

اثر یون فسفات بر خواص بیوفیزیکی کانال پتاسیمی شبکه آندوپلاسمی هیپاتوسیت موش صحرایی

حمید سپهری^۱(PhD)*، منوچهر اشرف پور^۲(PhD)

۱- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۲- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۰/۹/۱۹، اصلاح: ۹۰/۱۱/۱۹، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: شبکه آندوپلاسمی ارگانل مهمی است که در تنظیم طیفی از اعمال نقش دارد. اخیراً کانال پتاسیمی در غشاء شبکه آندوپلاسمی گزارش گردید که نقش فیزیولوژیک آن نامشخص است. شبکه آندوپلاسمی هیپاتوسیت منبع غنی از آنزیم گلوکز ۶- فسفاتاز است که در کنترل گلوکونئوز دخال دارد. از آنجاییکه یون فسفات متابولیت داخل لومنی این آنزیم شبکه آندوپلاسمی است در این مطالعه اثر یون فسفات بر فعالیت کانال پتاسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: استخراج وزیکول های شبکه آندوپلاسمی از طریق خارج نمودن کبد موش صحرایی و هموژنیزاسیون و انجام مراحل مختلف اولتراسانتریفیوژ صورت گرفت. فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ تازه استخراج گردید. غشاء دولایه لیپیدی با استفاده از فسفاتیدیل کولین و بر روی منفذی به قطر $350\mu\text{m}$ واقع در حد فاصل دو محفظه cis و trans که بترتیب حاوی کلرور پتاسیم ۲۰۰ و ۵۰ میلی مولار بودند تشکیل، سپس وزیکولها بدخل غشاء الحاق شد. فعالیت کانال با روش ثبت تک کانال در شرایط کنترل و در حضور یون فسفات در سمت داخل لومنی کانال ثبت شد و سپس خواص بیوفیزیکی آن با نرم افزار clampfit10 آنالیز گردید.

یافته ها: کانال پتاسیمی شبکه آندوپلاسمی دارای کندانسانس 550 Ps بود و فعالیت آن در بازه ولتاژی $+30$ تا -40 میلی ولت بصورت وابسته به ولتاژ تغییر کرد به این صورت که احتمال باز بودن و متوسط دامنه جریان عبوری از کانال در ولتاژ $+30$ میلی ولت بترتیب $0.73/$ و 26 پیکوآمپر ولی در ولتاژهای پایین، کانال از حداقل فعالیت برخوردار بود. در حضور غلظت 50 میلی مولار یون فسفات، میانگین جریان عبوری و نیز احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف نسبت به شرایط کنترل تغییر معنی داری پیدا نکرد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که غشا شبکه آندوپلاسمی هیپاتوسیت در موش صحرایی دارای نوعی کانال پتاسیمی با فعالیت وابسته به ولتاژ بوده و بنظر می رسد که ویژگی های الکتروفیزیولوژیک آن تحت تاثیر آنیون فسفات سمت داخل لومنی قرار نمی گیرد.

واژه های کلیدی: شبکه آندوپلاسمی، کانال پتاسیم، یون فسفات.

مقدمه

غشا ER و کانال های یونی می تواند بر فعالیت این ناقلین غشایی ER تاثیرگذار باشد. وجود کانال های کلری در غشای شبکه آندوپلاسمی هیپاتوسیت در مطالعات مختلف به اثبات رسیده و پیشنهاد شده که در خنثی سازی شارژ الکتریکی هنگام خروج کلسیم ایفاء نقش می کنند (۹-۵). کانال های پتاسیمی نیز علاوه بر غشاء سلول در غشای ارگانل های داخل سلولی از جمله در شبکه آندوپلاسمی گزارش شده اند و پاره ای از خواص بیوفیزیکی آن بیان گردیده است (۱۱و۱۰). پتانسیل غشاء شبکه آندوپلاسمی حدوداً " صفر میلی ولت بوده و میزان تغییرات ولتاژ آن بسیار پایین است (۱۲و۳)، بدلیل پایین بودن احتمال باز بودن کانال شبکه آندوپلاسمی در ولتاژ صفر میلی ولت، احتمالاً فعالیت آن توسط عوامل متابولیکی کنترل و تنظیم می گردد. نتایج مطالعات نشان می دهند که فعالیت این کانال توسط میزان ATP سیتوزولی کاهش می یابد (۱۱و۱۰) ولی تاکنون نقش عوامل

هیپاتوسیت ها سلول های اپی تلیال چند کاره ای هستند که از فعالیت متابولیکی بالایی برخوردار هستند. شبکه آندوپلاسمی در هیپاتوسیت ها بدلیل متابولیسم بالا توسعه زیادی یافته بطوریکه سطح آن $30-20$ برابر سطح غشا سلول می باشد. سطح وسیع شبکه آندوپلاسمی (Endoplasmic Reticulum-ER) حاوی سیستم های آنزیمی و کانال های یونی متعددی برای انجام اعمال فیزیولوژیک متنوع آن است (۱). تنظیم قند خون یکی از اعمال بسیار مهم ER است که از طریق آنزیم گلوکز ۶- فسفاتاز انجام می گیرد (۳و۲). جایگاه فعال کاتالیتیکی این آنزیم در سمت داخل لومنی ER قرار داشته و گلوکز ۶- فسفات را به گلوکز و یون فسفات تجزیه می کند، گلوکز از طریق ناقل $GLUT7$ و یون فسفات از طریق ناقل پروتئینی $T2$ از لومن وارد سیتوزول می شوند (۴و۳). با توجه به ماهیت آنیونی یون فسفات تغییر پتانسیل الکتریکی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مشترک دانشگاه علوم پزشکی گلستان و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۲۰۱۱۹۱۰۱۵ می باشد.

* مسئول مقاله:

آغشته گردیده و با غشاء دو لایه تماس داده شد و این عمل تا جاگیری کانال در BLM و برقراری جریان یونی ناشی از فعالیت کانال تکرار گردید.

ثبت فعالیت الکتریکی کانال: جهت ثبت فعالیت کانال از الکترودهای Ag/AgCl استفاده شد. این الکترودها به وسیله پل نمکی آگار ۳٪ در محلول سه مولار کلرور پتاسیم (agar salt bridge) به محفظه های cis و trans متصل گردید، الکترود متصل به محفظه cis بعنوان الکترود مرجع و ولتاژ از طریق الکترود متصل به محفظه trans اعمال شد. دامنه ولتاژ مورد استفاده در محدوده ۴۰- تا ۳۰+ میلی ولت قرار داشت که با فواصل ده میلی ولتی اعمال می گردید. الکترودها از طریق پری آمپی فایر به دستگاه آمپلی فایر (bilayer clamp -525A- Warner Instruments) متصل بودند و سیگنال های دریافتی به میزان ۱۰۰ برابر تقویت و جریان خروجی از آمپلی فایر با عبور از فیلتر 8 pole پایین گذر Bessel به میزان ۱ KHZ فیلتر شده و سپس جریان ها با استفاده از دستگاه ای تودی (analog to digital A/D) دوازده بیتی با دامنه $\pm 10 \text{ mV}$ دیجیتالیزه شده و با سرعت نمونه برداری (sampling rate) برابر ۵ KHz به کامپیوتر منتقل و ذخیره گردیدند. تمام آزمایشات BLM در دمای اطاق (حدود 23°C) انجام شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

ثبت های گرفته شده با مدت زمان حداقل ۵۰ ثانیه با استفاده از برنامه نرم افزار clampfit10 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بدست آوردن احتمال باز بودن کانال (کسری از زمان که کانال در حالت هدایتی سپری می نماید و از محاسبه نسبت تعداد نقاط ثبت شده در وضعیت هدایتی به کل تعداد نقاط در ثبت بدست می آید) و میانگین جریان در هر ولتاژ (میزان توزیع شدت جریان عبوری current amplitude histogram) آن با برنامه Clampfit10 رسم و با استفاده از رابطه Gaussian فیت گردید. منحنی رابطه جریان - ولتاژ با نرم افزار excel رسم شد و برای هر ولتاژ از ۵ ثبت استفاده گردید و نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ نشان داده شدند. میانگین مقادیر دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال در مرحله قبل و بعد از اضافه کردن دارو به سمت trans با استفاده از آزمون آماری paired T-Test مورد مقایسه قرار گرفته و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکولهای شبکه آندو پلاسمی در غشاء در محیط غیر همگون کلرید پتاسیم (5.0 mM KCl cis/5.0 mM KCl trans) ۲۰۰ ثبت گردید. تصویر ۱ جریانهای ثبت شده حاصل از فعالیت کانال را در ولتاژهای مختلف و در شرایط کنترل نشان می دهد. میانگین جریانهای ثبت شده و احتمال باز بودن کانال نیز در جدول شماره ۱ منعکس شده اند.

شکل ۲ منحنی رابطه جریان - ولتاژ را در شرایط کنترل نمایش می دهد. شیب منحنی که نشان دهنده کداکتانس کانال است برابر با 10.7 ± 55.0 پیکوسیمنس (pS) بود. با توجه به اینکه میزان پتانسیل معکوس (reverse potential) فعالیت کانال نزدیک به پتانسیل تعادلی پتاسیم $E_{K^+} = -34 \text{ mV}$ در شرایط یونی $[K^+] = \frac{200 \text{ mM}}{50 \text{ mM}}$ قرار دارد، می توان گفت کانال نسبت به پتاسیم نفوذ پذیر بوده و کاتیونی است. همچنین فعالیت کانال مشاهده شده در

متابولیکی داخل لومنی شبکه آندو پلاسمی بر فعالیت کانال پتاسیمی غشا شبکه آندوپلاسمی مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجائیکه آنیون فسفات متابولیت داخل لومنی آنزیم گلوکز- ۶ فسفاتاز شبکه آندوپلاسمی است (۱۳ و ۱۲) و گزارشاتی ارائه شده اند که بر تاثیر یون فسفات بر فعالیت کانال کلری شبکه آندوپلاسمی هپاتوسیت دلالت دارد (۸). این مطالعه با هدف تعیین اثر یون فسفات (HPO_4) داخل لومنی بر فعالیت کانال پتاسیمی شبکه آندو پلاسمی طراحی و به اجرا در آمده است.

مواد و روشها

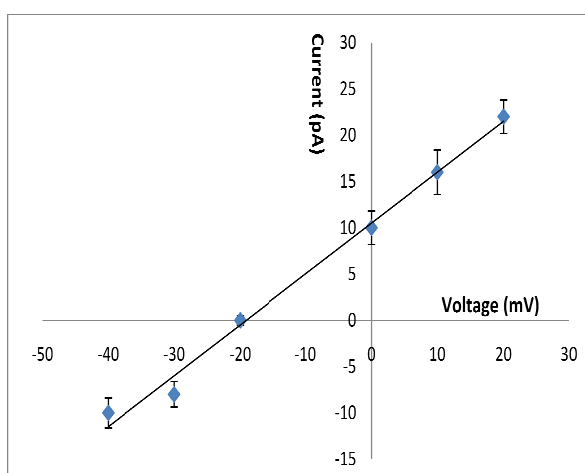
مواد: در این تحقیق از ۴- آمینوپیریدین (4-aminopyridine; 4-aminopyridine; 4-aminopyridine) بعنوان مهارکننده غیر اختصاصی کانال پتاسیمی، (trisma base) (N-Z-hydroxyethylpiperazine-N-Z- Hepes و trisma ethanesulfonic acid) که همگی محصول شرکت سیگما بودند و Na_2HPO_4 ، decan و KCl محصول شرکت مرک استفاده گردید. آب مقطر به کار رفته برای تهیه محلول، کلرید پتاسیم دیونیزه بوده است.

روش کار:

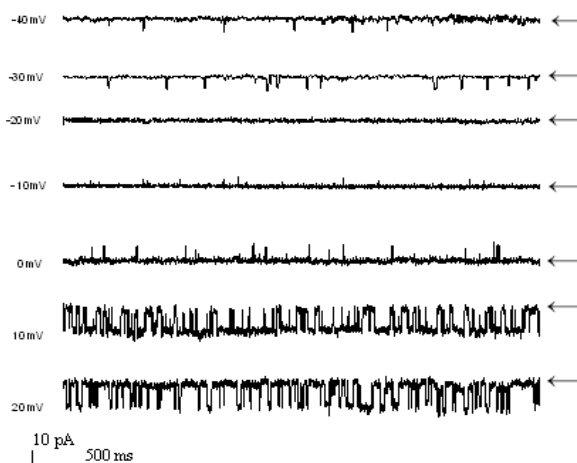
تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی (BLM-Bilayer lipid membrane) معمولاً برای تشکیل BLM از یک و یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می گردد. در مطالعه حاضر از فسفاتیدیل کولین جهت تشکیل BLM استفاده شد. ماده فوق بر اساس روش Singleton و با استفاده از زرده تخم مرغ تازه استخراج گردید (۱۴ و ۸). برای تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی از روش Mueller استفاده شد (۱۵). برای این منظور فسفاتیدیل کولین با غلظت ۲۵ mg/ml در n-decan حل و سپس با استفاده از سوزن دندانپزشکی (Stainless Steel) به قطر $150 \mu\text{m}$ با منفذی به قطر $250 \mu\text{m}$ که بر روی دیواره ای از جنس تفلون تعبیه شده بود تماس داده شده و غشاء تشکیل می گردید. محفظه cis (سمت سیتوپلاسمی) و trans (فضای داخل لومن) دو طرف منفذ بترتیب محلول ۲۰۰ mM و ۵۰ mM کلرید پتاسیم قرار داشت. محلولهای کلرید پتاسیم حاوی ۱۰ mM Hepes و pH آن با استفاده از trisma به ۷/۴ رسانده می شد. تشکیل غشاء از طریق مشاهده با استرئو میکروسکوپ انجام گرفت. غشائی که در حدود ۱۰۰ mV ولتاژ را تحمل می کرد و فاقد نشست بوده و ظرفیت خازنی حدود ۳۰۰ تا ۴۰۰ پیکو فاراد داشت جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج وزیکولهای شبکه آندوپلاسمی زبر و الحاق آن در غشاء:

موشهای نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۱۸۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. در هر نوبت استخراج از ۳ سر موش استفاده شد. حیوانات ۲۴ ساعت قبل از آزمایش گرسنه نگه داشته شده و در روز آزمایش و پس از بیهوشی با اتر با گیوتین کشته شدند، بعد از خارج کردن کبد، استخراج میکروزم های شبکه آندوپلاسمی زبر با روش Kan و از طریق همونیزاسیون بافت و سانتریفوژ آن در مراحل مختلف توسط دستگاه اولتراسانتریفوژ Beckman انجام گرفت (۱۶ و ۸)، وزیکول های ER استخراج شده در محلول بافر سوکروز ایمیدازول حل و در دمای -70°C نگهداری شد. جهت الحاق کانال به غشاء دو لایه لیپیدی، یک سوزن Stainless Steel به قطر $100 \mu\text{m}$ به وزیکولهای استخراج شده



شکل ۲. منحنی رابطه جریان - ولتاژ در شرایط کنترل و در محیط حاوی (n=5). (۲۰۰ mM KCl cis/۵۰ mM KCl trans)



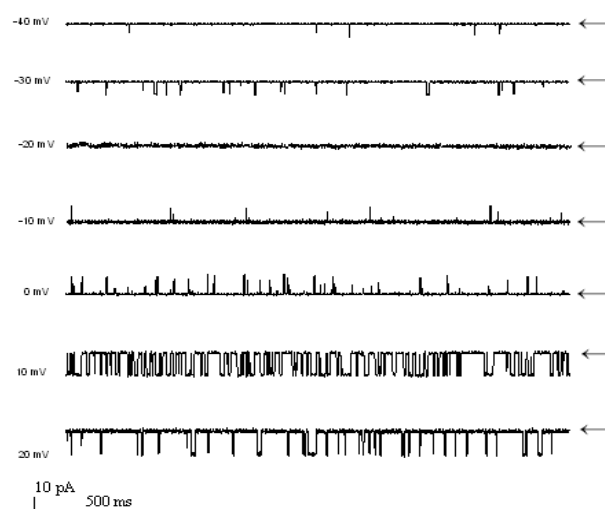
شکل ۳: ثبت از فعالیت کانال پتاسیمی پس از اضافه نمودن غلظت ۵۰ میلی مولار Na_2HPO_4 به محیط ترانس در ولتاژهای مختلف و در محیط (۲۰۰ mM KCl cis/۵۰ mM KCl trans).
← وضعیت بسته کانال را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

در این مقاله بدنبال الحاق وزیکولهای شبکه آندوپلاسمی در غشاء دو لایه لیپیدی نوعی کانال پتاسیمی با قابلیت هدایت 550 Ps بدست آمد که دارای رفتار وابسته به ولتاژ بود. بطوریکه در ولتاژهای منفی تقریباً کانال بسته بوده و احتمال باز بودن آن (Po) و نیز دامنه جریان عبوری از کانال در ولتاژهای بالاتر از ۲۰ میلی ولت به شدت افزایش پیدا کرده است. کانال پتاسیمی در غشای شبکه آندوپلاسمی هیاتوسیت موش صحرایی در مطالعات قبلی نیز شبیه کانال مطالعه حاضر از کنداکتانس بالایی برخوردار بود (۵۹۸ پیکوسیمنس) و دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال بصورت وابسته به ولتاژ تغییر می کرد به این صورت که در ولتاژهای مثبت کانال فعالیت بالایی داشت ولی فعالیت کانال در ولتاژهای پایین و منفی بصورت قابل ملاحظه ای کاهش می یافت (۱۰). پتانسیل غشاء ER حدوداً " صفر میلی ولت بوده و میزان تغییرات ولتاژی آن اندک است (۹) همانطور

حضور 4AP (4 aminopyridine) مهار گردید که نشان دهنده پتاسیمی بودن کانال مورد مطالعه است.

در مرحله بعدی مطالعه اثر آنیون فسفات Na_2HPO_4 با غلظت ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی مولار در ناحیه ترانس بر کانال مورد بررسی قرار گرفت که جریانهای ثبت بدست آمده در ولتاژهای مختلف و در حضور غلظت ۵۰ میلی مولار فسفات در شکل ۳ نمایش داده شده است. یون فسفات در هیچیک از دوزهای مورد مطالعه تاثیر معنی داری بر دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف نداشت. با توجه به اینکه غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی مولار یون فسفات تاثیر معنی داری بر فعالیت کانال نداشتند ثبت های مربوط به حضور این غلظت ها نمایش داده نشدند و در این قسمت تنها به نمایش ثبت های گرفته شده در حضور غلظت ۵۰ میلی مولار ناحیه trans اکتفا شده است.



شکل ۴: ثبت از فعالیت کانال پتاسیمی در شرایط کنترل و در ولتاژهای مختلف در محیط (۲۰۰ mM KCl cis/۵۰ mM KCl trans)

← وضعیت بسته کانال را نشان می دهد.

جدول ۱. میانگین جریان و احتمال باز بودن کانال در شرایط کنترل و پس از اضافه کردن دوز ۵۰ میلی مولار Na_2HPO_4 به سمت ترانس در ولتاژهای مختلف.

ولتاژ (میلی ولت)	کنترل		در حضور یون فسفات	
	دامنه جریان (پیکو آمپر)	احتمال باز بودن کانال	دامنه جریان (پیکو آمپر)	احتمال باز بودن کانال
-۴۰	10 ± 1.6	0.04 ± 0.01	11 ± 1.8	0.06 ± 0.01
-۳۰	8 ± 1.4	0.05 ± 0.06	9 ± 1.4	0.05 ± 0.06
-۲۰	0 ± 0.5	۰	0 ± 0.5	۰
-۱۰	7 ± 1.7	0.07 ± 0.05	5 ± 2.7	0.04 ± 0.05
۰	10 ± 1.8	0.03 ± 0.04	16 ± 1.4	0.05 ± 0.08
۱۰	22 ± 1.5	0.08 ± 0.03	15 ± 2.1	0.09 ± 0.03
۲۰	26 ± 1.8	0.07 ± 0.01	25 ± 2	0.1 ± 0.06

(۱۹-۱۷). یون کلسیم یکی دیگر از عوامل سیگنالینگ بسیار مهم داخل سلولی است که تغییر غلظت آن می تواند بر بسیاری از فعالیتهای داخل سلولی از جمله عملکرد کانال های یونی تاثیر گذار باشد و در این راستا گزارش های متعددی از وجود کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم در غشای سلول ها و نیز در غشای ارگانل های داخل سلولی ارائه شده اند (۲۲-۲۰).

اگرچه ویژگی های عملی کانال پتاسیمی گزارش شده در این مطالعه بصورت وابسته به ولتاژ تغییر می یابد ولی غلظت های مختلف یون فسفات تاثیری بر خواص بیوفیزیکی و الکتروفیزیولوژیک کانال بوجود نیاورد و در این راستا ممکن است سایر عوامل متابولیک از جمله نوکلئوتیدها و کلسیم فعالیت کانال مورد مطالعه را تحت تاثیر قرار دهند که این امر مستلزم مطالعه بیشتر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی گلستان و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

که یافته های این مطالعه نشان داد احتمال باز بودن کانال پتاسیمی گزارش شده حاضر نیز در این ولتاژ ناچیز است. همانطور که گفته شد یون فسفات تاثیر معنی داری بر خواص الکتروفیزیولوژیک کانال در ولتاژهای مختلف بوجود نیاورد و دامنه جریان و همچنین احتمال باز بودن کانال تغییر معنی داری نشان نداد. در مقابل Eliassi و همکاران کانال کلری را در شبکه آندو پلاسمی هپاتوسیت گزارش نموده اند که در حضور یون فسفات در حالیکه میزان جریان یونی عبوری از کانال بصورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرده بود ولی احتمال باز بودن کانال بطور قابل توجهی افزایش پیدا کرده بود (۸).

ممکن است فعالیت کانال پتاسیمی شبکه آندوپلاسمی توسط عوامل متابولیک دیگری تحت تاثیر قرار گیرد بطوریکه در مطالعات قبلی اثرات مهاري ATP و اثر تحریکی ADP-Mg، بعنوان متابولیت های مهم داخل سلولی بر فعالیت کانال پتاسیمی شبکه آندو پلاسمی گزارش گردید (۱۱و۱۰). یون هیدروژن یکی دیگر از متابولیت ها داخل سلولی است که می تواند بر فعالیت کانال تاثیر گذار باشد طوریکه اثر مهاري اسیدیته داخل سلولی بر فعالیت کانال های پتاسیمی ارگانل های کرومافینی گزارش شده است (۲). علاوه بر این بسیاری از پروتئین کینازهای داخل سلولی می توانند فعالیت کانال پتاسیمی را تحت تاثیر قرار دهند

Effect of Phosphate Ions on Biophysical Properties of Rat Hepatocytes Endoplasmic Reticulum Potassium Channel

H. Sepehri (PhD)^{1*}, M. Ashrafpour (PhD)²

1. Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

2. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(6); Nov 2012; pp: 33-38

Received: Dec 10th 2011, Revised: Feb 8th 2012, Accepted: May 2nd 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Rough endoplasmic reticulum is important organelle that plays a role in the regulation of a range of functions. Potassium channels in the endoplasmic reticulum membrane were recently reported that its physiological role is unknown. Hepatocyte endoplasmic reticulum is a rich source of glucose 6-phosphatase that is involved in the control of gluconeogenesis. Since phosphate ions are intra-luminal metabolites for this enzyme of endoplasmic reticulum thus, in this study, the effect of phosphate ions on potassium channel activity was studied.

METHODS: Endoplasmic reticulum vesicles extraction was accomplished following liver excision in rats, homogenization and several stages of ultracentrifugation. Phosphatidylcholine was extracted from fresh egg yolk. Bilayer lipid membrane was formed in a 350 μ m diameter aperture in between two chambers cis and trans contained 200/50 mM KCl solutions respectively, then vesicles were incorporated into bilayer lipid membrane. Ion channel activity was recorded by single channel recording technique both in control conditions and presence of phosphate ion in luminal face, next biophysical ion channel properties analyzed by Clampfit10 software.

FINDINGS: Endoplasmic reticulum Potassium channel was 550 pS conductance and its activity changed as voltage dependent manner in voltage range of +30 to -40 mV, in this respect the open probability and the average unitary current in a voltage + 30 mV were 0.73 and 26 pA, respectively. However, at lower voltages, the channel activity was minimal. In the presence of 50 mM phosphate ion, mean unitary current and also channel open probability did not change significantly in different voltages compared to the control condition ($p>0.05$).

CONCLUSION: Rat hepatocyte endoplasmic reticulum membranes has been a kind of potassium channel with voltage-dependent activity and it seems that its electrophysiological characteristics did not influenced by phosphate anion in luminal face.

KEY WORDS: *Endoplasmic Reticulum, Potassium channel, Phosphate ion.*

* Corresponding Author;

Address: Department of Physiology, Falsafi Educational Complex, Kilometer 2 of Gorgan-Tehran Road, Gorgan, Iran

Tel: +98 171 4422652

E-mail: hamsep49@yahoo.com

References

1. Picard L, Côté K, Teijeira J, Greentree D, Rousseau E. Sarcoplasmic reticulum K(+) channels from human and sheep atrial cells display a specific electro-pharmacological profile. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(9):1163-72.
2. Hordejuk R, Lobanov NA, Kicinska A, Szewczyk A, Dolowy K. pH modulation of large conductance potassium channel from adrenal chromaffin granules. *Mol Membr Biol* 2004;21(5):307-13.
3. van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* 2002;362(Pt 3):513-32.
4. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991;352(6332):244-7.
5. Szewczyk A, Just W. Intracellular ion channels. *FEBS Lett* 2010;584(10):1941
6. Estrada de Martin P, Novick P, Ferro-Novick S. The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem Cell Biol* 2005;83(6):752-61.
7. Morier N, Sauvé R. Analysis of a novel double-barreled anion channel from rat liver rough endoplasmic reticulum. *Biophys J* 1994;67(2):590-602.
8. Eliassi A, Garneau L, Roy G, Sauvé R. Characterization of a chloride-selective channel from rough endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes: evidence for a block by phosphate. *J Membr Biol* 1997;159(3):219-29.
9. Ashrafpour M, Babaei JF, Saghiri R, Sepehri H, Sharifi H. Modulation of the hepatocyte rough endoplasmic reticulum single chloride channel by nucleotide-Mg²⁺ interaction. *Pflugers Arch* 2012;464(2):175-82.
10. Sepehri H, Eliassi A, Sauvé R, Ashrafpour M, Saghiri R. Evidence for a large conductance voltage gated cationic channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 2007;457(1):35-40.
11. Ashrafpour M, Eliassi A, Sauve R, Sepehri H, Saghiri R. ATP regulation of a large conductance voltage-gated cation channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 2008;471(1):50-6.
12. Bootman MD, Petersen OH, Verkhratsky A. The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity. *Cell Calcium* 2002;32(5-6):231-4.
13. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001;18(4):247-56.
14. Singleton WS, Gray MS, Brown ML, White JL. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chem Soc* 1965;42:53-6.
15. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 1962;194(9):979-80.
16. Kan FW, Jolicoeur M, Paiment J. Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1107(2):331-41.
17. Gutierrez VP, Zambelli VO, Picolo G, et al. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotafphine on neuropathic pain in rats. *Behav Pharmacol* 2012;23(1):14-24.
18. Kang D, Kim GT, Kim EJ, et al. Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(3):609-15.
19. Braun G, Nemcsics B, Enyedi P, Czirják G. TRESK background K channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in *Xenopus* oocytes. *PLoS One* 2011;6(12):e28119.
20. Hristov KL, Chen M, Kellett WF, Rovner ES, Petkov GV. Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human detrusor smooth muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301(4):C903-12.
21. Li W, Aldrich RW. Electrostatic influences of charged inner pore residues on the conductance and gating of small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(15):5946-53.
22. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005;111(2):198-203.