مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۲، شماره ۱ (شماره پیاپی ۴۶)، بهار ۱۳۸۸، ۲۸-۱۹

اثر فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون اسید امینه سرین جایگاه ۳۶۲ بر روند آندوسیتوز کانال پتاسیمی نوع۲ قسمت خارجی مدولا کلیه

دکتر سعید حاجی هاشمی

استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی ، گروه فیزیولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک ، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۱۱/۵، تاریخ پذیرش ۸۸/۱/۲۶

چکیده

مقدمه: در این مطالعه اثر فسفوریله و دفسفوریله کننده اسید امینه سرین جایگاه ۳۶۲ برروند آندوسیتوزکانال پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه پس از بیان درغشاء اووسیت بررسی گردیده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی اووسیت‌های زاینوپوس لویس با استفاده از کلاژناز به روش استاندارد جدا گردیدند. روش تغییر سریع جهت ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه استفاده گردید. cRNA مربوط این کانال وموتاسیون هایS362A و S362D ایجاد شده به اووسیت‌ها تزریق گردید. پس از سه روز (زمان صفر) به محیط کشت برفلدین A، مهار کننده انتقال پروتئین‌های ساخته شده به غشاء به مقدار ۲۵ میکرومولار یا اتانول به عنوان حلال برفلدین A اضافه گردید. از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ دو الکترود برای اندازه گیری جریان‌های یونی وهمچنین پتانسیل غشاء استفاده شد.

نتایج: اووسیت‌های که کانال‌های پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه و یا موتاسیون فسفوریله کننده S362D را بیان می‌کردند در طی دوره انکوبه شدن در محلول برفلدین A کاهش معنی‌داری در میزان جریان یون پتاسیم وپتانسیل غشاء را نشان دادند. میزان کسر جریان برای کانال‌های پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه و موتاسیون فسفوریله کننده پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در برفلدینA برابر با ۰/۰۵±۰/۱۱ بود که به طور معنی‌داری باکسر جریان مربوط به موتاسیون دفسفوریله کننده ۰/۰۵±۰/۹۶ تفاوت داشت.

نتیجه گیری: اسید آمینه سرین جایگاه ۳۶۲ در قسمت داخلی ناحیه PDZ با ایجاد حالت فسفوریله در آندوسیتوز و تعیین تعداد کانال‌های پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه دخالت دارد.

واژگان کلیدی: کانال پتاسیمی، کانال پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولا کلیه، موتاسیون S362A، موتاسیون S362D، ناحیه PDZ، فسفوریلاسیون

نویسنده مسئول: اراک، میدان بسیج، مجتمع دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی،گروه فیزیولوژی
Email: S.hajihashemi@gmail.com

مقدمه

وظیفه کلیه‌ها نگهداری حجم و ترکیب یونی مایعات بدن می‌باشد. نفرون‌ها واحدهای ساختمانی و عملی در کلیه‌ها هستند. نحوه قرار گرفتن کانال‌های یونی و ناقل‌ها در غشاهای راسی و قاعده‌ای- جانبی نفرون‌ها بر روی باز جذب وترشح مواد تاثیر می‌گذارد. توزیع این پروتئین‌ها در غشاء سلول‌ها به صورتی نامتقارن می‌باشد که با وجود آندوسیتوز مداوم به کمک تداخل با اسکلت سلولی این حالت نامتقارن حفظ می‌گردد(۱، ۲). کانال پتاسیمی قسمت خارجی مدولا کلیه (Renal Outer Medullary K - ROMK) در نفرون‌ها وظیفه ترشح یون پتاسیم (K^+) را به عهده دارند. محل قرارگرفتن سه ایزو فورم مختلف از کانال‌های ROMK در غشاء راسی سلول‌های کلیه مشخص گردیده است(۳). آندوسیتوز کانال‌های ROMK ترشح یون K^+ در مجاری جمع کننده را تنظیم می‌کند(۶-۴).

روندهای اگزوسیتوز و آندوسیتوز تعداد کانال‌های ROMK در غشاء پلاسمایی را تعیین می‌نماید. وانگ و همکاران نقش فعالیت cSrc کیناز(ایزوفورم PTKs) در غشاءراسی نفرون‌های موش صحرایی را برروی تنظیم تعداد کانال‌های پتاسیمی گزارش کردند. تعداد کانال‌های پتاسیمی با مقدار دریافت K^+ از طریق رژیم غذایی در این حیوانات دارای رابطه‌ای معکوس می‌باشد(۷). تعداد کانال‌های پتاسیمی در سلول‌های مجاری جمع‌کننده قشری موش صحرایی و کانال‌های ROMK1 بیان شده در غشاء اووسیت‌ها و هم‌چنین سطح فعالیت cSrc کیناز توسط مهار کننده‌های تیروزین کیناز افزایش پیدا می‌کرد. استفاده از مهار گران تیروزین فسفاتاز تعدادآنها را کاهش داد. اثرات تیروزین کیناز و فسفاتاز بر روی تعداد و فعالیت این کانال‌های پتاسیمی توسط مهار کننده‌های آندوسیتوز ممانعت شد(۴، ۵، ۸، ۹).

مقدار پتاسیم موجود در رژیم غذایی تغییر در ترشح یون‌های پتاسیم به درون مجاری جمع‌کننده را از طریق ایجاد تغییر در آندوسیتوزشدن کانال‌های ROMK اعمال می‌کند. مقدار دریافت پتاسیم بر روی فعالیت cSrc تیروزین کیناز و تیروزین فسفاتاز مربوطه تغییر ایجاد می‌کند که بر روی میزان آندوسیتوز شدن و یا اگزوسیتوز شدن کانال‌های پتاسیمی تاثیر می‌گذارد. آندوسیتوز به دو صورت وابسته و غیر وابسته به کلاترین، پروتئین‌ها را از غشاء پلاسمای بر می‌دارد(۱۰). اطلاعات اندکی درباره چگونگی جایگزین شدن و بر داشته شدن کانال ROMK از غشاهای داخل و خارج سلولی (Trafficking) و مبادله شدن بین غشاها وجود دارد. زنگ و همکاران آندوسیتوزکانال ROMK ازطریق وزیکول‌های پوشیده با کلاترین (Clathrin Coated Vesicles-CCVs) را نشان دادند و نقش اسیدهای آمینه ناحیه انتهای کربوکسیل (C-terminal) کانال‌های ROMK ($K_{ir}1.1$) رادر این روند مشخص کردند(۶). در طول تکامل توالی اسیدهای آمینه انتهای‌های کربوکسیل کانال‌های ROMK در انسان و جوندگان حفظ شده است، محل قرارگرفتن این کانال‌ها در داخل غشاها را چندین الگو(Motifs) از این ناحیه تعیین می‌کند(شکل ۱). از جمله یک الگوی (YDNPNF) که با الگوی درون بری (Internalization Motif (Y/F)(D/E)MPXY) بسیاری از پروتئین‌های غشایی که از طریق CCVs به داخل برده می‌شوند به صورت هومولوگ است(۱۱).

مطالعه قبلی نشان داده است که موتاسیون جایگاه ۳۶۲ سبب افزایش پایداری وثبات کانال‌های ROMK2 در غشاء می‌گردد(۱۲). در این مطالعه چگونگی و مکانیسم این موتاسیون بر روی آندوسیتوز مورد بررسی قرار گرفته است. اسید امینه سرین در موقعیت ۳۶۲ در حالت طبیعی به صورت فسفوریله می‌باشد. به منظور بررسی اثر فسفوریله کننده برروی پایداری و اندوسیتوز کانال ROMK2 هنگام بیان شدن در غشاهای سلولی اووسیت‌ها موتاسیون‌هایS362D و S362A ایجاد گردید. موتاسیون S362A دارای اثرات دفسفوریله کننده و موتاسیون S362D دارای اثرات فسفوریله کننده می‌باشد. در این تحقیق آزمایشاتی انجام

گرفت تا نقش و اهمیت اثرات فسفوریله و دفسفوریله کننده اسید آمینه سرین جایگاه ۳۶۲ را در کنترل فعالیت عملی ROMK2 در غشا پلاسمای مشخص نماید.

KRG**YDNPNF**ILSEVNETDD*TKM*-COOH Human
KRG**YDNPNF**VLSEVDETDD*TQM*-COOH Rat
KRG**YDNPNF**VLSEVDETDD*TQM*-COOH Mouse

شکل۱: اسیدهای آمینه انتهاهای کربوکسیل انسان، رات و موش مورد قبول واقع شده برای درون بری بواسطه کلاترین(پر رنگ شده) را نشان می‌دهد. کازئین کیناز ۲ (با خط زیرآن مشخص شده ودر توالی انسانی حضور ندارد) واتصال PDZ (به صورت ایتالیک) نشان داده شده است. لغات پررنگ شده نشانگر توالی محل اتصال PDZ است که با توالی کازئین کیناز ۲ همپوشانی دارد. S قرمز رنگ شده به سرین در موقعیت S362A مربوط می شود.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. حیوانات ماده و بالغ زاینوپوس لویس(Xenopus laevis) درون تانک‌های پلاستیکی محتوی آب با درجه حرارت ۲۳-۱۹ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری می‌شدند. به منظور جدا کردن اووسیت‌ها حیوانات در محلول بیهوش کننده ترایکن متان سولفونات ۲ درصد (Tricane Methan Sulfonate) با pH برابر ۷/۸۰ قرار گرفتند. با استفاده از پروتکل استانداردی که توسط کوپر و برون ارائه شده است، اووسیت‌ها تحت شرایط آسپتیک جدا و نگهداری گردیدند(۱۳). محلول‌های استریل استفاده شدند. لوب‌های تخمدان به تکه‌های به اندازه تقریبی ۱×۱×۰/۵ سانتی‌متر بریده شدند. قطعات بریده شده درون لوله‌های کشت ۵۰ میلی لیتری محتوی محلولی فاقد کلسیم (ND96 - Ca^{2+} 0) منتقل گردیدند و برروی یک شیکر افقی (Rotatest R100, Luckham) قرار گرفت و شش بار هر ده دقیقه محلول آن با محلول تازه تعویض گردید. اووسیت‌ها دوبار در محلول فاقد کلسیم (ND96 - Ca^{2+} 0) محتوی ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر کلاژناز (Type 1A) به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. با توجه به قطر و شکل آنها اووسیت‌های سالم در مراحل ۵ و ۶ در زیر میکروسکپ شناسایی و جدا شدند، سپس در محلول OR3 با درجه حرارت ۱۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور سرد(LMS: Jencons Scientific Ltd) نگهداری شدند. براساس منحنی دوز- پاسخ برای غلظت‌های مختلف مطالعه قبلی cRNA به مقدار ۱ نانو گرم در حجم نهایی ۵۰ نانولیتر به اووسیت‌ها تزریق گردید و به اووسیت‌های کنترل ۵۰ نانولیتر آب تزریق گردید(۱۵). جریان یونی مربوط به کانال‌های پتاسیمی با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ دو الکترود(- Two Electrode Voltage Clamp TEVC) اندازه‌گیری گردید. گواردن و همکاران نشان داده‌اند که به دنبال تزریق cRNA به صورت آزمایشگاهی (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 ایجاد می‌شود به طور مشخص نتیجه تزریق cRNA می‌باشد(۱۴).

یک الکترود برای ثبت ولتاژ(الکترود ولتاژی) و دیگری برای تزریق جریان (الکترود جریان) بر پایه تکنیک TEVC در غشاء اووسیت وارد شد. پتانسیل غشاء به دنبال دریافت ولتاژتوسط الکترود ولتاژی با ولتاژ مورد درخواست مقایسه می‌شود و اختلاف بین این دو مقدار باتزریق جریان به صفر می‌رسد. آزمایشات ولتاژ کلمپ با استفاده از آمپلی فایر 500B (Axon Instruments, Gene - Clamp Foster City, CA, USA) انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزار (pClamp, Axon Instruments, Clampex version 6) بر روی یک کامپیوتر IBM (International

Business Machine) مجهز شده به یک مبدل آنالوگ به دیجیتال(Digidata 1200, Axon Instruments) ثبت گردیدند. در محفظه استاندارد اووسیت‌هاRC-3Z میزان۵ میلی لیتر از محلول در هر دقیقه برروی اووسیت‌ها سرریز شد. در داخل محلول پرفیوژن کننده الکترود رفرانس متصل به زمین(سیم $Ag/AgCl_2$) قرار داشت. الکترودهای ولتاژی و جریان از لوله‌های مویینه شیشه‌ای بروسیلیکات باقطر خارجی ۱/۵ میلی مترو قطر داخلی۰/۶۸ میلی‌متر (GC150F-15 Harvard Apparatus) تهیه گردید که با استفاده از یک میکروالکترودپولر عمودی (Microelectrode puller PP-83: Narishige, Japan) کشیده شدند. الکترودها با محلول کلرور پتاسیم۳ مولار پر شدند و الکترودهای با مقاومت ۲/۵- ۰/۵ مگااهم برای ثبت‌های داخل سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

با زاویه ۴۵ درجه نسبت به سطح اووسیت میکروالکترودها به آرامی به درون اووسیت‌ها وارد شدند. پیش از وارد کردن میکروالکترودها آنها با الکترود رفرنس صفر می‌شدند. اندازه‌گیری میران جریان یونی هنگامی انجام می‌شد که هر دو الکترود ولتاژی و جریان، پتانسیل غشائی یکسانی را نشان دادند. پس از ثابت شدن پتانسیل غشائی آمپلی فایر از حالت Setup mode به وضعیت Voltage Clamp mode تغییر داده شد. در ابتدا پتانسل در ۵۰- میلی ولت ثابت نگاه داشته شد، سپس ولتاژ از ۱۲۰- میلی ولت تا ۱۰۰+ میلی ولت در هر مرحله به اندازه۲۰ میلی ولت تغییر کرد و به مدت ۵۰ هزارم ثانیه در هر ولتاژ نگه داشته شد، در بین هر مرحله ولتاژ به ۵۰- میلی ولت بر گردانده شد. برای هرکدام از ثبت‌ها این پروتکل ۵ بار تکرار گردید و میانگین جریان‌های ثبت شده محاسبه گردید. باریم به عنوان مهار کننده کانال‌های ROMK در مطالعات TEVC به کار برده شد. بعد از ثبت نمودن رابطه ولتاژ – جریان با محلول کنترل ND96 ، محلول ND96 حاوی ۵ میلی مولار از کلرید باریم بر روی اووسیت‌ها جریان یافت تا این که میزان جریان کاهش یافته و در یک حالت پایدار باقی ماند.

در این حالت رابطه ولتاژ – جریان ثبت می‌گردید. پروتکل این قسمت از آزمایشات به صورتی بود که cRNA که کانال ROMK2 و یا موتاسیون مربوط را کد می‌کرد، سه روز قبل از قرار دادن در محلول برفلدین A (زمان صفر) به اووسیت‌ها تزریق می‌شد و در محیط کشت OR3 انکوبه گردید. در زمان صفر محیط کشت تعویض گردید و اووسیت‌ها به محیط کشت حاوی محلول برفلدین (Brefledin A- BFA) با غلظت ۲۵ میکرومولار یا به همان حجم از اتانول (حلال برفلدین A) منتقل گردیدند. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است با دوز ۲۵ میکرومولار از محلول برفلدین A میزان جریان در تمامی زمان‌ها (۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) پس از انکوبه شدن کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند(۱۵). محلول استوک برفلدین A به صورت ۱۵ میلی مولار در اتانول به عنوان حلال تهیه گردید. برفلدین A ماده‌ای است که می‌تواند انتقال پروتئین از شبکه اندوپلاسمی به دستگاه گلژی را مسدود نماید. بنابر این پروتئین‌های جدید ساخته شده به غشاء سلول اضافه نمی‌شود. مقدار کاهش در تعداد کانال‌های پتاسیمی نشان دهنده مقدار آندوسیتوز آنها می‌باشد. در طول دوره آزمایشات محیط کشت هر روز با محیط کشت تازه تعویض گردید. در همه آزمایشات از پلاسمید pTLN- ROMK2 (اهدای توسط دکتر گوردون کوپر) استفاده گردید. برای ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال ROMK موش صحرایی با استفاده از روش تغییر سریع ایجاد موتاسیون زای مستقیم در جایگاه (Site Directed Mutagensis) گردید. در قسمت داخلی ناحیه PDZ (PSD95/Drosophila disk large/ ZO-1 Domain) موتاسیون‌های S362A و S362D ایجاد گردیدند. در همه موارد پلاسمید با استفاده از MLU I به صورت خطی تبدیل گردید وcRNA توسط آنزیم RNA SP6 پلیمراز تولید شد.

میزان کسر جریان با استفاده از مقدار کاهش جریان توسط ۵ میلی مولار از کلرید باریم در مقایسه با

مقدار جریان در زمان صفر با استفاده از رابطه "کسر جریان = $I-I_{Ba}/I_0$" اندازه‌گیری گردید که نشان‌گر کاهش مقدار جریان است.در این رابطه I مقدار جریان پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول برفلدین A و I_{Ba} کاهش مقدار جریان توسط باریم پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول برفلدین A و I_0 مقدار جریان ثبت شده در زمان صفر قبل از انکوبه شدن در محلول برفلدین A را نشان می دهد. این رابطه به خوبی بیانگر این است که اگر پس از گذشت ۴۸ ساعت تعداد کانال‌های پتاسیمی و در نتیجه میزان جریان در غشاء اووسیت کاهش یافته باشد مقدار کسر جریان کاهش خواهد یافت.

نتایج به صورت میانگین همراه با انحراف معیار ارائه شده است. برای مقایسه نتایج از آزمون آنوای یکطرفه (آزمون توکی) ویا آزمون t استفاده گردید. سطح معنی دار بودن ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

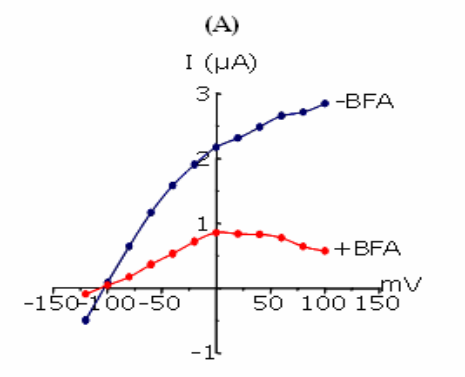
نتایج

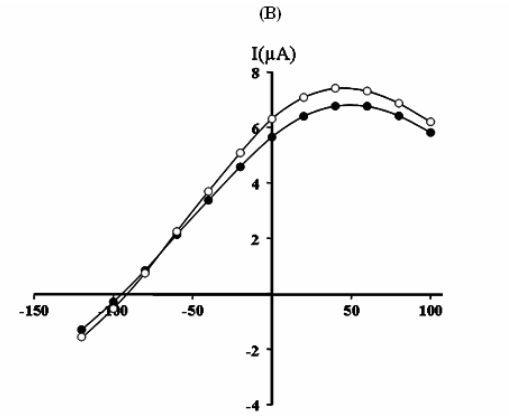
براساس نتایج، انکوبه کردن اووسیت‌ها در محلول ۲۵ میکرو مولار برفلدین A میزان جریان یون پتاسیم از طریق کانال‌های ROMK2 را کاهش داد. رابطه جریان- ولتاژ پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در دوز ۲۵ میکرومولار برفلدینA در شکل۲نشان داده شده است. برای ROMK2 میزان کسر جریان برابر با ۰/۱۶±۰/۰۵ (تعداد برابر ۱۸) بود(شکل۳).

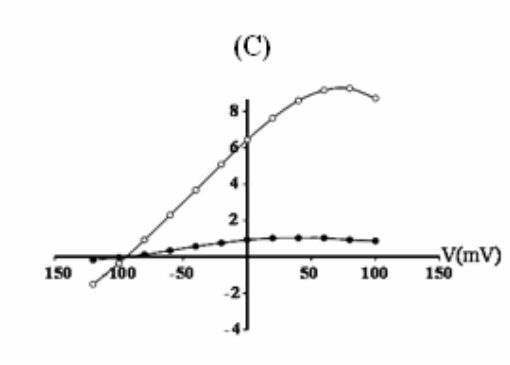
ثبت الکتروفیزیولوژیک جریان یون‌های پتاسیم از کانال ROMK2 با موتاسیون S362A که در اووسیت‌ها بیان گردیدند، پس از انکوبه شدن در محلول۲۵ میکرومولار برفلدینA در مدت زمان ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری را در میزان جریان یونی این کانال پتاسیمی موتاسیون یافته نشان نداد. نمودار جریان- ولتاژ از اووسیت‌های است که موتاسیون S362A را بیان کرده‌اند بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور برفلدین A در شکل ۲ نشان داده شده است. برای موتاسیون S362A میزان کسر جریان برابر با ۰/۹۶±۰/۰۵ (تعداد برابر ۲۴) بود وکاهشی معنی‌دار در میزان جریان حساس به باریم دیده نشد(شکل۳).

منحنی جریان- ولتاژ مربوط به یون‌های پتاسیم ثبت شده از کانال پتاسیمی ROMK2 با موتاسیون S362D که در غشاء اووسیت‌ها بیان شده بود پس از۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول۲۵ میکرو مولار برفلدین A کاهش معنی‌داری در میزان جریان یونی از این کانال‌های پتاسیمی را نشان داد(شکل ۲). میزان کسر جریان برای موتاسیون S362D برابر با ۰/۱۱±۰/۰۵ (تعداد برابر ۱۸) بود وکاهش معنی‌داری در میزان جریان حساس به باریم اندازه‌گیری گردید(شکل ۳).

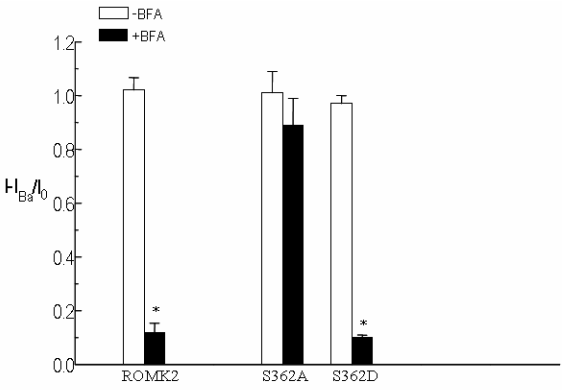
با توجه به این که پتانسیل استراحت غشاء اووسیت‌ها با تعداد کانال‌های ROMK2 رابطه مستقیم دارد، در طول آزمایشات درهر دو گروه از اووسیت‌های انکوبه شده در محلول دارای برفلدین A و محلول فاقد برفلدین A پتانسیل استراحت غشاء اووسیت‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد اووسیت‌های که کانال ROMK2 و موتاسیون S362D را بیان می‌کردند، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انکوبه شدن در محلول برفلدین A کاهش معنی‌داری در پتانسیل استراحت غشاء را در مقایسه با اووسیت‌های که در محلول فاقد برفلدین A انکوبه گردیدند نشان دادند ولی در اووسیت‌های که موتاسیون S362A را بیان کرده‌اند پس از این زمان اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود نداشت و پتانسیل استراحت غشاء تحت تاثیر برفلدین A قرار نگرفتند(شکل ۴).



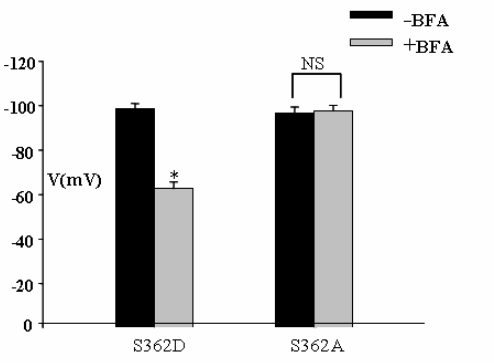




شکل۲. نمودارهای A, B, C اثرات ۴۸ ساعت انکوبه شدن در محلول ۲۵ میکرومولار برفلدین A بر روی تعداد کانال‌های پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولای کلیه طبیعی (ROMK2) (A) کانال‌های موتاسیون یافته S362A (B) و S362D (C) را با توجه به کاهش میزان جریان نشان می‌دهد.



شکل۳: کسر جریان اندازه گیری شده در اووسیت‌های که کانال‌های پتاسیمی نوع ۲ قسمت خارجی مدولای کلیه (ROMK2) وموتاسیون‌های S362A و S362D را بیان کرده‌اند درحضور و غیاب برفلدین A را پس از مدت ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. (با تعداد برابر ۲۴). p<۰/۰۰۱ =* این نتایج افزایش پایداری وثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 غشاء با ایجاد موتاسیون S362A را نشان می‌دهد



شکل۴. پتانسیل استراحت اندازه‌گیری شده در اووسیت‌های که کانال‌های پتاسیمی نوع۲ قسمت خارجی مدولای کلیه (ROMK2) با موتاسیون‌های S362A و S362D را بیان کرده‌اند در حضور و غیاب برفلدین A را پس از مدت ۴۸ ساعت نشان می‌دهد (با تعداد برابر ۲۴). p<۰/۰۰۱ =* این نتایج افزایش پایداری وثبات 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.

بحث

در مطالعه حاضر موتاسیون S362A سبب عدم کاهش میزان جریان یونی گردید که نشان دهنده عدم کاهش تعداد کانال‌های ROMK2 موتاسیون یافته در غشاء اووسیت می‌باشد. این قسمت می‌تواند در آندوسیتوز شدن این نوع از کانال دخالت داشته باشد. بر هم کنش‌های بین پروتئینی ممکن است چگونگی و نحوه بیان پروتئین‌های کانال‌هایROMK2 در کلیه را تحت تاثیر خود قرار دهد. کانال پتاسیمی با موتاسیون S362A حالت دفسفوریله شدن را ایجاد می‌کند. جریان‌های یونی ثبت شده از کانال‌های ROMK2 وکانال‌های موتاسیون‌های یافته ,S362D S362A و هم‌چنین پتانسیل استراحت اندازه‌گیری شده غشاء اووسیت‌ها، افزایش پایداری و متوقف شدن آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی موتاسیون یافته S362A را نشان می‌دهد(شکل ۲و۳و۴). بنابر این توالی S-E-V باید در پایداری و آندوسیتوز کانال‌های ROMK2 نقش داشته باشد. در شرایط طبیعی این جایگاه به صورت فسفوریله می‌باشد. موتاسیون S362A که حالت دفسفوریله را تبعیت می‌کند نسبت به آندوسیتوز مقاوم بود. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که این جایگاه از طریق فسفوریله شدن می‌تواند آندوسیتوز این کانال‌ها را تنظیم نماید. اختلال در فسفوریله شدن کانال‌های ROMK2 در این ناحیه سبب ایجاد مقاومت نسبت به آندوسیتوز شدن می‌گردد. وضعیت فسفوریله یا دفسفوریله شدن کانال‌های ROMK2 تعداد کانال‌های پتاسیمی فعال در غشاء را تعیین می‌نماید.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کانال ROMK در غشاء پلاسمای اووسیت‌های زاینوپوس لویس و (Cortical Collecting Duct)CCD دارای آندو سیتوز هستند. اووسیت‌های زاینوپوس لویس دارای ماشینی برای آندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین است. به این دلیل اووسیت‌ها برای مطالعه آندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین، بسیاری از کانال‌های یونی از جمله کانال‌های سدیمی اپیتلیالی (Epithelial Na Channel- ENaCs) ، (Cystic Fibrosis Ttransmembrane conductance Regulator) CFTR، کانال‌های کلراید و کانال‌های ROMK1 مورد استفاده قرار می‌گیرند(۸، ۱۶، ۱۷) مطالعات قبلی اثری از برفلدین A بر روی روندآندوسیتوز از طریق CCV در غشاهای پلاسمایی را نشان نداده‌اند(۱۸). در تحقیق حاضر تاثیر مهاری ماده برفلدین A بر روی ترافیک این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد که با مطالعات قبلی بر روی کانال‌های ROMK1 مطابقت دارد(۸).

بسیاری از روندهای سلولی به ارتباط و اثرات متقابل پروتئین بر سایر پروتئین‌ها وابسته است که توسط پروتئین‌های انجام می‌شود که درطول تکامل حفظ گردیده‌اند. بسیاری از اعمال مختلف سلولی به خصوصیات ساختمانی و کاتالیتیک هر کدام از این پروتئین‌ها بستگی دارد. این پروتئین‌های آداپتوری به صورت مستقیم یا با واسطه سایر پروتئین‌ها که می‌توانند بخش‌های از قطعات پلی پپتیدی را تشخیص دهند و به آنها متصل گردند بر روی این بر هم کنش‌ها تاثیر می‌گذارند(۱۹). پروتئین‌های ناحیه PDZ یکی از مهم‌ترین گروه آداپتورهای پروتئینی هستند که دارای حدود ۹۰ اسید آمینه است که به صورت اختصاصی به قطعات کوتاه در پروتئین‌های کربوکسیل- انتهای متصل می‌شود. پروتئین های تعدیل کننده ناحیه PDZ در نشانه‌گیری(Targeting) پروتئین‌های پیچیده نقش مهمی به عهده دارند. بسیاری از دنباله‌های سیتوپلاسمی پروتئین‌های عرض غشایی در نواحی تخصص یافته غشاء مانند کمپلکس های اتصال دهنده اپیتلیالی به یکدیگر متصل می‌شوند(۲۰). در قطب بندی شدن پروتئین‌ها در غشا راسی یا قاعده ای سلول‌های اپی تلیالی چندین ناحیه PDZ متصل شونده شرکت دارند که مجتمع‌های پروتئینی را به یکدیگر متصل می‌کنند(۲۱). رابطه بین ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها به اثرات متقابل اختصاصی بین آنها در درون سلول‌ها بستگی دارد. برخی از این بر هم کنش‌ها از طریق نواحی پروتئینی حفظ شده در طول تکامل با ناحیه تعدیل کننده واتصالی

PDZ انجام می‌شود. ناحیهPDZ در بیشتر پروتئین‌های اسکلت سلولی همانند (Post Synaptic Density 95-PSD-95(95 که یک نوع از پروتئین متراکم پس سیناپسی است حضور دارد و نقش مهمی در عملکردساختمان‌های غشایی دارد. تعدیل عملکرد کانال‌های ROMK توسط اسکلت سلولی ارتباط و اتصال بین این کانال‌ها و اسکلت سلولی را تایید می‌کند. موتاسیون در کانال ROMK در موقعیت اسید امینه T332 سبب تغییر چارچوب (Frame Shift) و یک کدون متوقف کننده زودرس درنزدیک کربوکسیل- انتهای می‌شود که انتقال کانال به درون غشاء پلاسمایی را مهار می‌کند و سبب ایجاد سندرم بارتر (Bartter's Syndrome) می‌شود. شواهدی وجود دارد که پروتئین‌های ناحیه PDZ می‌توانند عمل لیگاندهای خودشان را علاوه بر انجام وظیفه همانند یک داربست تنظیم نمایند. برای پروتئین‌های PDZ قابلیت اتصال به توالی‌های کربوکسیل- انتهای کوچک راه ساده‌ای است که با پروتئین‌های هدف بدون بر همزدن ساختمان و عملکرد کلی لیگاند هایشان تداخل نمایند. این که نواحی PDZ چگونه این عمل را انجام می‌دهند نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. عملکرد کانال‌های یونی 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 نوع $K_{ir}2.3$ از طریق نواحی کوچکی از کربوکسیل- انتهای به اسکلت سلولی متصل می‌شود.این کانال‌ها با پروتئین متصل شونده95-PSD از PDZ بر هم کنش می‌کند و به این ترتیب به رشته‌های اکتین اسکلت سلولی متصل می‌شود. اسید آمینه سرین در ناحیه کربوکسیل- انتهای از کانال‌های $K_{ir}2.3$ برای این بر هم کنش مهم و ضروری می‌باشد(۲۲) به علاوه فسفوریله شدن این اسید آمینه توسط پروتئین کیناز (Ptotein Kinase A A-PKA) این اثرات متقابل را تنظیم می‌کند. وقتی که سرین فسفوریله می‌شود $K_{ir}2.3$ به PSD-95 متصل نمی‌شود و در این پروتئین فسفوریله شدن می‌تواند تراکم و تعداد کانال‌های پس سیناپسی را کنترل نماید(۱۰، ۲۲). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بر هم کنش‌های مشابهی را پیشنهاد می‌کند که ممکن است چگونگی و نحوه بیان پروتئین‌های کانال‌های ROMK2 درنفرون‌های کلیه را تحت تاثیر خود قرار دهد،که می‌تواند میزان ترشح پتاسیم و دفع پتاسیم از کلیه‌ها را تنظیم نماید. با توجه به این که فسفوریله شدن وابسته به کازیین کیناز نوع ۲ CKII پایداری بعضی از پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۲۳)، این که آیا در این فسفوریلاسیون کازیین کیناز نوع ۲ دخالت دارد به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش پیش رونده درمیزان جریان از کانال‌ها ROMK2 و موتاسیون S362D دراثر برفلدین A ناشی از تاثیر بر روی باز شدن این 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 با این عقیده توافق دارد که بین کوبوکسیل انتهای کانال‌های ROMK2 و اجزاء مسیر آندوسیتوز تداخل عمل وجود دارد و یک ناحیهPDZ با عملکرد مناسب برای آندوسیتوز ضروری است. فسفوریله شدن اسید آمینه سرین در ناحیه PDZ از کانال های ROMK2 برای آندوسیتوز این کانال‌ها مهم و ضروری می‌باشد.

منابع

1. Bomsel M, Prydz K, Parton RG, Gruenberg J, Simons K. Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol 1989; 109: 3243-3258.
2. 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. JCell Biol 1989; 109: 3259-3272.

3. 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 1997; 273: F739-F748.
4. Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, Gu R, Huang XY, Hebert SC, GiebischG, Wang WH. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and –tyrosine phosphatase. J Biol Chem 2001; 276: 7156-7163.
5.Wei Y, Bloom P, Gu R, Wang W. Proteintyrosine phosphatase reduces the number of
apical small conductance K+ channels in the rat cortical collecting duct. J Biol Chem 2000; 275:20502-20507.
6. Zeng WZ, Babich V, Ortega B, Quigley R,White SJ, Welling PA, Huang CL. Evidence for endocytosis of ROMK potassium channel via clathrin-coated vesicles. Am J Physiol Renal Physiol 2002; 283: F630-F639.
7. Wang W, Lerea KM, Chan M, Giebisch G.Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K+ channels. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: F165-F171.
8. Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K+ channel II. Cloning and distribution of alternative forms. Am J Physiol 1995; 268: F1132-F1140.
9. Hebert SC. An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). Kidney Int 1995; 48: 1010-1016.
10. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature 2003; 422: 37-44.
11. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol 1996; 12: 575-625.
12. Hajihashemi S. The S362A mutation block ROMK2 (K_{ir}1.1b) endocytosis in Xenopus laevis oocyte membrane. J of Physiology and Pharmacology (In press)
13. Cooper GJ, Boron WF. Effect of PCMBS on CO2 permeability of Xenopus oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. Am J Physiol 1998; 275: C1481-C1486.
14. 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 1971; 233: 177-182.
15. Hajihashemi S, White SJ. [Effect of the V364D mutation in membrane endocytosis of ROMK2 (Kir1.1b)]. Rahavard Danesh 2007; 10(3): 25-35.
16. Bradbury NA, Clark JA, Watkins SC, Widnell CC, Smith HS, Bridges RJ. Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator. Am J Physiol 1999; 276(4 Pt 1): L659-L668.
17. Shimkets RA, Lifton RP, Canessa CM. The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. J Biol Chem 1997; 272(41): 25537-41.
18. Wood SA, Park JE, Brown WJ. Brefeldin A. Causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. Cell 1991; 67(3): 591-600.
19. Scott JD, Pawson T. Cell communication: the inside story. Sci Am 2000; 282: 72-79.
20. 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 2003; 23: 4663-4672.
21. Bilder D, Schober M, Perrimon N. Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. Nat Cell Biol 2003; 5: 53-58.
22. 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 1996; 17: 759-767.
23. Yin X, Jedrzejewski PT, Jiang JX. Casein kinase II phosphorylates lens connexin 45.6 and is involved in its degradation. J of Biological Chemistry 2000; 275: 6850-6.

Journal of Arak University of Medical Sciences *Original Article*
spring 2009; 12(1): 19-28

The Effect of Phosphorylation and Dephosphorylation of the Serine Residue (S362) on ROMK2 (K_{ir}1.1b) Endocytosis

Hajihashemi S

Assistant Professor, PhD in Physiology, Physiology Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received 24 Jan, 2009 Accepted 15 Apr, 2009

Abstract

Background: In this study, the effects of S362A and S362D mutations on the membrane turnover and the stability of ROMK2 channel when expressing in Xenopus laevis oocytes were examined.

Methods and Materials:In this experimental study, oocytes were isolated by standard protocols using collagens (Type 1A). Mutations of the cytoplasmic termini of ROMK2 were constructed using the quick-change approach for site-directed mutagenesis. Xenopus oocytes were injected with cRNA encoding ROMK2 or S362A or S362D mutant three days prior to treatment with BFA solution (time 0). Brefeldin A (BFA) was added to the OR3 medium (+BFA) at concentrations of 25µM (inhibit insertion of new proteins into the cell membrane) or ethanol as BFA vehicle (-BFA). Two-electrode voltage clamp (TEVC) was used to measure oocyte ROMK-dependent currents and membrane potential.

Results: In oocytes was expressing ROMK2 and/or the S362A mutant, there was significant reduce in current and membrane voltage of K. The fractional currents for ROMK2 and S362D mutant demonstrated a slight difference 48h following treatment of oocytes with BFA, 0.16±0.05(n=18) and 0.11±0.05(n=18) respectively. This was; however, significantly different from the fractional current of S362A mutant which stood at 0.96±0.05(n=24).

Conclusion: Mutant Serine residue S362A which causes phosphorylation in endocytosis and helps determine the number of ROMK2, plays an important part in PDZ domain.

Key words: Potassium Channel**,** ROMK2, S362A Mutant, S362D Mutant, BFA, PDZ domain, Phosphorylation.

Corresponding author;
Email: S.hajihashemi@gmail.com
Address: Physiology Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.