

اثر ایجاد موتاسیون V364D در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK2 (Kir1.1b) بر روی روند آندوسیتوز آنها

دکتر سعید حاجی هاشمی^{1*}، دکتر استنلی وایت²

- 1- استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی، عضو هیئت علمی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
2- استاد، دکتری تخصصی فیزیولوژی، عضو هیئت علمی، انستیتوی غشاء و بیولوژی سیستم‌ها، دانشگاه لیدز، انگلستان

تاریخ دریافت ۸۵/۹/۲۲، تاریخ پذیرش ۸۶/۱/۲۲

چکیده

مقدمه: مطالعات انجام شده نشان داده که آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK برای تنظیم ترشح K^+ در قسمت‌های انتهایی نفرون و مجاری جمع کننده مهم می‌باشد. در این مطالعه اثرات موتاسیون V364D بر پایداری کانال پتاسیمی ROMK2 هنگامی که در غشاء اووسیت بیان می‌شود بررسی گردیده است.

روش کار: در این پژوهش تجربی اووسیت‌های *Xenopus laevis* به روش استاندارد با استفاده از کلاژناز جدا گردیدند. با استفاده از روش quick-change در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK2 موتاسیون زای مستقیم ایجاد گردید. cRNA که ROMK2 و موتاسیون V364D را کد می‌کرد، سه روز قبل از قرار دادن در محلول BFA (زمان صفر) به اووسیت‌ها تزریق می‌شد. به محیط کشت برفلدین A (+BFA) به مقدار 5-25 میکرومولار (مهار کننده انتقال پروتئین‌های ساخته شده به غشاء) یا اتانول به عنوان حلال BFA (-BFA) اضافه گردید. با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکتروود جریان یونی و پتانسیل استراحت غشاء اووسیت‌ها پس از بیان کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و موتاسیون V364D اندازه‌گیری گردید. جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تی آموزشی استفاده شد.

نتایج: یافته‌های حاصل نشان داد اثر BFA بر روی میزان جریان به صورت وابسته دوز است. بر خلاف کانال‌های پتاسیمی ROMK2 اووسیت‌هایی که موتاسیون V354D را بیان می‌کردند در هیچ کدام از زمان‌های ثبت مورد نظر در طی دوره انکوبه شدن در BFA در هر دو غلظت 5 و 25 میکرومولار کاهش در میزان جریان یونی این کانال پتاسیمی دیده نشد. برای ROMK2 پس از این که اووسیت‌ها 48 ساعت تحت تأثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با $0/24 \pm 0/05$ ($n=16$) بود در حالی که برای موتاسیون V364D برابر با $1/17 \pm 0/09$ بود.

نتیجه گیری: نتایج، افزایش پایداری و توقف آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK2 غشاء با ایجاد موتاسیون V364D را نشان می‌داد. بنابر این باید بین انتهای کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و اجزاء مسیر آندوسیتوز تداخل عمل وجود داشته باشد و قسمت داخلی ناحیه PDZ (S-E-V) در آندوسیتوز و پایداری کانال‌های پتاسیمی ROMK2 در غشاء دخالت دارد.

واژگان کلیدی: ROMK2، موتاسیون V364D، BFA، ناحیه PDZ

*نویسنده مسئول: اراک، میدان بسیج، مجتمع دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

Email: s.hajihashemi@gmail.com

مقدمه

سیستم‌های دفعی ترکیب شیمیایی مایعات بدن را با دفع مواد زائد متابولیک و نگهداری مقادیر مناسبی از آب، نمک و مواد غذایی تنظیم می‌کنند. کلیه‌ها، کبد، ریه‌ها و پوست اجزا سیستم دفعی می‌باشند. کلیه‌ها اندام‌های مسئول نگهداری حجم و ترکیب یونی مایعات بدن هستند. نفرون واحد ساختمانی و عملی کلیه است. عمل انتقال دهنده اپی‌تلیوم نفرون‌ها به چگونگی توزیع پروتئین‌ها و لیپیدها در غشاء رأسی و قاعده‌ای - جانبی بستگی دارد. با وجود آندوسیتوز مداوم این توزیع نامتقارن در غشاء رأسی و قاعده‌ای - جانبی توسط روندهای توزیع کننده پروتئین‌ها و احتباس انتخابی پروتئین‌ها به کمک تداخل با اسکلت سلولی نگاه داشته می‌شود (1،2). ایزو فورم‌های مختلف کانال پتاسیمی ROMK در قسمت‌های انتهایی نفرون و در مجاری جمع کننده حضور دارند و مسئول ترشح K^+ در این قسمت‌ها هستند. موقعیت و محل پروتئین کانال‌های پتاسیمی ROMK در غشاء رأسی سلول‌های کلیه شناسایی شده است (3). کانال ROMK1 ($K_{ir}1.1a$) به طور گسترده در مجاری جمع کننده قشری بیان می‌شود. ROMK2 ($K_{ir}1.1b$) در بخش قشری قسمت ضخیم بازوی بالا رونده لوله هنله، لوله دور و مجاری جمع کننده قشری و هم‌چنین ROMK3 ($K_{ir}1.1c$) در بخش مرکزی و قشری قسمت ضخیم بازوی بالا رونده لوله هنله و لوله دور یافت می‌شوند (4).

در سلول‌های پستانداران چندین مسیر از جمله فاگوسیتوز، داخل بردن از طریق کاوولا¹ (نواحی بسار کوچکی که غنی از کلاسترول و گلیکواسفنگولیپید است) و آندوسیتوز به واسطه کلاترین برای آندوسیتوز وجود دارد. نواحی پوشیده شده کلاترینی از دو پروتئین کلاترین و آداپتور کلاترین تشکیل شده است. جوانه زدن از غشاء پلاسمایی در آندوسیتوز به واسطه کلاترین به پروتئینی به نام

دینامین² نیاز دارد، که به GTP متصل می‌شود و آن را هیدرولیز می‌کند. موتاسیون دینامین آندوسیتوز را مهار می‌نماید. تعداد کانال‌های پتاسیمی در غشاء پلاسمایی بیان‌گر تعادل دینامیکی بین روندهای جایگزین کردن آگزوسیتوزی کانال پروتئینی و آندوسیتوز برگشتی آن می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK برای تنظیم ترشح K^+ در مجاری جمع کننده کلیه مهم می‌باشد (5-7). اخیراً وانگ و همکاران گزارش کردند که فعالیت cSrc کیناز (ایزوفورم PTKs) در کلیه موش‌های رات برای تنظیم تعداد کانال‌های پتاسیمی غشاء رأسی لازم است و بارژیم دریافت K^+ در این حیوانات رابطه‌ای معکوس دارد (8). مهارگران تیروزین کیناز و تیروزین فسفاتاز تعداد کانال‌های پتاسیمی را در ثبت‌های پیچ کلامپ³ از سلول‌های مجاری جمع کننده (CCDs) جدا شده رات و کانال‌های ROMK1 بیان شده در اووسیت‌ها و هم‌چنین سطح فعالیت cSrc کیناز به ترتیب افزایش و کاهش می‌دهند. با استفاده از مهارگران آندوسیتوز اثرات مهار کننده‌های تیروزین کیناز و فسفاتاز بر روی فعالیت این کانال‌های پتاسیمی جلوگیری می‌گردید (6،4،9). این نتایج نشان می‌دهد که تنظیم آندوسیتوزی کانال‌های ROMK مکانیسم مهمی است که ترشح پتاسیم به وسیله مجاری جمع کننده را توسط رژیم دریافت پتاسیم تحت تأثیر قرار می‌دهد. تغییر در رژیم دریافت پتاسیم، فعالیت cSrc تیروزین کیناز و تیروزین فسفاتاز مربوطه را تغییر می‌دهد که به نوبه خود میزان آندوسیتوز و یا آگزوسیتوز کانال‌ها را تغییر می‌دهد. پروتئین‌ها از چند طریق از غشاء پلاسمایی برداشته می‌شوند که شامل هر دو نوع مکانیسم وابسته و غیر وابسته به کلاترین می‌باشد (10).

گوردون و همکاران نشان داده‌اند که به دنبال تزریق crRNA به صورت *in vitro*، اووسیت‌ها پروتئین جدید را از روی crRNA الگو در تعداد کپی بیشتر با چند

2 - Dynamin.

3 - Patch Clamp.

1 - Caveolae.

گردید و هر بار از 10 عدد از اووسیت‌ها ثبت گرفته شد. حیوانات در تانک‌های پلاستیکی و آب با درجه حرارت 19- 23 درجه سانتی گراد در شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی نگهداری می‌شدند. به طور خلاصه حیوانات در محلول بیهوش کننده تراپن 2 درصد³ با pH برابر 7/80 قرار می‌گرفتند. بعد از بیهوش شدن، حیوان با جدا کردن سر و تخریب طناب نخاعی کشته شد. اووسیت‌ها به همان روش پروتکل استاندارد⁴ که توسط کوپر و همکارانش توصیف شده است، تحت شرایط آسپتیک جدا و نگهداری شدند (14). همه محلول‌ها با عبور از فیلترهای با قطر منافذ 0/2 میکرومتر استریل شدند. به طور خلاصه لوب‌های تخمدان جدا شده و به تکه‌های به اندازه تقریبی 1x1x0/5 سانتی متر بریده شدند و به داخل لوله‌های کشت 50 میلی لیتری منتقل گردیدند و بر روی یک شیکر افقی⁴ به مدت یک ساعت در محلولی فاقد کلسیم (Ca²⁺ ND96 - 0) قرار گرفتند، هر ده دقیقه محلول آن با محلول تازه تعویض شد. اووسیت‌ها دوبار در محلول فاقد کلسیم (Ca²⁺ ND96 - 0) محتوی 2 میل گرم در میلی لیتر کلاژناز (Type 1A) به مدت 20 دقیقه قرار گرفتند. اووسیت‌های سالم در مراحل V و VI با توجه به قطر و شکل آنها شناسایی و در زیر میکروسکپ جدا شدند و در محلول OR3 در 18 درجه سانتی گراد در آنکوباتور سرد⁵ نگهداری شدند. پس از به دست آوردن منحنی دوز- پاسخ cRNA به مقدار 1 نانوگرم در حجم نهایی 50 نانوگرم تزریق گردید و به اووسیت‌های کنترل 50 نانوگرم آب تزریق گردید. با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکترود (TEVC)⁶ جریان یونی مربوط به کانال‌های پتاسیمی ROMK2 رات اندازه گیری گردید.

برابر سطح همان نوع پروتئین با منشاء داخلی خود اووسیت می‌سازند. بنابراین سیگنال بزرگی که ایجاد می‌شود به طور مشخص نتیجه تزریق cRNA می‌باشد (شکل 1) (11). با وجود مطالعات گسترده الکتروفیزیولوژی انجام شده بر روی کانال پتاسیمی ROMK اطلاعات کمی درباره مکانیسم‌های انتقال دهنده کانال در داخل سلول و مبادله شدن آن با غشاء وجود دارد. زنگ و همکارانش شواهد غیر قابل انکاری را برای آندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK از طریق وزیکول‌های پوشیده با کلاترین (CCV)¹ گزارش نموده‌اند و اهمیت و نقش اسیدهای آمینه ناحیه انتهای کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMK (Kir1.1) را در این روند مشخص نموده‌اند (7). توالی انتهای کربوکسیل کانال‌های پتاسیمی ROMKs انسان و جوندگان به مقدار زیادی در طول تکامل حفظ شده‌اند و دارای چند الگودر داخل قسمت‌های انتهای آنها هستند که در تعیین محل قرارگیری کانال‌های پروتئینی دارای اهمیت می‌باشند (شکل 2). از جمله یک الگوی YDNPN که با الگوی درون ببری² (Y/F)(D/E)MPXY بسیاری از پروتئین‌های غشایی که از طریق CCVs به داخل برده می‌شوند، به صورت هومولوگ است (12). روشن نشده است که آیا موتاسیون اسید آمینه والین در موقعیت 364 (V364D) در انتهای کربوکسیل پایدار و آندوسیتوز این کانال هنگامی که ROMK2 به صورت پایدار در اووسیت بیان می‌شود را تحت تأثیر می‌گذارد (13). در این تحقیق آزمایشاتی انجام گرفت تا نقش V364D را در کنترل فعالیت عملی ROMK2 در غشا پلاسمایی مشخص نماید.

روش کار

در این تحقیق تجربی حیوانات ماده و بالغ *Xenopus laevis* از شرکت Blades Biologicals خریداری گردیدند. برای انجام آزمایشات هر آزمایش پنج بار تکرار

3 - Tricaine methansulfonate.

4 - Rotatest R100, Luckham.

5 - LMS: Jencons Scientific Ltd.

6 - Two Electrode Vltage canp.

1 - Clathrin-Coated Vesicles .

2 - Internalization motif.

mode به وضعیت Voltage Clamp mode تغییر داده شد. در ابتدا پتانسل در 50- میلی ولت نگاه داشته شد و سپس از 120- تا +100 میلی ولت تغییر داده شد. در هر مرحله به اندازه 20 میلی ولت تغییر داده شد و به مدت 50 میلی ثانیه در هر ولتاژ نگاه داشته شد و بین هر مرحله ولتاژ به 50- میلی ولت بر گردانده شد. برای هر ثبت این پروتکل 5 بار تکرار گردید و متوسط سیگنالها محاسبه گردید. باریم به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی ROMK در مطالعات TEVC به کار برده شد. بعد از ثبت نمودن رابطه ولتاژ- جریان (I-V) با محلول کنترل ND96، محلول ND96 حاوی 5 میلی مولار از $BaCl_2$ بر روی اووسیتها جریان می یافت تا این که میزان جریان به حالت پایدار برسد. در این حالت ثبت رابطه ولتاژ- جریان (I-V) تکرار می شود. پروتکل این آزمایشات به این صورت انجام شده است. cRNA که ROMK2 را کد می کرد سه روز قبل از قرار دادن در محلول BFA (زمان صفر) به اووسیتها تزریق می شد و در محیط کشت OR3 انکوبه می گردید. در زمان صفر به محیط کشت حاوی BFA (+BFA) به مقدار 5-25 میکرومولار یا حلال BFA⁷ (اتانول) اضافه گردید. محلول استوک BFA به صورت 15 میلی مولار در اتانول به عنوان حلال تهیه گردید. BFA ماده ای است که انتقال پروتئین از شبکه اندوپلاسمی (ER) به دستگاه گلژی را مسدود می نماید، بنابراین پروتئینهایی که جدید ساخته شده به غشاء سلول اضافه نمی شود و میزان کاهش در تعداد کانالها میزان آندوسیتوز آنها را نشان می دهد. در طول دوره آزمایشات، محیط کشت هر روز با محیط کشت تازه تعویض گردید. در همه آزمایشات از پلاسمید pTLN-OMKR2 (اهدایی توسط دکتر گوردون کویر) استفاده گردید. برای ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK رات با استفاده از روش quick-change موتاسیون زای مستقیم جایگاه⁸

بر اساس تکنیک TEVC غشاء اووسیت توسط دو الکتروود، یک الکتروود برای ثبت ولتاژ (الکتروود ولتاژی) و دیگری برای تزریق جریان (الکتروود جریان) سوراخ گردید. پتانسیل غشاء به دنبال دریافت ولتاژ توسط الکتروود ولتاژی با ولتاژ مورد درخواست مقایسه می شود و اختلاف بین این دو مقدار با تزریق جریان به صفر می رسد. آزمایشات ولتاژ کلمپ با استفاده از آمپلی فایر Clamp 500B-Gene¹ انجام گرفت. داده ها با استفاده از نرم افزار Clampex² بر روی یک کامپیوتر IBM مجهز شده به یک مبدل آنالوگ به دیجیتال³ ثبت گردیدند. محفظه اووسیتها RC-3Z⁴ مورد استفاده قرار گرفت که به یک پمپ خلاء متصل می شد که مکش محفظه اووسیت را تأمین می کرد. میزان جریان محلول به میزان 5 میلی لیتر در هر دقیقه بر روی اووسیتها سرریز می شد. الکتروود رفرانس متصل به زمین (سیم Ag/AgCl₂) در داخل محلول پرفیوژن کننده اطاقک قرار گرفت. الکتروودها از لوله های موئینه شیشه ای بروسیلیکات با قطر خارجی 1/5 میلی متر و قطر داخلی 0/86 میلی متر⁵ با استفاده از یک میکرو الکتروود پولر عمودی⁶ کشیده شدند. الکتروودها با کلرور پتاسیم 3 مولار پر شدند و الکتروودهای با مقاومت 0/5-2/5 میلی اهم برای ثبت های داخل سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

نحوه گرفتن ثبت های ولتاژ کلمپ میکروالکتروودها با زاویه 45 درجه نسبت به سطح اووسیت به آرامی به درون اووسیتها وارد گردید. قبل از وارد کردن میکروالکتروودها آنها با الکتروود رفرانس صفر گردیدند. اندازه گیری ها هنگامی انجام گرفت که هر دو الکتروود ولتاژ و جریان، پتانسیل غشائی یکسانی را نشان می دادند. هنگامی که پتانسیل غشائی ثابت گردید آمپلی فایر از حالت Setup

1 - Axon Instruments, Foster City, CA, USA.

2 - pClamp, Axon Instruments, version 6.

3 - Digidata 1200, Axon Instruments.

4 - Warner Instruments Inc.

5 - GC150F-15 Harvard Apparatus.

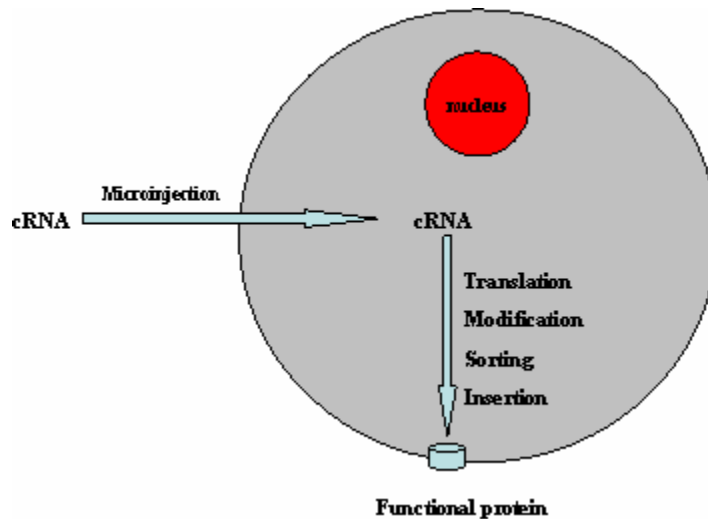
6 - Microelectrode puller PP-83: Narishige, Japan.

7 - Brefeldin A.

8 - Site-directed mutagenesis.

شده است. برای مقایسه نتایج آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تی دانش آموزی به کار برده شد. سطح معنی دار بودن 5 درصد می باشد.

ایجاد گردید. موتاسیون V364D یک موتاسیون در قسمت داخلی ناحیه PDZ تولید شد. در همه موارد پلاسمید با استفاده از MLU I به صورت خطی تبدیل گردید و cRNA توسط آنزیم RNA SP6 پلیمرز تولید گردید. نتایج به صورت میانگین همراه با انحراف استاندارد ارائه



شکل ۱. روش بیان پروتئین با منشاء خارجی در اووسیت های *Xenopus laevis*

KRGYDNP N FILSEVNETDDTKM-COOH	Human
KRGYDNP N FVLSEVDETDDTQM-COOH	Rat
KRGYDNP N FVLSEVDETDDTQM-COOH	Mouse

شکل ۲. اسید های آمینه انتهای کربوکسیل انسان، رات و موش مورد قبول واقع شده برای درون بری به واسطه کلاترین (پر رنگ شده) را نشان می دهد. V قرمز رنگ شده به والین در موقعیت V364 مربوط می شود.

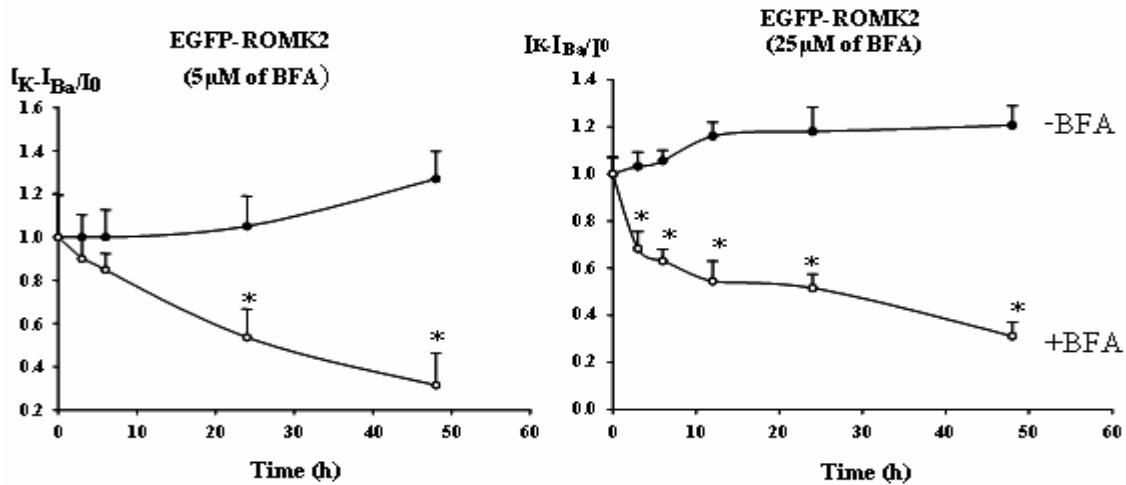
حضور 25 میکرومولار BFA حدود 15-10 ساعت می باشد. برای ROMK2 پس از این که اووسیت ها 48 ساعت تحت تأثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با $0/24 \pm 0/05$ (n=16) بود. شکل 4 میزان جریان از دو عدد اووسیت از این سری از آزمایشات بعد از 48 ساعت انکوبه شدن در 25 میکرومولار BFA را نشان می دهد و کاهش واضحی در سطح جریان حساس به باریم را نشان می دهد. اثر برفلدین A (BFA) بر روی موتاسیون V354D کانال پتاسیمی ROMK2: اووسیت هایی که موتاسیون V354D کانال پتاسیمی ROMK2 را بیان می کردند در هیچ کدام از زمان های ثبت مورد نظر در طی

نتایج

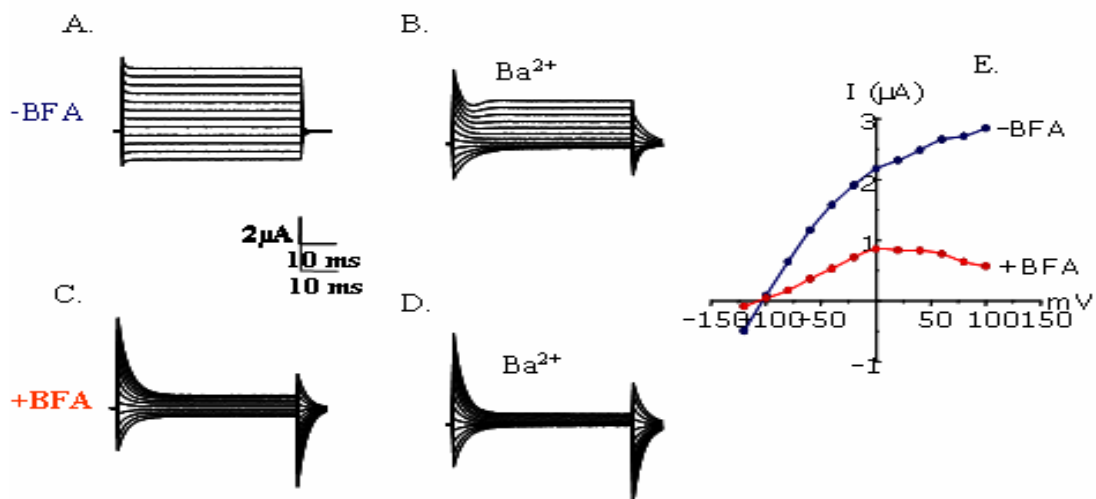
اثر برفلدین A (BFA) بر روی کانال پتاسیمی ROMK2: انکوبه کردن کانال پتاسیمی ROMK2 در هر دو محلول 5 و 25 میکرومولار BFA سبب کاهش میزان جریان گردید. اثر BFA بر روی جریان به صورت وابسته دوز است به این صورت که با دوز 5 میکرومولار BFA میزان جریان بعد از 24 ساعت کاهش معنی داری پیدا می کرد. در حالی که با دوز 25 میکرومولار BFA میزان جریان در تمامی زمان ها (3، 24، 6، 12 و 48) ساعت پس از انکوبه شدن) کاهش معنی داری مشاهده گردید (شکل 3). زمانی که کاهش جریان ROMK2 به نصف می رسد در

می‌دهد. چنان که پیش بینی می‌شد اگر تعداد کل کانال‌های پتاسیمی ROMK2 در غشاء اووسیت توسط BFA کاهش یابد پتانسیل استراحت غشاء دیپلاریزه می‌شود و V_M از E_K دور می‌شود و بر خلاف آن V_M در اووسیت‌هایی که V364D را بیان می‌کنند تحت تأثیر BFA قرار نگرفت (شکل 7).

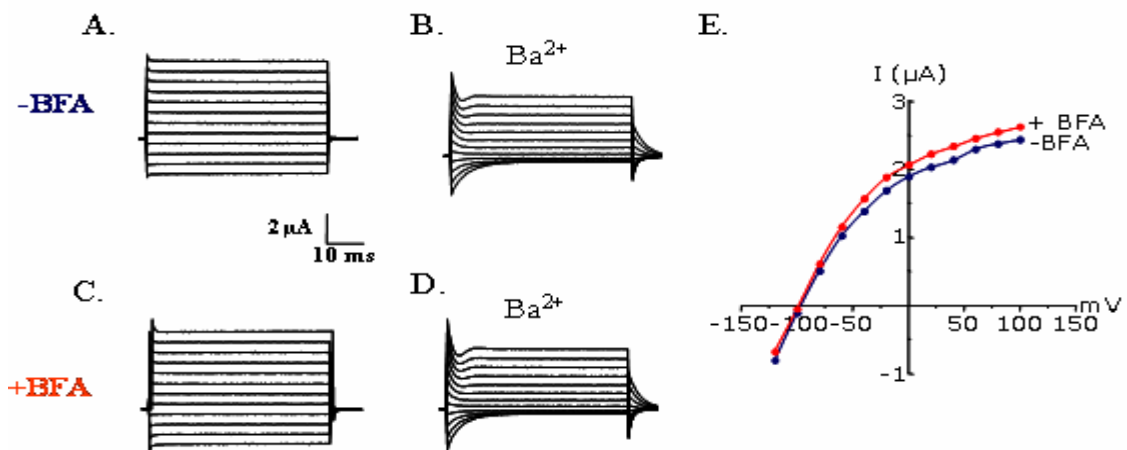
دوره انکوبه شدن در BFA در هر دو غلظت 5 و 25 میکرو مولار کاهش در میزان جریان یونی این کانال پتاسیمی نشان ندادند. پس از این که اووسیت‌ها 48 ساعت تحت تأثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با $1/17 \pm 0/09$ ($n=16$) بود. شکل 5 نمودارهای جریان از دو عدد اووسیت که موتاسیون V354D را بیان کرده‌اند را، بعد از 48 ساعت انکوبه شدن در حضور BFA نشان می‌دهد. شکل 6 کل دوره زمانی برای دوزهای بالا و پایین BFA را نشان



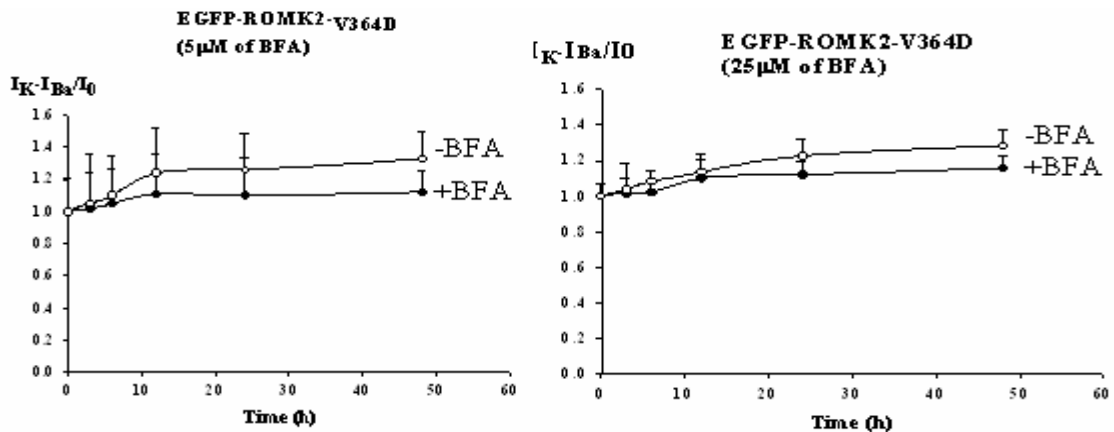
شکل ۳. کاهش کسر جریان در زمان‌های مختلف برای ROMK2 در حضور یا غیاب ۵ میکرو مولار از BFA (منحنی سمت چپ) و ۲۵ میکرو مولار از BFA (منحنی سمت راست). دایره‌های تو خالی در حضور BFA و دایره‌های تو پر به عنوان کنترل در زمان‌های مختلف می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین همراه با SD نشان داده شده است.



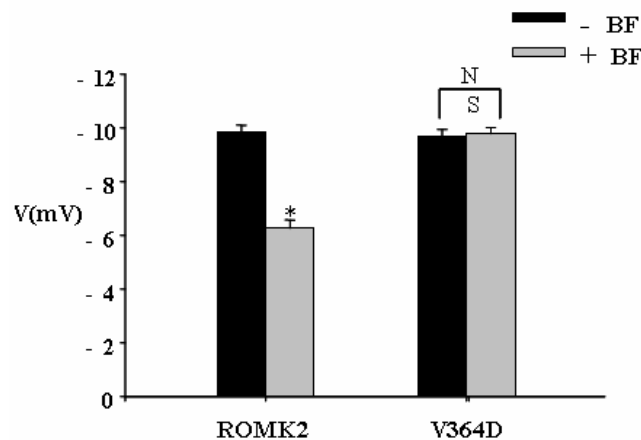
شکل ۴. اثر BFA بر روی کانال پتاسیمی ROMK2 را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثبت شده A-D از دو اووسیت Xenopus در حضور و عدم حضور ۵ میکرو مولار از کلرور باریم در گروه کنترل (منحنی‌های A و B) و گروه بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور ۵ میکرو مولار از BFA (منحنی‌های C و D) را نشان می‌دهد. نمودار E منحنی جریان-ولتاژ (I/V) از همان اووسیت را نشان می‌دهد.



شکل ۵. اثر BFA بر روی کانال پتاسیمی موتاسیون یافته ROMK2-V364D را نشان می دهد. منحنی های ثبت شده A-D از دو اووسیت *Xenopus* در حضور و عدم حضور ۵ میکرو مولار از کلرور باریم در گروه کنترل (منحنی های A و B) و گروه بعد از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در حضور ۵ میکرو مولار از BFA (منحنی های C و D) را نشان می دهد. نمودار E منحنی جریان-ولتاژ (I/V) از همان اووسیت را نشان می دهد.



شکل ۶. میزان کسر جریان در دوره زمانی ۴۸ ساعت برای ROMK2-V364D در حضور یا غیاب ۵ میکرو مولار از BFA (منحنی سمت راست) و ۲۵ میکرو مولار از BFA (منحنی سمت چپ). دایره های تو خالی در حضور BFA و دایره های تو پر به عنوان کنترل در زمان های مختلف می باشد. داده ها به صورت میانگین همراه با SD نشان داده شده است.



شکل ۷. پتانسیل استراحت اندازه گیری شده در اووسیت هایی که EGFP-ROMK2 و V364D را بیان کرده اند در حضور و غیاب BFA را پس از مدت ۴۸ ساعت نشان می دهد ($n = 24$, $P < 0.001$ *).

بحث

چندین مطالعه نشان داده است که کانال ROMK در غشاء پلاسمایی آندوسیتوز می‌گردد. با استفاده از BFA انتقال کانال‌هایی که به صورت جدید ساخته می‌شوند به غشاء پلاسمایی متوقف گردید. ولی ادامه آندوسیتوز این کانال‌ها در غشاء اووسیت سبب کاهش تعداد کانال‌های پتاسیمی و در نتیجه کاهش میزان جریان یون‌های پتاسیم در ثبت‌های الکتروفیزیولوژی گردید. ثبت‌های الکتروفیزیولوژی به این منظور انتخاب گردید که از نظر کمی برای کانال‌های فعال غشاء بسیار دقیق هستند.

اووسیت‌های *Xenopus laevis* دارای ماشینی برای آندوسیتوز از طریق CCVs است و برای مطالعه آندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین (CCV) بسیاری از کانال‌های یونی از جمله کانال‌های سدیمی اپی‌تلیال (ENaCs)، CFTR، کانال‌های کلراید و کانال‌های پتاسیمی ROMK1 مورد استفاده قرار می‌گیرند (4، 15، 16). BFA ماده‌ای است که بر روی آندوسیتوز از طریق CCV در غشاهای پلاسمایی تأثیری ندارد (17). آزمایشات ما تأثیر مهارت ماده BFA بر روی ترافیک این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد که با مطالعات قبلی دیگران بر روی کانال‌های ROMK1 مطابقت دارد (4). آندوسیتوز از طریق CCVs در غشاء پلاسمایی چندین نقش دارد. از جمله این وظایف نگهداری هموستاز سلولی توسط باز یافت اجزاء پروتئینی به درون غشاء پلاسمایی است که توسط فعالیت مداوم ترشحی، برداشت مولکول‌ها از فضای خارج سلولی و تنظیم تعداد پروتئین‌های غشاء در شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک انجام می‌شود.

بر هم کنش پروتئین با پروتئین برای بسیاری از روندهای سلولی حیاتی است و توسط بخش‌های پروتئینی حفظ شده در طول تکامل میانجی‌گری می‌شود. تنظیم بسیاری از اعمال مختلف سلولی نه تنها به خصوصیات ساختمانی و کاتالیتیک هر کدام از پروتئین‌ها بلکه به تداخل فضایی و زمانی بین آنها بستگی دارد. این بر هم کنش‌ها

ممکن است به صورت مستقیم یا با واسطه پروتئین‌های آداپتوری باشد که بخش‌هایی از قطعات پلی‌پپتیدی را تشخیص می‌دهند و با یا بدون تعدیل‌های پس از ترجمه به آنها متصل می‌شوند (18). یکی از مهم‌ترین گروه آداپتورهای پروتئینی، پروتئین‌های ناحیه PDZ است که حاوی تعداد متغییری از اسیدهای آمینه حدود 90 اسید آمینه است که به طور اختصاصی به قطعات کوتاه در پروتئین‌های C - انتهایی متصل می‌شود. ناحیه PDZ پروتئین تعدیل‌کننده هستند که در نشانه‌گیری¹ پروتئین و ساخته شدن پروتئین‌های پیچیده نقش دارد. بسیاری از این لیگاندها دنباله‌های سیتوپلاسمی پروتئین‌های عرض‌گشایی هستند که در نواحی اختصاصی غشاء مانند اتصالات پیچیده اپی‌تلیال به یکدیگر اتصال می‌آیند (19). چندین ناحیه PDZ که مجتمع‌ها را به یکدیگر متصل می‌کند در پولاریته (قطبی شدن) غشا رأسی و قاعده‌ای سلول‌های اپی‌تلیال شرکت دارد (20). توالی اختصاصی تداخل‌های بین پروتئین‌ها اساس را برای مرتب شدن ساختمانی و عملکردی درون سلول‌ها فراهم می‌کند. بعضی از بر هم کنش‌ها توسط نواحی پروتئینی ساختمانی حفظ شده با ناحیه تعدیل‌کننده و اتصالاتی PDZ واسطه می‌شود. ناحیه PDZ در پروتئین‌های همراه اسکلت سلولی همانند PSD-95 حضور دارد و یک نقش مهم در ساختمان‌های غشایی دارد. تعدیل کانال‌های پتاسیمی ROMK توسط اسکلت سلولی اتصال بین این کانال‌ها و اسکلت سلولی را تأیید می‌کند. موتاسیون کانال ROMK در موقعیت T332 سبب شیفت بدنه² و یک کدون متوقف‌کننده زودرس در نزدیک C-انتهایی می‌شود که آمد و شد³ کانال به غشاء پلاسمایی را مهار می‌کند و سبب ایجاد سندروم بارترز⁴ می‌شود. در حال حاضر این روشن شده است که پروتئین‌های ناحیه PDZ یک نقش بسیار مهم در هدف‌گیری پروتئین به بخش‌های

1 - Targeting.

2 - Frame shift.

3 - Trafficking.

4 - Bartter's syndrome.

ROMK2 با واسطه CCV توسط تیروزین کیناز و فسفاتاز بررسی می‌شود.

نتیجه گیری

این نتایج نشان می‌دهد که کاهش پیش رونده در میزان جریان از کانال‌های ROMK2 در اثر BFA ناشی از تأثیر بر روی باز شدن کانال نیست بلکه نتیجه کاهش در تعداد کانال‌های عمل کردی در غشاء پلاسمایی است. موتاسیون V364D مقاومت پروتئین کانال‌های ROMK2 نسبت به آندوسیتوز را سبب می‌شود که با این عقیده توافق دارد که بین C- انتهای کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و اجزاء مسیر آندوسیتوز تداخل عمل وجود دارد و ممکن است که یک ناحیه PDZ دارای عملکرد مناسب را برای آندوسیتوز نیاز داشته باشد.

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. *J Cell 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. 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.
5. Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, Gu R, Huang XY, Hebert SC, Giebisch G, Wang WH. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2001; 276, 7156-7163.

اختصاصی غشاء و وارد شدن به درون کمپلکس‌های غول پیکر مولکولی¹ دارد. هم چنین شواهدی وجود دارد که آنها می‌توانند عمل لیگاند‌های خودشان را علاوه بر انجام وظیفه همانند یک داربست تنظیم نمایند. این قابلیت اتصال به توالی‌های C- انتهای کوچک راه ساده مقایسه‌ای برای پروتئین‌های PDZ پیشنهاد می‌کند که با پروتئین‌های هدف بدون برهم زدن ساختمان و عمل کلی لیگاند‌هایشان تداخل می‌نمایند. سوال کلیدی که باقیمانده است، این است که نواحی PDZ چگونه این عمل را انجام می‌دهد؟ عملکرد کانال می‌تواند توسط کنترل توزیع کانال به درون نواحی تخصص یافته از غشاهای پلاسمایی و یا از طریق اسکلت سلولی تنظیم گردد. برای مثال کانال K_{ir}2.3 از طریق نواحی کوچکی از C- انتهای به اسکلت سلولی متصل می‌شود که با پروتئین متصل شونده PSD-95 (یک نوع از پروتئین متراکم پس سیناپسی) از PDZ تداخل می‌کند که به آن اجازه می‌دهد به رشته‌های اکتین اسکلت سلولی متصل شود. اسید آمینه سرین در ناحیه C- انتهای از کانال‌های K_{ir}2.3 برای این برهم کنش مهم و ضروری است (21). نتایج به دست آمده در این مطالعه برهم کنش‌های مشابهی را پیشنهاد می‌کند که ممکن است بیان پروتئین‌های کانال‌های ROMK2 در کلیه را تحت تأثیر قرار دهد.

پتانسیل استراحت اندازه گیری شده و هم چنین میزان جریان ثبت شده یون‌های پتاسیم از کانال‌های ROMK2 در اووسیت‌هایی که ROMK2 و V364D را بیان کرده‌اند در حضور و غیاب BFA افزایش پایداری و ثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 در غشاء با ایجاد موتاسیون V364D را نشان می‌دهد، که با این عقیده توافق دارد که S-E-V در تعیین پایداری کانال‌های پتاسیمی ROMK و هم چنین آندوسیتوز آنها نقشی به عهده دارد. در آزمایشات آینده چگونگی تنظیم آندوسیتوز کانال

6. Wei Y, Bloom P, Gu R, Wang W. Protein-tyrosine phosphatase reduces the number of apical small conductance K⁺ channels in the rat cortical collecting duct. *J Biol Chem* 2000; 275, 20502-20507.
7. 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.
8. 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.
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. 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.
12. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12, 575-625.
13. Shieh BH, Zhu MY. Regulation of the TRP Ca²⁺ channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1996; 16, 991-998.
14. 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.
15. 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.
16. 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):25537-25541.
17. 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.
18. Scott JD, Pawson T. Cell communication: the inside story. *Sci Am* 2000; 282, 72-79.
19. 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.
20. Bilder D, Schober M, Perrimon N. Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 53-58.
21. Cohen NA, Brenman JE, Snyder SH, Brecht DS. Binding of the inward rectifier K⁺ channel K_{ir} 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 1996; 17, 759-767.

Effect of the V364D mutation in membrane endocytosis of ROMK2 (K_{ir}1.1b)

Hajihashemi S²³, White SJ²⁴

Abstract

Introduction: Recent studies suggest that endocytosis of ROMK channels is important for regulation of K⁺ secretion in cortical collecting ducts. In this study the effect of V364D mutation is examined on the membrane turnover and stability of ROMK2 channel when expressing in *Xenopus laevis* oocytes.

Materials and Methods: In this experimental study oocytes were isolated by standard protocols using collagenase (Type 1A). Mutations of the cytoplasmic termini of ROMK2 were constructed using the quikchange approach for site-directed mutagenesis. *Xenopus* oocytes were injected with cRNA encoding ROMK2 or V364D mutant three days prior to treatment with BFA solution (time 0). Brefeldin A (BFA) was added to the OR3 medium (+BFA) at concentrations of 5-25 μM (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. Data was analysed using Student's t-tests or ANOVA as appropriate.

Results: Incubation of oocytes expressing ROMK2 channels in both 5 μM and 25 μM BFA caused a reduction in the normalized steady state currents. The effect of BFA was dose dependent. In oocytes expressing the V364D mutant, there was no decay in current at any time point during incubation with BFA at either 5 μM or 25 μM. The fractional current for ROMK2 at 48h following treatment of oocytes with BFA was 0.24 ± 0.05 (n=16) which was significantly different to V364D mutant (1.17 ± 0.09).

Conclusion: These results show that the V364D mutation increases the general stability of ROMK and renders the protein resistant to endocytosis, consistent with the idea that there is an interaction between the C-terminal of ROMK2 and components of the endocytotic pathway. A functional PDZ domain (the S-E-V) plays a key role in determining stability of ROMK.

Key words: ROMK2, V354D mutant, BFA, PDZ domain

23 - Assistant professor, department of physiology, school of medical science, Arak University of medical sciences.

24 - Professor, institute of membrane and systems biology, University of Leeds, UK.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.