Physiology and Pharmacology, 13 (1), 48 - 56
Spring 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The S362A mutation block ROMK2 (Kir1.1b) endocytosis in *Xenopus laevis* oocyte membrane

Saeed Hajihashemi *

Dep. Physiology, School of Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 17 Jul 2008 **Revised: 13 Jan 2009** **Accepted: 22 Jan 2009**

Abstract

Introduction: ROMK channel is localized on the apical membrane of nephrons. 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 S362A mutation is examined on the membrane turnover and stability of ROMK2 channel when expressed in *Xenopus laevis* oocytes.

Methods: oocytes were isolated by standard protocols using collagenase (Type 1A). Mutations of the cytoplasmic termini of ROMK2 were performed using the quik-change approach for site-directed mutagenesis.

Xenopus oocytes were injected with cRNA encoding ROMK2 or S362A mutant 3 days prior to treatment with Brefeldin A added to the OR3 medium (+BFA) at the concentration of 25 µM or ethanol as BFA vehicle (-BFA). BFA inhibits the insertion of new proteins into the cell membrane. Two-electrode voltage clamp (TEVC) was used to measure oocyte ROMK-dependent currents and membrane potential. Data was analyzed using Student's t-tests or ANOVA as appropriate.

Results: Incubation of oocytes expressing ROMK2 channels in 25 µM BFA caused a reduction in the currents and membrane voltage. In oocytes expressing the S362A mutant, there was no decay in current and membrane voltage after 48 hours incubation with BFA at 25 µM. The fractional current for ROMK2 at 48h following treatment of oocytes with BFA was 0.24 ± 0.05 (n=24), which was significantly different from S362A mutant (0.96 ± 0.05, n=24).

Conclusion: These results show that the S362A mutation increases the general stability of ROMK and renders the protein resistance to endocytosis. This is 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 the stability of ROMK.

Keywords: ROMK2, S362A mutant, BFA, PDZ domain.

* Corresponding author e- mail: hajihashemi@hotmail.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۱)، ۴۸ – ۵۶
بهار ۱۳۸۸

فیزیولوژی و فارماکولوژی

متوقف شدن روند آندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK2 ($K_{ir}1.1b$) در اثر موتاسیون S362A درغشاء اووسیت‌های *Xenopus laevis*

سعید حاجی هاشمی*
گروه فیزیولوژی ،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

دریافت: ۲۶ تیر ۸۷ بازبینی: ۲۳ دی ۸۷ پذیرش: ۲ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: کانال‌های پتاسیمی ROMK در غشاء راسی سلول‌های کلیه قرار گرفته‌اند. ایزو فورم‌های مختلفی از کانال پتاسیمی ROMK در قسمت‌های انتهای نفرون و در مجاری جمع کننده شناسایی شده‌اند که وظیفه ترشح یون K^+ را بر عهده دارند. تحقیقات نشان داده‌اند که آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK برای ترشح K^+ در مجاری جمع کننده نقش مهمی دارا می‌باشد. در این مطالعه اثرات موتاسیون S362A (جایگزین کردن اسید آمینه سرین در جایگاه شماره ۳۶۲ با اسید آمینه آلانین) بر روی اندوسیتوز کانال پتاسیمی ROMK2 پس از بیان درغشاء اووسیت بررسی گردیده است.

روش‌ها: در این پژوهش تجربی اووسیت‌های *Xenopus laevis* با استفاده از کلاژناز به روش استاندارد جدا گردیدند و جهت ایجاد موتاسیون در انتهای کربوکسیل کانال پتاسیمی ROMK2 با استفاده از روش ایجاد تغییر سریع ایجاد موتاسیون زای مستقیم گردید. cRNA ای کهROMK2 و موتاسیون S362A را کد می‌کرد به اووسیت‌ها تزریق شد. پس از گذشت سه روز (زمان صفر) به محیط کشت برفلدین A (BFA+) مهار کننده انتقال پروتئین‌های ساخته شده به غشاء به مقدار ۲۵ میکرومولار یا اتانول به عنوان حلال BFA (BFA –) اضافه گردید. با استفاده از تکنیک ثابت نگه داشتن ولتاژ با استفاده از دو الکترود جریان‌های یونی مربوط به کانال‌های پتاسیمی ROMK2 و موتاسیون S362A اندازه گیری گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که مقدار جریان یونی پتاسیم از کانال‌های پتاسیمی ROMK2 با موتاسیون S362A بر خلاف کانال‌های پتاسیمی بدون موتاسیون ROMK2 پس از انکوبه شدن در محلول ۲۵ میکرو مولار BFA کاهش معنی‌داری پیدا نکرد. برای ROMK2 پس از اینکه اووسیت‌ها ۴۸ ساعت تحت تاثیر BFA بودند میزان کسر جریان برابر با 0.24 ± 0.05 (n=16) بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج افزایش پایداری وثبات کانال‌های پتاسیمی ROMK2 درغشاء بعد از ایجاد موتاسیون S362A را نشان می‌دهد. قسمت داخلی ناحیه PDZ به ترتیب با اسیدهای سرین – گلوتامیک اسید– والین (S-E-V) در تعیین پایداری و آندوسیتوز کانال‌های پتاسیمی ROMK2 در غشاء سلول دخالت دارد.

واژه‌های کلیدی: ROMK2، موتاسیون S362A، BFA، ناحیه PDZ

مقدمه

ترکیب شیمیایی مایعات بدن با دفع مواد زائد متابولیک توسط اندام‌های دفعی و نگهداری مقادیر متناسبی از آب، نمک و مواد غذای تنظیم می‌شود. کلیه‌ها اندام های مسئول نگهداری حجم و ترکیب یونی مایعات بدن هستند. نفرون‌ها واحدهای ساختمانی و عملی در کلیه‌ها هستند. عملکرد اپیتلیوم نفرون‌ها به نحوه قرار گرفتن پروتئین‌ها و لیپیدهای آن درغشاء راسی و قاعده‌ای– جانبی بستگی دارد. این پروتئین‌ها در غشاء راسی و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: hajihashemi@hotmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj