

مقاله پژوهشی

شواهد الکتروفیزیولوژی مبنی بر وجود یک کانال جدید کلر در غشاء داخلی میتوکندری مغز موش صحرائی

فرزاد شایانفر^۱، جواد فحانیک بابائی^۲، ناصر خدای عطالو^۳، رضا صغیری^۴، افسانه الیاسی^{۵،*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران
۴. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران
۵. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲۸ دی ۱۳۹۵

دریافت: ۹ آبان ۱۳۹۵

چکیده

زمینه و هدف: وجود کانالهای کلر در غشاء داخلی میتوکندری گزارش شده است. این کانالها موجب تنظیم حجم اندامک و سلول، ارتباطات سلولی و اسیدی شدن اندامک ها و حفاظت سلولی می شوند. مطالعات قبلی ما حضور یک کانال کلری با هدایت 301pS را در غشاء داخلی میتوکندری مغز نشان داد. در مطالعه حاضر، رفتار بیوفیزیکی یک کانال کلر جدید در غشاء داخلی میتوکندری مغز موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت.

روشها: مغز موش صحرائی بالغ جدا و هموژنیزه شد. هموژنات را طی ۳ مرحله در MSE -دیژیتونین، آب، و Na_2CO_3 سانتریفیوژ شد و وزیکول های غشاء داخلی میتوکندری به شکل محلول در MSE جدا گردید. فسفاتیدیل کولین زرده تخم مرغ جهت تشکیل غشاء دو لایه لیپید استخراج گردید. این غشاء در منفذی به قطر $200 \mu\text{m}$ تشکیل شد. سیگنالهای ثبت تک کانال به میزان 1 kHz فیلتر شدند و با سرعت نمونه برداری 10 kHz ذخیره گردیدند. اطلاعات بر اساس Markov's noise free single channel analysis با نرم افزار Pclamp 10 آنالیز گردیدند.

یافتهها: کانال الحاق شده در غشاء لیپیدی دولایه در محیط الکترولیتی 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans یک کانال آنیونی با کندانانس 158 pS بود. احتمال باز بودن کانال نشان داد که این کانال یک کانال وابسته به ولتاژ بوده و در محدوده ولتاژی بین $\pm 20 \text{mV}$ فعالیت بالایی دارد. اضافه کردن ماده مهار کننده کانال کلر DIDS به ناحیه ای که معادل محیط داخل سلولی (سمت سیس) است سبب مهار قوی کانال گردید.

نتیجه گیری: این بررسی حضور یک کانال آنیونی وابسته به ولتاژ در غشای داخلی میتوکندری بافت مغز موش صحرائی را نشان داد. این کانال ممکن است در اعمالی چون تنظیم پتانسیل غشایی، تنظیم pH، سنتز ATP و حفاظت سلولی در مغز نقش کلیدی داشته باشد.

واژه های کلیدی: کانال کلر، غشاء داخلی میتوکندری، غشاء لیپیدی دو لایه

مقدمه

تغییر دادن غلظت یونهای کلیدی در فرایند پیام رسانی سلولی (که کنترل کننده دامنه وسیعی از عملکردهای سلول می باشند) شرکت می نمایند. علیرغم این که مطالعات وسیعی در زمینه کانالهای یونی غشای پلاسمایی صورت گرفته است اما به دلیل دسترسی مشکل به غشاهای داخل سلولی، مطالعات چندانی در زمینه الکتروفیزیولوژی، نقش فیزیولوژیک و ماهیت

کانالهای یونی، پروتئینهای غشایی هستند که با

afseliassi@gmail.com

http://ijpp.phypha.ir

ijpp@phypha.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

پست الکترونیکی:

توسط کلروفورم بیهوش شدند. مغزها فوراً خارج و به محلول سرد MSE (225 mM مانیتول، 75 mM سوکرز، 5 mM هیپس، 1 mM EGTA و 1 mg/ml BSA با pH 7/4) منتقل و شستشو داده شدند. پس از لیز توسط MSE-ناگاریز (0.5%/ ناگاریز در محلول MSE)، با هموژنایزر الکتریکی در 600 units/s هموژنیزه شدند. در ادامه محلول MSE اضافه شد و با سرعت $2000 \times g$ برای 4 دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول رویی برداشته شد و با سرعت $12000 \times g$ برای 9 دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در 10 ml محلول MSE- دیژیتونین سرد (محلول 0.2%/ دیژیتونین در محلول MSE) حل شده و 10-8 مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی بدست آید. در انتها سوسپانسیون با سرعت $12000 \times g$ برای 11 دقیقه سانتریفیوژ و ویزیکولهای حاصل در 300 μ l محلول MSE حل شد تا غلظت حدود 20 mg/ml پروتئین بدست آید.

برای جداسازی غشاء داخلی میتوکندری از روش Da Cruz و همکاران استفاده شد [8]. بطور خلاصه، میتوکندری ها با غلظت 5 mg/ml پروتئین در آب مقطر سوسپانسیون شده و برای 20 دقیقه روی یخ تکان داده شدند. این ترکیب 20 مرتبه با هموژنایزر دستی هموژنیزه و دو مرتبه با سرعت $12000 \times g$ برای 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای بدست آمده ب 0.1 M بیکرنات پتاسیم (pH 11/5) در غلظت نهایی 0.5 mg/ml بمدت 20 دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. غشاء داخلی میتوکندری با سرعت $100000 \times g$ برای 35 دقیقه سانتریفیوژ شد تا به صورت ویزیکول بدست آید. نمونه ها در دمای 70- درجه سانتیگراد نگهداری می شدند.

جهت تشکیل غشا دولایه لیپیدی، از یک یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می گردد. در این مطالعه از فسفاتیدیل کولین جهت تشکیل غشا دولایه لیپیدی استفاده شد. به این منظور فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton استخراج گردید [9]. بطور خلاصه، در مرحله اول فسفولیپیدها با استفاده از حلال های آلی از سایر ترکیبات همانند پروتئین ها، پیگمان های رنگی، و سایر چربی ها جدا شده و بعد از آن جهت جدا سازی فسفاتیدیل کولین از سایر فسفاتیدها از ستون کروماتوگرافی استفاده گردید که فاز ثابت آن، آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن متانل و کلروفورم بود. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از تکنیک Thin Layer

ساختاری این کانال ها در دست نمی باشد. کانال های یونی داخل سلولی از عوامل مهم تنظیم کننده اندامک های درون سلولی و عملکرد سلول هستند. کانال کلر یک ساختار غشایی است که باز شدن آن موجب عبور یون کلر می شود. کانال های کلر علاوه بر غشای سلول در غشاهای درون سلول نیز یافت می شوند. تا کنون هفت عضو از خانواده کانال های کلر درون سلولی (CLICs, Chloride Intracellular Channels) یافت شده است که در هومئوستاز یونی و تنظیم حجم نقش ایفا می کنند [1].

انواع مختلفی از کانال های یونی توسط تکنیک پچ کلمپ بطور مستقیم و تکنیک الحاق کانال به درون غشای مصنوعی بطور غیر مستقیم در غشا داخلی میتوکندری شناسایی شده اند [2، 3]. شواهد نشان می دهند سه نوع کانال کلر شامل کانال آنیونی غشا داخلی میتوکندری (IMAC, Inner Membrane Anion Channel) [1]، منفذ انتقالی نفوذ پذیر (PTP, Permeability Transition Pore) [4] و کانال آنیونی وابسته به ولتاژ (VDAC, Voltage-Dependent Anion Channel) در غشا میتوکندری وجود دارند [5]. نتایج قبلی ما نیز نشان داد که یک کانال انتخابی آنیونی با کندانسانسی برابر 301 pS در غشای داخلی میتوکندری بافت مغز وجود دارد که غیر حساس به ATP می باشد [6]. در این مطالعه رفتار بیوفیزیکی کانال آنیونی در غشا داخلی میتوکندری مغز مورد مطالعه قرار گرفت. این مطالعه نشان می دهد غشای داخلی این ارگانل حاوی کانال آنیونی متفاوت با کانال آنیونی در مطالعه قبلی ما می باشد. این کانال دارای کندانسانس 158 pS و رفتار وابسته به ولتاژ بوده و حساس به ماده مهار کننده کانال کلر 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) می باشد.

مواد و روش ها

کلرید پتاسیم، دیژیتونین، سوکرز، D-مانیتول، بیکرنات سدیم هیپس، تریس اسیدی، EGTA، سرم آلبومین گاوی (BSA)، DIDS و nagarase از شرکت سیگما و n-دکان از شرکت مرک خریداری شدند.

نمونه های میتوکندری مورد استفاده با روش Kuddin و همکاران استخراج گردیدند [7]. دو موش صحرایی نر بالغ

Chromatography تعیین گردید.

برای تشکیل غشاء از روش مولر و همکاران استفاده شد [۱۰]. در این روش از دو محفظه سیس و ترانس از جنس تفلون استفاده می شود که توسط محلولهای کلرید پتاسیم با غلظت های (KCl ۲۰۰mM KCl cis/۵۰ mM trans) پر می شوند. در دیواره محفظه ترانس منفذی به قطر $250 \mu\text{m}$ تعبیه شده که غشاء دو لایه لیپیدی توسط قرار دادن محلول لیپیدی فسفاتیدیل کولین (با غلظت 25 mg/ml در حلال n - دکان) با استفاده از سوزن استیل به قطر $150 \mu\text{m}$ بر روی منفذ تشکیل می گردید.

جهت ثبت الکتروفیزیولوژی، وزیکول های استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری، توسط سوزن استیل به قطر $150 \mu\text{m}$ با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می شد. جریان عبوری از تک کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال و محفظه ترانس گراند می شد. اتصالات الکتریکی دو محفظه توسط الکترودهایی از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمکی/آگار (۳ مولار KCl) با دستگاه آمپلی فایر برقرار می گردید. تمام ثبتها در 1 kHz با استفاده از یک فیلتر ۴ پل بس و با سرعت نمونه برداری 10 kHz نمونه برداری و توسط دستگاه ثبت (شرکت Axon) به کامپیوتر منتقل و ذخیره می شدند. جهت آنالیز از نرم افزار Pclamp 10 (شرکت Axon) استفاده شد.

در مرحله بعد، با استفاده از ماده مهار کننده کانال کلر (DIDS)، فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور DIDS با دوز $10 \mu\text{m}$ [۶] به محفظه cis اضافه شد.

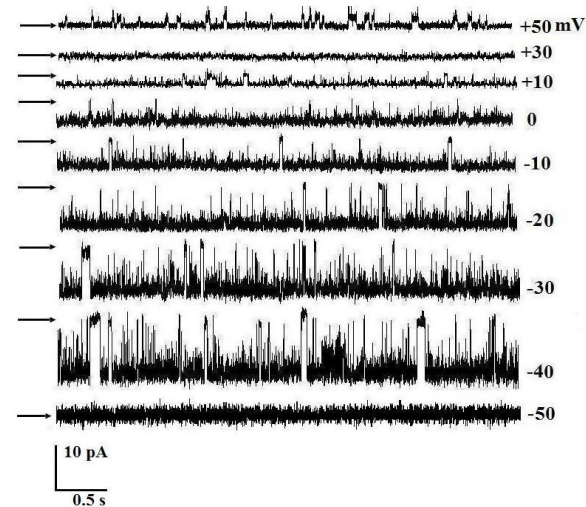
در روشهای تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، ساده ترین حالت، حضور یک وضعیت بسته و یک وضعیت باز می باشد. ارتفاع یا آمپلی تود بین این دو وضعیت نشان دهنده میزان عبور جریان از درون کانال بر اساس پیکو آمپر (pA) می باشد. متوسط میزان جریان عبوری توسط رسم هیستوگرام بدست می آمد. کنداکنانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ-جریان محاسبه گردید. احتمال باز بودن کانال (P_o) از طریق به کارگیری الگوریتمهای استاندارد تعیین رخدادهای در Pclamp10، بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی بدست می آمد. محاسبه P_o از روی قطعات یک دقیقه ای در ولتاژهای معین صورت گرفت. نتایج به

صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. جهت بررسی اثر DIDS بر فعالیت کانال از آزمون t-test استفاده شد و سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

خواص الکتروفیزیولوژی کانال کلری غشاء داخلی میتوکندری

بعد از قرار دادن وزیکول های استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری مغز موش در غشاء لیپیدی دو لایه، عبور یک جریان آنیونی مشاهده گردید. شکل ۱ نمونه ای از ثبت های تک کانال اندازه گیری شده در محدوده ولتاژی بین -50 mV تا $+50 \text{ mV}$ در شرایط کنترل (mM/۵۰ mM KCl, cis/trans) را نشان می دهد. نمودار ۱ نحوه فعالیت کانال به شکل $200 \pm$ میلی ولت مشاهده گردید. منحنی ولتاژ-جریان (I-V) در محدوده ولتاژی ± 40 میلی ولت رفتار اهمیک داشته ($n = 4$) و شیب منحنی که نشان دهنده کنداکنانس کانال است میزان کنداکنانس را معادل 158 pS نشان داد (نمودار ۱ الف). مشاهده پتانسیل معکوس (reversal potential) $+30 \text{ mV}$ در منحنی جریان-ولتاژ حاکی از آن است که تحت شرایط کنترل، کانال نسبت به آنیون انتخابی است. احتمال باز بودن (P_o) نشان می دهد که این کانال، یک کانال وابسته به ولتاژ می باشد.



شکل ۱- نمونه ثبت تک کانال در ولتاژهای انتخابی در محدوده $\pm 50 \text{ mV}$ محیط نامتقارن KCl (cis/trans) $200/50 \text{ mM}$ با سرعت نمونه برداری 10 kHz و فیلتر کم گذار دیجیتال Gaussian به میزان 1 kHz .

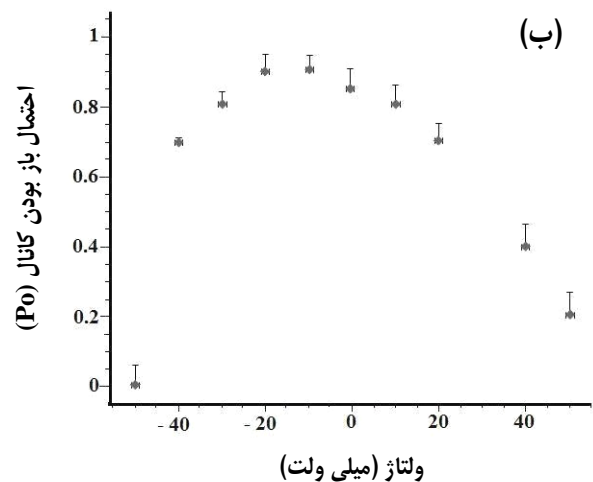
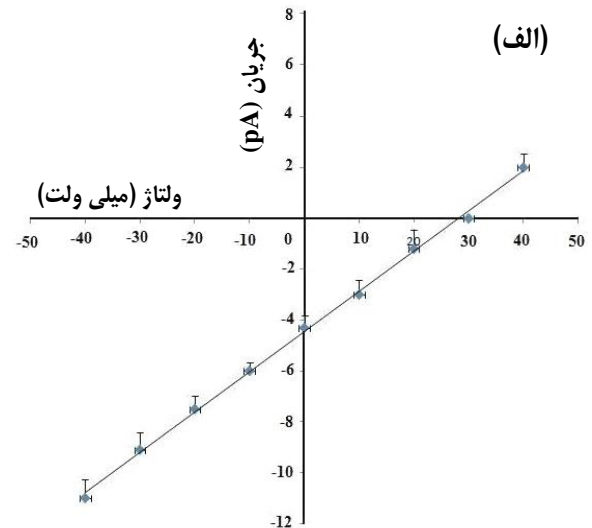
شکل ۲ مشاهده می شود اضافه کردن DIDS با دوز $10 \mu\text{M}$ به محفظه cis سبب مهار کانال در ولتاژ منفی و مثبت گردید ($n = 4$).

بحث

مطالعه حاضر حضور یک کانال کلری با کنداکتانس 158 pS وابسته به ولتاژ را در غشا داخلی میتوکندری مغز موش صحرائی نشان داد. بعلاوه، فعالیت کانال توسط DIDS مهار گردید.

غشا میتوکندری حاوی کانال‌های متنوعی از جمله کانال‌های آنیونی است. تاکنون چندین نوع از این کانال‌ها توسط متدهای پیچ کلمپ [۳] و الحاق کانال به داخل غشا لیپیدی [۲] شناسایی شده اند. مطالعات اولیه توسط Sorgato و همکاران در سال ۱۹۸۷ [۱۳] و Schönfeld و همکاران در سال ۲۰۰۴ حضور کانال آنیونی تحت نام IMAC را نشان داد [۱۴]. کانال IMAC با کنداکتانس 107 pS ، رفتاری وابسته به ولتاژ داشت به نحوی که افزایشی در احتمال بازبودن کانال در پتانسیل‌های مثبت مشاهده می شد. کانال دیگری از دسته کانال‌های انتخابی آنیونی میتوکندریایی کانال PTP است. این کانال به دلیل ساختار بسیار پیچیده دارای کنداکتانس‌های متغیری در بازه $1/3 - 9/0 \text{ nS}$ بوده و باز و بسته شدن‌های سریع در زمان فعالیت کانال مشاهده می شود. یک نوع از این کانال دارای چندین زیرواحد از جمله یک نیم کنداکتانس (half-conductance) بوده و به زیرواحد نیم کنداکتانس اصطلاحاً Half-PTP یا مختصراً HP گفته می‌شود.

HP احتمالاً یک زیرواحد با دوام طولانی از PTP است و یا یک مونومری از آن است که با تبدیل به دایمر، تشکیل یک PTP را می‌دهد و بصورت منفرد و یا همزمان باز می‌شوند و کنداکتانس‌های مختلف را به وجود می‌آورد [۱۵]. نتایج مطالعات ما کنداکتانس کانال را در محدوده 158 pS نشان می‌دهد که بسیار کوچکتر از کنداکتانس کانال‌های خانواده PTP است. بر خلاف مطالعات De Marchi و همکاران (۲۰۰۸) که نشان دادند فعالیت HP در حضور کلسیم بالا پایدار می‌باشد [۱۵] نتایج ما بیانگر آن است که فعالیت کانال در غیاب کلسیم هیچگونه تغییری نمی‌یابد (اطلاعات نشان داده نشده است). بنابراین، مطالعات اولیه بیوفیزیکی و فارماکولوژیکی کانال نشان می‌دهد این کانال احتمالاً در خانواده PTP قرار

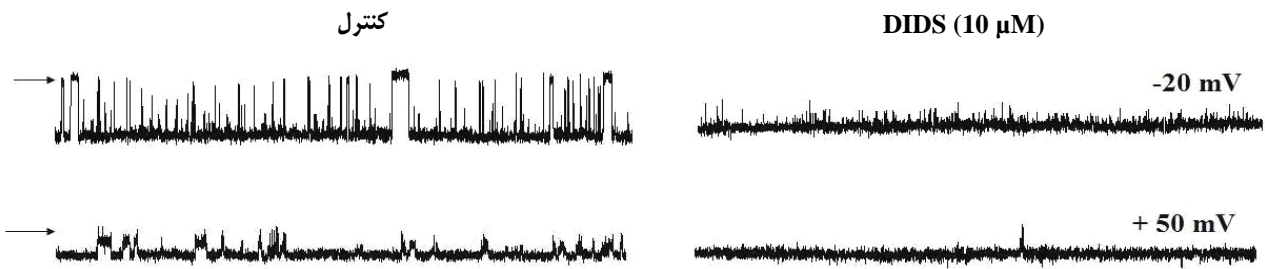


نمودار ۱- نمودارهای جریان-ولتاژ و احتمال باز بودن-ولتاژ. A: رابطه جریان-ولتاژ تک‌کانال در محیط نامتقارن $200/50 \text{ mM}$ (cis/trans) KCl. نقاط رسم شده میانگین \pm انحراف معیار برای ۴ نمونه می‌باشند. B: احتمال باز بودن کانال بعنوان تابعی از ولتاژ.

اثر ولتاژ بر روی ویژگی‌های باز و بسته شدن کانال با اندازه‌گیری احتمال باز بودن کانال (P_o) در ولتاژهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که منحنی نشان می‌دهد (نمودار ۱ب).

احتمال بازبودن کانال بصورت زنگ مانند بوده و در ولتاژهای مثبت و منفی به شدت کاهش و در محدوده $20 \pm$ میلی ولت افزایش می‌یابد به نحوی که حداکثر احتمال باز بودن کانال در این محدوده برابر $0/09 \pm 0/9$ است.

در مرحله بعد، با استفاده از مهار کننده کانال کلر (DIDS)، فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در



شکل ۲- اثر مهارکننده کانال کلر DIDS بر فعالیت کانال در ولتاژهای مثبت و منفی در دو ولتاژ انتخابی -20 mV و $+50$ mV. سمت چپ فعالیت کانال در شرایط کنترل و سمت راست در حضور DIDS را نشان می‌دهد. محیط نامتقارن KCl (cis/trans) $200/50$ mM با سرعت نمونه برداری 10 KHz و فیلتر کم‌گذار دیجیتال Gaussian به میزان 1 kHz.

پیچ‌کلمپ بر روی میتوپلاست‌ها از بافت‌های مختلف نشان داده شده است [۱۳]. کانال آنیونی مشاهده شده در مطالعه‌ی ما نیز دارای کنداکتانس مشابه بوده و در یک مطالعه مقدماتی نیز مشاهده نمودیم pH اسیدی ($5/8 <$) سبب مهار فعالیت کانال می‌گردد. این موضوع این احتمال را مطرح می‌سازد که کانال مورد مطالعه ما ممکن است همان IMAC باشد. مطالعات بیشتری برای روشن‌سازی این پیشنهاد لازم است.

مطالعات نشان دادند کانال‌های آنیونی غشاء داخلی میتوکندری مانند IMAC در دپلاریزاسیون میتوکندری نقش داشته و عواملی مانند ROS باعث باز شدن آن می‌گردد [۱۹]. همچنین پیشنهاد شده است که دپلاریزاسیون غشای میتوکندری در ارتباط با کاهش ATP رخ می‌دهد. از طرف دیگر، کاهش تولید ATP و افزایش ROS با آپوپتوز در ارتباط هستند [۲۰] و مهارکننده‌های کانال کلر باعث مهار آپوپتوز ناشی از افزایش ROS می‌شوند [۲۱]. بنابراین این احتمال وجود دارد که کانال مورد مطالعه در تنظیم فرایند سنتز ATP و در آپوپتوز نقش موثری داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع مطالعه حاضر برای اولین بار خصوصیات بیوفیزیکی یک کانال کلر وابسته به ولتاژ 158 pS را نشان می‌دهد. با توجه به اعمال مهم کانال‌های آنیونی میتوکندری و نقش این کانال‌ها در ورود کلر به فضای داخلی ماتریکس و متعاقب آن هیپرپولاریزاسیون غشاء داخلی میتوکندری و همچنین در تعدیل تولید ROS، احتمال دارد این کانال در تنظیم زنجیره تنفسی و تولید ROS نقش داشته باشد. با نتایج به دست آمده زمینه برای مطالعات بیشتر باز گشته است.

نمی‌گیرد، اگر چه مطالعات بیشتری در این خصوص لازم می‌باشد. در این رابطه ممکن است که کانال‌های آنیونی میتوکندریایی بخشی از ساختار کانال VDAC باشند. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کانال آنیونی با کنداکتانس 158 pS دارای رفتار اهمیک بوده و در ولتاژهای مثبت به شدت فعال و در ولتاژهای بالاتر از $20 \pm$ میلی ولت شروع به بسته شدن می‌کند. این در حالی است که خواص بیوفیزیکی VDAC رفتار اهمیک با کنداکتانس $4-4/5$ nS را نشان می‌دهد و در حین فعالیت کانال، حالت‌های باز شدن با کنداکتانس‌های کمتر و بسته شدن‌های جزئی نیز صورت می‌گیرد [۱۶]. مطالعات نشان می‌دهند که نسبت نفوذپذیری کلر به پتاسیم (P_{Cl}/P_K) تقریباً 1 تا 4 می‌باشد، بویژه در خصوص حالت‌های باز با کنداکتانس پایین، نفوذپذیری به کاتیون‌ها به شدت افزایش می‌یابد [۱۷]. بر خلاف آن، مطالعه ما نشان داد که نه تنها کنداکتانس و وابستگی به ولتاژ این کانال مشابهتی با VDAC ندارد بلکه نسبت به کلر بسیار نفوذپذیرتر بوده ($P_{Cl}/P_K \sim 17$) و یک کانال انتخابی آنیونی است. بنابر این، به نظر نمی‌آید این کانال به این خانواده نیز تعلق داشته باشد.

این نظر وجود دارد که یون‌های کلر از طریق کانال آنیونی غشای داخلی (IMAC) از غشای داخلی میتوکندری می‌گذرند. این کانال یک کانال آنیونی غیرانتخابی با کنداکتانس 158 pS است که طیف متنوعی از آنیون‌ها از یون‌های کوچک تک ظرفیتی مانند کلر گرفته تا آنیون‌های چند ظرفیتی مانند سترات، فروسیانید و حتی ATP را از خود عبور می‌دهد [۱۸]. این کانال توسط ترکیبات گوناگونی تنظیم می‌شود و با Mg^{2+} ($IC_{50} = 38 \mu M$) ماتریکس و سطح پایین pH ماتریکسی ($pH < 7/2$) مهار می‌گردد [۱۸]. هم چنین، وجود کانال 108 pS در میتوکندری (در غلظت 150 mM KCl) در آزمایشات

ملاحظات مالی

از مراکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و علوم اعصاب که حمایت مالی این تحقیق را به عهده داشتند تشکر به عمل می آید.

سهیم نویسندگان

ف.ش: انجام مطالعه; ج.ف: انجام مطالعه و آنالیز آماری; ن.خ: انجام مطالعه; ر.ص: مشاوره و نظارت بر حسن اجرای مطالعه; ا.ا: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

- [1] Littler DR, Harrop SJ, Goodchild SC, Phang JM, Mynott AV, Jiang L, Valenzuela SM, Mazzanti M, Brown LJ, Breit SN, Curmi PM, The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? *FEBS Lett* 584 (2010) 2093–2101.
- [2] Koszela-Piotrowska I, Choma K, Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A, Kunz WS, Malekova L, Kominkova V, Ondrias K, Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell Mol Biol Lett* 12 (2007) 493–508.
- [3] Ballarin C, Sorgato MC, Anion channels of the inner membrane of mammalian and yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 28 (1996) 125–130.
- [4] De Marchi U, Basso E, Szabò I, Zoratti M, Electrophysiological characterization of the Cyclophilin D-deleted mitochondrial permeability transition pore. *Mol Membr Biol* 23 (2006) 521–530.
- [5] Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS, The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 12 (2006) 2249–2270.
- [6] Fahanik Babaei J, Eliassi A, Saghiri R, Characterization of biophysical properties of single chloride channel in rat brain mitochondrial inner membrane by channel incorporation into bilayer lipid membrane. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 97–107.
- [7] Kudin AP, Bimpong-Buta NY-B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS, Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279 (2004) 4127–4135.
- [8] Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou J-C, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 209 (2003) 105–116.
- [9] Singleton W, Gray M, Brown M, White J, Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chem Soc* 42 (1965) 53–56.
- [10] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC, Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J Phys Chem B* 67 (1963) 534–535.
- [11] Toulmé E, Blais D, Léger C, Landry M, Garret M, Séguéla P, Boué-Grabot E, An intracellular motif of P2X3 receptors is required for functional cross-talk with GABAA receptors in nociceptive DRG neurons. *J Neurochem* 102 (2007) 1357–1368.
- [12] Quinton PM, Reddy MM, Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding. *Nature* 360 (1992) 79–81.
- [13] Sorgato MC, Keller BU, Stühmer W, Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature* 330 (1987) 498–500.
- [14] Schönfeld P, Sayeed I, Bohnensack R, Siemen D, Fatty acids induce chloride permeation in rat liver mitochondria by activation of the inner membrane anion channel (IMAC). *J Bioenerg Biomembr* 36 (2004) 241–248.
- [15] De Marchi U, Szabo I, Cereghetti GM, Hoxha P, Craigen WJ, Zoratti M A, Maxi-chloride channel in the inner membrane of mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777 (2008) 1438–1448.
- [16] Báthori G, Szabó I, Schmehl I, Tombola F, De Pinto V, Zoratti M, Novel aspects of the electrophysiology of mitochondrial porin. *Biochem Biophys Res Commun* 243 (1998) 258–263.
- [17] Tan W, Colombini M, VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1768 (2007) 2510–2515.
- [18] Beavis AD, Properties of the inner membrane anion channel in intact mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 24 (1992) 77–90.
- [19] Cortassa S, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B, A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species. *Biophys J* 87 (2004) 2060–2073.
- [20] Ricci JE, Waterhouse N, Green DR, Mitochondrial functions during cell death, a complex (I–V) dilemma. *Cell Death Differ. Nature Publishing Group* 10 (2003) 488–492.
- [21] Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y, Chloride channel inhibition prevents ROS dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 16 (2005) 147–154.

Research paper

Electrophysiological evidence for the presence of a new chloride channel in rat brain mitochondrial inner membrane

Farzad Shayanfar¹, Javad Fahanik-Babaei², Naser Khodaei³,
Ataloo³, Reza Saghiri⁴, Afsaneh Eliassi^{1,5*}

1. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Paramedical Faculty, Army University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5. Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 30 October 2016

Accepted: 17 January 2017

Abstract

Background and aim: Chloride channels are present in mitochondrial membranes where they regulate volume and acidity of cells and organelles, cell signaling, and protective mechanisms of the cells. We have previously reported the presence of a 301 pS chloride channel in mitochondrial inner membrane of the rat brain. In this work we characterized biophysical properties of a new chloride channel in the mitochondrial inner membrane of the rat brain.

Methods: The rat brain was harvested and homogenized in the MSE-nagarase lysis buffer. The homogenate was centrifuged in 3 steps in MSE-digitonin, H₂O, Na₂CO₃, respectively. Vesicles of mitochondrial inner membrane were then extracted in MSE solution. The membrane lipid L- α -Phosphatidylcholine was extracted from fresh egg yolk. Bilayer lipid membrane was formed in a 200 μ m diameter hole. All recorded data were filtered at 1 kHz and stored at a sampling rate of 10 kHz for offline analysis by PClamp10 software. Statistical analysis was performed by Markov's noise-free single channel analysis.

Results: Channel incorporation into planar lipid bilayer revealed a selective anion channel with a conductance of 158 pS in 200 mM KCl cis/50 mM KCl trans electrolyte. The channel open probability appeared to be voltage dependent as the channel was very active at the voltages between \pm 20 mV. Adding the chloride channel inhibitor DIDS in the side corresponding to the cell internal medium (cis) caused a strong inhibition of the channel activity.

Conclusion: Our results indicate the presence of a chloride channel in the mitochondrial inner membrane of the rat brain. This channel might play a role in maintaining proper pH level, regulation of membrane potential, ATP synthesis, and cell protection.

Keywords: Bilayer lipid membrane, Chloride channel, Mitochondrial inner membrane

Please cite this article as follows:

Shayanfar F, Fahanik-Babaei J, Khodaei Ataloo N, Saghiri R, Eliassi A, Electrophysiological evidence for the presence of a new chloride channel in rat brain mitochondrial inner membrane. *Iran J Physiol Pharmacol* 2 (2018) 67-73.

*Corresponding author e-mail: afseliassi@gmail.com

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

Journal E-mail: ijpp@phypha.ir