فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۱)، ۸۰ – ۹۳
بهار ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

شواهدی حاکی از حضور یک کانال کاتیونی جدید در غشا داخلی میتوکندری مغز

جواد فحانیک بابائی[۱]، عادله جعفری[۱،۲]، افسانه الیاسی[۱،۲*]، 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: ۱۱ آذر ۹۱ پذیرش: ۱۶ اسفند ۹۱

چکیده

مقدمه: مطالعات ما و دیگران نشان می‌دهند که چندین کانال کاتیونی در غشای داخلی میتوکندری مغز موش صحرایی وجود دارد. در این مطالعه ما مشخصات تک کانال کاتیونی را در غشای داخلی میتوکندری مغز موش صحرایی با استفاده از الحاق کانال به داخل غشای دو لایه لیپیدی مصنوعی گزارش داده‌ایم.

روش ها: مغز موش صحرایی بالغ بعد از برداشتن، هموژنیزه و محلول آن در طی مراحل MSE– دیژیتونین، آب، و بیکربنات سدیم سانتریفیوژ و وزیکول های غشاء داخلی میتوکندری جدا گردید. فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ جهت تشکیل غشاء دو لایه لیپید استخراج گردید. این غشاء در منفذی به قطر 150 µm تشکیل شد. سیگنالهای ثبت تک کانال به میزان 1 kHz با فیلتر پایین گذر، فیلتر و با سرعت نمونه برداری 10 kHz ذخیره گردیدند. اطلاعات بر اساس Markov noise free single channel analysis با نرم افزار Pclamp 10 آنالیز گردیدند.

یافته ها: کانال کاتیونی با کنداکتانس ۹۳ پیکوسیمنس در شرایط غلظتی *trans* 200 mM KCl/*cis* 50 mM KCl مشاهده گردید. احتمال باز بودن کانال وابستگی به ولتاژ در محدوده ولتاژی ۴۰+ تا ۵۰– میلی‌ولت را نشان نداد. ویژگی بارز کانال، باز و بسته شدن‌های سریع آن بود. ۴– آمینوپیریدین در ولتاژهای مثبت و منفی سبب مهار کانال گردید.

نتیجه گیری: نتایج ما حضور کانال کاتیونی جدیدی را در میتوکندری سلول‌های مغزی نشان می‌دهد که تاکنون در خصوص حضور و خواص بیوفیزیکی آن در میتوکندری مغز گزارشی وجود نداشته است.

واژه‌های کلیدی: میتوکندری، غشاء دو لایه لیپیدی، 4-AP، کانال‌های کاتیونی میتوکندری

مقدمه

میتوکندری برای بسیاری از فرآیندهای سلولی وابسته به انرژی، ATP تولید می‌کند و به عنوان مرکز حیات سلول شناخته شده است. همچنین این ارگانل در طی فرآیندهایی مانند هایپوکسی و ایسکمی، تخریب نورونی و پیری با کاهش انرژی و تنظیم یونهای سیتوزولی، دارای نقش اساسی است [۵۰]. از اجزاء سازنده غشاء داخلی میتوکندری، کانال‌های یونی مانند کانال‌های پتاسیمی می‌باشند. این کانال‌ها نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند تنظیم pH [۱۶، ۵۱]، استرس‌های اکسیداتیو [۲، ۲۹]، تنظیم چرخه کلسیم سلولی و آپوپتوز [۵۰]، حفاظت سلولی [۲۹، ۳۱]، و در نهایت هدف و مقصد نهایی بسیاری از داروها می‌باشند [۳۵، ۳۶].

روش‌های مختلفی برای شناسایی این کانال‌ها در

* نویسندگان مسئول مکاتبات: af.eliassi@sbmu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Archive of SID
www.SID.ir

میتوکندری به کار رفته است مانند اندازه گیری جریان پتاسیمی در میتوکندری‌های استخراج شده [۲۰]، اندازه گیری تغییرات پتانسیل اکسایش- کاهش، اندازه‌گیری مستقیم جریان پتاسیمی با استفاده از الکترودهای انتخابی انتقال دهنده K^+ [۵، ۶، ۷، ۲۱، ۲۲]، ثبت جریان پتاسیمی از غشای داخلی میتوکندری با استفاده از تکنیک پچ‌کلمپ، قرار دادن پروتئین کانال یا وزیکول حاوی کانال در غشای دولایه مصنوعی، روش‌ها و تکنیک‌های مولکولی، فارماکولوژی و ایمونوهیستوشیمی [۴، ۳۲، ۵۲، ۵۳، ۵۶]. استفاده از این روش‌ها منجر به شناسایی و دسته بندی انواع کانال‌ها در غشای خارجی و داخلی میتوکندری شده است.

بر اساس استفاده از این تکنیک‌ها و یافته‌ها، تاکنون یک نوع کانال پتاسیمی به نام کانال یک سویه ساز رو به داخل (Kir) در غشای خارجی میتوکندری [۵۰] و پنج نوع کانال در غشای داخلی میتوکندری شناسایی شده که عبارتند از: کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP ($mitoK_{ATP}$) [۶، ۲۴]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکتانس بالا ($mitoBK_{Ca}$) [۱۷، ۱۸، ۴۲]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکتانس متوسط ($mitoIK_{Ca}$) [۱۴]، کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ $Kv_{1.3}$ ($mitoKv_{1.3}$) [۴۸، ۴۹]، و کانال پتاسیمی دو منفذی TASK-3 [۳۹] به نظر می‌رسد این کانال‌ها مشابه با کانال‌های پتاسیمی غشاء سلول نقش مهمی را در کنترل پایداری غشاءهای داخلی میتوکندری دارا باشند [۵۲].

کانال $mitoK_{ATP}$ اولین بار با استفاده از تکنیک پچ کلمپ در میتوکندری کبد موش صحرایی شناسایی گردید [۲۴]. سپس این کانال‌ها در قلب [۳۴] مغز [۳، ۱۵، ۲۸]، کلیه [۸]، عضله اسکلتی [۱۵]، لنفوسیت T انسان [۱۳] و حتی میتوکندری آمیب [۲۵] و گیاه [۳۳] نیز گزارش داده شد.

اولین مطالعه در میتوکندری سلول‌های مغزی با استفاده از تکنیک الحاق کانال به غشاء لیپیدی دولایه توسط Kulawiak و همکاران صورت گرفت و دو نوع کانال پتاسیمی با کنداکتانس های ۷۰-۹۰ و ۲۶۰-۳۲۰ پیکوسیمنس گزارش شد [۲۸]. در پژوهشی دیگر Choma و همکارانش این کانال را در سلول‌های مغزی مطالعه نمودند این کانال کنداکتانس ۲۱۹ پیکوسیمنس داشته و احتمال باز بودن آن ۰/۵ در ولتاژهای منفی و ۰/۲ در ولتاژهای مثبت بود، آنها همچنین با استفاده از برخی داروهای مهار کننده کانال K_{ATP} مانند داروی $ATP\text{-}Mg^{2+}$، 5-HD، HMR و مارگاتوکسین، خواص فارماکولوژیک این کانال را بررسی نمودند [۱۱].

بر اساس وابستگی به ولتاژ و کنداکتانس در سطح تک کانال، کانال‌های پتاسیمی حساس به کلسیم به سه گروه کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا (BK_{Ca})، با کنداکتانس متوسط (IK_{Ca}) و کنداکتانس پائین (SK_{Ca}) تقسیم می‌شوند [۴۶، ۵۵]. کانال‌های BK_{Ca} در غشاء داخلی میتوکندری نیز وجود دارند. اولین بار Siemen و همکاران در سال ۱۹۹۹ با استفاده از تکنیک patch-clamp، کانال پتاسیمی با کنداکتانس بالا که توسط Ca فعال می‌شود (کانال mitoBK) را در سلول‌های گلیومای کشت شده LN229 انسان شناسایی نمودند [۴۲]. با استفاده از ابزارهای مورفولوژیک حضور کانال BK با کنداکتانس بالا در غشاء داخلی میتوکندری مغز نیز نشان داده شده است [۳۷]. این کانال نسبت به توکسینهای ایبروتوکسین و کریبدوتوکسین اثرات متفاوتی دارند. گروه Kunz و همکاران نشان دادند که این کانال‌ها توسط کریبدوتوکسین مهار می‌گردند [۴۵]، از طرفی نتایج قبلی آزمایشگاه ما، منجر به شناسایی کانال $mitoBK_{Ca}$ در مغز شد که حساس به ایبروتوکسین و غیر حساس به کریبدوتوکسین شده بود [۱۷] . همچنین در آزمایش دیگری حضور $mitoBK_{Ca}$ را گزارش نمودیم که به ATP نیز حساس بود [۱۸]. این تنوع حساسیت به توکسینها ناشی از تفاوت زیر واحدهای تنظیمی کانال است که منجر به اختلاف خواص بیوفیزیکی و فارماکولوژی کانال‌های BK_{Ca} می‌شود. ثابت شده که کانال $mitoBK_{Ca}$ نقش مهمی را در حفاظت قلبی و مغزی در برابر آسیب‌هایی مانند ایسکمی بر عهده دارند [۹، ۴۱، ۴۵]. در سال ۲۰۰۹ خواص کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس متوسط (mitoIKca) در غشاء داخلی میتوکندری جدا شده از دودمان سلولی تومور کلون انسان HCT116 با استفاده از تکنیک پچ کلمپ بر روی میتوپلاستها تعیین گردید [۱۴]. این کانال در انواع دیگر سلول‌ها از جمله رده سلول‌های HeLa از آدنوکارسینومای سرویکس انسانی و فیبروبلاست های جنین موش شناسایی

Archive of SID
www.SID.ir

گردیده است [۴۰]. فعالیت کانال در سطح پایین کلسیم به طور کامل متوقف شده و مهارکننده های کانال $K_{ca}3.1$ غشای پلاسمایی مانند کلوتریمازول و TRAM-34 در غلظت نانومولار فعالیت کانال را مهار نمود [۱۴]. علاوه بر این، موقعیت این کانال توسط ابزارهای وسترن بلات و فلورسانت نیز تایید گردیده است. این کانال نقشی همانند کانال‌های $mitoBK_{Ca}$ و $mitoK_{ATP}$ در مرگ سلولی داشته و برای تایید این نقش از داروی TRAM-34 استفاده گردید و نشان داده شد که در حضور این دارو سلول‌های مورد مطالعه القای مرگ سلولی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند [۴۰]. تاکنون کانال مشابهی با $mitoIK_{ca}$ در بافت مغز گزارش نشده است.

در این بررسی رفتار بیوفیزیکی تک کانال کاتیونی غشاء داخلی میتوکندری سلول‌های مغز را که متفاوت با سایر کانال‌های کاتیونی گزارش شده در میتوکندری مغز می‌باشد را با استفاده از تکنیک الحاق کانال به داخل غشاء لیپیدی دو لایه، مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در آزمایش عبارت بودند از: کلرید پتاسیم، دیژیتونین، سوکرز، D–مانیتول، بیکربنات سدیم، هیپس، تریس اسیدی، سرم آلبومین گاوی (BSA[1])، 4-AP[2]، ATP، TEA[3]، EGTA و ناگاریز از شرکت سیگما، n– دکان از شرکت مرک خریداری شدند. محلول‌های مورد نیاز در استخراج میتوکندری عبارتند از: محلول MSE (225 mM مانیتول، 75 mM سوکرز، 5 mM هیپس، 1 mM EGTA, 1 mg/ml BSA pH 7.4)، محلول -MSE– ناگاریز (محلول ۰/۵ ٪ ناگاریز در محلول MSE)، محلول MSE – دیژیتونین (محلول ۰/۲ ٪ دیژیتونین در محلول MSE).

در استخراج میتوکندری از مغز، نمونه های میتوکندری مورد استفاده با روش Kuddin و همکاران استخراج گردیدند [۲۷] دو موش بزرگ آزمایشگاهی (۱۸۰ تا ۲۰۰ گرمی) توسط کلروفرم بیهوش و سر آنها بریده شده، مغز آنها را فوراً خارج و به محلول سرد MSE منتقل و چند مرتبه شستشو داده شدند. پس از اضافه کردن ۱۰ میلی‌مول محلول MSE– ناگاریز، به آن با هموژنایزر الکتریکی در ۶۰۰ units/s هموژنیزه شدند. در ادامه ۲۰ میلی مول محلول سرد MSE به آن اضافه شده و هموژن در g × ۲۰۰۰ برای ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول را برداشته و در g × ۱۲۰۰۰ برای ۹ دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای بدست آوردن سیناپتوزومها، رسوب حاصل را با ۱۰ میلی‌مول محلول MSE– دیژیتونین سرد حل نموده و محلول را به ظرف هموژنیزه کننده منتقل و ۸–۱۰ مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی بدست آید. سرانجام سوسپانسیون در g ×۱۲۰۰۰ برای ۱۱ دقیقه سانتریفیوژ و ویزیکولهای حاصل در µl ۳۰۰ محلول MSE حل شده تا غلظت حدود mg/ml ۲۰ پروتئین بدست آید.

برای جدا سازی غشاء داخلی میتوکندری از روش Da Cruz و همکاران استفاده شد [۱۲]. بطور خلاصه، میتوکندری ها در غلظت mg/ml ۵ در آب مقطر سوسپانسیون شده و برای ۲۰ دقیقه روی یخ تکان داده شدند. این ترکیب ۲۰ مرتبه با هموژنایزر دستی هموژنیزه و دو مرتبه در g ×۱۲۰۰۰ برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای بدست آمده با ۰/۱ مولار بیکربنات پتاسیم (pH 11.5) در غلظت نهایی mg/ml ۰/۵ به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. غشاء داخلی میتوکندری با سانتریفیوژ در g × ۱۰۰۰۰۰ برای ۳۵ دقیقه به صورت ویزیکول بدست آمد. نمونه‌ها جهت بررسی وسترن بلات و الکتروفیزیولوژی در دمای ۷۰– درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

جهت تشکیل غشاء دولایه لیپیدی (BLM) از یک یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می‌گردد. در این پروژه جهت تشکیل BLM از فسفاتیدیل کولین استفاده شد. فسفاتیدیل کولین (PC) از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکاران در سال ۱۹۶۵ استخراج گردید [۴۳]. 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

1. Bowine serum albumin
2. 4- Aminopyridin
3. Tetraethylammonium

Archive of SID
www.SID.ir

فاز ثابت آن، آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن متانول و کلروفرم بود، جدا گردید. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC [1] مورد سنجش قرار گرفت.

برای تشکیل غشاء از روش Muller و همکاران استفاده شد [۳۰]. در این روش دو محفظه سیس (فضای سیتوپلاسمی) و ترانس (فضای لومنی) از جنس تفلون که دارای محلول‌های کلرید پتاسیم با غلظت‌های (200/50 mM KCl cis/ trans) بودند، استفاده شد. در دیواره محفظه ترانس منفذی به قطر ۲۵۰ µm تعبیه شده بود. غشاء دو لایه لیپیدی توسط قرار دادن محلول لیپیدی فسفاتیدیل کولین (با غلظت ۲۵ mg/ml در حلال n–دکان) با استفاده از سوزن استیل به قطر ۱۵۰ µm بر روی منفذ تشکیل گردید. تشکیل غشاء توسط استرئومیکروسکوپ مشاهده و ظرفیت خازنی آن به طور معمول بین ۲۰۰ pF تا ۳۰۰ توسط آمپلی فایر اندازه گیری گردید. جهت تنظیم pH محلول‌های کلرید پتاسیم از هیپس (1 mM) و تریسمای بازی (1 M) استفاده شد.

جهت ثبت الکتروفیزیولوژی، وزیکولهای استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری، توسط سوزن استیل به قطر ۱۵۰ میکرومتر با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می‌شد. جریان عبوری از تک کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری می‌گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال می‌شد و محفظه ترانس گراند می‌گردید. اتصالات الکتریکی دو محفظه توسط الکترودهایی از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمکی/آگار (۳مولار KCl) با دستگاه آمپلی فایر برقرار می‌گردید. تمام ثبت‌ها در 1 kHz با استفاده از یک فیلتر پایین گذر ۴ پل بسل و با سرعت نمونه برداری ۱۰ kHz (طبق پروتکل معمول ثبت از تک کانال) نمونه برداری و توسط دستگاه ثبت (شرکت Axon) به کامپیوتر منتقل و ذخیره می‌گردیدند. جهت آنالیز از نرم افزار Pclamp 10 (شرکت Axon) استفاده گردید.

در روش‌های تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، ساده‌ترین حالت حضور یک وضعیت بسته و یک وضعیت باز می‌باشد. ارتفاع یا آمپلی تود بین این دو وضعیت نشان دهنده میزان عبور جریان از درون کانال بر اساس پیکو آمپر (pA) می‌باشد (شکل۲). متوسط میزان جریان عبوری توسط رسم هیستوگرام بیان شد (شکل۳). کنداکتانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ–جریان محاسبه گردید. احتمال باز بودن کانال [2] (P_o) از طریق به کار گیری الگوریتم‌های استاندارد تعیین رخدادها در Pclamp10، بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی صورت گرفت. P_o از روی قطعات یک دقیقه‌ای در ولتاژهای معین محاسبه گردید (جدول ۱).

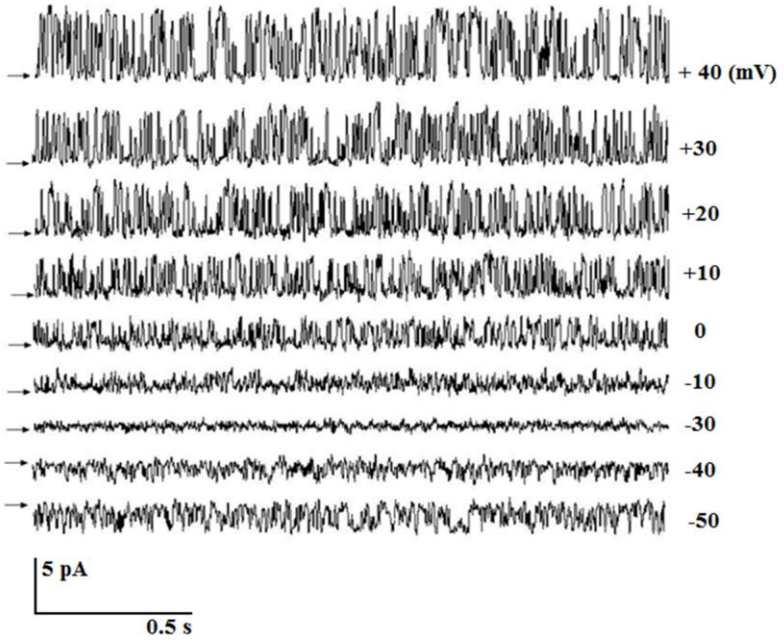
یافته ها

خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال کاتیونی غشاء داخلی میتوکندری مغز: فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکول‌های غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی در محیط غیر همگون کلرید پتاسیم (200/50 mM KCl cis/ trans) ثبت گردید. در ۱۰٪ از کوشش‌ها، نیم تا ده دقیقه بعد از الحاق وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی کانال مشاهده گردید. پس از مشاهده فعالیت کانال، جریان‌های عبوری از کانال در ولتاژهای مختلف در مدت زمان‌های معینی (حدود یک دقیقه) ثبت می‌گردید. آزمایش‌های ما حضور سه نوع کانال پتاسیمی شامل کانال پتاسیمی حساس به ATP (K_{ATP})، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم (BK_{Ca}^{2+}) [۱۷] و کانال پتاسیمی حساس به کلسیم و ATP (BK_{Ca}^{+2} – ATP sensitive) [۱۸] را نشان داد که دارای کنداکتانس‌ها و خواص بیوفیزیکی مختلفی بودند. کانال مورد مطالعه در مقایسه با سه کانال‌ها پتاسیمی دیگر میتوکندری دانسیته کمتری داشته و تعداد دفعات مشاهده آن نیز کمتر بوده است. (در حدود ۵ تا ۷ درصد نسبت به سایرین). شکل ۱ جریان‌های ثبت شده در ولتاژهای مختلف غشاء، از ۴۰+ تا ۵۰– میلی ولت را نشان می‌دهد. مطابق این شکل ارتفاع جریان در ولتاژهای مثبت افزایش یافته و در ولتاژهای منفی به سمت ولتاژ ۳۰– میلی ولت (پتانسیل معکوس) ارتفاع جریان به صفر نزدیک شده و در ولتاژهای منفی‌تر از پتانسیل معکوس، مجدداً افزایش ارتفاع مشاهده می‌شود.

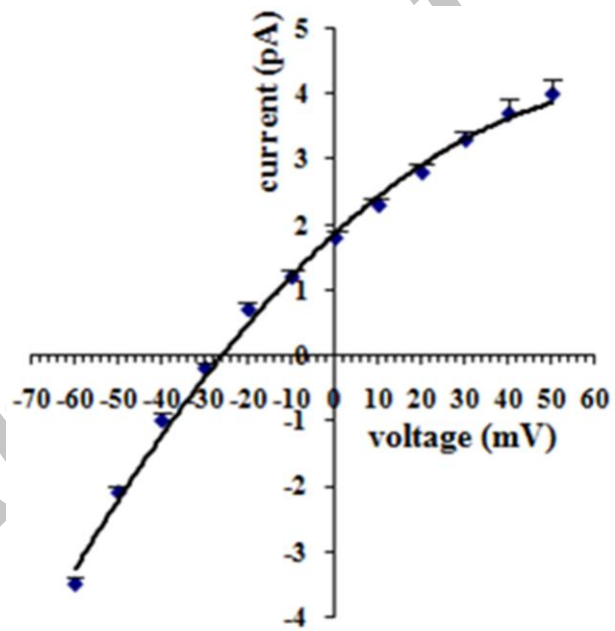
1. Thin Layer Chromatography

2. Open probability

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- نمونه ای از جریان‌های ثبت شده از تک کانال، منحنی ولتاژ- جریان و احتمال باز بودن کانال به عنوان تابعی از ولتاژ. جریان‌های تک کانـال در شـرایط غلظتـی ۲۰۰/۵۰ mM KCl cis/ trans در محدوده ولتاژی ۴۰+ تا ۵۰- میلی‌ولت ثبت شده‌اند. پیکان‌ها حالت بسته کانال را نشان می‌دهند.



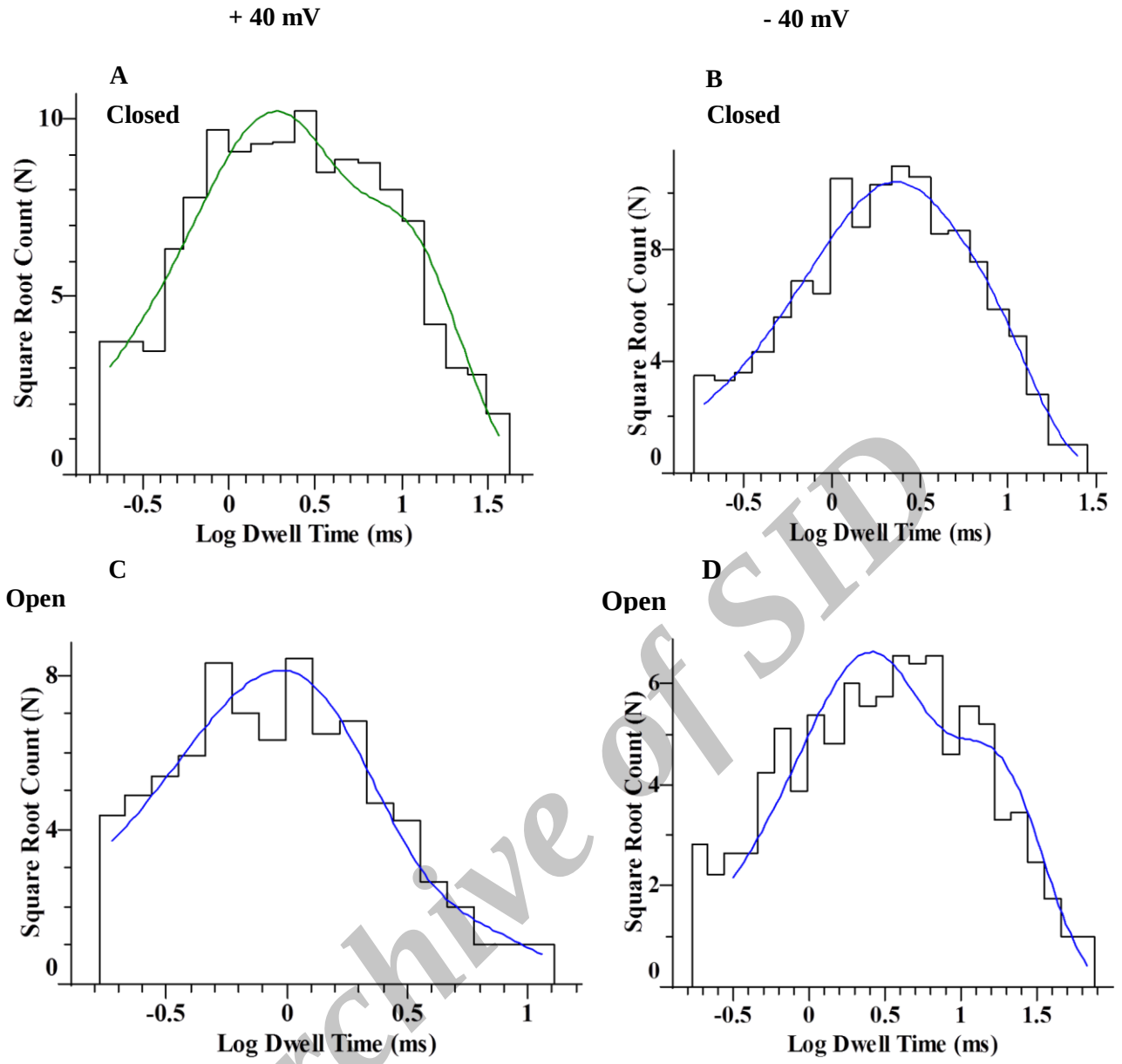
شکل ۲- ارتباط جریان- ولتاژ، شیب خط معادل کنداکتانس کانال و برابر ۹۳ پیکوسیمنس در ولتاژهای ۴۰ + تا ۶۰- میلی ولت.

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

Voltage (mV)	-50	-40	-10	0	+10	+30	+40
Open probability (Po)	0.5 ±0.02	0.4 ±0.06	0.5 ±0.07	0.5 ±0.04	0.4 ±0.04	0.3 ±0.02	0.4 ±0.05

Measurements were carried out under asymmetrical 200 mM KCl cis/50 mM KCl *trans* condition. Data points are mean ± SE from 6 experiments

www.SID.ir



شکل ۳- منحنی‌های بررسی توزیع زمانی وضعیت بسته و باز تک کانال در ولتاژهای منفی و مثبت. توزیع‌های زمانی وضعیت بسته، دو جزء توانی را در ۴۰+ mV (A) و دو جزء توانی را در ۴۰- mV (B) و توزیع‌های زمانی وضعیت باز، یک جزء توانی را در ۴۰+ mV (C) و یک جزء توانی را در ۴۰- mV نشان می‌دهد (D).

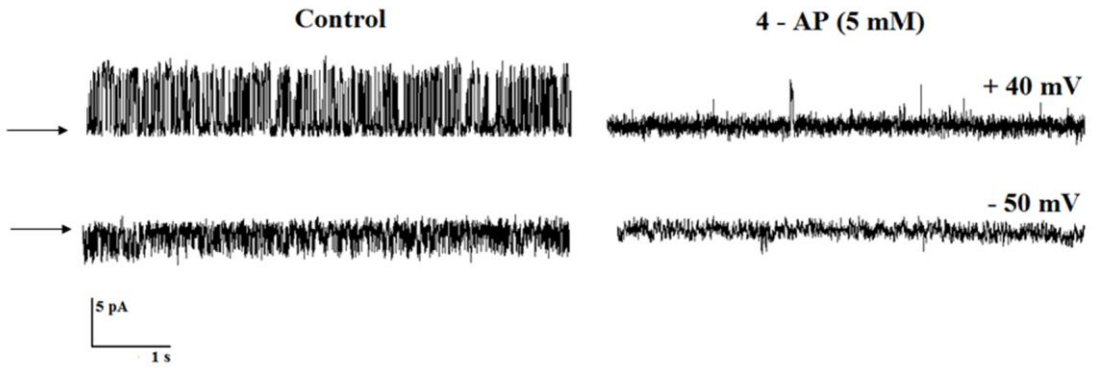
در ولتاژهای مثبت‌تر از پتانسیل معکوس، جریان پتاسیمی بصورت رو به بالا و مثبت ثبت گردیده که ناشی از حرکت یون‌ها در جهت گرادیان غلظتی از محفظه سیس به ترانس است. در حالی که در ولتاژ منفی‌تر از ۳۰- میلی ولت جریان‌های رو به پایین ثبت گردیده که نشانه حرکت رو به داخل یا به عبارتی حرکت یون پتاسیم از محفظه ترانس به محفظه سیس می‌باشد. هم چنین شکل ۱ حاکی از آن است که احتمال باز بودن کانال در محدوده ولتاژهای مورد استفاده (۵۰- تا ۵۰+ میلی ولت) وابستگی به ولتاژ ندارد.

در شکل ۲ نمودار جریان- ولتاژ برای وضعیت کاملاً باز نمایش نشان داده شده است. رابطه جریان-ولتاژ در محدوده ۵۰+ تا۶۰- میلی ولت برای کانال به صورت تقریباً خطی بوده و مختصر افزایش جریانی را در محدوده ۱۰- تا ۶۰- میلی ولت (inward rectification) نشان می‌دهد. شیب منحنی در محدوده ۱۰- تا ۶۰- میلی ولت که نشان دهنده کنداکتانس کانال است برابر با ۹۳ پیکوسیمنس است.

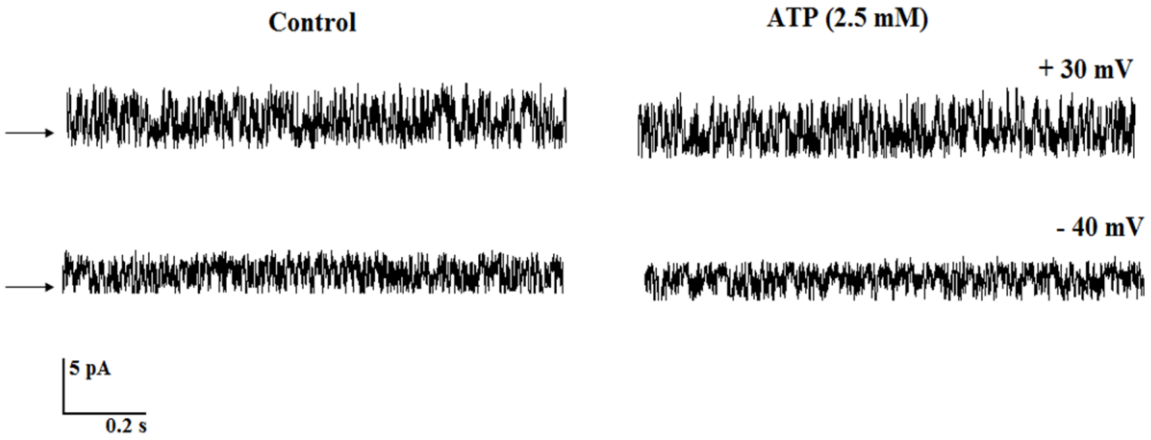
همچنین در شکل نشان داده شده است که پتانسیل معکوس[1] برای وضعیت هدایتی کانال ۲۷- میلی ولت می‌باشد.

1. Reverse potential

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤- اثر 4-AP، به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال‌های پتاسیمی بر روی فعالیت کانال $mitoK_{ATP}$. ثبت از تک کانال تحت شرایط کنترل (200/50 mM KCl; cis/trans) و بلافاصله بعد از افزودن 4-AP با غلظت 10 mM در ناحیه سیتوپلاسمی (cis) (n = 4) در ولتاژ 50 mV– و 40 mV+. پیکان حالت بسته کانال را نشان می‌دهد.



شکل ٥- اثر ATP، به عنوان مهار کننده انتخابی کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP (mitoKATP) بر روی فعالیت کانال ثبت از تک کانال تحت شرایط کنترل 200/50 mM KCl cis/ trans و بلافاصله بعد از افزودن ATP با غلظت ۲/۵ میلی مولار در ناحیه سیتوپلاسمی (cis) (n = 4) در ولتاژ ۳۰+ و ۴۰– میلی‌ولت. پیکان حالت بسته کانال را نشان می‌دهد.

بر اساس رابطه گلدمن–هوچکینز–کتز $E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_k[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$ نسبت نفوذ پذیری کانال در مورد یون‌های پتاسیم به کلر بالاتر از ۲۵ (P_K/P_{Cl} >25) در شرایط یونی $\frac{[k]i}{[k]o} = \frac{200\ mM}{50\ mM}$ است. بنابراین، می‌توان بیان نمود که کانال برای عبور کاتیون انتخابی بوده و یک کانال کاتیونی است.

اثر ولتاژ بر روی ویژگی‌های باز و بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال (open probability; P_o) در ولتاژهای مختلف در محیط (200/50 mM KCl cis/ trans) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ما نشان داد که هیچ‌گونه وابستگی به ولتاژ و تأثیر آن در باز و بسته شدن کانال وجود ندارد. جدول ۱، میزان احتمال باز بودن کانال را در ولتاژهای مختلف نشان می‌دهد.

جزئیات بیشتر اثر ولتاژ روی نحوه باز و بسته شدن تک کانال توسط بررسی توزیع‌های زمانی (dwell time) distributions حالت‌های باز و بسته کانال در دو ولتاژ مثبت و منفی مورد مطالعه قرار گرفت. در هیستوگرام های توزیع زمانی بسته، فواصل زمانی وضعیت بسته به زمان‌هایی اطلاق گردیده که در آن میزان جریان صفر و یا ۰/۳± پیکو آمپر بوده است. در هیستوگرام های باز فواصل زمانی باز به زمان‌هایی اطلاق گردیده که در آن میزان جریان در حداکثر مقدار خود بوده است. مثال‌هایی از این هیستوگرام‌ها برای کانال‌ها در شکل ۳ برای ولتاژ های ۴۰+ و ۴۰– میلی ولت نشان داده شده است. توزیع‌های زمانی وضعیت بسته، دو جزء توانی را در ۴۰+ mV با ثوابت زمانی $\tau_{closed2} \sim 9$ ms; $\tau_{closed1} \sim 1.5$ ms (شکل ۳A) و دو جزء توانی را در

www.SID.ir

mV ۴۰- با ثوابت زمانی $\tau_{closed1} \sim 2$ ms ;$\tau_{closed2} \sim 14$ m (شکل 4B) نشان می‌دهد. توزیع زمانی باز، با یک تابع توانی منطبق گردیده است و همان‌طور که شکل D و 3C نشان می‌دهد توزیع‌های زمانی وضعیت باز، یک جزء توانی را در mV ۴۰+ با ثابت زمانی $\tau_{open} \sim 3$ ms (شکل 3C) و یک جزء توانی را در mV ۴۰- با ثابت زمانی $\tau_{open} \sim 2$ ms نشان می‌دهد (شکل 3D). این نتایج نشان می‌دهد اثر معنی‌داری از ولتاژ بر روی توزیع زمانی حالت‌های باز و بسته کانال وجود ندارد.

4-AP به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال پتاسیمی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ اثر افزودن 4-AP را در محفظه cis در غلظت ۱۰ میلی‌مول را بر روی فعالیت کانال در دو ولتاژ ۴۰ + و ۵۰- میلی‌ولت را نشان می‌دهد. میزان جریان برای ولتاژ ۴۰ + میلی‌ولت قبل از اضافه کردن 4-AP برابر با ۱± ۶ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۴ (شکل ۴) و برای ولتاژ ۵۰- میلی‌ولت میزان ۰/۵± ۳ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۵ بود (شکل ۴). 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.

ATP به عنوان مهار کننده کانال پتاسیمی $mitoK_{ATP}$ بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۶ اثر افزودن ATP در محفظه cis در غلظت ۲/۵ میلی مولار را بر روی فعالیت کانال در دو ولتاژ ۳۰+ و ۴۰- میلی‌ولت نشان می‌دهد. میزان جریان برای ولتاژ ۳۰+ میلی ولت قبل از اضافه کردن ATP برابر با ۱± ۴ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۳ (شکل ۵) و برای ولتاژ ۴۰- میلی‌ولت میزان جریان ۰/۵± ۲ پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۴ بود (شکل ۵). پس از اضافه کرد ATP تغییری در فعالیت کانال مشاهده گردید و احتمال باز بودن کانال در هر دو ولتاژ بدون تغییر ثابت ماند.

بحث

کانال‌های پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری دارای نقش‌های مهمی می‌باشند. برای مثال، تنظیم چرخه پتاسیم توسط این کانال‌ها با جلوگیری از افزایش بیش از اندازه حجم ماتریکس میتوکندری موجب حفظ تمامیت ساختاری این اندامک می‌گردد [۲۳]. این تنظیم می‌تواند پیام رسانی کلسیم درون سلولی را توسط میتوکندری یا شبکه آندوپلاسمی مرتبط با آن تحت تأثیر قرار دهد [۲۱، ۳۸، ۴۷]. هم چنین ممکن است در شرایط فعالیت نورونی و یا شرایط پاتولوژیک مانند ایسکمی یک افزایش خارج سلولی یون پتاسیم رخ داده و منجر به اختلال عملکرد نورون گردد و این در حالی است که سلول‌های آستروسیت، این یون‌ها را از طریق غشای پلاسمایی وارد میتوکندری‌های خود نموده و این اثر مخرب را به نوعی تعدیل می‌نمایند [۲۶]. از دیگر اعمال مهم کانال‌های پتاسیمی می‌توان به نقش آنها در فرآیند حفاظت سلولی و همچنین آپوپتوز اشاره نمود. تاکنون کانال‌های پتاسیمی چندی در غشای داخلی میتوکندری یافت شده‌اند که از یک طرف در حفاظت سلولی (مانند کانال‌های $mitoK_{ATP}$ و $mitoBK_{Ca}$) و از طرف دیگر در فرآیند آپوپتوز (مانند کانال‌های $KV_{1.3}$ و $mitoBK_{Ca}$) نقش مهمی را ایفا می‌نمایند [۱۰].

در این مطالعه، ما موفق به شناسایی خواص بیوفیزیکی و رفتار کینتیکی یک کانال کاتیونی جدید در غشا داخلی میتوکندری مغز گردیدیم. نتایج ما یک کانال کاتیونی غیر وابسته به ولتاژ با کنداکتانس ۹۳ پیکوسیمنس را در شرایط (200/50 mM KCl cis/ trans) با یک منحنی نسبتاً خطی جریان- ولتاژ را نشان می‌دهد. منحنی جریان- ولتاژ در شکل ۲، بیان می‌کند که پتانسیل معکوس شدن کانال نزدیک به ۳۰- میلی‌ولت می‌باشد که بسیار نزدیک به پتانسیل تعادلی نرنست برای پتاسیم در شرایط آزمایش ما (E_k = -۳۴ mV) می‌باشد. این مشاهده به وضوح نشان می‌دهد، جریان ثبت شده از فعالیت کانال که در شکل ۱ نمایش داده شده، یک کانال نفوذپذیر به کاتیون می‌باشد، در حالی‌که طبق رابطه نرنست، پتانسیل معکوس شدن برای جریان کلر برابر با ۳۴+ میلی‌ولت می‌باشد. همچنین نتایج ما حاکی از عدم وابستگی به ولتاژ احتمال باز بودن کانال در محدوده ولتاژی مورد آزمایش است و توزیع زمانی بسته بودن و باز بودن کانال با ثوابت زمانی یکسان در ولتاژهای ۴۰+ و ۴۰- میلی ولت تایید کننده عدم وابستگی به ولتاژ کانال در محدوده ولتاژی ۴۰± میلی‌ولت است. نتایج ما اثر مهار ۴- آمینوپیریدین و عدم تأثیر ATP را نیز نشان می‌دهد. تاکنون کانال‌های پتاسیمی

Archive of SID
www.SID.ir

مشابه با کانال‌های پتاسیمی در غشاء داخل میتوکندری دیده شده است. این کانال‌ها شامل کانال پتاسیمی حساس به ATP ($mitoK_{ATP}$) [۲۴]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکتانس بالا ($mitoBK_{Ca}$) [۴۲]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکتانس متوسط [۱۴]، کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ [۴۸] و کانال پتاسیمی دو منفذی (mitoTASK) [۳۹] می‌باشند. مطالعات اخیر ما حاکی از حضور یک کانال جدید پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکتانس بالا می‌باشد [۱۷، ۱۸] مقایسه رفتاری بیوفیزیکی کانال گزارش شده در مطالعه حاضر با مطالعات گذشته حاکی از حضور یک کانال جدید می‌باشد. منحنی نسبتاً خطی جریان- ولتاژ در مطالعه حاضر، برای کانال‌های ($mitoK_{ATP}$) [۲۴] و کانال پتاسیمی حساس به کلسیم [۴۲] نیز گزارش شده است. هم چنین مطالعات قبلی ما، که مطالعه حاضر در ادامه آن می‌باشد یک رابطه خطی بین منحنی جریان- ولتاژ در کانال ($mitoK_{ATP}$) (در حال چاپ در مجله فیزیولوژی- فارماکولوژی)، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم و ATP [۱۸] و غیر حساس به ATP [۱۷] را در غشاء داخلی میتوکندری مغز نشان می‌دهد. مطالعات ما، کنداکتانس کانال $mitoK_{ATP}$ را ۱۴۳ پیکوسیمنس (مقاله در حال چاپ در جمله فیزیولوژی- فارماکولوژی) و مطالعات Choma و همکاران [۱۱] میزان آن را ۱/۵ ± ۲۱۹ پیکوسیمنس نشان داد که این آزمایشات به ترتیب در محیط‌های 250/50 mM KCl cis/ trans و 50/450 mM KCl cis/ trans انجام شده است. هم چنین، کنداکتانس کانال پتاسیمی حساس به کلسیم در غشاء داخلی میتوکندری سلول‌های گلیوما با تکنیک پچ‌کلمپ برابر با ۱۸ ± ۲۹۵ [۴۲]، در مغز با تکنیک الحاق کانال به داخل غشا به دو لایه لیپیدی در شرایط 50/450 mM KCl cis/ trans برابر با ۲۶۵ پیکوسیمنس [۴۵] و در کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP و غیر حساس به ATP در مطالعه قبلی ما به ترتیب ۵۶۵ پیکوسیمنس [۱۸] و ۲۱۱ پیکوسیمنس [۱۷] در شرایط 200/50 mM KCl cis/ trans بود.

مطالعه حاضر، کنداکتانس کانال را ۹۳ پیکوسیمنس نشان می‌دهد که با کنداکتانس کانال‌های $mitoK_{ATP}$ و $mitoBK_{Ca}$ مغز که در آزمایشگاه ما و دیگران گزارش شده متفاوت است. در خصوص چگونگی باز و بسته شدن کانال (Channel gating) و مقایسه آن با سایر کانال‌های پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری مغز، مطالعات Choma و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که $mitoK_{ATP}$ مغز در محدودهٔ ولتاژی ۱۰۰+ تا ۷۰- میلی ولت به صورت وابسته به ولتاژ عمل کرده و احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای منفی، بیشتر از ولتاژهای مثبت است به نحوی که میزان احتمال باز بودن کانال در ۶۰- میلی‌ولت ۰/۵ و در ولتاژ ۶۰ + میلی‌ولت نزدیک به ۰/۲ است [۱۱]. همین مطالعه نشان می‌دهد که توزیع زمانی حالت باز کانال از یک تابع نمایی در دو ولتاژ ۳۰- و ۳۰+ میلی ولت با ثوابت زمانی ۲۵ و ۱۶ میلی ثانیه تبعیت می کند و حالت بسته کانال درهمان محدودهٔ ولتاژ از یک تابع نمایی با ثابت زمانی ۴۸ میلی ثانیه در ولتاژ ۳۰+ میلی ولت و ۴۴ میلی ثانیه در ولتاژ ۳۰- میلی‌ولت تبعیت می‌کند. مطالعات قبلی ما نشان داد که کانال $mitoK_{ATP}$ مغز در محدودهٔ ولتاژ ۴۰- و ۴۰+ میلی ولت، توزیع زمانی کانال در وضعیت باز از دو تابع نمایی با ثوابت زمانی ۲ و ۱۰ میلی ثانیه تبعیت می‌کند که وابستگی به ولتاژ ندارد اما توزیع زمانی وضعیت بسته کانال در ولتاژ ۴۰+ میلی‌ولت دارای یک جزء نمایی با ثابت زمانی ۴/۵ میلی ثانیه و دو جزو نمایی در ۴۰- میلی ولت با ثوابت زمانی ۱/۵ و ۱۲ میلی ثانیه است (مقاله در حال چاپ در جمله فیزیولوژی- فارماکولوژی). به عبارت دیگر، کانال $mitoK_{ATP}$ در مطالعه ما، نشان داد دارای فعالیت وابسته به ولتاژ بوده و احتمال باز بودن در ولتاژهای مثبت، بالا و در ولتاژهای منفی با ایجاد شدن یک وضعیت بسته شدن نسبتاً طولانی در کانال، احتمال باز بودن کاهش می‌یابد. در خصوص کانال $mitoBK_{Ca}$ مطالعه siemmen و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر روی میتوکندری سلول‌های گلیوما، نشان داد که در شرایط مشابه با شرایط آزمایش‌های ما (غلظت کلسیم 10 mM~)، احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مثبت، ۰/۹ و در ولتاژهای منفی تا ۶۰- میلی‌ولت، میزان آن به ۰/۱ نزدیک می‌گردید [۴۲]. هم چنین، مطالعات (skaleska) و همکاران (۲۰۰۹) بر روی میتوکندری مغز، وابستگی به ولتاژ کانال $mitoBK_{Ca}$ را توضیح می‌دهد. آنها نشان دادند توزیع زمانی وضعیت باز کانال در ۹۰ میلی‌ولت برابر با ۱ میلی ثانیه و در ۱۰- میلی ولت برابر با ۱۰ میلی ثانیه بوده و توزیع زمانی وضعیت بسته کانال در ۹۰ میلی ولت برابر با ۱ میلی ثانیه و در ۱۰- میلی ولت برابر

www.SID.ir
Archive of SID

با ۶/۲ میلی ثانیه است [۴۵]. به عبارت دیگر این نتایج نشان می‌دهد که در ولتاژهای مثبت‌تر از ولتاژ معکوس شدن، کانال عمدتاً در وضعیت باز به سر می‌برد و در ولتاژهای منفی بسته می‌باشند. مطالعات اخیر ما نیز که به موازات مطالعه حاضر صورت می‌گرفت نشان داد که کانال پتاسیمی حساس به کلسیم و غیر حساس به ATP [۱۸] وابسته به ولتاژ بوده و در ولتاژ ۵۰- میلی ولت احتمال آن ۰/۵ و در ولتاژ ۴۰+ میلی‌ولت، احتمال باز بودن کانال به ۰/۹ می‌رسد. آنالیز توزیع زمانی در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که وضعیت بسته کانال کاتیونی، از دو تابع نمایی با ثوابت زمانی ۱/۵ و ۹ میلی ثانیه در ۴۰+ میلی ولت و دو تابع نمایی با ثوابت زمانی ۲ و ۱۴ میلی ثانیه در ۴۰- میلی ولت تبعیت می‌کند، در حالی که تعداد حالت‌های باز کانال از یک تابع نمایی در ولتاژهای ۴۰- و ۴۰+ میلی ولت با ثوابت زمانی حدود ۳ میلی ثانیه تبعیت می‌نماید (شکل۴). این نتایج تأییدی است بر رفتار غیر وابسته به ولتاژ کانال در محدودهٔ ولتاژی ۴۰± میلی ولت است.

از نظر خصوصیات فارماکولوژیک، کانال‌های K_{ATP} توسط افزایش ATP داخل سلولی (۲/۵ میلی مول) مهار و با کاهش آن فعال می‌گردند. هم چنین ترکیبات سولفونیل اوره مانند گلیبن کلامید و تولبوتامید با اتصال به زیر واحدهای سولفوفیل اوره، ساختمان کانال K_{ATP} سبب مهار کانال می‌گردند [۱]. Choma و همکاران نشان دادند که کانال پتاسیمی ۲۱۹ پیکوسیمنس موجود در غشا داخلی میتوکندری مغز توسط ATP مهار می‌گردد [۱۱]. هم چنین مطالعات ما که در راستای مطالعه حاضر قرار داشت حضور کانال پتاسیمی ۱۴۳ پیکوسیمنس را که با ATP و گلیبن کلامید مهاری گردید ولی تحت تأثیر ایبریوکسین (IbTx) و کریبدوتوکسین (ChTx) قرار نمی‌گرفت را نشان دادیم (مقاله تحت چاپ در مجله فیزیولوژی- فارماکولوژی). در مطالعه حاضر، همان‌طور که شکل ۵ نشان می‌دهد، فعالیت کانال مورد نظر در مطالعه حاضر توسط ATP تحت تأثیر قرار نگرفت. ما همچنین اثر گلیبن کلامید را روی آن بررسی نموده و عدم اثر آن را مشاهده نمودیم (اطلاعات نشان داده نشده است). هم چنین مهار کننده‌های فارماکولوژیک چندی برای مهار کانال‌های پتاسیمی حساس به کلسیم نیز شناخته شده است. این مهار کننده‌ها شامل پپتید کریبدوتوکسین (ChTx) و ایبریوتوکسین (IbTx) می‌باشند [۱۹] مطالعات Skalska و همکاران (۲۰۰۹) [۴۵] و Siemen همکاران (۱۹۹۹) [۴۲] به ترتیب در میتوکندری مغز و سلول‌های گلیوما، مهار کانال پتاسیمی را توسط ChTx و Skalska و همکاران (۲۰۰۸) مهار کانال را توسط IbTx و ChTx در میتوکندری عضله اسکلتی را نشان دادند [۴۴]. مطالعه ما که به موازات مطالعه حاضر نیز صورت گرفت، مهار کانال پتاسیمی با کنداکتانس ۵۶۵ پیکوسیمنس را توسط IbTx و نه ChTx و کانال پتاسیمی ۲۱۱ پیکوسیمنس را توسط IbTx را نشان داد. بررسی اثر IbTx و ChTx بر روی کانال کاتیونی مورد مطالعه حاضر، مورد بررسی قرار گرفت و عدم اثر را نشان داد. (اطلاعات جهت آماده شدن برای ارسال به مجله می‌باشد).

از نقطه نظر اهمیت فیزیولوژیک کانال‌های کاتیونی میتوکندری می‌توان بیان داشت مطالعات در حال رشد نشان می‌دهند که این کانال در حفاظت سلولی در مقابل ایسکمی و آپوپتوز و هم چنین در تنظیم حجم ماتریکس میتوکندری و ورود کلسیم نقش دارند [۵۰].

به طور خلاصه، مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که رفتار بیوفیزیکی یک کانال کاتیونی جدید را در غشای داخلی میتوکندری مغز نشان می‌دهد. مطالعه ما نشان داد که کنداکتانس، نحوه باز و بسته شدن کانال، احتمال باز بودن و توزیع زمانی باز و بسته شدن کانال با سه کانال پتاسیمی دیگر که در آزمایشگاه ما به موازات این تحقیق انجام شده و با آزمایشات دیگران متفاوت است. این کانال توسط ۴- آمینوپیریدین مهار و ATP روی آن اثر ندارد.

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 می‌آید.

Archive of SID
www.SID.ir

References

[1] Ashcroft FM, Gribble FM, New windows on the mechanism of action of K (ATP) channel openers. ***Trends Pharmacol Sci*** 21 (2000) 439-45.

[2] Averaimo S, Milton RH, Duchen MR, Mazzanti M, Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): sensor and effector during oxidative stress. ***FEBS Lett*** 584 (2010) 2076-2084.

[3] Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P, Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. ***J Biol Chem*** 276 (2001) 33369-33374.

[4] Bednarczyk P, Potassium channels in brain mitochondria. ***Acta Biochim Pol*** 56 (2009) 385-392.

[5] 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 (2008a) 540-548.

[6] Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A, New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. ***J Bioenerg Biomembr*** 40 (2008b) 325–335.

[7] Bernardi P, Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. ***Physiol Rev*** 79 (1999) 1127-1155.

[8] Cancherini DV, Trabuco LG, Reboucas NA, Kowaltowski AJ, ATPsensitive K^+ channels in renal mitochondria. ***Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*** 285 (2003) 1291-1296.

[9] Cao C, Healey S, Amaral A, Lee-Couture A, Wan S, Kouttab N, Chu W, Wan Y, ATP-sensitive potassium channel: a novel target for protection against UV-induced human skin cell damage. ***J Cell Physiol*** 212 (2007) 252–263.

[10] Cardoso AR, Queliconi BB, Kowaltowski AJ, Mitochondrial ion transport pathways: role in metabolic diseases. ***Biochim Biophys Acta*** 1797 (2010) 832-838.

[11] Choma K, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz W, Dolowy K, Szewczyk A, Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. ***J Bioenerg Biomembr*** 41 (2009) 323-334.

[12] Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. ***J Biol Chem*** 278 (2003) 41566-41571.

[13] Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Gonoi T, Wolf G, Siemen D, The human mitochondrial K_{ATP} channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch clamp approach. ***Biochim Biophys Acta*** 1656 (2004) 46-56.

[14] De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabo I, Zoratti M, Intermediate conductance Ca^{2+}-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. ***Cell Calcium*** 45 (2009) 509-516.

[15] Debska G, Kicinska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS, Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. ***Biochim Biophys Acta*** 1556 (2002) 97-105.

[16] Edwards JC, Kahl CR, Chloride channels of intracellular membranes. ***FEBS Lett*** 584 (2010) 2102-2111.

[17] 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.

[18] 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.

[19] Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ, Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. ***Toxicon*** 39 (2001) 739-748.

[20] Garlid KD, Beavis AD, Swelling and contraction of the mitochondrial matrix II Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. ***J Biol Chem*** 260 (1985) 13434-13441.

[21] Garlid KD, Cation transport in mitochondria the potassium cycle. ***Biochim Biophys Acta*** 1275 (1996) 123-126.

[22] Garlid KD, Paucek P, Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. ***Biochim Biophys Acta*** 1606 (2003) 23-41.

[23] Heinen A, Camara AK, Aldakkak M, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF mitochondrial Ca^{2+}-induced K^+ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. ***Am J Physiol Cell Physiol*** 292(2007) C148-C156.

Archive of SID

www.SID.ir

[24] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T, ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. ***Nature*** 352 (1991) 244-247.

[25] 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. ***J Biol Chem*** 282 (2007) 17433-17441.

[26] Kozoriz MG, Church J, Ozog MA, Naus CC, Krebs C, Temporary sequestration of potassium by mitochondria in astrocytes. ***J Biol Chem*** 285 (2010) 31107-31119.

[27] 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.

[28] Kulawiak B, Bednarczyk P, reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. ***Acta Neurobiol Exp*** 65 (2005) 271-276.

[29] Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. ***FEBS Lett*** 584 (2010) 2043-2048.

[30] Muller P, Donald O, Rudin B, Tien H, westcott WC, Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. ***Circulation*** 26 (1962) 1166 -1171.

[31] Nowikovsky K, Schweyen RJ, Bernardi P, Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. ***Biochim Biophys Acta*** 1787 (2009) 345-350.

[32] O'Rourke B, Mitochondrial ion channels. ***Annu Rev Physiol*** 69 (2007) 19-49.

[33] Pastore D, Stoppelli MC, Di Fonzo N, Passarella S, The existence of the K(+) channel in plant mitochondria. ***J Biol Chem*** 274 (1999) 26683-26690.

[34] Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD, Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. ***J Biol Chem*** 267 (36) (1992) 2606-29.

[35] Peixoto PM, Ryu SY, Kinnally KW, Mitochondrial ion channels as therapeutic targets. ***FEBS Lett*** 584 (2010) 2142-2152.

[36] Peixoto PM, Lue JK, Ryu SY, Wroble BN, Sible JC, Kinnally KW, Mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) function triggers a Bax/Bak-dependent bystander effect. ***Am J Pathol*** 178 (2011) 48-54.

[37] 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.

[38] Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P, Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. ***Biochim Biophys Acta*** 1787 (2009) 1342-1351.

[39] Rusznak Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Diens B, Fodor J, Telek A, Gomczi M, Szucs G, Csernoch L, Mitochondrial xpression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and nonmalignant human cells. ***Virchows Arch*** 452 (2008) 415-426.

[40] Sassi N, De Marchi U, Fioretti B, Biasutto L, Gulbins E, Francolini F, Szabò I, Zoratti M, An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel mtKCa3.1. ***Biochim Biophys Acta Bioenergetics*** 1797 (2010) 260-1267.

[41] Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H, Mitochondrial Ca^{2+}-activated K^+ channels in cardiac myocytes: A mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. ***Circulation*** 111 (2005) 198-203.

[42] Siemen DLC, 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 Comm*** 257 (1999) 549-554.

[43] Singleton WS, Gray MS, Chromatographically homogenous lecitin from egg phopholipids. ***Am Oil Chem Society*** 24 (1965) 53-63.

[44] Skalska J, Piwońska M, Wyroba E, Surmacz L, Wieczorek R, Koszela-Piotrowska I, Zielińska J, Bednarczyk P, Dołowy K, Wilczynski GM, Szewczyk A, Kunz WS, A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria. ***Biochim Biophys Acta*** 1777 (2008) 651-659.

[45] Skalska J, Bednarczyk P, Piwonska M, Kulawiak B, Wilczynski G, Dolowy K, Kudin AP, Kunz WS, Szewczyk A, Calcium ions regulate K uptake into brain mitochondria: the evidence for a novel potassium

Archive of SID

www.SID.ir

channel. ***Int J Mol Sci*** 10 (2009) 1104-1120.

[46] Stowe DF, Aldakkak M, Camara AK, Riess ML, Heinen A, Varadarajan SG, Jiang MT, Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca^{2+}-sensitive K^+ channel opening requires superoxide radical generation. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 290 (2006) 434-40.

[47] Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, Rizzuto R, Mitochondrial dynamics and Ca^{2+} signaling. ***Biochim Biophys Acta*** 1763 (2006) 442-449.

[48] Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E, Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 105 (2008) 14861-14866.

[49] Szabò I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E, A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. ***J Biol Chem*** 280 (2005) 12790-12798.

[50] Szabo I, Leanza L, Gulbins E, Zoratti M, Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. ***Pflugers Arch–Eur J physiol*** 463 (2012) 231-246.

[51] Szewczyk A, The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function (review). ***Mol Membr Biol*** 15 (1998) 49-58.

[52] Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels. ***IUBMB Life*** 61 (2009) 134-143.

[53] 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.

[54] Wolfgang F, Graier M, Frieden M, Malli R, Mitochondria and Ca^{2+} signaling: old guests, new functions. ***Pflugers Arch Eur J Physiol*** 455 (2007) 375-396.

[55] Yamashita Y, Sakai K, Sakamoto N, Nonaka J, Koyamada K, Improved hierarchical parameter optimization technique: application for a cardiac myocyte model. ***Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*** 1 (2006) 3487-3490.

[56] Zoratti M, De Marchi U, Gulbins E, Szabo I, Novel channels of the inner mitochondrial membrane. ***Biochim Biophys Acta*** 1787 (2009) 351-363.

Archive of SID

www.SID.ir