

خواص بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی غشای داخلی میتوکندری مغز موشهای صحرائی نر در شرایط آلزایمر

عادلہ جعفری^{۱،۲}، جواد فحانیک بابائی^۱، افسانہ الیاسی^{۳،*}، رضا صغیری^۳
۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران
دریافت: ۲۱ دی ۹۱ پذیرش: ۲۸ بهمن ۹۱

چکیده

مقدمه: آلزایمر یک بیماری نورودژنراسیون پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی است که با اختلال در حافظه و تغییر رفتار و شخصیت همراه است. بررسی های اخیر، نقش کانالهای میتوکندری را در اختلالات حافظه ای بسیار مهم می شمارند. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی غشای داخلی میتوکندری در شرایط آلزایمر می باشد.

روش ها: آلزایمر از طریق تزریق داخل بطنی آمیلوئید بتا ۱-۴۲ ($4\mu\text{g}/\mu\text{l}$) به موشهای صحرائی نر (۲۲۰-۲۵۰ گرم) نژاد ویستار القا شد. پس از دو هفته، غشای داخلی میتوکندری مغز استخراج و وزیکولهای حاوی میتوکندری به غشای دو لایه لیپیدی الحاق شد و خصوصیات تک کانال پتاسیمی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، خلوص نمونه میتوکندری از طریق وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصیتعیینگردید.

یافته ها: بر اساس اطلاعات قبلی، یکی از کانالهای پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری دارای کنداکنانس ۹۳ پیکوسیمنس و حساس به 4-AP بود. در مطالعه حاضر، نشان داده شد که در شرایط آلزایمر، کنداکنانس کانال در ولتاژهای منفی به ۱۱۴ پیکوسیمنس افزایش یافته منحنی جریان-ولتاژ یک inward rectification را نشان می دهد. وسترن بلات و استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی علیه اندامکهای داخل سلولی نشان داد که نمونه استخراج شده فقط حاوی میتوکندری است.

نتیجه گیری: داده های ما نشان داد که خصوصیات بیوفیزیکی کانال پتاسیمی بطور معنی داری در موشهای صحرائی مبتلا به آلزایمر تغییر می کند. بر این اساس، پیشنهاد می شود کانالهای پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری احتمالاً در بیماری آلزایمر درگیر بوده و می توانند به عنوان هدف در اتخاذ برنامه درمانی در نظر گرفته شوند.

واژه های کلیدی: بیماری آلزایمر، کانال پتاسیمی، میتوکندری، غشاء دو لایه لیپیدی

مقدمه

[۳۱]. از دست رفتن وسیع نورونها، وجود کلافهای نوروفیبریلاری^۱ (NFT) و پلاکهای پیری در مغزاز جمله علائم مشخصه این بیماری است [۷]. عمده ترین بخش تشکیل دهنده پلاکهای پیری، آمیلوئید بتا است که یک پپتید ۴۰ تا ۴۳ اسید آمینه ای است که از عملکرد بتا و گاما سکریتاز بر

آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی است که با اختلال در حافظه و شناخت همراه است. این بیماری عمده ترین علت ایجاد دمانس (۶۰ تا ۷۰ درصد) است

af.eliassi@sbmu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

*نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

1. Neurofibrillary tangle

خارج سلولی تنظیم کنند. شاهد این امر درگیر بودن این کانالها در فرایند شکل پذیری نورونی است [۴۵]. گزارشهای وجود دارد که تعدیل فعالیت کانال پتاسیمی غشاء سلولی، فرایندهای شناختی از قبیل حافظه ارتباطی و یادگیری را تنظیم می کند [۱۶]. چنین یافته هایی سبب پیشبرد تحقیقات در زمینه فعالیت غیر طبیعی کانال پتاسیمی در آلزایمر شده است. بر این اساس اختلال عملکرد کانالهای پتاسیمی در فیبروبلاست [۱۲] و پلاکت [۱۰] در بیماران مبتلا به آلزایمر نشان داده شده است.

Stackman و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نقش کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس پایین^۳ (SK) را در تنظیم تحریک پذیری غشاء در نورونهای CA₁ گزارش نموده و مطرح کردند که این کانالها یادگیری و پلاستیسیته سیناپسی را در هیپوکامپ تعدیل می کنند [۴۰]. در همین راستا Hammond و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که مهار کانالهای SK یادگیری را تقویت می کند. افزایش بیان این کانالها سبب نقص در حافظه و یادگیری وابسته به هیپوکامپ و تضعیف EPSP های زیر آستانه ای و شکل پذیری سیناپسی در برشهای مغزی هیپوکامپ می شود [۱۷].

تاکنون پنج نوع کانال پتاسیمی در غشای داخلی میتوکندری شناسایی شده اند که شامل کانال پتاسیمی وابسته به ATP^۴ (mitoK_{ATP})، کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا^۵ (mitoBK_{Ca}) و کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس متوسط^۶ (mitoIK_{Ca})، کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ (mitoKv1.3) و کانال پتاسیمی دو منفذ TASK-3 می باشد [۹، ۱۹، ۳۷، ۳۸]. علاوه بر این، آزمایشگاه ما نیز در مطالعات اخیر خود با استفاده از تکنیک الحاق کانال در غشاء دو لایه لیپیدی، حضور دو نوع کانال mitoBK_{Ca} با کنداکتانس های ۵۶۵ و ۲۱۱ پیکوسیمنس را در غشاء داخلی میتوکندری نشان داد [۱۳]. علیرغم اهمیت این کانالها و نقش فیزیولوژیک آنها در حفاظت نورونی،

روی پپتید پیش ساز آمیلوئید^۱ (APP) بوجود می آید [۱۱]. آمیلوئید بتا به صورتهای مختلفی از قبیل منومرهای آمیلوئید بتا، الیگومرهای محلول آمیلوئید بتا با وزن مولکولی بالا و پایین و لیگاندهای قابل انتشار مشتق از آمیلوئید بتا و منفذهای آمیلوئید، پروتوفیبریل و فیبریل (۱۰-۱۷) وجود دارد [۳۰]. اخیراً این بحث مطرح شده است که الیگومرها یا فیبریلهای آمیلوئید بتا سبب سمیت شده و از دست رفتن سیناپسها و در نهایت مرگ نورونی را بدنبال دارد. علاوه بر ایجاد پلاکهای پیری و کلافهای نوروفیبریلاری و تغییرات بافتی، ضایعات داخل سلولی از قبیل تجمع آمیلوئید بتا در داخل سلول [۵] و عدم کارایی صحیح میتوکندری [۱۱، ۲۵] نیز مشاهده شده است.

میتوکندری منبع عمده تولید انرژی برای عملکرد صحیح سلولهای مغزی است. اگرچه مکانیسم دقیق ورود آمیلوئید بتا به داخل میتوکندری معلوم نیست اما به نظر می رسد که آمیلوئید بتا از طریق ترانس لوکاز غشای خارجی میتوکندری وارد ارگانل می شود و در کریستای غشای داخلی، ماتریکس و غشای خارجی آن لوکالیزه می شود [۱۸]. شواهد گوناگونی پیشنهاد می کنند که آمیلوئید بتا و APP لوکالیزه شده در میتوکندری با پروتئینهای میتوکندریایی وارد واکنش شده و تولید گونه های فعال اکسیژن^۲ (ROS) را افزایش می دهند و سبب آسیب ساختاری و عملکردی میتوکندری شده و در نتیجه مانع عمل طبیعی نورون می شوند [۲۲، ۲۵].

علاوه بر این، یکی از اجزاء سازنده غشاء داخلی میتوکندری، کانالهای یونی از جمله کانالهای پتاسیمی می باشند. کانالهای پتاسیمی مختلفی در میتوکندری، شناسایی شده اند که نقش مهمی را در بسیاری از فرایندهای سلولی ایفا می کنند. این کانالها در تنظیم حجم میتوکندری [۳، ۲۱]، اسیدیته [۳]، هومئوستاز کلسیم [۴۴]، آپوپتوز [۴۱] و حفاظت سلولی [۲۴] نقش داشته و مانند سایر اندامکها، هدف و مقصد نهایی بسیاری از داروها می باشند [۳۲]. خصوصیات این کانالها به طور دائمی تعدیل می شود که اجازه می دهد تا آنها فرایندهای پیام رسانی داخل سلولی را در پاسخ به نشانه های

3. Low Conductance Ca-activated Potassium Channel
4. ATP-sensitive Potassium Channel
5. Large Conductance Ca-activated Potassium Channel
6. Intermediate Conductance Ca-activated Potassium Channel

1. Amyloid Precursor Protein
2. Reactive Oxygen Species

SDS ۱٪/۰/۱)، بافر ترانسفر (تریس بازی ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، متانول ۲۰٪)، محلول TBS (تریس اسیدی ۱۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۹٪/۰/۹)، محلول TBS-T (محلول TBS و Tween-20 ۰/۰/۵٪)

این تحقیق، نوعی مطالعه تجربی^۱ می باشد که در سال ۹۰ در گروه فیزیولوژی علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفت. کلیه آزمایشات و تمامی روشهای مطالعه بر روی حیوانات به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رسید. در این مطالعه از موشهای صحرایی نر از نژاد ویستار (wistar) در محدوده وزنی ۲۲۰ - ۲۵۰ گرم استفاده شد. تمام حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲۲-۲۰ °C)، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند.

از طریق تزریق داخل بطنی آمیلوئید بتا ۱-۴۲ آلزایمر ایجاد شد. بدین شرح که ابتدا آمیلوئید بتا ۱-۴۲ با استفاده از آب دیونیزه با حجم نهایی ۴ μg/μl [۵]، حل شد و سپس جهت ایجاد تجمع^۲ به مدت ۳ روز در دمای اتاق نگهداری شد. برای القاء آلزایمر، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۲ mg/kg) بیهوش می شدند، پس از بی هوشی دو عدد کانول (۲۲ G) در بطنهای طرفی قرار داده می شد. مختصات محل قرارگیری کانولها بر اساس اطلس پاکسینوس بدین ترتیب است که: ۰/۸ میلی متر به طرف عقب و ۱/۶ میلی متر به طرف راست و چپ نسبت به برگما و ۳ میلی متر پایین تر از سطح جمجمه. سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون، یک میکرولیتر از محلول آماده شده به هر کدام از بطنها تزریق گردید.

برای تایید آلزایمر، ۱۴ روز پس از تزریق، حافظه موشهای صحرایی با استفاده از دستگاه حافظه اجتنابی غیر فعال^۳ مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه های میتوکندری مورد استفاده با روش Kudin و همکارانش استخراج گردیدند [۲۳]. پس از بی هوشی دو موش صحرایی با کلروفورم و بریدن سر، بلافاصله مغز حیوانات خارج

خصوصیات آنها در سطح تک کانال در نورونهای مغزی مورد بررسی قرار نگرفته است اگرچه گزارشهایی از عملکرد آنها در بافتهای محیطی وجود دارد. در همین راستا مطالعاتی بر روی خصوصیات بیوفیزیکی کانالهای پتاسیمی غشای داخلی میتوکندری مغز در شرایط نرمال در سطح تک کانال در آزمایشگاه ما در حال انجام است که در مطالعه اخیر موفق به شناسایی کانال پتاسیمی جدیدی با کندانسانس ۹۳ pS در غشاء داخلی میتوکندری گشته ایم (مقاله تحت بررسی جهت چاپ در مجله می باشد).

بر این اساس، با توجه به نقش کانالهای پتاسیمی در حافظه و یادگیری و شواهد مبتنی بر تغییر این کانالها در بیماران مبتلا به آلزایمر و نیز با توجه به ناکافی بودن بررسی کانالها در سطح تک کانال، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آلزایمر بر روی خصوصیات بیوفیزیکی کانالهای پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری مغز می باشد.

مواد و روشها

کلرید پتاسیم، دیژیتونین، سوکروز، D-مانیتول، بیکربنات سدیم، هیپس، تریس اسیدی و بازی، سرم آلبومین گاوی (BSA)، ۴-آمینوپیرییدین (4-AP)، EGTA، ناگاریز و آمیلوئید بتا ۱-۴۲ (amyloid beta1-42) از شرکت سیگما، کاغذ نیتروسلولز و کیت لومینسانس (ECL-kit) از شرکت (Amersham)، n-دکان از شرکت مرک و کتامین و زایلازین از داروپخش آنتی بادی های Cox1، Calnexin و Actin از شرکت سانتاکروزو Golgi Marker58K از شرکت abcam خریداری شدند.

محلولهای مورد نیاز در استخراج میتوکندری عبارتند از: محلول MSE (مانیتول ۲۲۵ میلی مولار، سوکروز ۷۵ میلی مولار، هیپس ۵ میلی مولار، سرم آلبومین گاوی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، EGTA ۱ میلی مولار، pH: ۷/۴)، محلول MSE-ناگاریز (محلول ۰/۰/۵٪ ناگاریز در محلول MSE)، محلول MSE - دیژیتونین (محلول ۰/۰/۲٪ دیژیتونین در محلول MSE).

محلولهای مورد نیاز در وسترن بلات عبارتند از: تانک بافر (تریس بازی ۰/۰/۲۵ میلی مولار، گلیسین ۰/۱۹۲ میلی مولار

1. Experimental
2. Aggregation
3. Passive avoidance test

پروتئینهای جدا شده بر ژل بوسیله دستگاه بلات^۲ به کاغذ منتقل و برای قرار گرفتن در مجاورت آنتی بادی آماده گردیدند [۳۳]. قبل از آن کاغذها به مدت یک شب در دمای °C ۴ محلول بلاکینگ که شامل بافر TBS-T و شیر بدون چربی ۱۰٪ می باشد در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن کاغذها به مدت ۲ ساعت در مجاورت آنتی بادی های اولیه شامل: آنتی بادی های Actin, Cox1, Calnexin و Golgi Marker قرار داده شدند. پس از شستشو با محلول TBS-T، کاغذها به مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی بادی ثانویه تیمار گردیدند.

پس از شستشوی نهایی با محلول TBS-T کاغذها با استفاده از روش شیمیولومینسانس^۳ (ECL-kit) بر روی فیلم عکاسی ظاهر و باندهای پروتئینی بررسی گردیدند. جهت تشکیل غشاء دولایه لیپیدی^۴ (BLM) از یک یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می گردد. در این پروژه جهت تشکیل BLM از فسفاتیدیل کولین استفاده شد.

استخراج فسفاتیدیل کولین^۵ (PC): ماده فوق از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکارانش استخراج گردید [۳۹]. 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 متانول و کلروفرم بود، جدا گردید. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC 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 با غلظتهای (200 mM cis/50 mM trans) بودند، استفاده شد. در دیواره محفظه ترانس منفذی به قطر 250 μm تعبیه شده بود. این

می شد. مغزها به محلول سرد MSE منتقل و چندین مرتبه شسته می شدند. سپس ۱۰ میلی لیتر محلول MSE-ناگاریز به آنها اضافه کرده و با هموژنایزر الکتریکی با دور ۶۰۰ واحد بر ثانیه (unit/s) هموژنیزه شدند. در ادامه ۲۰ میلی لیتر دیگر از محلول سرد MSE به آن اضافه شد (مرحله ۱ و سترن بلات) و به مدت ۴ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیدند. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی را برداشته و به مدت ۹ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیدند. برای بدست آوردن سیناپتوزومها، رسوب حاصل را با ۱۰ میلی لیتر از محلول MSE-دیژیتونین سرد حل نموده (مرحله ۲) و محلول به ظرف هموژنیزه کننده منتقل و ۸ تا ۱۰ مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی بدست آید. سرانجام سوسپانسیون به مدت ۱۱ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ و ویزیکولهای حاصل در ۱۳۰۰ μl محلول MSE حل شده (مرحله ۳) تا غلظت حدود ۲۰ mg/ml پروتئین بدست آید.

برای جدا سازی غشاء داخلی میتوکندری از روش DaCruz و همکاران استفاده شد [۸]. بدینصورت که میتوکندری ها در غلظت ۵ mg/ml در آب مقطر سوسپانسیون شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ تکان داده شدند. سپس این ترکیب ۲۰ مرتبه بوسیله هموژنایزر دستی هموژنیزه و دوبار هر کدام ۵ دقیقه ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای بدست آمده به همراه بیکربنات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH: ۱۱/۵) در غلظت نهایی ۵ mg/ml ۰/۵ بمدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. سرانجام، محلول به مدت ۳۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و غشاء داخلی میتوکندری به صورت ویزیکول (مرحله ۴) بدست آمد. نمونه ها جهت بررسی و سترن بلات و الکتروفیزولوژی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

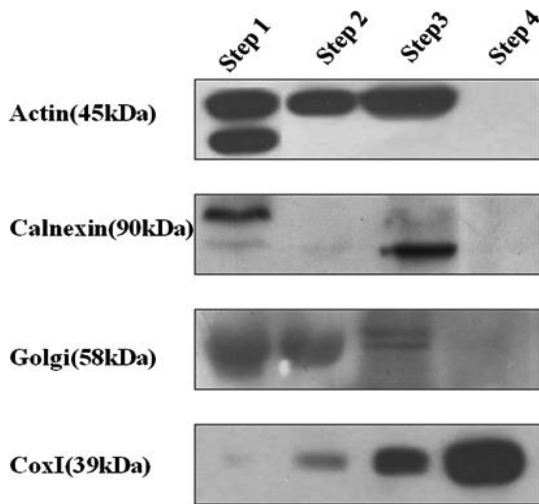
پس از اندازه گیری غلظت پروتئین، نمونه حاصله با استفاده از روش برادفورد، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای °C 95 انکوبه شدند. میزان ۳۰ میکروگرم از نمونه جهت الکتروفورز در ژل ۱۲٪ در نظر گرفته شد. سپس پروتئینها به کاغذهای نیتروسولوزی منتقل گردیدند. کاغذها از قبل به مدت ۳۰ دقیقه در ترانسفر بافر انکوبه شده بودند. و سپس

1. SDS-PAGE

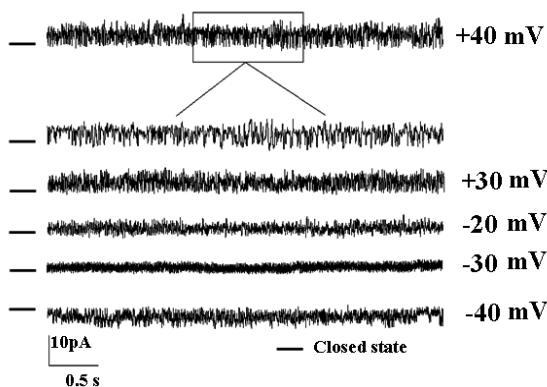
2. SD-Transblot
3. Chemiluminescence
4. Bilayer Lipid Membrane
5. Phosphatidylcholine

یافته ها

جهت اطمینان از القاء آرایمر از آزمون حافظه اجتنابی استفاده شد. (داده ها نشان داده نشد). با استفاده از تکنیک western blotting و آنتی بادی های اختصاصی برای غشای پلاسمایی و اندامکهای داخل سلولی خلوص نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). بر این اساس از آنتی بادی های اختصاصی علیه غشای پلاسمایی (Actin, 45kDa)، دستگاه گلژی (Golgi Marker, 58kDa)، شبکه آندوپلاسمی



شکل ۱- خلوص نمونه میتوکندری؛ وسترن بلات مغز موش صحرایی. کاغذها با آنتی بادی های اختصاصی مجاور شد؛ مارکر غشای پلاسمایی: Actin (45kDa)، مارکر غشای داخلی میتوکندری CoxI (39 kDa)، مارکر شبکه آندوپلاسمی Calnexin (90 kDa)، مارکر دستگاه گلژی Golgi marker (58 kDa). مراحل ۱ تا ۴ نشان دهنده مراحل مختلف استخراج میتوکندری می باشد که در بخش روشها مشخص گردیده است.



شکل ۲- نمونه ای از جریانهای ثبت شده از تک کانال. جریانهای تک کانال در شرایط غلظتی 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans (n=4) در محدوده ولتاژی +۴۰ mV تا -۴۰ mV ثبت شده اند. خطوط ممتد، حالت بسته کانال را نشان می دهند.

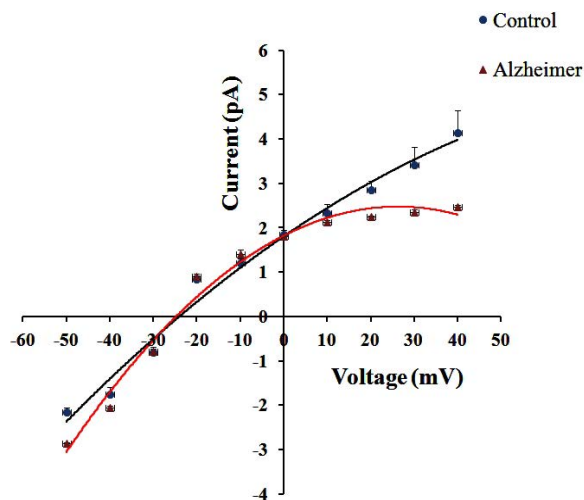
اختلاف غلظت با ایجاد گرادیان اسمزی در دو سوی غشاء به جا رفتن کانال در غشاء کمک می کند. غشاء دو لایه لیپیدی توسط قرار دادن محلول لیپیدی فسفاتیدیل کولین (با غلظت 25 mg/ml در حلال n - دکان) با استفاده از سوزن استیل به قطر 150µm بر روی منفذ تشکیل گردید. تشکیل غشاء توسط استرئومیکروسکوپ مشاهده و ظرفیت خازنی آن به طور معمول بین 200 pF تا 300 توسط آمپلی فایر اندازه گیری گردید. جهت تنظیم pH محلولهای کلرید پتاسیم از هیپس (1 mM) و تریس بازی یک مولار استفاده شد.

وزیکولهای استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری، توسط سوزن استیل به قطر 150µm جهت الحاق کانال با غشاء دولایه لیپیدی تماس داده شد. جریان عبوری از تک کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال شد و محفظه ترانس گراند گردید. اتصالات الکتریکی دو محفظه توسط الکترودهایی از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمکی/آگار (KCl 3M) با دستگاه آمپلی فایر برقرار گردید. تمام ثبتها به میزان 1 kHz با استفاده از یک فیلتر ۴ پل بس، فیلتر و با سرعت نمونه برداری 10kHz نمونه برداری و توسط دستگاه ثبت (شرکت Axon Pclamp9) به کامپیوتر منتقل و ذخیره گردیدند. جهت آنالیز از نرم افزار clamfit9 (شرکت Axon) استفاده گردیدند.

در روشهای تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، ساده ترین حالت حضور یک وضعیت بسته و یک وضعیت باز بود. ارتفاع یا آمپلی تود بین این دو وضعیت نشان دهنده میزان عبور جریان از درون کانال بر اساس پیکو آمپر (pA) بود. کنداکتانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ-جریان محاسبه گردید. احتمال باز بودن کانال (P_o) از طریق به کارگیری الگوریتمهای استاندارد تعیین رخدادهای clamfit9، بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی صورت گرفت. P_o از روی قطعات یک دقیقه ای در ولتاژهای معین محاسبه گردید. اطلاعات بصورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش گردیدند. همچنین، برای مقایسه آمپلی تود بین گروههای کنترل و آرایمر از t-test و نرم افزار spss ۱۵ استفاده شد. معنی دار بودن به صورت $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

کلرید پتاسیم (200 mM KCl cis / 50 mM KCl trans) ثبت گردید. در ۵٪ از کوششها، نیم تا ده دقیقه بعد از الحاق وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی کانال مشاهده گردید. شکل ۲، جریانهای ثبت شده در ولتاژهای مختلف غشاء، از ۴۰+ تا ۴۰- میلی ولت را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود در ولتاژهای مثبت تر از پتانسیل معکوس جریان پتاسیمی بصورت رو به بالا و مثبت ثبت گردیده که ناشی از حرکت یونها در جهت گرادیان غلظتی از محفظه سیس به ترانس بود. میزان جریان در ولتاژ نزدیک به ۳۰- میلی ولت به شدت کاهش یافته و در ولتاژ ۳۰- میلی ولت به صفر رسید. در ولتاژ منفی تر از ۳۰- میلی ولت جریانهها روبه پایین ثبت گردیده که نشانه حرکت یون پتاسیم از محفظه ترانس به محفظه سیس بود. با این حال احتمال باز بودن کانال تغییری نشان نداد.

در شکل ۳ نمودار ولتاژ-جریان نشان داده شده است. نمودار، رابطه جریان-ولتاژ را برای وضعیت کاملاً باز نمایش می دهد. رابطه جریان-ولتاژ در محدوده صفر تا ۴۰- میلی ولت برای کانال به صورت خطی بود در حالیکه در ولتاژهای مثبت کاهش نشان داده که نشاندهنده کاهش جریان خروجی پتاسیم (outward) بود. شیب منحنی که نشاندهنده کنداکتانس کانال است در ولتاژهای منفی برابر با



شکل ۳- منحنی ولتاژ-جریان در دو گروه کنترل و آلزایمر. شیب خط معادل کنداکتانس کانال و در ولتاژهای منفی در گروه آلزایمر برابر ۹۳ pS و در گروه کنترل برابر با ۱۱۴/۹ pS بود.

و غشاء داخلی میتوکندری (Calnexin, 90kDa) استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که نمونه میتوکندری فاقد پروتئینهای موجود در اندامکهای دیگر و نیز غشای پلاسمایی می باشد. خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری مغز:

فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی در محیط غیر همگون

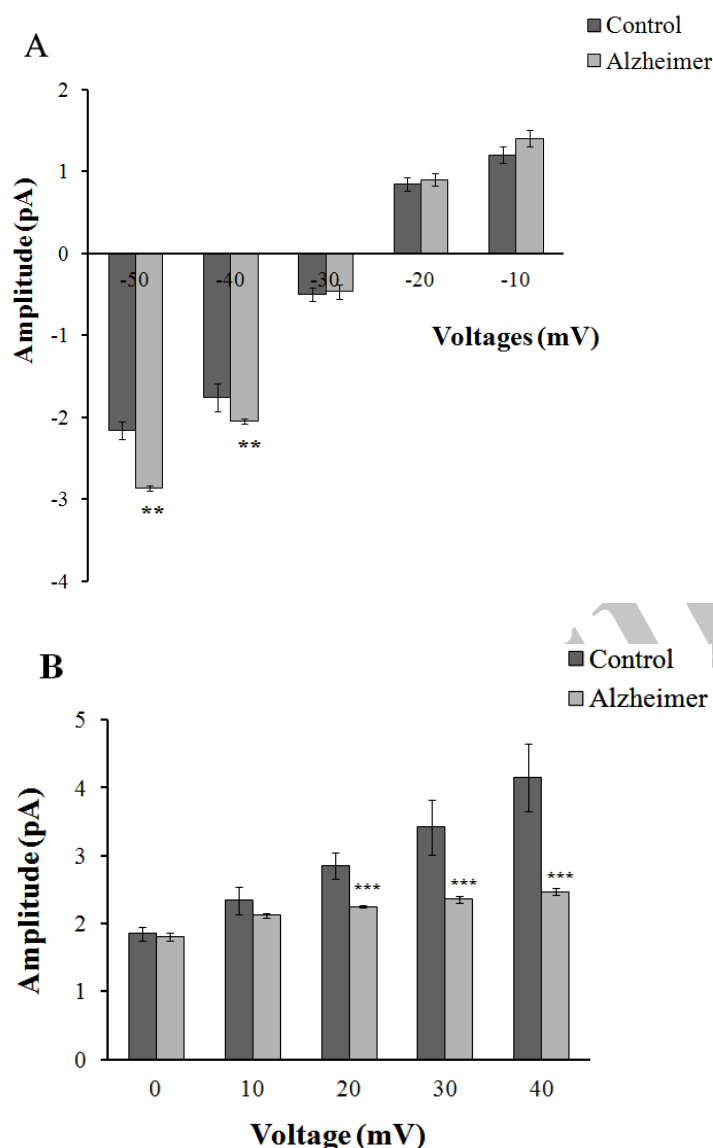
Table 1. Channel open probability (P_o) at different membrane voltage

Voltage(mV)	-40	-10	0	+10	+30	+40
Open probability (P_o)	0.49 ± 0.01	0.41 ± 0.04	0.4 ± 0.03	0.44 ± 0.06	0.44 ± 0.08	0.43 ± 0.08

Measurements were carried out under asymmetrical 200 mM KCl cis / 50 mM KCl trans condition. Data points are mean ± SE from 4 experiments.



شکل ۴- اثر 4-AP، بعنوان مهار کننده غیر انتخابی کانالهای پتاسیمی بر روی فعالیت کانال. ثبت از تک کانال تحت شرایط کنترل (200/50 mM KCl; cis/trans) و بلافاصله بعد از افزودن 4-AP با غلظت ۱۰ mM در ناحیه سیتوپلاسمی (cis) (n = 4) در ولتاژ ۵- mV و ۴۰+ mV. خطوط ممتد حالت بسته کانال را نشان می دهد.



شکل ۵- مقایسه جریان عبوری از کانال در دو گروه کنترل و آلزایمر. A: مقایسه میزان جریان عبوری در محدوده ولتاژی mV -۵۰ تا ۱۰- در گروه کنترل و آلزایمر. در ولتاژ ۳۰- میزان جریان نمودار میزان نويز پایه است. B: مقایسه میزان جریان عبوری در محدوده ولتاژی mV صفر تا ۴۰+ در گروه کنترل و آلزایمر. هر یک از ستونها بیانگر میانگین ± اختلاف معیار می باشد. ** نشان دهنده $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل است. *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است.

اثر ولتاژ بر روی ویژگیهای باز و بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال $(P_o)^2$ در ولتاژهای مختلف در محیط (200 mM KCl cis/50 mM KCl trans) مورد بررسی قرار گرفت. احتمال باز بودن کانال در محدوده ولتاژی مورد آزمایش تابعی از ولتاژ نبود (جدول ۱).

اثر AP-4 به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال پتاسیمی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ اثر افزودن AP-4 در محفظه سپس در غلظت ۱۰ میلی

۱۱۴/۹ پیکوسیمنس^۱ (pS) بود. همچنین بر اساس شکل، پتانسیل معکوس (reverse potential) برای وضعیت هدایتی کانال ~ 25 میلی ولت بود. بر اساس رابطه گلدمن-هوچکینز-کتر $E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_k[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$ نسبت نفوذ پذیری کانال در مورد یونهای پتاسیم به کلر بالاتر از ۲۵ (PK/PCl > 25) در شرایط یونی $\frac{[K]_i}{[K]_o} = \frac{200 mM}{50 mM}$ است. بنابراین، می توان بیان نمود که کانال برای عبور کاتیون انتخابی بوده و یک کانال کاتیونی است.

تکنیک الحاق کانال به دو لایه لیپیدی غشا شناسایی شده است که شامل ۱) $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (در دست چاپ)، ۲) BK_{Ca} حساس به ATP [۳۴]، ۳) BK_{Ca} غیر حساس به ATP [۲۵]، و ۴) کانال پتاسیمی حساس به 4-AP [در دست چاپ] می باشد. در مطالعه حاضر اثر آلزایمر القا شده بر موشهای صحرایی بر رفتار بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی حساس به 4-AP مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات پیشین در شرایط کنترل یک کانال پتاسیمی را در غشای داخلی میتوکندری مغز در شرایط غلظتی غیر همگون کلرید پتاسیم (200 mM KCl cis / 50 mM KCl trans) نشان داد که نمودار جریان-ولتاژ آن در دامنه ولتاژی منفی با شیب کنداکتانس ۹۳ پیکوسیمنس خطی است و نمایانگر کاهش جریان از ولتاژ ۲۰- به سمت ولتاژهای مثبت می باشد. همچنین احتمال باز بودن کانال وابسته به ولتاژ نبوده و تغییرات ولتاژ در هر دو ولتاژهای منفی و مثبت احتمال باز بودن کانال را تغییر نمی دهد. در همین راستا، نتایج حاصل از بررسی در شرایط آلزایمر وجود یک کانال پتاسیمی غیر وابسته به ولتاژ را در شرایط غلظتی مشابه نشان داد که همانند کانال پتاسیمی شناسایی شده در موشهای کنترل فقط با 4-AP مهار شد. این کانال در محدوده ولتاژی صفر تا ۴۰- کنداکتانس ۱۱۴ پیکوسیمنس را نشان داد، در حالیکه در ولتاژهای مثبت از میزان جریان کاسته شد. منحنی جریان-ولتاژ در شکل ۳، بیان می کند که پتانسیل معکوس شدن کانال نزدیک به ۳۰- میلی ولت می باشد که به پتانسیل تعادلی نرنست برای پتاسیم در شرایط آزمایش ما ($E_{\text{K}} = -34 \text{ mV}$) بسیار نزدیک می باشد. این مشاهده گواهی بر این موضوع است که جریان ثبت شده از فعالیت کانال (شکل ۲) نشاندهنده یک کانال نفوذپذیر به کاتیون می باشد، در حالی که طبق رابطه نرنست، پتانسیل معکوس شدن برای جریان کلر برابر با ۳۴+ میلی ولت است. احتمال باز بودن کانال نیز در ولتاژهای مختلف تفاوت معناداری از خود نشان نداد که همانطور که ذکر شد نشان دهنده رفتار مستقل از ولتاژ کانال می باشد.

بخشی از نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان جریان خروجی در ولتاژهای مثبت در گروه آلزایمر در مقایسه با کنترل کاهش معناداری یافت (شکل ۵) بطوریکه در ولتاژهای ۳۰+ و ۴۰+ میلی ولت با $p < 0.001$ معنی دار شد. این یافته

مولار را بر روی فعالیت کانال در دو ولتاژ ۴۰+ و ۵۰- میلی ولت نشان می دهد.

میزان جریان برای ولتاژ ۴۰+ میلی ولت قبل از اضافه کردن 4-AP برابر با $2/5 \pm 0/55$ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۴۳ و برای ولتاژ ۵۰- میلی ولت میزان جریان $2/87 \pm 0/5$ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۴۲ بود. پس از اضافه کردن 4-AP فعالیت کانال به طور کامل مهار گردید و احتمال باز بودن کانال در هر دو ولتاژ به صفر رسید.

جهت بررسی تغییرات احتمالی در رفتار بیوفیزیکی کانال، میزان جریان (برحسب پیکو آمپر، pA) در دو گروه در ولتاژهای مختلف با استفاده از t-test مورد بررسی قرار گرفت. میزان جریان عبوری در ولتاژهای صفر، ۱۰-، ۲۰- و ۳۰- میلی ولت تفاوت معنی داری در دو گروه نشان نداد. در ولتاژهای ۱۰+ و ۲۰+ اگرچه کاهش مختصری در جریان در گروه آلزایمر ایجاد شد ولی معنی دار نبود، اما میزان جریان در ولتاژهای ۳۰+ و ۴۰+ کاهش جریان در گروه آلزایمر با $p \leq 0.001$ معنی دار شد. بالعکس در ولتاژهای منفی شامل ۴۰- و ۵۰- میزان جریان در گروه آلزایمر افزایش معنی داری ($p \leq 0.01$) در مقایسه با کنترل نشان داد (شکل ۵).

بحث

آلزایمر از طریق کلافهای نوروفیبریلاری داخل سلولی و پلاکهای پیری خارج سلولی و از دست رفتن وسیع نورونها و سیناپسها در مغز مشخص می شود و با دژنراسیون پیشرونده سیستم عصبی همراه است. بررسی های اخیر تجمع آمیلوئید بتا را در سلول و اندامکهای از قبیل میتوکندری نشان داده است که به نظر می رسد در اختلال عملکرد میتوکندری نقش عمده ای ایفا کند [۷، ۱۱، ۲۵]. علاوه بر این، گزارشهای متعددی از تغییر عملکرد کانالهای یونی، تغییر در بیان انواع متعدد کانالهای پتاسیمی از قبیل SK، تغییر در جریان ورودی یا خروجی از کانال در بیماران آلزایمری نیز مطرح شده است [۳۴، ۲۰، ۳۶، ۴۰]. در گذشته نشان دادیم که چندین کانال پتاسیمی در غشای داخلی مغز موشهای صحرایی از طریق

1. picoAmper

کانال به تعادل می رسد).

نکته جالب توجه در تحقیق حاضر تغییر رفتار کانال در ولتاژهای منفی است، به نحوی که میزان جریان در ولتاژهای منفی تر از پتانسیل معکوس (۴۰- و ۵۰- میلی ولت) در گروه آلزایمر افزایش معنی داری ($p \leq 0.01$) در مقایسه با کنترل نشان داد (شکل ۵). این تغییر رفتار سبب گردید رابطه جریان - ولتاژ در ولتاژهای صفر تا ۴۰- میلی ولت، شیب خط کنداکتانس 114 pS را نشان دهد که نسبت به کنداکتانس 93 pS در گروه کنترل افزایش داشت. در حقیقت این کانال در شرایط آلزایمر یک inwardrectification را از خود نشان داد، بطوریکه به نظر می رسد در ولتاژهای منفی تر از پتانسیل معکوس میزان جریان پتاسیمی از میتوکندری به سیتوپلاسم افزایش می یابد. درباره عوامل موثر در inward rectification در کانالهای K_{ir} تئوریهای مختلفی مطرح شده است. اولین بار Armstrong و همکارانش به نقش ذرات باردار مثبت اشاره کردند که مسیر هدایت یونی را از بخش سیتوپلاسمی مهار می کند [۱]. بررسیهای بیشتر درباره نقش عوامل داخلی موثر در این رفتار بر روی میوسیت‌های قلبی، نشان داد که منیزیم داخل سلولی سبب بسته شدن منفذ کانال شده و به صورت مستقل از ولتاژ سبب یکسو نمودن جریان پتاسیمی می شود [۲۶]. همچنین گزارشهای مبنی بر نقش مهم پلی آمینهای داخل سلولی مطرح شده که در غلظتهای میکرومولار در سیتوپلاسم حضور داشته و به صورت وابسته به ولتاژ در inward rectification نقش دارند [۲۹]. با این وجود به نظر می رسد عوامل دیگری در تعیین درجه rectification موثر می باشند، بطوریکه در گروهی از کانالها در ولتاژهای ۵۰+ میلی ولت جریان خروجی به طور کامل مهار می شود در حالیکه در دسته ای دیگر اگرچه جریان کاهش می یابد اما حتی در مثبت ترین ولتاژها هم به صفر نمی رسد [۴، ۴۳]. در توضیح این مطلب، بررسی های اخیر به نقش عوامل موجود در ساختمان کانال اشاره کرده اند. به عنوان مثال، oliver و همکارانش نشان دادند که در کانال $K_{ir1.1}$ و $K_{ir2.1}$ جایگاهی در TM2 وجود دارد که در rectification های با قدرت بالا دارای اسید آمینه های با بار منفی است و در صورت تغییر این آمینواسید به نوع خنثی، کانال درجات خفیف تری از rectification را از

نشان می دهد که با افزایش ولتاژ میزان جریان پتاسیمی رو به خارج در موشهای آلزایمری در مقایسه با کنترل کاهش یافته است. در همین راستا، Jun-fengHou و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثر آمیلوئید بتا ۱-۴۲ را بر رفتار کانالهای پتاسیمی در نورونهای کشت داده شده از طریق تکنیک whole cell patch clamp مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که در نورونهای آلوده به آمیلوئید بتا، جریان پتاسیمی کاهش یافته است [۲۰]. همچنین، chen و همکارانش مطرح کردند که آمیلوئید بتای خارج سلولی نیز جریان خروجی پتاسیم را در نورونهای هیپوکامپ در موش صحرایی کاهش داده و در نتیجه سبب افزایش تحریک پذیری در نورونها می شود [۶]. پتانسیل غشا و تحریک پذیری نورونها به مقدار بسیار زیادی وابسته به یون پتاسیم است به عنوان مثال جریان خروجی پتاسیم مسئول ایجاد رپلاریزاسیون غشا است. در مطالعات ذکر شده جریان خروجی پتاسیم در حضور آمیلوئید بتا دستخوش تغییر شد که با یافته ما مطابقت دارد. Chen و همکارانش همچنین گزارش کردند که آمیلوئید بتای خارج سلولی سبب افزایش جریان رو به داخل کلسیم در نورونهای هیپوکامپ موش صحرایی شده است. پیشنهاد شده است که افزایش کلسیم داخل سلولی القا شده توسط آمیلوئید بتا، می تواند شروع کننده اختلال عملکرد نورونی در سلولهای هیپوکامپ باشد [۶] بر اساس یافته های قبلی و مشاهدات ما، این احتمال وجود دارد که اثر آمیلوئید بتا بر کاهش جریان خروجی پتاسیم (outward current) در سمیت سلولی ایجاد شده در اثر این بیماری موثر باشد.

اطلاعات کمی از اثرات آمیلوئید بتای تجمع یافته در داخل سلول بر خصوصیات الکتروفیزیولوژیکی نورونها در دست می باشد. Jun-fengHou و همکارانش گزارش کردند که آمیلوئید بتا ۱-۴۲ داخل سلولی، پتانسیل استراحتی غشای سلول را در نورونهای انسانی کشت داده شده ($6/3 \text{ mV} \pm 35$) به طور معناداری در مقایسه با کنترل ($6/4 \text{ mV} \pm 77/5$) کاهش داده است [۲۰]. بر خلاف آن، نتایج مطالعه فعلی (شکل ۳) نشان داد پتانسیل معکوس در گروه آلزایمر تفاوت معنی داری با پتانسیل معکوس در گروه کنترل ندارد (پتانسیل معکوس در حقیقت نشاندهنده پتانسیلی از غشا می باشد که در آن میزان جریان خروجی و ورودی از

سالهای زیادی از مطرح شدن channelopathy نمی گذرد، با این وجود مشخص شده است که اختلال عملکرد کانالهای یونی در طیف وسیعی از بیماریها مانند صرع، آریتمی، دیابت و بیماریهای نورودژنراتیو نقش ایفا می کند. مطالعه حاضر اولین مطالعه ای است که رفتار بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی شناسایی شده در غشای داخلی میتوکندری را در شرایط بیماری آلزایمر از طریق تکنیک الحاق کانال به غشای دو لایه لیپیدی مورد بررسی قرار می دهد. بطور خلاصه، این بررسی نشان داد که خصوصیات رفتاری کانال پتاسیمی غشای داخلی میتوکندری در شرایط آلزایمر دستخوش تغییر شده است. این یافته پیشنهاد می کند که احتمالاً کانالهای مذکور در پاتوژنز بیماری آلزایمر درگیر می باشند. با این وجود، انجام مطالعات بیشتری در این زمینه ضروری به نظر می رسد. امید است که روشن شدن مکانیسمهای درگیر بتواند در یافتن راههای درمان بیماران در سطح سلول موثر باشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه و انستیتو پاستور ایران که در انجام قسمتی از اجرای طرح همکاری داشتند، تشکر بعمل می آید.

خود نشان خواهد داد. به نظر می رسد که اسیدآمینه های با بار منفی در مکان یاد شده، در پایدار شدن اتصال پلی آمینها و یون منیزیم با منفذ کانال از طریق یک واکنش الکترواستاتیک نقش دارند [۲۸]. با توجه به موارد ذکر شده، این احتمال وجود دارد که افزایش معنی دار جریان در ولتاژهای منفی در شرایط آلزایمر ناشی از تغییر احتمالی در ساختمان کانال مورد نظر باشد. اگرچه اظهار نظر قطعی در باره پیامدهای این تغییر رفتار کانال و نقش احتمالی آن در پاتوژنز بیماری مستلزم بررسی های بیشتر می باشد.

همچنین از نظر فارماکولوژیک هم، در بین کانالهایی که تاکنون در غشای داخلی میتوکندری یافت شده است، کانالهای K_{ATP} توسط افزایش ATP داخل سلولی (۲/۵ میلی مول) مهار و با کاهش آن فعال می شوند. همچنین ترکیبات سولفونیل اوره مانند گلی بن کلامید و 5-HD سبب مهار این کانالها می شوند [۲]. برای مهار کانالهای BK_{Ca} میتو پیتیدهای مهار کننده منفذ کانال از قبیل ایبریوتوکسین^۲ (IbTx) و کاریدوتوکسین^۳ (ChTx) با غلظت ۱۰۰ نانومولار استفاده می شود [۱۵، ۴۲]. در مطالعه حاضر همانطور که در شکل ۴ آمده است، فعالیت کانال مورد نظر هم در ولتاژهای منفی و هم مثبت در اثر 4-AP مهار شد. حالیکه به ATP، IbTx و ChTx پاسخی نداد (داده ها نشان داده نشد).

همچنین جهت تأیید خلوص نمونه میتوکندری، از تکنیک وسترن بلات و آنتی بادیهای اختصاصی اندامکهای داخل سلولی استفاده نمودیم و نشان دادیم سیتوکروم اکسیداز یا زیر واحد ۱- کمپلکس iv (cox1, complexIV-subunit1) فقط در نمونه میتوکندری حاصله حضور دارد در حالیکه استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی actin, calnexin, golgi و 58kDa مشخص کرد که اسکلت سلولی، شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی در مراحل ابتدایی تر استخراج خارج شده و در نمونه میتوکندری پایانی حضور ندارند که در حقیقت نشاندهنده خلوص بالای نمونه میتوکندری استخراج شده می باشد.

1. 5-hydroxydecanoic acid
2. Iberiotoxin
3. Charybdotoxin

References

- [1] Armstrong CA, Inactivation of potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J Gen Physiol* 54 (1969) 553-575.
- [2] Ashcroft FM, Gribble FM, New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. *Trends Pharmacol Sci* 21 (2000) 439-45.
- [3] Bednarczyk P, Barker GD, Halestrap AP, Determination of the rate of K⁺ movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777 (2008) 540-548.
- [4] Bianchi L, Roy ML, Taglialatea M, Lundegen DW, Brown AM, Ficker E, regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem* 271 (1996) 6114-6121.
- [5] Boyd-Kimball D, Sultana R, Faipoon H, Lynn BC, Casamenti F, Pepu G, Klein JB, Butterfield AA, Proteomic identification of proteins specifically oxidised by intra cerebral injection of amyloid β -peptide(1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132 (2005) 313-324.
- [6] Chen C, Beta-amyloid increase dendritic Ca²⁺ influx by inhibiting the A-type K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (2005) 1913-1919.
- [7] Crews L, Masliah E, Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19 (2010) R12-R20.
- [8] Da Cruz, Xenarios I, Langidge J, Vilbois F, Paron A P, Martinou JC, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 42 (2003) 41566-41571.
- [9] De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabò 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.
- [10] De Silva HA, Aronson JK, Grahame-smith DG, Jobst KA, Smith AD, Abnormal function of potassium channels in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 352 (1998) 1590-1593.
- [11] Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK, Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26 (2006) 9057-68.
- [12] Etcheberrigaray R, Ito E, Oka K, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL, Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8209-8213.
- [13] Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Jafari A, Sauve R, Salari S, Saghiri R, Electro-pharmacological profile of a mitochondrial inner membrane big-potassium channel from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 454-460.
- [14] Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Saghiri R, How many types of large conductance Ca⁽⁺²⁾-activated potassium channels exist in brain mitochondrial inner membrane: evidence for a new mitochondrial large conductance Ca⁽²⁺⁾-activated potassium channel in brain mitochondria. *Neuroscience* 199 (2011) 125-32.
- [15] Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39 (2001) 739-48.
- [16] Giese KP, Peters M, Vernon J, Modulation of excitability as learning and memory mechanism: a molecular genetics perspective. *Physiol Behav* 73 (2001) 803-810.
- [17] Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW, Small-conductance Ca⁺-activated channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26 (2006) 1844-1853.
- [18] Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager, Pavlov PF, Alafuzoff I, Leinonen V, Ito A, Winbald B, Glaser E, Ankarcrona M, The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Sci USA* 105 (2008) 13145-13150.
- [19] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T, ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352 (1991) 244-247.
- [20] Jung-Feng Hou, Jia Cui, Long-Chuan Yu, Yan Zhang, Intracellular amyloid induces impairments on electrophysiological properties of cultured human neurons. *Neurosci Lett* 462 (2009) 294-299.

- [21] Kicinska A, Swida A, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dolowy K, Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, ATP-sensitive Potassium Channel in Mitochondria of the Eukaryotic Microorganism *Acanthamoebacastellani*. *J Biol Chem* 282 (2007) 17433-441.
- [22] Knobloch M, Konietzko U, Krebs DC, Nitsch RM, Intracellular A β and cognitive deficits precede beta amyloid deposition in transgenic arc A β mice. *Neurobiol Aging* 28 (2007) 1297-1306.
- [23] 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.
- [24] Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Lett* 584 (2010) 2043-2048.
- [25] Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH, Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implication for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15 (2006) 1437-1449.
- [26] Matsuda H, Effects of external and internal K $^{+}$ ions on magnesium block of inwardly rectifying K $^{+}$ channels in guinea pig heart cells *J Physiol* 435 (1991) 83-99.
- [27] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC, Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. *J Phys Chem* 67 (1963) 534-535.
- [28] Oliver D, Baukrowits T, Fakler B, Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K $^{+}$ channels. *Eur J Biochem* 267 (2000) 5824-29.
- [29] Oliver D, Hahn H, Antz C, Interaction of permanent and blocking ions in cloned inward-rectifier K $^{+}$ channels. *Biophys J* 74 (1998) 2318-26.
- [30] Paulson JB, Ramsden M, Forster C, Sherman MA, McGowan E, Ashe KH, Amyloid plaque and neurofibrillary tangle pathology in a regulatable mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 173 (2008) 762-772.
- [31] Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LN, Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *FEBS J* 277 (2010) 1389-409.
- [32] Peixoto PM, Ryu SY, Kinnally KW, Mitochondrial ion channels as therapeutic targets. *FEBS Lett* 584 (2010) 2142-2152.
- [33] Piwonska M, Wilczek E, Szewczyk A, Wilczynski GM, Differential distribution of Ca $^{2+}$ -activated potassium channel beta4 subunit in rat brain: immunolocalization in neuronal mitochondria. *Neuroscience* 153 (2008) 446-460.
- [34] Pouloupoulou C, Markakis I, Davaki P, Tsaltas E, Rombos A, Hatzimanolis A, Vassilopoulos D, Aberrant modulation of a delayed rectifier potassium channel by glutamate in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37 (2010) 339-348.
- [35] Querfurth HA, Laferla F, Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362 (2010) 329-344.
- [36] Ramsden M, Plant LD, Webster NJ, Vaughan PFT, Henderson Z, Pearson HA, Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid β protein (1-40) on K $^{+}$ channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurons. *J Neurochem* 79 (2001) 699-712.
- [37] Rusznak Z, Bakondi G, Koszka L, Pocsai K, Diens B, Fodor J, Telek A, Gomczi M, Szucs G, Csernoch L, Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch* 452 (2008) 415-426.
- [38] Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F, Ca $^{2+}$ -activated K $^{+}$ channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 549-554.
- [39] Singleton WS, Gray Ms, Brown ML, White JL, Chromatographically homogeneous lecithin from EGG phospholipids. *J Am oil chem Soc* 42 (1965) 53-56.
- [40] Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Malie J, Adelman JP, Tzounopoulos T, Small conductance Ca $^{+}$ -activated channels modulates synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci* 22 (2002) 10163-10171.
- [41] Szabó I, Bock J, Grassmé 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 U S A* 105 (2008) 14861-6.
- [42] Szewczyk A, Kajma A, Malinska D, Wrzosek A, Bednarczyk P, Zabłocka B, Dołowy K, Pharmacology

- of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS Lett* 584 (2010) 2063-2069.
- [43] Wible BA, Taglialatea M, Ficker E, Brown AM, Gating of inwardly rectifying K⁺ channels localized to a single negatively charged residue. *Nature* 371 (1994) 246-249.
- [44] Wolfgang F, Graier M, Frieden M, Malli R, Mitochondria and Ca²⁺ signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* 455 (2007) 375-396.
- [45] Zhang W, Linden DJ, The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4 (2003) 885-900.

Archive of SID