

## موتاسیون M338T کانال پتاسیمی ROMK2 (Kir1.1b) هدف گذاری اشتباهی را در سلول های MDCK سبب می شود

سعید حاجی هاشمی<sup>۱\*</sup>، والری کولینز<sup>۲</sup>، گوردون کوپر<sup>۳</sup>، استنلی وایت<sup>۴</sup>

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- دکتری فیزیولوژی، گروه علوم زیست پزشکی، دانشگاه شفیلد، انگلستان

۳- استاد، دکتری تخصصی فیزیولوژی، گروه علوم زیست پزشکی، دانشگاه لیدز، انگلستان

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** سندرم بارتر از اختلالات توبولی کلیه است که سبب کاهش باز جذب سدیم و کلر در قسمت ضخیم بازوی بالا رونده لوله هنله و سبب دفع سدیم و کلر می شود. سندرم بارتر نوع ۲ با موتاسیون های ژن KCNJ1 ایجاد می شود که کانال های پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات تصحیح کننده به سمت داخل (ROMK) Kir1.1 را کد می کند. در این پژوهش اثرات موتاسیون جایگاه 338 بر روی کانال پتاسیمی ROMK2 بررسی گردیده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، با موتاسیون زای مستقیم اسید آمینه ترئونین جایگزین اسید آمینه متیونین گردید (موتاسیون M338T). کانال های پتاسیمی ROMK2 نوع طبیعی و نوع موتاسیون یافته M338T درون اووسیت های زاینوپوس لوپس و به صورت موقتی در سلول های کشت داده شده MDCK بیان گردیدند. با تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکتروود، جریان های یونی مربوط به کانال های پتاسیمی ROMK2 و موتاسیون یافته در اووسیت ها اندازه گیری گردید. با تکنیک میکروسکوپی کونفو کال توزیع کانال های پتاسیمی ROMK2 مارک شده با EGFP (برچسب دار) در غشاهای سلول های MDCK بررسی گردید.

**یافته ها:** کانال های پتاسیمی ROMK2 نوع طبیعی و نوع موتاسیون یافته M338T درون اووسیت ها عملکردی یکسان داشتند. توزیع کانال های پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T در غشای سلول های MDCK فاقد قطبیت و سلول های دارای قطبیت تفاوت داشت.

**نتیجه گیری:** موتاسیون جایگاه M338T باعث تغییر در تداخلات قسمت کربوکسیل کانال های پتاسیمی ROMK2 می گردد. هدف گذاری اشتباهی در *in vivo*، نیروی پیش برنده ترشح پتاسیم و باز جذب سدیم و کلر در این قسمت نفرون را کاهش می دهد.

**واژگان کلیدی:** سندرم بارتر، کانال پتاسیمی ROMK2، موتاسیون M338T، غشاء اووسیت

\*نویسنده مسئول: اراک، سردشت مجتمع پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

Email: S.hajihashemi@gmail.com

## مقدمه

سندرم بارتر اختلال ژنتیکی هتروژن است که مشخصه آن از دست دادن سدیم و کلر توسط کلیه هیپوکالمی آلکالوز متابولیک می‌باشد که به علت نقص در بازجذب سدیم و کلر توسط قسمت ضخیم بازوی بالارونده لوله هنله می‌باشد (۱-۳). عملکرد طبیعی قسمت ضخیم بازوی بالارونده به روابط عملی بین چند پروتئین غشائی پیش برنده در انتقال سدیم و کلر بستگی دارد. بنابراین از دست دادن عملکرد این پروتئین‌ها به مهار بازجذب سدیم و کلر منجر می‌گردد. موتاسیون‌های ناقل سه گانه  $\text{Na}^+$ - $\text{NKCC2}$  (Kir1.1) ROMK غشاء رأسی سندرم بارتر نوع ۲، موتاسیون در کانال پتاسیمی  $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  سندرم بارتر نوع ۱، موتاسیون در کانال پتاسیمی ROMK (Kir1.1) غشاء رأسی سندرم بارتر نوع ۲، موتاسیون در کانال کلری غشاء قاعده‌های - جانبی (CIC-Kb) سندرم بارتر نوع ۳ و موتاسیون در پروتئین جانبی بارترین مربوط به کانال کلری (CIC-Kb) بارتر نوع ۴ را ایجاد می‌کنند. اولین عضو از خانواده بزرگ کانال‌های پتاسیمی تصحیح کننده به سمت داخل (Kir) که پروتئین آن جدا گردید، کانال پتاسیمی ROMK بود (۴). این پروتئین توسط ژن *KCNJI* کد گذاری می‌گردد که از پنج اگزون تشکیل شده است. قسمت بیشتر پلی پپتید توسط اگزون ۵ کد گذاری می‌گردد (اگزون اصلی). در کلیه به علت به هم تابیده شدن ژن *KCNJI* سه ایزوفرم پلی پپتیدی اصلی (3- ROMK1) تولید می‌شود که تفاوت آنها تنها در توالی قسمت انتهایی آمینی آنها می‌باشد، این ایزو فرم‌ها در غشاء رأسی سلول‌های قسمت ضخیم بازوی بالارونده، توپول خمیده دور مجاری جمع کننده قشری و مرکزی بیان می‌گردند (۵-۷). تا به امروز تعداد زیادی موتاسیون در اگزون اصلی ژن *KCNJI* در نتیجه موتاسیون‌های متوقف کننده زودرس، جایگزینی اسیدهای آمینه غیر محافظتی یا حذف‌های بزرگ گزارش شده است (۸-۱۰). چنین موتاسیون‌هایی اثرات گوناگونی بر روی عملکرد کانال، از جمله اختلال در انتقال به غشاء پلاسمایی، نقص در عملکرد منفذ کانال، ایجاد تغییر در تداخل با مولکول‌های پیام رسان

مانند فسفاتیدیل ۴ و ۵ دی فسفات و تغییر دادن در حساسیت کانال به pH دارند (۱۱-۱۳).

خصوصیت بسیار مهم سلول‌های اپیتلیال توانایی بیان پروتئین‌ها در نواحی غشاء پلاسمایی مشخص شده رأسی یا قاعده‌های - جانبی می‌باشد، جایی که چنین پروتئین‌هایی عملکرد خاص خود را انجام می‌دهند. بیان پروتئین قطیت یافته در سلول‌های اپیتلیالی توسط ترکیبی از چیدمان اختصاصی و مکانیسم‌های نگهدارنده تعیین می‌گردد (۱۴، ۱۵). در مطالعات قبلی تأثیر جایگاه 362 کانال پتاسیمی ROMK2 از طریق ایجاد حالت فسفوریله اسید آمینه سرین بر روی روند آندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK2 بررسی گردید. موتاسیون S362A که حالت دفسفوریله را ایجاد می‌کند، سبب ایجاد مقاومت نسبت به آندوسیتوز می‌گردد؛ که نشان می‌دهد این جایگاه آندوسیتوز این کانال‌ها را تنظیم می‌نماید (۱۶، ۱۷).

در کلیه، نشانه روی نامناسب پروتئین‌ها، بیماری‌های توپولی را ایجاد می‌کند که شامل شکل‌های تواریتی اسیدوز توپولی کلیوی و دیابت بی‌مزه می‌باشد (۱۸)، موتاسیون هتروژن *KCNJI* (T1631C) با جانشین کردن متیونین با ترئونین در جایگاه ۳۳۸ کانال پتاسیمی ROMK2 با شکل ملایمی از سندرم بارتر همراه است (۲۰)، (۸). با توجه به فنوتیپ مشاهده شده اثر این موتاسیون بر روی عملکرد کانال پتاسیمی ROMK2 نا مشخص است. توالی انتهایی کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMKs دارای چندین الگو در داخل قسمت‌های انتهایی هستند که در تعیین محل قرارگیری کانال پروتئینی دارای اهمیت هستند. این فرضیه مطرح می‌گردد که کانال پتاسیمی ROMK2 با موتاسیون M338T ممکن است نتواند به صورتی مناسب در سلول‌های اپیتلیال کلیه قرار گیرد. به منظور بررسی این احتمال عملکرد و چگونگی استقرار نوع وحشی و موتاسیون یافته کانال پتاسیمی ROMK2 (بیشترین ایزوفرم) در اووسیت‌ها و در سلول‌های قطبی شده و غیر قطبی شده سلول‌های MDCK (Madin Darby Canine Kidney) آزمایش گردید.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که در بخش علوم زیست پزشکی دانشگاه شفیلد کشور انگلستان انجام شده است. کانال پتاسیم ROMK2 موش صحرایی به درون پلاسمید pTLN قابل بیان در اووسیت ساب کلون گردید (۲۱). قالب خواندن باز کانال ROMK2 توسط اندونوکلازهای ECOR1 و BAMH1 از پلاسمید قبلی pcDNA3-ROMK2 جدا گردید و در جایگاه مشابه درون پلاسمید pTLN ساب کلون گردید (۲۲). موتاسیون M338T با استفاده از پروتکل Quikchange در درون pEGFP-C2-ROMK2 و pTLN-ROMK2 با تغییر دادن نوکلوتیدهای ATG به ACG ایجاد گردید (۲۲). موتاسیون ایجاد شده با تعیین توالی نوکلوتیدی تأیید گردید (UK لارک، تکنولوژی، تاکلی). برای تولید RNA مکمل پلاسمید pTLN با استفاده از اندونوکلازهای MLU I یا SNAB1 به صورت خطی تبدیل گردید و RNA مکمل توسط آنزیم RNA SP6 پلیمرز تولید گردید (آمبون، هانتینگدون).

## بیان کردن ژن در اووسیت‌ها و اندازه‌گیری میزان جریان با تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ

حیوانات وحشی ماده و بالغ زینوپوس نژاد لوئیس بر اساس پروتکل انسانی که در بخش علوم زیست پزشکی دانشگاه شفیلد کشور انگلستان تأیید شده است با جدا کردن سر و تخریب طناب نخاعی کشته شدند. اووسیت‌ها به همان روش پروتکل استاندارد که توسط کوپر و همکاران توصیف شده است تحت شرایط ضد عفونی شده جدا و نگهداری شدند (۲۳). به اووسیت‌ها مقدار ۱ نانوگرم در حجم نهایی ۵۰ نانولیت از RNA مکمل که کانال پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T را کد گذاری می‌کرد، تزریق گردید و هم‌چنین به اووسیت‌های کنترل ۵۰ نانولیت آب تزریق گردید. با تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکتروود در دمای اتاق (۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد) جریانات یونی کانال‌ها اندازه‌گیری گردید. محلول پرفیوز کننده (محلول ND96) محفظه

اووسیت شامل ۵ میلی مول HEPES، ۱/۸ میلی مول CaCl<sub>2</sub>، ۱ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۲ میلی مول KCl و ۹۶ میلی مول NaCl با pH برابر ۷ بود. در محلول حاوی باریم، کلرید باریم جانشین کلرید سدیم گردید. جهت تعیین حساسیت کانال‌های طبیعی ROMK2 و M338T موتاسیون یافته نسبت به pH از نسخه ۲ نرم افزار آکسوتیپ استفاده گردید، به این ترتیب که پتانسیل غشاء در منفی ۵۰ میلی ولت ثابت نگه داشته شد و در حالی که pH داخل سلولی (pH<sub>i</sub>) اووسیت با اسید ضعیف بوتیرات کاهش می‌یافت میزان جریان اندازه‌گیری گردید. غشاء اووسیت نسبت به بوتیرات بسیار نفوذ پذیر است و داخل سیتوپلاسم سلول را اسیدی می‌کند. از آنجا که مکانیسم‌های تنظیم کننده داخل سلولی فعال نیست، pH<sub>i</sub> در سطح جدید ثابت باقی می‌ماند (۲۳، ۲۴) آزمایشات با محلول پرفیوز کننده حاوی ۳ میلی مولار بوتیرات انجام گردید و با اضافه کردن بوتیریک اسید به ترتیب با غلظت‌های ۸، ۲۴، ۷۵ و ۶۱۳ میکرو مول، pH محلول‌ها ۷/۴، ۶/۹، ۶/۴ و ۵/۴ تنظیم گردید (بر اساس pK<sub>a</sub> ۴/۸۱ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد).

## ترانسفکشن سلولهای MDCK

گونه با مقاومت پایین (نوع II) به صورت تک لایه ای MDCK در تراکم ۳×۱۰<sup>۵</sup> سلول در هر چاهک ظروف فالكون ۶ چاهکی حاوی ۵-۴ صفحه شیشه‌ای نازک (۱۳ میلی متر طول و با ضخامت شماره (۱، BDH)) کشت داده شد و اجازه داده شد تا ۶۰-۵۰ درصد سلول‌ها با یکدیگر متصل شوند. سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ برای ۷۲-۴۸ ساعت قبل از فیکس کردن و کونفوکال میکروسکوپی نگهداری گردید.

با استفاده از ۱ میکرو گرم از DNA مکمل و ۳ میکرولیتر از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ۱ میلی‌لیتر از سرم Gibco Invitrogen OptiMEM فاقد آنتی بیوتیک، براساس راهنمایی کارخانه تولید کننده انتقال ژنی انجام گردید. بعد از گذشت ۱۲-۶ ساعت مخلوط معرف بر داشته

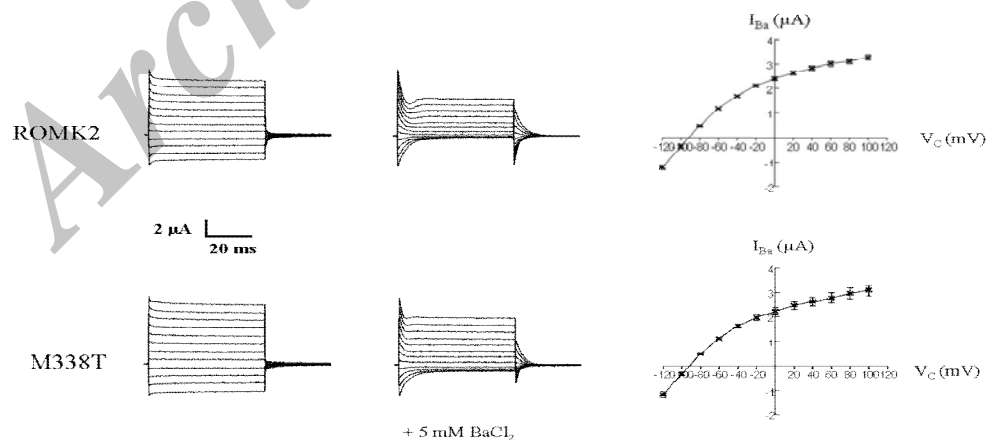
دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت و سپس فیکس گردید. با استفاده از تیغه چاقوی کوچک جراحی تمیز فیلتر از محل قرار گرفتن جدا گردید و درون وکتاشیلد بر روی اسلایدهای مخصوص (VWR) میکروسکوپ کونفوکال با ضخامت ۱ میلی متر قرار گرفت و با استفاده از لاک ناخن که با دقت در بالای فیلتر قرار گرفت مهر و موم گردید. اسلایدها در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. فلورسانس با استفاده از لیزر Ar زیر میکروسکوپ کونفوکال (مدل زایس - متا ۵۱۰ آگزوپلان ۲) با استفاده از فیلترهای مناسب مشاهده شد. همه داده‌ها با استفاده از نظر توان لیزر و تنظیمات فتومولتی پلایر یکسانی گرفته شد. تصاویر با استفاده از (NIH ImageJ نسخه ۱.۳۵۱) یا مرورگر تصویر زایس (نسخه ۳.۲۰، ال اس ام) تجزیه و تحلیل شد و با نسخه ۸ Paint Shop Pro مرتب و تکثیر گردید.

#### یافته‌ها

ثابت نگه داشتن ولتاژ و رابطه بین میزان جریان و ولتاژ در اووسیت‌های دارای کانال پتاسیمی ROMK2 نوع طبیعی و یا موتاسیون یافته M338T اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

شد و با محیط کشت مینیموم ایگلز (Minimom Eagles) حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله جایگزین گردید. برای رشد سلول‌ها به صورت تک لایه‌ای تعداد  $3 \times 10^5$  سلول بر روی فیلترهای نفوذپذیر (با قطر ۶/۵ میلی‌متر و اندازه منفذ ۰/۴ میکرومتر) کشت گردید و اجازه داده شد تا سلول‌ها به یکدیگر متصل گردند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد برای ۷۲-۴۸ ساعت قبل از فیکس کردن و کونفوکال میکروسکوپی نگهداری گردید.

سلول‌ها بر روی cover slips با قطر ۱ سانتی‌متر کشت شدند و سه بار با محلول بافر فسفات سالین شستشوداده شد و سپس با محلول متانول استن (با نسبت حجمی ۷:۳) فیکس گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۷). محلول فیکس کننده خارج گردید و قبل از این که داخل وکتا شیلد قرار گیرد به مدت ۱۰ دقیقه سلول‌ها در دمای اتاق خشک گردیدند. سلول‌های تک لایه‌ای کشت شده بر روی فیلتر سه بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد و سپس غشاء رأسی در معرض غلظت ۴۰ میکروگرم رودآمین کونژوگه با PNA (حامل آزمایشگاهی) در محلول بافر سالین به مدت ۳۰ دقیقه در

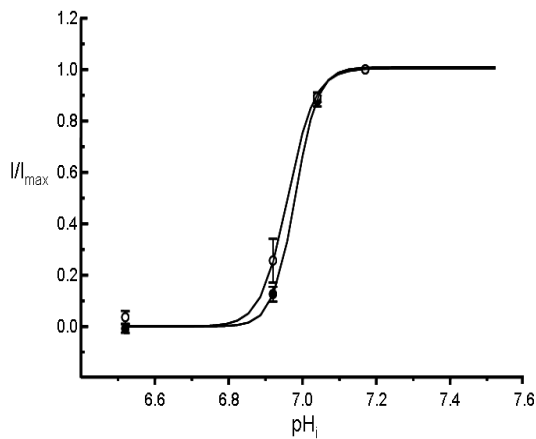


شکل ۱. اثر ۵ میلی مولار کلرید باریم بر روی کانال پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T-OMK2 نمودار سمت راست منحنی جریان-ولتاژ از همان اووسیت را نشان می‌دهد.

صفر میلی ولت اندازه‌گیری شد که با اضافه کردن کلرید باریم ۵ میلی مولار میزان جریان ۵۸ درصد کاهش نشان داد.

اووسیت‌های دارای نوع طبیعی کانال میزان جریانی برابر  $4/13 \pm 0/13$  میکرو آمپر ( $n=7$ ) در پتانسیل

فاقد و دارای قطبیت پروتئین همراه EGFP مشابه بود، کسر بزرگی از پروتئین کانال به صورت داخل سلولی بود (شکل ۳). اندازه‌گیری فلورسانس در اطراف سلول‌های MDCK فاقد قطبیت نشان داد که سطح مطلق فلورسانس بین سلول‌های دارای کانال طبیعی ROMK2 و موتاسیون یافته M338T تفاوتی نداشت ( $10/3 \pm 80/3$  در برابر  $16/9 \pm 86/5$  واحد فلورسنت،  $n=14$ ). این نتایج با داده‌های الکتروفیزیولوژیک به دست آمده از اووسیت نشان می‌دهد که در سلول‌های فاقد قطبیت هر دو فعالیت عملکردی و خصوصیت انتقال به غشاء ROMK2 نوع طبیعی و جهش یافته M338T یکسان بود.



شکل ۲. میزان جریان یونی  $K^+$  اندازه‌گیری شده به سمت درون نسبت به جریان ماکزیمم ( $I/I_{max}$ ) در برابر تغییر pH درون سلولی در اووسیت‌های که کانال ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T را نشان می‌دهد. حساسیت کانال پتاسیمی OMK2 طبیعی (دایره‌های تو خالی) و موتاسیون یافته M338T- ROMK2 (دایره‌های تو پر) نسبت به pH داخل سلولی را نشان می‌دهد. داده‌ها حاصل ۸ آزمایش برای هر گروه به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد.

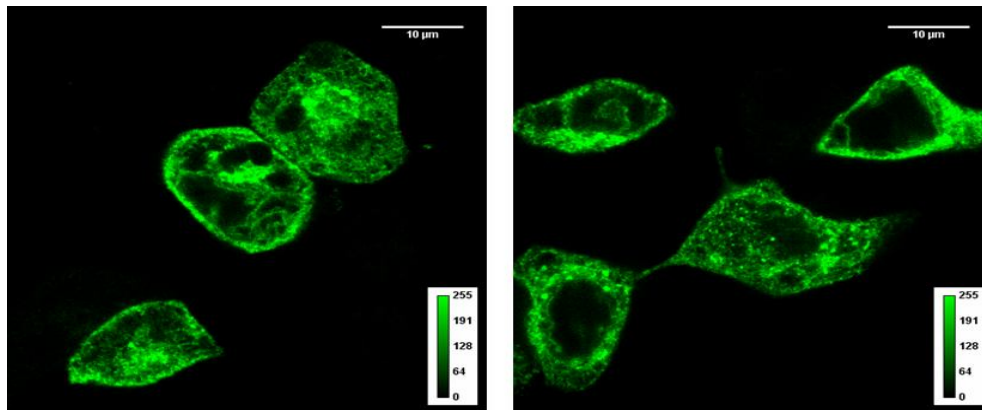
در اووسیت‌های دارای کانال پتاسیمی با موتاسیون M338T در ولتاژ صفر میلی ولت میزان جریان  $4/18 \pm 0/12$  میکرو آمپر ( $n=7$ ) اندازه‌گیری شد که تفاوت معنی‌داری بین جریان کانال پتاسیمی طبیعی و موتاسیون یافته M338T وجود نداشت.

پتانسیل غشاء برای اووسیت‌های بیان کننده کانال پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T تفاوت معنی‌داری نداشت ( $91/7 \pm 1/43$  میلی ولت در مقابل  $92/2 \pm 1/29$  میلی ولت).

کانال پتاسیمی ROMK2 نسبت به تغییر در pH سیتوپلاسمی حساس است و اسیدی شدن داخل سلولی احتمال باز بودن کانال را کاهش می‌دهد (۲۴). تأثیر موتاسیون M338T بر حساسیت کانال ROMK2 آزمایش گردید.

در اووسیت‌های زاینویوس لويس دارای کانال پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته با اضافه کردن غلظت‌های مختلف بوتیرات pH داخل سلولی کاهش یافت و میزان جریان از کانال اندازه‌گیری گردید (۲۴). شکل ۲ وابستگی به pH داخل سلولی را نشان می‌دهد که در نوع طبیعی ROMK2 نتایج با گزارش‌های قبلی توسط گروه‌های دیگر مشابه بود و موتاسیون M338T هیچ تأثیری بر عملکرد کانال از نظر وابستگی به pH داخل سلولی نداشت (شکل ۲) ( $6/96 \pm 12$  درصد در مقابل  $6/98 \pm 0/4$  درصد) ( $pK_a = 7.2$ , ۲۵, ۲۶).

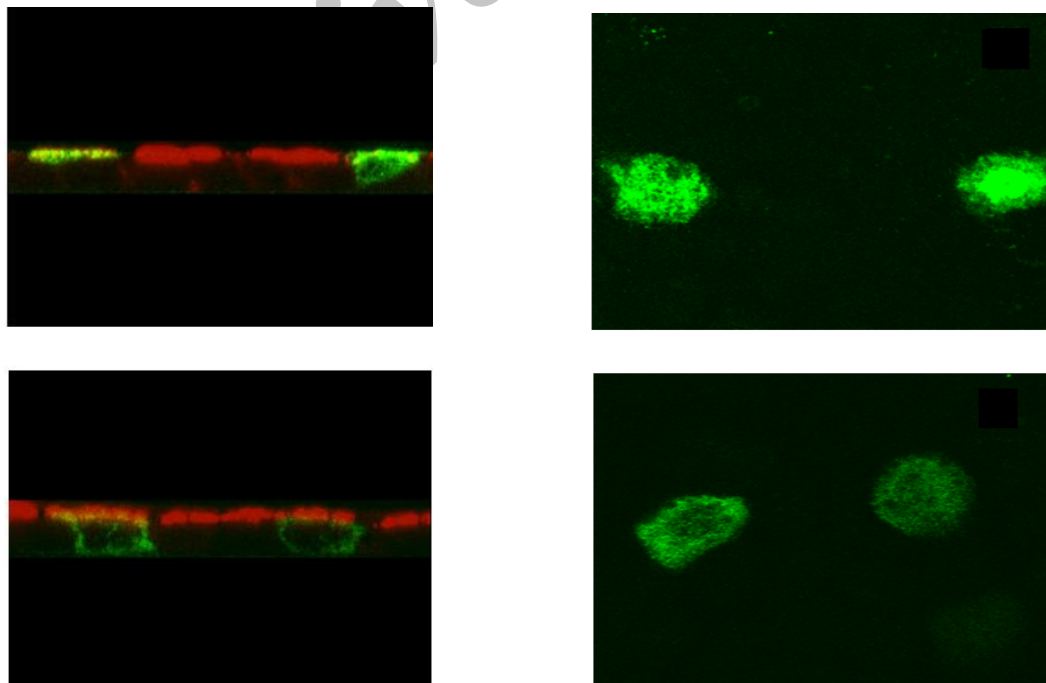
از آنجا که برای برخی از پروتئین‌های غشاء، تفاوت‌های ذاتی در مکانیسم‌های انتقالی به غشاء پس از بیان در سلول‌های دارای قطبیت و فاقد قطبیت وجود دارد (۳۲). با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس کونفوکال، توزیع داخل سلولی از پروتئین‌های فلورسنت قبل و بعد از ایجاد قطبیت بررسی شد. در سلول‌های MDCK، بیان در هر دو حالت



شکل ۳ بیان پروتئین متصل به EGFP در سلول‌های فاقد قطبیت MDCK را نشان می‌دهد. تصاویر میکروسکوپ کونفوکال مربوط به سلول‌های فاقد قطبیت MDCK که EGFP-ROMK2 (شکل سمت راست) و موتاسیون EGFP-M338T (شکل سمت چپ) را بیان شده است. تصاویر نشان می‌دهد که قرار گرفتن کانال در غشاء سلول‌های فاقد قطبیت توسط موتاسیون M338T تحت تاثیر قرار نگرفت. شدت فلورسانس در اطراف هر سلول با نرم افزار NIH image اندازه گیری شد. نوار ضمیمه شدت کالیبراسیون را نشان می‌دهد. نوار مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

کانال طبیعی ROMK - EGFP در قطب رأسی سلول MDCK توزیع گردید. بر خلاف پروتئین طبیعی، موتاسیون M338T در غشا‌های قاعده‌ای و جانبی سلول مشاهده شد (شکل ۴).

برای تعیین این که آیا قطبیت سلول‌ها بر روی انتقال پروتئین‌ها و برداشت آنها از غشاء تاثیر دارد، پروتئین کانال ROMK2 همراه با EGFP در سلول‌های تک لایه‌ای دارای قطبیت MDCK بیان گردید. شکل ۴ نشان می‌دهد



شکل ۴. بیان پروتئین متصل به EGFP در سلول‌های دارای قطبیت MDCK را نشان می‌دهد. تصاویر مربوط به سلول‌های تک لایه‌ای دارای قطبیت MDCK می‌باشد که EGFP-ROMK2 (ردیف بالا) و موتاسیون EGFP-M338T (ردیف پایین) در آنها بیان شده است. در سلول‌های دارای قطبیت MDCK توزیع کانالها تغییر یافت. موتاسیون EGFP-M338T در غشاء قاعده‌ای جانبی دیده شد و سطح بیان کانال ROMK2 موتاسیون یافته M338T در غشاء رأسی کاهش یافت.

"RKR Triad" نامیده می‌شود (۲۶، ۲۷). اگر چه اخیراً مشخص گردیده است که حساسیت کانال ROMK نسبت به pH به تداخلات داخلی دیگری وابسته است و وضعیت فسفوریلاسیون اسید آمینه سرین پروتئین کیناز (S200 A and S294) در درون انتهای کربوکسیل حساسیت نسبت به pH را تغییر می‌دهد (۲۴، ۲۸). اگر چه یافته‌های ما نشان داد که ترئونین قابل فسفوریله شدن وضعیت ۳۳۸، اثری بر روی حساسیت کانال نسبت به pH نداشت. فقدان اثر موتاسیون M338T بر روی خصوصیات کانال و حساسیت به pH با این ایده که موتاسیون دارای پلی‌مورفیسم آللی است مغایرتی ندارد (۲۵).

هدف‌گیری اشتباه پروتئین‌های غشاء با دیگر اختلالات توارثی توبولی کلیه از جمله اسیدوز مربوط به توبول دور و دیابت بی‌مزه نفروزونیک مرتبط است (۲۹، ۱۹). بنابراین احتمال تأثیر موتاسیون M338T بر تغییر الگوهای بیان ROMK2 در سلول‌های اپیتلیال مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌های متصل به EGFP در سلول‌های فاقد قطبیت پستانداران مانند سلول‌های MDCK بیان می‌شود، که سطوح مشابهی از پروتئین نوع طبیعی و نوع موتاسیون یافته وجود دارد (۲۲، ۳۰، ۳۱). فلورسانس سطح غشاء EGFP-ROMK به طور مستقیم با کانال‌های بیان شده موجود رابطه مستقیم دارد، به علاوه داده‌های مربوط به عملکرد این کانال‌ها در اووسیت‌ها نشان می‌دهد که قرار گرفتن در غشاء سلول‌های فاقد قطبیت توسط موتاسیون M338T تحت تأثیر قرار نگرفت (۳۲). آزمایشات وسترن بلات سطوح مشابهی از پروتئین نوع طبیعی و موتاسیون یافته را در غشاء سلول‌های Sf9 نشان داد (۲۵). هنگامی که موتاسیون M338T در سلول‌های دارای قطبیت MDCK بیان گردید، توزیع قطبی کانال‌ها تغییر یافت. در غشاء قاعده‌ای - جانبی وجود فلورسانس مشهود بود و سطح بیان کانال ROMK2 موتاسیون یافته M338T در غشاء رأسی کاهش یافت. از این مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت که انتقال کانال‌ها به غشاء رأسی کاهش یافته است یا این که برداشت کانال توسط آندوسیتوز افزایش یافته است. تنظیم

برای تعیین این که آیا بیان M338T در غشاء رأسی کمتر از ROMK2 نوع طبیعی بود، شدت فلورسانس در غشاء رأسی اندازه‌گیری و مقایسه گردید. میزان EGFP پروتئین فلورسنت در داخل غشاء رأسی سلول نوع طبیعی به مقدار قابل توجهی از نوع موتاسیون یافته EGFP - M338T بیشتر بود ( $57/3 \pm 10/1$  در مقابل  $113 \pm 5/37$  واحد فلورسانس  $n=12$  و  $P < 0/10$  به ترتیب برای موتاسیون M338T و نوع طبیعی). بنابراین، جایگزینی ترئونین با متیونین در جایگاه ۳۳۸ منجر به بیان پروتئین در ناحیه‌های قاعده‌ای جانبی از سلول و سطوح پایین‌تر از بیان در غشاء رأسی گردید.

## بحث

در این مطالعه هنگامی که کانال پتاسیمی ROMK2 طبیعی و موتاسیون یافته M338T در اووسیت‌های زینوپوس لویس بیان گردید، سطح یکسانی از جریان ماکروسکوپی و درجه مشابهی از تصحیح و حساسیت به باریم مسدود کننده کانال پتاسیمی را نشان داد. میزان جریان کانال پتاسیمی طبیعی و موتاسیون یافته در پتانسیل‌های معکوس یکسان بود که نشان می‌دهد که موتاسیون M338T بر روی حساسیت کانال تأثیری ندارد. با توجه به این که موتاسیون M357T کانال ROMK1 که معادل موتاسیون M338T کانال پتاسیمی ROMK2 است، این یافته با مشاهدات گزارش شده قبلی کانال ROMK1 و عدم تأثیر موتاسیون M357T بر هدایت یک کانال یونی، احتمال باز بودن و یا نفوذ پذیری انتخابی، زمانی که در سلول‌های اسپودوپترا فروژپیردا (*Spodoptera* Frugiperda Sf9) بیان می‌شد مطابقت داشت.

کانال ROMK نسبت به تغییرات pH داخل سلولی در محدوده فیزیولوژیک بسیار حساس می‌باشد. این وابستگی به pH به حضور اسید آمینه لیزین باردار (K80) در انتهای آمینی مربوط می‌باشد که با دو اسید آمینه آرژنین سیتوپلاسمی تداخل فیزیکی دارد یکی در انتهای آمینی (R41) و دیگری در انتهای کربوکسیل (R311) که

دارند. که یکی الگوی NPXY/F (اسیدهای آمینه ۳۵۹ - ۳۵۴) که آندوسیتوز وابسته به کلاترین کانال ROMK2 را تعیین می‌کند (۳۱، ۳۲) و سرانجام سه اسید آمینه انتهای کربوکسیل ROMK (TQM-COOH) که الگوی اتصال PDZ نوع ۱ را تشکیل می‌دهد که به پروتئین شبه داربستی، فاکتور تنظیم کننده مبادله گر سدیم و هیدروژن (NHERF) متصل می‌گردد و تداخل با پروتئین تنظیم گر هدایت کننده فیروز کیستیک را تسهیل و بیان موثر ماکرومولکول‌های پیچیده را امکان پذیر می‌سازد (۳۵).

با توجه به این که مسیرهای انتقال بیوستتزی در سلول‌های فاقد قطبیت و دارای قطبیت به صورتی متفاوت می‌باشد. در سلول‌های فاقد قطبیت پروتئین‌های مربوط به غشاء رأسی می‌توانند با وجود نداشتن مکانیسم‌های احتباس کننده در غشاء رأسی به طور موثری در غشاء قرار گیرند که این مطلب در این مطالعه نیز مشاهده گردید (۳۶، ۳۷). متیونین ۳۳۸ کانال ROMK2 و اسیدهای آمینه مشابه آن در ROMK1 و ROMK3 در همه کانال‌های هومولوگ ROMK پستانداران حفظ گردیده است. که اهمیت عملکرد این اسید آمینه را نشان می‌دهد. با این تحقیق مشخص می‌گردد که متیونین موقعیت ۳۳۸ در ناحیه‌ای از پروتئین کانال ROMK2 قرار گرفته که در بیان طبیعی و قطبیت یافتن کانال در غشاء رأسی دارای اهمیت است. بیشتر موتاسیون‌های بارتر که بر کانال‌های ROMK تأثیر می‌گذارد در سلول‌های فاقد قطبیت مطالعه شده است. از ۲۰ موتاسیون کانال ROMK در ۱۴ موتاسیون در سلول‌های اووسیت و سلول‌های کلیه جنینی انسان نشان داده شده است که کانال پتاسیمی موتاسیون یافته به غشاء پلاسمای نمی‌رسد (۱۱). بنابراین مکانیسم‌های پیچیده‌ای در از دست دادن عملکرد کانال دخالت دارد.

### نتیجه گیری

نتیجه این تحقیق نشان می‌دهد که بر خلاف موتاسیون‌های که به طور کامل فعالیت کانال را از بین می‌برد، موتاسیون M338T عملکرد کانال در بازوی ضخیم

انتقال به غشاء و برداشتن کانال از غشاء برای فعالیت کانال بسیار مهم است. هر دو این روندها به تداخلات بین اسیدهای آمینه درون انتهای کربوکسیل با دیگر نواحی کانال و با دیگر پروتئین‌های مرتبط وابستگی دارد (۳۳). بنابراین با توجه به نتایج مربوط به نقص در توزیع کانال‌های با موتاسیون M338T هنگامی که در سلول‌های دارای قطبیت بیان می‌شود، این احتمال وجود دارد که این قسمت بر روی توزیع و قرار گرفتن در غشاء سلولی تأثیر داشته باشد. جایگزین نمودن متیونین با ترئونین سبب جایگزینی زنجیره آب گریز با یک زنجیره جانبی قطبی می‌گردد. بر اساس مدل سازی که بر اساس ساختمان کانال پتاسیمی ROMK1 انجام گرفت پیش بینی می‌شود که یک تداخل اضافه بین اسید آمینه متیونین ۳۳۸ و ایزولوسین موقعیت ۲۵۳ وجود داشته باشد. این تداخل اضافه سبب تغییرات بزرگی در خمیده شدن پروتئین و تغییر در ساختمان سه بعدی پروتئین کانال پتاسیمی نمی‌شود از این رو فعالیت عملکردی کانال با موتاسیون M338T تغییری پیدا نمی‌کند. نوع طبیعی و نوع موتاسیون یافته M338T کانال پتاسیمی ROMK2 در اووسیت یا سلول‌های فاقد قطبیت MDCK به صورت سطوح یکسانی بیان می‌شوند. بنابر این به نظر می‌رسد موتاسیون‌های که خمیده شدن و تا خوردن پروتئین در نواحی اطرف موتاسیون را محدود می‌کنند بر روی تداخلات مکانیسم‌های پردازش گز اجزاء داخل سلولی تأثیر دارند. چنین تداخلاتی در سلول‌های دارای قطبیت ثابت گردیده است و برای دیگر پروتئین‌های غشایی توپول‌های کلیه پردازش وابسته به قطبیت نیز گزارش شده است (۲۷). قسمت انتهایی تا جایگاه متیونین ۳۳۸ کانال ROMK2 دارای قسمت RXR به عنوان الگوی نگهداری کننده به شبکه اندوپلاسمیک شناخته شده است، که از طریق تداخلات وابسته به فسفوریلاسیون با انتهای آمینی این نوع کانال را کنترل می‌کند و اجازه ورود کانال ROMK در مسیر ترشحی را می‌دهد (۳۴-۳۲). انتهای کربوکسیل کانال‌های ROMK دارای دو الگوی شناخته شده هستند، که در برداشته شدن و احتباس در غشاء پلاسمایی اهمیت



6. Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1997; 273(5): F739-F748.
7. Lee W, Hebert SC. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. I. Expression in rat distal nephron segments. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1995; 268(6):F1124-F1131.
8. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, et al. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nature genetics*. 1996;14(2):152-6.
9. Starremans PG, van der Kemp AW, Knoers NV, van den Heuvel LP, Bindels RJ. Functional implications of mutations in the human renal outer medullary potassium channel (ROMK2) identified in Bartter syndrome. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2002; 443(3): 466-72.
10. Károlyi L, Konrad M, Köckerling A, Ziegler A, Zimmermann DK, Roth B, et al. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics*. 1997; 6(1):17-26.
11. Peters M, Ermert S, Jeck N, Derst C, Pechmann U, Weber S, et al. Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney international*. 2003; 64(3): 923-32.
12. Flagg TP, Tate M, Merot J, Welling PA. A mutation linked with Bartter's syndrome locks Kir 1.1 a (ROMK1) channels in a closed state. *The Journal of general physiology*. 1999; 114(5): 685-700.
13. Lopes C, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron*. 2002; 34(6):933-44.
14. Cho JT, Guay-Woodford LM. Heterozygous mutations of the gene for Kir 1.1 (ROMK) in antenatal Bartter syndrome presenting with transient hyperkalemia, evolving to a benign

بالا رونده لوله هنله را کاهش می‌دهد. ولی با توجه به چگونگی بیان این کانال که در این تحقیق مشخص گردید، عملکرد کانال به طور کامل از بین نمی‌رود. با توجه به این که موتاسیون جایگاه M338T بر روی تداخلات قسمت کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMK2 تأثیر می‌گذارد احتمالاً با هدف گذاری اشتباهی در *in vivo* نیروی پیش برنده مربوط به ترشح پتاسیم و باز جذب سدیم و کلر در این قسمت نفرون را کاهش می‌دهد. مطالعات آینده بر روی موتاسیون‌های موثر بر روی پردازش سلولی کانال‌های ROMK2 در سلول‌های دارای قطبیت پیشنهاد می‌شود، که می‌تواند مکانیسم‌های که سبب از دست رفتن عملکرد کانال ROMK2 در سندرم بارتر می‌شود را روشن نماید که می‌تواند به درمان این بیماری نیز کمک کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله با استفاده از حمایت های مالی مرکز تحقیقات کلیه انگلستان در دانشگاه شفیلد انجام شده است که از تمام حامیان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

### منابع

1. Bartter FC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: A new syndrome. *The American Journal of Medicine*. 1962;33(6):811-28.
2. Hebert SC. Bartter syndrome. Current opinion in nephrology and hypertension. 2003; 12(5): 527-32.
3. Karet FE. Monogenic tubular salt and acid transporter disorders. *Journal of nephrology*. 2002; 15:S57-S68.
4. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 1993; 362(6415): 31-8.
5. Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS, Slightom JL, et al. Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(39):24261-70.

- course. *Journal of Korean Medical Science*. 2003; 18(1): 65-8.
15. Muth TR, Dunbar LA, Cortois-Coutry N, Roush DL, Caplan MJ. Sorting and trafficking of ion transport proteins in polarized epithelial cells. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1997; 6(5):455-9.
  16. Campo C, Mason A, Maouyo D, Olsen O, Yoo D, Welling P. Molecular mechanisms of membrane polarity in renal epithelial cells. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2005; 153: 47-99.
  17. Hajjhashemi S. The S362A mutation block ROMK2 (Kir1. 1b) endocytosis in *Xenopus laevis* oocyte membrane. *Physiology and Pharmacology*. 2009;13(1):48-56.
  18. Hajjhashemi S. The Effect of Phosphorylation and Dephosphorylation of the Serine Residue (S362) on ROMK2 (Kir1. 1b) Endocytosis. *Arak Medical University Journal*. 2009; 12(1): 19-28.
  19. Devonald MAJ, Karet FE. Renal epithelial traffic jams and one-way streets. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; 15(6): 1370-81.
  20. Kamsteeg EJ, Bichet DG, Konings I, Nivet H, Lonergan M, Arthus MF, et al. Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus. *The Journal of cell biology*. 2003; 163(5): 1099-1109.
  21. Schwalbe RA, Bianchi L, Accili EA, Brown AM. Functional consequences of ROMK mutants linked to antenatal Bartter's syndrome and implications for treatment. *Human Molecular Genetics*. 1998;7(6):975-80.
  22. Fakler B, Schultz J, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner H, et al. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *The EMBO Journal*. 1996; 15(16):4093-9.
  23. Leipziger J, MacGregor GG, Cooper GJ, Xu J, Hebert SC, Giebisch G. PKA site mutations of ROMK2 channels shift the pH dependence to more alkaline values. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000; 279(5): F919-F926.
  24. Choe H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H. A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1997; 273(4): F516-F529.
  25. Toye AM, Banting G, Tanner MJA. Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *Journal of cell science*. 2004; 117(8): 1399-1410.
  26. Ortega B, Millar I, Beesley A, Robson L, White S. Stable, polarised, functional expression of Kir1. 1b channel protein in Madin-Darby canine kidney cell line. *The Journal of Physiology*. 2000; 528(1):5-13.
  27. Collares-Buzato C, Jepson M, McEwan GTA, Hirst BH, Simmons N. Co-culture of two MDCK strains with distinct junctional protein expression: a model for intercellular junction rearrangement and cell sorting. *Cell and tissue research*. 1998; 291(2):267-76.
  28. McNicholas CM, MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G. pH-dependent modulation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1998; 275(6):F972-F981.
  29. Leng Q, MacGregor GG, Dong K, Giebisch G, Hebert SC. Subunit-subunit interactions are critical for proton sensitivity of ROMK: Evidence in support of an intermolecular gating mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(6):1982-7.
  30. Devonald MAJ, Smith AN, Poon JP, Ihrke G, Karet FE. Non-polarized targeting of AE1 causes autosomal dominant distal renal tubular acidosis. *Nature genetics*. 2003;33(2):125-7.
  31. Zeng WZ, Babich V, Ortega B, Quigley R, White SJ, Welling PA, et al. Evidence for endocytosis of ROMK potassium channel via clathrin-coated vesicles. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002; 283(4): F630-F639.
  32. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell A, Dong K, et al. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K<sup>+</sup> secretion. *Nature genetics*. 2003; 35(4): 372-6.
  33. O'Connell AD, Leng Q, Dong K, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC.

- Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K<sup>+</sup> channel (ROMK). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102(28):9954-9.
34. Wang WH. Regulation of ROMK (Kir1. 1) channels: new mechanisms and aspects. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2006;290(1):F14-F19.
35. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2003;4(3):181-91.
36. Yoo D, Fang L, Mason A, Kim BY, Welling PA. A phosphorylation-dependent export structure in ROMK (Kir 1.1) channel overrides an endoplasmic reticulum localization signal. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(42): 35281-9.
37. Yoshimori T, Keller P, Roth MG, Simons K. Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells. The Journal of cell biology. 1996;133(2):247-256

Archive of SID