواده های دیگر کانالهای پتاسیمی قرار دارد که جهت طبقه بندی آن نیاز به مطالعه بیشتری است.

بطور خلاصه در مطالعه حاضر، یک کانال پتاسیمی با کنداكتانس نسبتاً بالا در غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم هیپاتوسیت های کبدی شناسایی گردید. احتمالاً این کانال نقش مهمی را در فرآیندهای سلولی مانند جبران شارژهای الکتریکی، تشکیل pH تنظیم حجم سلول، حفاظت سلولی و اپوپتوز دارا می باشد. عدم تأثیر ولتاژ روی باز و بسته شدن کانال نشان دهنده آن است که کانال کاندیدای خوبی برای تنظیم از طریق پیام رسانی سلولی در زمان عمل سلول و حفاظت سلولی است.

سپاسگزاری

در پایان از مرکز علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند و آقای جواد فحانیک بابائی که در تهیه لیپید مورد نیاز، نهایت همکاری را داشتند، قدردانی می گردد.

References

[1] Ashrafpour M, Eliassi A, Sauve R, Sepehri H, Saghir H. ATP regulation of a large conductance voltage-gated cation channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 471 (2008) 50-56.

نتایج ما حضور یک کانال پتاسیمی را در هیپاتوسیتها تأیید می کند که خواص فارماکولوژی و کنداكتانس مشابه با کانالهای گزارش شده از سارکوپلاسمیک رتیکلوم بافتهای قلبی دارد، اما وابستگی به ولتاژ کانالهای سارکوپلاسمیک را نشان نمی دهد. مطالعه قبلی ما حضور یک کانال پتاسیمی با کنداكتانس 596 pS و حساس به 4-AP را در غشاء هیپاتوسیت‌های کبدی نشان می داد که بندرت به همراه آن یک جریان پتاسیمی با کنداكتانسی حدود یک سوم (368 pS) آن، یعنی مشابه با کنداكتانس کانال حاضر، همراه بود. علت اینکه در مطالعه قبلی این جریان بندرت مشاهده می شد احتمالاً مربوط به تغییراتی است که در تکنیک داده شده است. به نحوی که در مطالعه قبلی، الحاق کانال از ناحیه سیس (سیتوپلاسمی) و اعمال ولتاژ از ناحیه ترانس (لومنی) صورت می گرفت. در حالیکه در مطالعه حاضر، الحاق کانال و اعمال ولتاژ از ناحیه سیس صورت گرفته و طبق مطالعات گزارش شده، اعمال ولتاژ کمک به الحاق کانال به داخل غشاء دو لایه می نماید. بنابراین بنظر می رسد جریان پتاسیمی بدست آمده در مطالعه حاضر همان جریان پتاسیمی 368 pS گزارش شده [۲۵] باشد. در مطالعات قبلی، گزارش نمودیم که کانال پتاسیمی 596 pS حساس به ATP می باشد. به نحوی که حضور ATP در ناحیه سیتوپلاسمی بطور وابسته به دوز سبب مهار کانال می گردید در حالیکه ADP-Mg سبب فعالیت کانال می شود [۱].

کانالهای حساس به ATP برای اولین بار در غشاء پلاسمایی بافت قلب شناسایی گردید [۱۷] و پس از آن در بسیاری از سلولهای تحریک پذیر مانند سلولهای β -پانکراس، نورونها، میوسیت‌های قلبی، سلولهای عضله صاف و مخطط شناسایی شد [۲۴]. بعلاوه Mahli و همکاران [۱۵] گزارش کردند که سایونیت Kir6.1 و mRNA مربوط به SUR1

[2] Bednarczyk P, Potassium channels in brain mitochondria. *Acta Biochim Pol* 56 (2009) 385-392.
[3] Busija DW GT, Domoki F, Katakam PV, Bari F, Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008) 1471-1477.

- [4] Cheng Y, Gu XQ, Bednarczyk P, Wiedemann FR, Haddad GG, Siemen D, Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell Physiol Biochem* 22 (2008) 127-136.
- [5] Choma K BP, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz WS, Dolowy K, Szewczyk A, Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 41 (2009) 323-334.
- [6] Coronado R, Rosenberg RL, Miller C, Ionic selectivity, saturation, and block in a K⁺-selective channel from sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 76 (1980) 425-446.
- [7] 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.
- [8] De Marchi U SN, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabo I, Zoratti M, Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium* 45 (2009) 509-516.
- [9] Hordejuk R, Lobanov NA, Kicinska A, Szewczyk A, Dolowy K, pH modulation of large conductance potassium channel from adrenal chromaffin granules. *Mol Membr Biol* 21 (2004) 307-313.
- [10] Hordejuk R, Szewczyk A, Dolowy K, The heterogeneity of ion channels in chromaffin granule membranes. *Cell Mol Biol Lett* 11 (2006) 312 - 325.
- [11] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T, ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352 (1991) 244 - 247.
- [12] Kan F JM, Paiement J, Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *BBA-Biomembranes* 1107 (1992) 331 - 341.
- [13] Kulawiak B BP, Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 65 (2005) 271 - 276.
- [14] Liu QY, Rasmuson RL, Liu QX, Strauss HC, Voltage-dependent, open channel blockade of the cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel by 4-aminopyridine. *Can J Cardiol* 14 (1998) 275 - 280.
- [15] Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadcani SO, Spray DC, McDonald TV, Gupta S, KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 275 (2000) 26050 - 26057.
- [16] Mueller P RD, Tien H, Wescott W, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Circulation* 26 (1962) 979 - 980.
- [17] Noma A, ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305 (1983) 147 - 148.
- [18] Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y, Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289 (2005) 1635 - 1642.
- [19] Picard L, Cote K, Teijeira J, Greentree D, Rousseau E, Sarcoplasmic reticulum K⁺ channels from human and sheep atrial cells display a specific electropharmacological profile. *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 1163 - 1172.
- [20] Picher M, Decrouy A, Rousseau E, Conducting and voltage-dependent behaviors of potassium ion channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum: comparison with the cardiac isoform. *Biochim Biophys Acta* 1279 (1996) 93 - 103.
- [21] Puducherry I, Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* 129 (2009) 223 - 232.
- [22] Quesada I RJ, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B, Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 9544 - 9549.
- [23] Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H, Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111 (2005) 198 - 203.
- [24] Seino S, ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 61 (1999) 337 - 362.
- [25] Sepehri H, Eliassi A, Sauve R, Ashrafpour M, Saghir R, Evidence for a large conductance voltage gated cationic channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 457 (2007) 35 - 40.

- [26] Singleton W GM, Brown M, White J, Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chemist Soc* 42 (1965) 53 - 56.
- [27] Skalska J, Bednarczyk P, Piwonska M, Kulawiak B, Wilczynski G, Dolowy K, Kudin AP, Kunz WS, Szewczyk A, Calcium ions regulate K^+ uptake into brain mitochondria: The evidence for a novel potassium channel. *Int J Mol Sci* 10 (2009) 1104 - 1120.
- [28] Szabo I BJ, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E, Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 14861 - 14866.
- [29] Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life* 61 (2009) 134 - 143.
- [30] Watanabe M KK, Ohsawa I, Mizukoshi G, Takahashi K, Asoh S, Ohta S, Katayama Y, nvolvement of mitoKATP channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance. *Brain Res* 1238 (2008) 199 - 207.