Physiology and Pharmacology, 13 (1), 48 - 56
Spring 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The S362A mutation block ROMK2 (Kir1.1b) endocytosis in *Xenopus laevis* oocyte membrane

Saeed Hajihashemi *

Dep. Physiology, School of Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 17 Jul 2008 **Revised: 13 Jan 2009** **Accepted: 22 Jan 2009**

Archive of SID

Abstract

Introduction: ROMK channel is localized on the apical membrane of nephrons. Recent studies suggest that endocytosis of ROMK channels is important for regulation of K^+ secretion in cortical collecting ducts. In this study, the effect of S362A mutation is examined on the membrane turnover and stability of ROMK2 channel when expressed in *Xenopus laevis* oocytes.

Methods: oocytes were isolated by standard protocols using collagenase (Type 1A). Mutations of the cytoplasmic termini of ROMK2 were performed using the quik-change approach for site-directed mutagenesis.

Xenopus oocytes were injected with cRNA encoding ROMK2 or S362A mutant 3 days prior to treatment with Brefeldin A added to the OR3 medium (+BFA) at the concentration of 25 µM or ethanol as BFA vehicle (-BFA). BFA inhibits the insertion of new proteins into the cell membrane. Two-electrode voltage clamp (TEVC) was used to measure oocyte ROMK-dependent currents and membrane potential. Data was analyzed using Student's t-tests or ANOVA as appropriate.

Results: Incubation of oocytes expressing ROMK2 channels in 25 µM BFA caused a reduction in the currents and membrane voltage. In oocytes expressing the S362A mutant, there was no decay in current and membrane voltage after 48 hours incubation with BFA at 25 µM. The fractional current for ROMK2 at 48h following treatment of oocytes with BFA was 0.24 ± 0.05 (n=24), which was significantly different from S362A mutant (0.96 ± 0.05, n=24).

Conclusion: These results show that the S362A mutation increases the general stability of ROMK and renders the protein resistance to endocytosis. This is consistent with the idea that there is an interaction between the C-terminal of ROMK2 and components of the endocytotic pathway. A functional PDZ domain (the S-E-V) plays a key role in determining the stability of ROMK.

Keywords: ROMK2, S362A mutant, BFA, PDZ domain.

* Corresponding author e- mail: hajihashemi@hotmail.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۱)، ۴۸ – ۵۶
بهار ۱۳۸۸

متوقف شدن روند آندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK2 ($K_{ir}1.1b$) در اثر موتاسیون S362A درغشاء اووسیت‌های *Xenopus laevis*

سعید حاجی هاشمی*
گروه فیزیولوژی ،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

دریافت: ۲۶ تیر ۸۷ بازبینی: ۲۳ دی ۸۷ پذیرش: ۲ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: کانال‌های پتاسیمی ROMK در غشاء راسی سلول‌های کلیه قرار گرفته‌اند. ایزو فورم‌های مختلفی از کانال پتاسیمی ROMK در قسمت‌های انتهای نفرون و در مجاری جمع کننده شناسایی شده‌اند که وظیفه ترشح یون K^+ را بر عهده دارند. تحقیقات نشان داده‌اند که آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK برای ترشح K^+ در مجاری جمع کننده نقش مهمی دارا می‌باشد. در این مطالعه اثرات موتاسیون S362A (جایگزین کردن اسید آمینه سرین در جایگاه شماره ۳۶۲ با اسید آمینه آلانین) بر روی اندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK2 پس از بیان درغشاء اووسیت بررسی گردیده است.

روش‌ها: در این پژوهش تجربی اووسیت‌های *Xenopus laevis* با استفاده از کلاژناز به روش استاندارد جدا گردیدند و جهت ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK2 با استفاده از روش ایجاد تغییر سریع ایجاد موتاسیون زای مستقیم گردید. cRNA ای کهROMK2 و موتاسیون S362A را کد می‌کرد به اووسیت‌ها تزریق شد. پس از گذشت سه روز (زمان صفر) به محیط کشت برفلدین A (BFA+) مهار کننده انتقال پروتئین‌های ساخته شده به غشاء به مقدار ۲۵ میکرومولار یا اتانول به عنوان حلال BFA (BFA –) اضافه گردید. با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکترود جریان‌های یونی مربوط به کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و موتاسیون S362A اندازه گیری گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که مقدار جریان یونی پتاسیم از کانال‌های پتاسیمی ROMK2 با موتاسیون S362A بر خلاف کانال‌های پتاسیمی بدون موتاسیون ROMK2 پس از انکوبه شدن در محلول ۲۵ میکرو مولار BFA کاهش معنی‌داری پیدا نکرد. برای ROMK2 پس از اینکه اووسیت‌ها ۴۸ ساعت تحت تاثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با 0.24 ± 0.05 (n=16) بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج افزایش پایداری وثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 درغشاء بعد از ایجاد موتاسیون S362A را نشان می‌دهد. قسمت داخلی ناحیه PDZ به ترتیب با اسیدهای سرین – گلوتامیک اسید– والین (S-E-V) در تعیین پایداری و آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK2 در غشاء سلول دخالت دارد.

واژه‌های کلیدی: ROMK2، موتاسیون S362A، BFA، ناحیه PDZ

مقدمه

ترکیب شیمیایی مایعات بدن با دفع مواد زائد متابولیک توسط اندام‌های دفعی و نگهداری مقادیر متناسبی از آب، نمک و مواد غذای تنظیم می‌شود. کلیه‌ها اندام های مسئول نگهداری حجم و ترکیب یونی مایعات بدن هستند. نفرون‌ها واحدهای ساختمانی و عملی در کلیه‌ها هستند. عملکرد اپیتلیوم نفرون‌ها به نحوه قرار گرفتن پروتئین‌ها و لیپیدهای آن درغشاء راسی و قاعده‌ای– جانبی بستگی دارد. این پروتئین‌ها در غشاء راسی و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: hajihashemi@hotmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Archive of SID

شکل۱- اسیدهای آمینه انتهاهای کربوکسیل انسان، موش صحرایی و موش مورد قبول واقع شده برای درون بری بواسطه کلاترین (پر رنگ شده) را نشان می‌دهد. کازئین کیناز II (با خط زیر آن مشخص شده و در توالی انسانی حضور ندارد) و اتصال PDZ (به صورت ایتالیک) نشان داده شده است. لغات پر رنگ شده نشانگر توالی محل اتصال PDZ است که با توالی کازئین کیناز II همپوشانی دارد. S مشخص شده با ستاره به سرین موقعیت S362 را نشان می‌دهد.

قاعده‌ای- جانبی سلول‌ها به صورتی نامتقارن توزیع می‌شوند که با وجود آندوسیتوز مداوم به کمک تداخل با اسکلت سلولی این حالت نامتقارن حفظ می‌گردد [۱۳،۴]. کانال پتاسیمی ROMK به شکل سه ایزو فورم مختلف در بخش‌های مختلف انتهای نفرون‌ها و همچنین در مجاری جمع کننده شناسایی شده‌اند و ترشح یون K^+ در این قسمت‌ها را به عهده دارند. محل قرارگرفتن کانال‌های پتاسیمی ROMK در غشاء راسی سلول‌های کلیه مشخص گردیده است [۲۱]. مطالعات اخیر نشان داده‌است که آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK برروی تنظیم ترشح یون K^+ در مجاری جمع کننده تاثیر دارد [۱۲،۱۹،۲۳].

تعادل دینامیکی بین روندهای اگزوسیتوزی جایگزین کننده پروتئین‌های ساخته شده و آندوسیتوزآن‌ها، تعداد کانال‌های پتاسیمی ROMK در غشاء پلاسمایی را تعیین می‌کند. اخیرا Wang و همکارانش نشان دادند که در کلیه‌های موش صحرایی تعداد کانال‌های پتاسیمی غشاءراسی با مقدار رژیم دریافت پتاسیم در این حیوانات دارای رابطه ای معکوس می‌باشد [۱۸]. تعداد کانال های پتاسیمی درثبت‌های پچ کلامپ[1] از سلول‌های مجاری جمع کننده (CCDs) موش صحرایی، همچنین کانال‌هایROMK1 بیان شده درغشاء اووسیت‌ها توسط مهار گران تیروزین کیناز افزایش می‌یافت ولی توسط مهار گران تیروزین فسفاتاز کاهش می‌یافت. استفاده از مهار کننده‌های آندوسیتوز اثرات تیروزین کیناز و فسفاتاز بر روی تعداد و فعالیت این کانال‌های پتاسیمی را ممانعت می‌کرد [۱۹،۳،۱۰،۱۲].

ترشح پتاسیم در مجاری جمع کننده به رژیم غذای دریافت پتاسیم وابسته است و توسط مکانیسم آندوسیتوز کانال‌های ROMK تنظیم شود. تغییر دررژیم دریافت پتاسیم فعالیت cSrc تیروزین کیناز و تیروزین فسفاتاز مربوطه را تغییر می‌دهد که به نوبه خود بر میزان آندوسیتوز و یا اگزوسیتوز کانال‌های پتاسیمی تاثیر می‌گذارد. آندوسیتوز به دو صورت وابسته و غیروابسته به کلاترین پروتئین‌ها را از غشاء پلاسمای بر می‌دارد [۷]. با وجود مطالعات گسترده الکتروفیزیولوژی انجام شده بر روی کانال پتاسیمی ROMK هنوز اطلاعات کمی در باره مکانیسم‌های انتقال دهنده به غشاهای خارج و داخل سلولی (trafficking) و مبادله شدن غشائی آن وجود دارد. شواهد غیرقابل انکاری توسط Zeng و همکارانش گزارش شده‌است که آندوسیتوزکانال پتاسیمی ROMK ازطریق وزیکول‌های پوشیده با کلاترین[2] (CCVs) را نشان می‌دهد و همچنین نقش اسیدهای آمینه ناحیه انتهای کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی($K_{ir}1.1$) ROMK را در این روند مشخص می‌کند [۲۳]. پروتئین‌های ناحیه PDZقابلیت اتصال به توالی‌های انتهای کربوکسیل را دارد که با پروتئین‌های هدف تداخل می‌نمایند. در انسان وجوندگان توالی اسیدهای آمینه انتهای‌های کربوکسیل کانال‌های پتاسیمیROMKs به مقدار زیادی در طول تکامل حفظ شده است و دارای چندین الگو (motifs) هستند که محل قرارگیری این کانال‌ها در داخل غشاها را تعیین می‌کند (شکل۱). از جمله یک الگوی (YDNPNF) که با الگوی درون بری[3] (Y/F)(D/E)MP)بسیاری از پروتئین‌های غشایی که از طریق CCVs به داخل برده می‌شوند به صورت هومولوگ است [۱۱].

موتاسیون S362A (جایگزین کردن اسید آمینه سرین در جایگاه شماره ۳۶۲ با اسید امینه آلانین) یک موتاسیون در قسمت داخلی ناحیه PDZ است. در حالت طبیعی اسید امینه سرین دارای اثرات فسفوریلاسیون کننده می‌باشد ولی موتاسیون ایجاد شده S362A دارای اثرات دفسفوریلاسیون کننده می‌باشد. اثرات دفسفوریلاسیون کننده موتاسیون S362A بر روی پایداری کانال پتاسیمی ROMK2 هنگام بیان شدن در غشاهای سلولی اووسیت‌ها هنوز مشخص نشده است. در این تحقیق آزمایشاتی انجام گرفت تا نقش

1. Patch Clamp

2. Clathrin-Coated Vesicles (CCV's)
3. Internalization motif

Archive of SID

موتاسیون S362A و اسید آمینه سرین جایگاه ۳۶۲ را در کنترل فعالیت عملی ROMK2 در غشا پلاسمایی مشخص نماید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. حیوانات ماده و بالغ *Xenopus laevis* از شرکت Blades Biologicals خریداری گردیدند. حیوانات درون تانک های پلاستیکی محتوی آب با درجه حرارت 23ºC -19 در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و۱۲ ساعت روشنایی نگهداری می‌شدند. به طور خلاصه حیوانات در محلول بیهوش کننده ترایکن[1] ۲٪ با pH برابر 7.80 قرار گرفتند. پس از بیهوشی حیوانات با جدا کردن سر و تخریب طناب نخاعی کشته شدند. به روش پروتکل استانداردی که توسط Cooper و همکارانش توصیف شده است اووسیت‌ها تحت شرایط آسپتیک جدا و نگهداری شدند [۸]. همه محلول‌ها مورد استفاده با عبوراز فیلترهای با قطر منافذ 0.2 µm استریل شدند. بصورت خلاصه لوب های تخمدان جدا شده و به تکه‌های به اندازه تقریبی 1 cm ×1 cm × 0.5 cm بریده شدند و سپس به داخل لوله های کشت ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و بر روی یک شیکر افقی (Rotatest R100, Luckham) به مدت یک ساعت در محلولی فاقد کلسیم (0- Ca^{2+} ND96) قرار دادیم و هر ده دقیقه محلول آن را با محلول تازه تعویض کردیم. اووسیت‌ها دوبار در محلول فاقد کلسیم[2] محتوی 2 mg/ml کلاژناز (Type 1A) به مدت ۲۰ دقیقه قرار دادیم. اووسیت‌های سالم در مراحل V و VI با توجه به قطر و شکل آن‌ها در زیر میکروسکپ شناسایی و جدا شدند و در محلول OR3 با درجه حرارت 18ºC درون ا نکوباتور سرد (LMS: Jencons Scientific Ltd) نگهداری شدند. پس از بدست آوردن منحنی دوز- پاسخ برای غلظت‌های مختلف، cRNA به مقدار 1 ng در حجم نهایی 50 nl تزریق گردید و به اووسیت‌های کنترل 50 nl آب تزریق گردید. با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکترود (TEVC) جریان یونی پتاسیم مربوط به کانال‌های پتاسیمی ROMK2 موش صحرایی اندازه‌گیری گردید. Gurdon و همکارانش قبلا نشان داده‌اند که بدنبال تزریق cRNA به صورت *in vitro*، اووسیت‌ها از روی الگو cRNA تا چند برابر سطح همان نوع از پروتئین با منشاء داخلی پروتئین سازی می‌کنند. بنابراین سیگنال بزرگی که با بیان پروتئین ایجاد می شود به طور مشخص نتیجه تزریق cRNA می‌باشد (۹).

بر اساس تکنیک TEVC غشاء اووسیت توسط دو الکترود، یک الکترود برای ثبت ولتاژ (الکترود ولتاژی) و دیگری برای تزریق جریان (الکترود جریان) سوراخ می‌شود. پتانسیل غشاء به دنبال دریافت ولتاژ توسط الکترود ولتاژی با ولتاژ مورد درخواست مقایسه می‌شود و اختلاف بین این دو مقدار با تزریق جریان به صفر می‌رسد. آزمایشات ولتاژ کلمپ با استفاده از آمپلی فایر (Axon Instruments, Foster Gene -Clamp 500B City, CA, USA) انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزار (pClamp, Axon Instruments, version 6) Clampex بر روی یک کامپیوتر IBM مجهز شده به یک مبدل آنالوگ به دیجیتال (Digidata 1200, Axon Instruments) ثبت گردیدند. اطاقک استاندارد اووسیت‌ها Warner Instruments (Inc.) RC-3Z متصل به یک پمپ خلاء که مکش محفظه اووسیت را تامین می کرد مورد استفاده قرار گرفت. میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول ND96 در هر دقیقه بر روی اووسیت‌ها سرریز می‌شد. الکترود رفرانس متصل به زمین (سیم Ag/AgCl) در داخل محلول پرفیوژن کننده درون اطاقک قرار گرفت. الکترودهای ولتاژی و جریان از لوله‌های مویینه شیشه‌ای بروسیلیکات با قطر خارجی 1.5mm و قطر داخلی 0.86 mm (GC150F-15 Harvard Apparatus) تهیه می‌گردید که با استفاده از میکرو الکترود پولر عمودی (Microelectrode puller PP-83: Narishige, Japan) کشیده می‌شدند. الکترودها با محلول کلرور پتاسیم ۳ مولار پر می‌شدند و تنها الکترودهای با مقاومت بین 0.5 – 2.5 MΩ برای ثبت های داخل سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

میکروالکترودها با زاویه ۴۵ درجه نسبت به سطح اووسیت به آرامی به درون اووسیت‌ها وارد می‌گردیدند. قبل از وارد کردن میکروالکترودها آن‌ها با الکترود رفرنس صفر می‌شدند.

1. Tricaine methansulfonate
2. 0 - Ca^{2+} ND96

Archive of SID

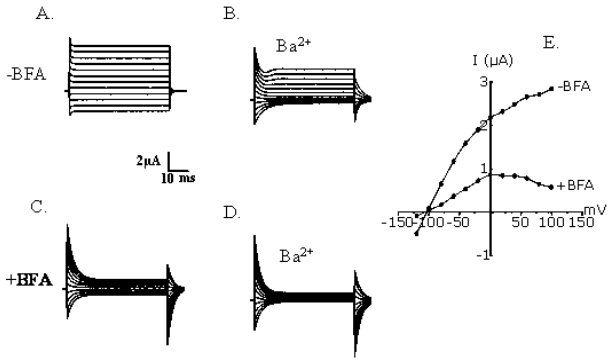
اندازه‌گیری‌ها هنگامی انجام می‌گرفت که هر دو الکترود ولتاژی و جریان، پتانسیل غشائی یکسانی را نشان می‌دادند. هنگامی که پتانسیل غشائی ثابت می‌گردید آمپلی فایر از حالت Setup mode به وضعیت Voltage Clamp mode تغییر داده می‌شد. در ابتدا پتانسیل در 50 mV- ثابت نگاه داشته می‌شد و سپس ولتاژ از120 mV- تا 100 mV+ به اندازه 20 mV در هر مرحله تغییر داده می‌شد و به مدت 50 ms در هر ولتاژ ثابت نگاه داشته می‌شد و بین هر مرحله ولتاژ به 50 mV- بر گردانده می‌شد. برای هرکدام از ثبت‌ها این پروتکل ۵ بار تکرار می‌گردید و سپس متوسط سیگنال‌ها محاسبه می‌شد. باریم به عنوان مسدودکننده کانال های پتاسیمی ROMK2 در مطالعات TEVC به کار برده می‌شد. بعد از ثبت نمودن رابطه ولتاژ –جریان (I-V) با محلول کنترل ND96، محلول ND96 حاوی 5 mM از $BaCl_2$ بر روی اووسیت‌ها جریان می یافت تا این که جریان یون پتاسیم از کانال‌های ROMK2 کاهش می‌یافت و به یک حالت پایدار می‌رسید در این حالت رابطه ولتاژ – جریان (I-V) ثبت می گردید. باریم به میزان ۵ میلی مولار به عنوان مهار کننده کانال های پتاسیمی ROMK2 در مطالعات TEVC به کار برده شد. بنابراین اگرپس از تزریق cRNA کانال پتاسیمی بیان می گردید. استفاده از این ماده بعنوان مهار کننده کانال باید میزان جریان یونی از این کانال‌ها را کاهش می‌داد. در غیر این صورت اگر جریان یونی ثبت شده مربوط به این نوع کانال نبود میزان جریان تغییری نداشت. پروتکل آزمایشات به این صورت بود که cRNAای که ROMK2 را کد می کرد سه روز قبل از قرار دادن درمحلول BFA (زمان صفر) به اووسیت‌ها تزریق می شد و درمحیط کشت مخصوص OR3 انکوبه می‌گردید. در زمان صفر محیط کشت تعویض می‌گردید و اووسیت‌ها به محیط کشت مخصوص OR3 حاوی محلول BFA (BFA+) به مقدار ۲۵ میکرومولار یا به محیط کشت OR3 با همان حجم از اتانول (به عنوان حلال BFA) منتقل می‌گردیدند. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده بودکه با دوز ۲۵ میکرومولارBFA میزان جریان یونی پتاسیم از کانال‌های پتاسیمی به علت کاهش تعداد کانال‌ها در تمامی زمان‌ها [h ۴۸ و۳،۶،۱۲،۲۴] پس از انکوبه شدن کاهش معنی‌داری پیدا می‌کرد [۱]. محلول استوک BFA به صورت 15 mM در اتانول به عنوان حلال تهیه گردید. BFA ماده‌ای است که انتقال پروتئین‌های ساخته شده از شبکه آندوپلاسمی (ER) به دستگاه گلژی را مسدود می‌نماید. بنابراین پروتئین‌های جدید ساخته شده به غشاء سلول اضافه نمی‌شود. کاهش درتعداد کانال‌های پتاسیمی نشان دهنده میزان آندوسیتوز آن‌ها می‌باشد زیرا این کانال به صورت مداوم با عمل آندوسیتوز از غشاء بر داشته می‌شوند. درطی دوره آزمایشات محیط کشت هر روز با محیط کشت تازه تعویض می‌گردید. در همه آزمایشات از پلاسمید pTLN-ROMK 2 (اهدایی توسط دکتر Gordon Copper) استفاده گردید. برای ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK2 موش صحرایی با استفاده از روش ایجاد تغییر سریع ایجاد موتاسیون زای مستقیم در جایگاه می‌گردید. موتاسیون S362A یک موتاسیون در قسمت داخلی ناحیه PDZ با این روش تولید گردید. در همه موارد پلاسمید با استفاده از MLU I به صورت خطی تبدیل می‌گردید وcRNA توسط آنزیم RNA SP6 پلیمراز تولید می‌گردید میزان کسر جریان با استفاده از میزان کاهش جریان توسط 5 mM از BaCl2 در مقایسه با مقدار جریان در زمان صفر با استفاده از رابطه زیر اندازه‌گیری گردید.

$$\text{کسر جریان} = I\text{-}I_{Ba}/I_0$$

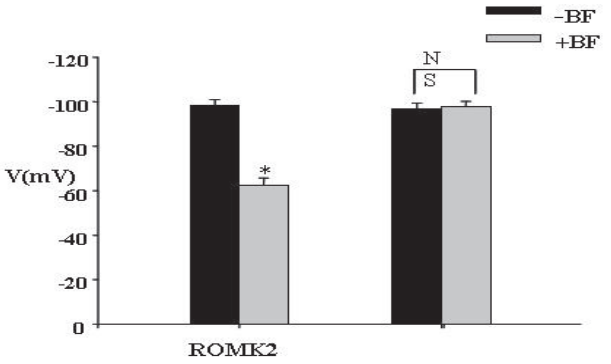
که بیانگر خوبی از کاهش مقدار جریان می‌باشد. در این رابطه I مقدار جریان پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول BFA و I_{Ba} کاهش مقدار جریان توسط باریم پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول BFA و I0 مقدار جریان ثبت شده در زمان صفر قبل از انکوبه شدن در محلول BFA می‌باشد.که این رابطه به خوبی نشان می‌دهد اگر پس از گذشت ۴۸ ساعت تعداد کانال‌های پتاسیمی در غشاء اووسیت کاهش یافته باشد مقدار کسر جریان کاهش می‌ابد. در صورت عدم کاهش جریان مقدار کسر جریان برابر با یک می‌شود.

نتایج به صورت میانگین همراه با SD ارائه شده‌است. برای مقایسه نتایج ANOVA یکطرفه (Tukey's test) و یا t-tests دانش آموزی به کار برده شد. سطح معنی‌دار بودن ۵٪ می‌باشد.

Archive of SID



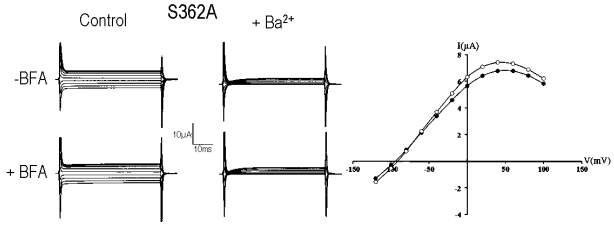
شکل۲- اثر BFA بر روی کانال پتاسیمی ROMK2 را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثبت شده A-D ازدو اووسیت Xenopus درحضور و عدم حضور 5mM از کلرور باریم در گروه کنترل (منحنی‌های B و A) و گروه بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور µM 25 از BFA (منحنی‌های D وC) را نشان می‌دهد. نمودار E منحنی جریان- ولتاژ (I/V) از همان اووسیت را نشان می‌دهد.



شکل۴- پتانسیل استراحت اندازه‌گیری شده در اووسیت‌های که ROMK2 و موتاسیون S362A را بیان کرده‌اند درحضور و غیاب BFA را پس از مدت ۴۸ ساعت نشان می‌دهد (n = 24) P < 0.001 = * این نتایج افزایش پایداری و ثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 غشاء با ایجاد موتاسیون S362A را نشان می‌دهد، که با این عقیده توافق دارد که S-E-V در تعیین پایداری کانال‌های پتاسیمی ROMK نقشی به عهده دارد.

یافته‌ها

نتایج این تحقیق نشان داد که انکوبه کردن اووسیت‌ها در محلول ۲۵ میکرو مولار BFA میزان جریان از طریق کانال‌های پتاسیمی ROMK2 کاهش می‌داد. با دوز ۲۵ میکرومولارBFA میزان جریان در زمان‌های [h ۴۸ و۲۴] پس از انکوبه شدن کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند (شکل۲). برای ROMK2 پس از اینکه اووسیت‌ها ۴۸ ساعت تحت تاثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با (n=16) 0.05 ± 0.24 بود (شکل ۵). شکل ۲ میزان جریان یونی پتاسیم مربوط به دو عدد اووسیت از این سری از آزمایشات را پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن درمحلول ۲۵ میکرومولار BFA را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثبت شده A-D ازدو اووسیت *Xenopus* در حضور و عدم حضور 5mM از کلرور باریم در گروه کنترل (منحنی‌های B و A) و گروه دارای موتاسون S362A بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور µM 25 از BFA (منحنی‌های D و C) را نشان می‌دهد. نمودار E منحنی جریان- ولتاژ (I/V) از همان اووسیت را نشان می‌دهد.



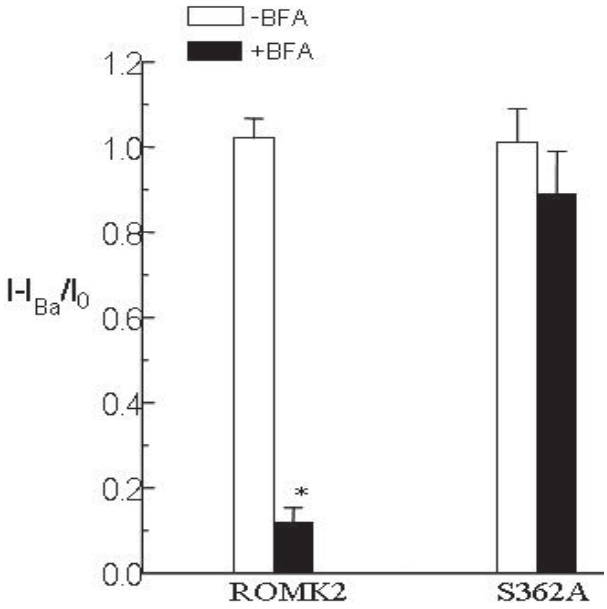
شکل۳- اثر BFA بر روی کانال پتاسیمی موتاسیون یافته ROMK2- S362A را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثبت شده A-D ازدو اووسیت *Xenopus* در حضور و عدم حضور 5mM از کلرور باریم در گروه کنترل (منحنی‌های B و A) و گروه دارای موتاسون S362A بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور µM 25 از BFA (منحنی‌های D و C) را نشان می‌دهد. نمودار E منحنی جریان- ولتاژ (I/V) از همان اووسیت را نشان می‌دهد.

نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۵ نتایج نشانگر کاهش سطح میزان جریان یونی پتاسیم حساس به باریم می‌باشد.

ثبت الکتروفیزیولوژیک جریان یون‌های پتاسیم از کانال پتاسیمی ROMK2 با موتاسیون S362A که در اووسیت‌ها بیان می‌شدند پس از انکوبه شدن در BFA در مدت زمان h ۴۸ و۲۴ در غلظت ۲۵ میکرو مولارکاهش معنی‌داری را در میزان جریان یونی این کانال پتاسیمی نشان نداد. نمودارهای ثبت جریان از اووسیت های است که موتاسیون S362A را بیان کرده‌اند بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور BFA در شکل ۳ نشان داده شده است.بعد از۴۸ ساعت انکوبه شدن در BFA میزان کسر جریان برابر با 0.05± 0.96 بود وکاهشی در میزان جریان دیده نشد (شکل۵).

پتانسیل استراحت غشاء اووسیت‌ها که به تعداد کانال‌های پتاسیمی ROMK2 بستگی دارد در طول آزمایشات در هر دو گروه از اووسیت‌های انکوبه شده در محلول دارای BFA (BFA+) و محلول فاقد BFA (BFA-) اندازه‌گیری گردید. چنان که نتایج نشان می‌دهد اووسیت‌های که کانال پتاسیمی ROMK2 را بیان می‌کردند بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انکوبه شدن در محلول BFA کاهش معنی‌داری در پتانسیل استراحت غشاء را در مقایسه با اووسیت‌های که در محلول فاقد BFA انکوبه گردیدند را نشان می‌دادند ولی در اووسیت‌های که موتاسیون S362A را بیان می‌کنند در این زمان اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود نداشت و تحت تاثیر BFA قرار نگرفتند (شکل ۴).

Archive of SID



شکل۵- کسر جریان اندازه‌گیری شده در اووسیت‌های که ROMK2 و موتاسیون S362A را بیان کرده‌اند درحضور و غیاب BFA را پس از مدت ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. (n = 24) P < 0.001 = * این نتایج افزایش پایداری و ثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 غشاء با ایجاد موتاسیون S362A را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با توجه به عدم کاهش میزان جریان که نشان دهنده عدم کاهش تعداد کانال‌های پتاسیمی ROMK2 موتاسیون یافته در غشاء اووسیت است می‌توان نتیجه گرفت که این قسمت از کانال در آندوسیتوز شدن این نوع از کانال دخالت دارد. می‌توان بر هم کنش‌های را پیشنهاد کرد که ممکن است چگونگی و نحوه بیان پروتئین‌های کانال‌های ROMK2 در کلیه را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. موتاسیون S362A کانال پتاسیمی حالت دفسفوریلاسون را تقلید می‌کند. میزان جریان‌های یونی ثبت شده از بیان کانال‌های پتاسیمی ROMK2 وکانال‌های موتاسیون یافته S362A و پتانسیل استراحت اندازه‌گیری شده غشاء اووسیت‌ها، افزایش پایداری و متوقف شدن اندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی موتاسیون یافته S362A را نشان می‌دهد (شکل ۴و۵). که نشان می‌دهد که توالی S-E-V در پایداری و آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK2 نقش دارد. در شرایط طبیعی این جایگاه به صورت فسفوریله می‌باشد. موتاسیون S362A که حالت دفسفوریله را تبعیت می کند نسبت به آندوسیتوز مقاوم بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این جایگاه از طریق فسفوریلاسیون می‌تواند آندوسیتوز این کانال‌ها را تنظیم نماید. اختلال در فسفوریلاسیون کانال‌های ROMK2 در این ناحیه سبب ایجاد مقاومت نسبت به آندوسیتوز می‌گردد. وضعیت فسفوریلاسیون یا دفسفوریلاسیون کانال‌های ROMK2 تعداد کانال‌های پتاسیمی فعال در غشاء را تعیین می‌نماید با توجه به این که فسفوریلاسیون وابسته به کازیین کیناز نوع II می‌باشد بنابراین می‌تواند پایداری پروتئین‌ها را به این صورت تحت تاثیر قرار دهد [۲۲]. تحقیقات قبلی نشان داده است که BFA ماده‌ای است که بر روی روند آندوسیتوز از طریق CCV در غشاءهای پلاسمایی تاثیری ندارد [۱۶]. تحقیق حاضر تاثیر مهاری BFA بر روی انتقال این کانال‌های پروتئینی به غشاء را نشان می‌دهد که با مطالعات قبلی دیگران بر روی کانال‌های ROMK1 مطابقت دارد [۲۳].

چندین مطالعه قبلی نشان داده‌اند که کانال پتاسیمی ROMK در غشاء پلاسمای اووسیت‌های *Xenopus laevis* و همچنین درمجاری جمع کننده قشری نفرون‌ها دستخوش آندو سیتوز می‌گردد. اووسیت‌های *Xenopus laevis* دارای ماشینی برای آندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین (CCVs) است با توجه به این ویژگی این اووسیت‌ها برای مطالعه آندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین بسیاری از کانال‌های یونی از جمله کانال‌های سدیمی اپیتلیال (ENaCs)، CFTR، کانال‌های کلراید و کانال‌های پتاسیمی ROMK1 مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۵،۱۷،۲۳].

برای بسیاری از روندهای سلولی ارتباطات و اثرات متقابل پروتئینی بر سایر پروتئین‌ها غشاء سلولی حیاتی است که این عمل توسط پروتئین‌های انجام می شود که ساختمان آن‌ها درطول تکامل حفظ گردیده است. بسیاری از اعمال مختلف سلولی به خصوصیات ساختمانی و کاتالیتیک هر کدام از این پروتئین‌ها بستگی دارد. پروتئین های آداپتوری به صورت مستقیم یا با واسطه سایر پروتئین‌ها بر روی این بر هم کنش‌ها تاثیر می‌گذارند که می‌توانند بخش‌های از قطعات پلی پپتیدی را تشخیص دهند و به آن‌ها متصل گردند [۱۵]. پروتئین‌های ناحیه

Archive of SID

PDZ یکی از مهمترین گروه آداپتور های پروتئینی هستند که دارای حدود ۹۰ اسید آمینه است که به صورت اختصاصی به قطعات کوتاه در پروتئین‌های انتهای کربوکسیل متصل می‌شود. ناحیه PDZ به عنوان یک پروتئین تعدیل کننده عمل می‌کند که در نشانه گیری (targeting) پروتئین‌های پیچیده نقش مهمی دارد. بسیاری از این لیگاندها دنباله‌های سیتوپلاسمی پروتئین‌های عرض غشایی هستند که در نواحی تخصص یافته غشاء مانند کمپلکس‌های اتصال دهنده اپیتلیالی با یکدیگر متصل می‌شوند [۱۴]. چندین ناحیه PDZ متصل شونده شناسایی شده‌اند که مجتمع‌های پروتئینی را به یکدیگر متصل می‌کنند و در قطبی شدن پروتئین‌ها در غشا راسی ویا قاعده‌ای سلول‌های اپی تلیالی شرکت دارند [۲]. اثرات متقابل اختصاصی بین پروتئین‌ها ارتباط بین ساختمان و عملکرد آن‌ها را در درون سلول‌ها مشخص می‌کند. برخی از این بر هم کنش‌ها از طریق نواحی پروتئینی حفظ شده در طول تکامل با ناحیه تعدیل کننده و اتصالی PDZ انجام می شود. همچنین ناحیه PDZ درپروتئین‌های اسکلت سلولی همانند PSD-95 (یک نوع از پروتئین متراکم پس سیناپسی) حضور دارد و نقش بسار مهمی درعملکرد ساختمان‌های غشایی به عهده دارد. تنظیم کانال‌های پتاسیمی ROMK توسط اسکلت سلولی ارتباط و اتصال بین این کانال‌ها و اسکلت سلولی را نیز تایید می‌کند. موتاسیون در کانال پتاسیمی ROMK در جایگاه اسید آمینه T332 سبب شیفت قالب وایجاد یک کدون متوقف کننده زودرس درنزدیک انتهای کربوکسیل می‌شود که انتقال این کانال به درون غشاء پلاسمایی را مهار می‌کند و سبب ایجاد سندرم بارتر می‌شود. امروزه مشخص شده‌است که پروتئین‌های ناحیه PDZ نقش بسیار مهمی در هدف‌گیری پروتئین به درون مولکول‌های پیچیده و وارد شدن به بخش‌های اختصاصی غشاء را دارد. همچنین شواهدی وجود دارد که آن‌ها می‌توانند علاوه بر انجام وظیفه همانند یک داربست عمل لیگاندهای خودشان را نیز تنظیم نمایند. برای پروتئین‌های PDZ قابلیت اتصال به توالی‌های انتهای کربوکسیل راه ساده‌ای است که با پروتئین‌های هدف بدون بر همزدن ساختمان و عملکرد کلی لیگاندهایشان تداخل نمایند. این که نواحی PDZ چگونه این عمل را انجام می‌دهند نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. عملکرد کانال می‌تواند توسط کنترل توزیع و پخش شدن کانال به درون نواحی تخصص یافته از غشاهای پلاسمایی و یا از طریق اسکلت سلولی تنظیم گردد. برای مثال کانال $K_{ir}2.3$ از طریق نواحی کوچکی از C– انتهای به اسکلت سلولی متصل می شود که با پروتئین متصل شونده PSD-95 از PDZ بر هم کنش می کند و به آن اجازه می دهد به رشته های اکتین اسکلت سلولی متصل شود. اسید آمینه سرین در ناحیه C– انتهای از کانال های $K_{ir}2.3$ برای این بر هم کنش مهم و ضروری می‌باشد [۶] بعلاوه فسفوریلاسیون این اسید آمینه توسط پروتئین کیناز A این اثرات متقابل را تنظیم می‌کند. وقتی که سرین فسفوریله می‌شود $K_{ir}2.3$ به PSD-95 متصل نمی‌شود و در این نوع از کانال، فسفوریلاسیون می‌تواند تراکم کانال های پس سیناپسی را کنترل نماید [۶]. در مورد کانال‌های پتاسیمی ROMK2 نیز فسفوریله شدن به عنوان یک عامل تنظیم کننده عمل می‌کند اینکه آیا در این فسفوریلاسیون CKII دخالت دارد به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش پیش رونده در میزان جریان یون پتاسیم از کانال‌های ROMK2 درحضور BFA ناشی از تاثیر بر روی باز شدن این نوع از کانال‌ها نیست بلکه نتیجه کاهش در تعداد کانال‌های فعال در غشاء پلاسمایی است. موتاسیون S362A مقاومت پروتئین کانال‌های ROMK2 نسبت به آندوسیتوز را سبب می‌شود که نشان می‌دهدکه بین انتهای کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و اجزاء مسیر آندوسیتوز تداخل عمل وجود دارد و یک ناحیه PDZ با عملکرد مناسب برای آندوسیتوز ضروری است.

Archive of SID

References

[1] Bilder D, Schober M, Perrimon N. Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. ***Nat Cell Biol*** 5 (2003) 53-58.

[2] Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, et al. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K+ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. ***Am J Physiol*** 268 (1995) F1132-1140.

[3] Bomsel M, Prydz K, Parton RG, Gruenberg J, Simons K. Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. ***J Cell Biol*** 109 (1989) 3243-3258.

[4] Bradbury NA, Clark JA, Watkins SC, Widnell CC, Smith HSt, Bridges RJ. Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. ***Am J Physiol*** 276 (1999) L659-668.

[5] Cohen NA, Brenman JE, Snyder SH, Bredt DS. Binding of the inward rectifier K+ channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. ***Neuron*** 17 (1996) 759-67.

[6] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. ***Nature*** 422 (2003) 37-44.

[7] Cooper GJ, Boron WF. Effect of PCMBS on CO2 permeability of Xenopus oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. ***Am J Physiol*** 275 (1998) C1481-6.

[8] Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. ***Nature*** 233 (1971) 177-182.

[9] Hajihashemi S, White SJ, Effect of the V364D mutation in membrane endocytosis of ROMK2 (Kir1.1b) ***Rahavard Danesh*** 10 (2007) 25-35.

[10] Hebert SC, An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). ***Kidney Intl*** 48 (1995) 1010-1016.

[11] Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. ***Ann Rev Cell Dev Biol*** 12 (1996) 575-625.

[12] Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, et al. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. ***J Biol Chem*** 276 (2001) 7156-7163.

[13] Parton RG, Prydz K, Bomsel M, Simons K, Griffiths G. Meeting of the apical and basolateral endocytic pathways of the Madin-Darby canine kidney cell in late endosomes. ***J Cell Biol*** 109 (1989) 3259-3272.

[14] Radziwill G, Erdmann RA, Margelisch U, Moelling K. The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. ***Mol Cell Biol*** 23 (2003) 4663-4672.

[15] Scott JD, Pawson T. Cell communication: the inside story. ***Sci Am*** 282 (2000) 72-9.

[16] Shieh BH, Zhu MY. Regulation of the TRP Ca2+ channel by INAD in drosophila photoreceptors. ***Neuron*** 16 (1996) 991-998.

[17] Shimkets RA, Lifton RP, Canessa CM. The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. ***J Biol Chem*** 272 (1997) 25537-25541.

[18] Wang W, Lerea KM, Chan M, Giebisch G. Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. ***Am J Physiol*** 278 (2000) F165-171.

[19] Wei Y, Bloom P, Gu R, Wang W. Protein-tyrosine phosphatase reduces the number of apical small conductance K+ channels in the rat cortical collecting duct. ***J Biol Chem*** 275 (2000) 20502-20507.

[20] Wood SA, Park JE, Brown WJ. Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. ***Cell*** 67 (1991)591-600.

[21] 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. ***Am J Physiol*** 273 (1997) F739-748.

[22] Yin X, Jedrzejewski PT, Jiang JX. Casein kinase II phosphorylates lens connexin 45.6 and is involved in its degradation. ***J Biol Chem*** 275 (2000) 6850-6856.

[23] 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. ***Am J Physiol*** 283 (2002) F630-639.

Archive of SID