

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 探討鎘作用於 C1C-1 蛋白可能的結合位置
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 陳玠汝
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-002-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 林明忠

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 100年05月09日

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫
* : 探討鎘作用於 CIC-1 蛋白可能的結合位置
* 名稱

執行計畫學生：陳玠汝

學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-002-B

研究期間：99年7月1日至100年2月底止，計8個月

指導教授：林明忠

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開
查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

中華民國 100年 3月 31日

摘要

從過去的研究與報告我們知道鎘中毒會造成骨骼與腎臟病變之現象，而後續的研究也顯示鎘會抑制骨骼肌氯離子傳導度造成肌無力(myotonia)，但鎘在氯離子管道蛋白(CIC-1)可能的胺基酸結合位尚未知，因此提出可能的研究方案來探討鎘作用於氯離子管道蛋白上的可能結合位置。而人類CIC-1蛋白有988個胺基酸，如何預測可能的變異點是個難題，因此我們初步使用生物資訊學的工具CLUSTALW來比對哺乳類CIC-1與相似的電鰻CIC-0分析，依據已知二價離子鋅與CIC-0結合位以推測CIC-1的幾個可能結合位點。比對結果發現幾個可能二價鋅離子的位點，除了與CIC-0 C212位置相似的CIC-1 C277，此外還找出其它可能改變鎘作用的位點C278, R304和V321。我們使用現有的人類CIC-1 pTLN去建構CIC-1-pcDNA3.1的質體，再以位點突變的方式建構變異的質體既C277A, C278A, R304A和V321A，並利用HEK293t cell表達變異的CIC-1蛋白，然後實行western blotting 確認CIC-1蛋白有正確的表達在膜表面，最後使用全細胞電位鉗定技術(whole cell patch clamp)來測量鎘(氯化鎘)對於這些變異蛋白所產生的電流是否會失去抑制作用或抑制效力，目前的結果發現 R304A, V321A 位點變異與野生型比較並未失去對鎘的敏感性，而C277A對鎘的敏感性略降，C278A則對於鎘的反應產生阻抗性，初步推測鎘在CIC-1上的結合位至少包含了C278，鎘與鋅離子在CIC-1上的結合方式可能不同。

序論

CIC-1是一個長度大約988個胺基酸的哺乳類動物膜蛋白，其形成Cl⁻ channel主要表現在骨骼肌之中，且Cl⁻ channel為一電位依賴型的離子通道。CIC-1在骨骼肌之中表達的位置，受到骨骼肌在發育時的肌肉電生理活化和神經分佈的影響 (7)。目前我們對CIC-1 channel 家族蛋白質在生理功能上的了解，大都是來自於人類的遺傳性疾病之相關研究。CIC-1 的變異會造成先天型肌強直症 (Myotonia Congenita)的遺傳性疾病 (6)，病患可能會出現肌肉僵直、肌肉肥厚化和肌肉痙攣症狀。針對這個疾病的研究也讓我們了解到，CIC-1 Cl⁻ channel在骨骼肌的靜止膜電位的再極化和調控之中，扮演著很重要的角色，是極為重要的離子通道。肌強直(Myotonia) 可以被定義為骨骼肌細胞膜出現過度興奮的一種現象，是一種不斷重覆發生動作電位，使肌收縮時間延長或產生肌肉僵直現象。其成因就是因為CIC-1 變異，而造成的氯離子電通透性下降 (8)。和其它興奮性細胞相比，骨骼肌一般都有著很高的氯離子傳導度(GCl, Cl⁻ Conductance)，佔了細胞膜在靜止狀態時所有背景電流的85%以上 (9)。因為在靜止膜電位時佔有極大比率的 GCl 電流，可以幫助穩定靜止膜電位，和提供骨骼肌在動作電位結束時的再極化作用。而在這之中，佔有最大比例的電位依賴型氯離子通道就是CIC-1，不過這個作用也有電位依賴性鉀離子通道的參與，但比例不大。當肌纖維細胞膜 (Sarcolemmal membrane) 進行去極化作用時，肌漿網 (sarcoplasmic reticulum) 會從本來的儲存鈣離子狀態，變成釋放鈣離子狀態。從骨骼肌需要T-tubule系統來專門負責電位變化傳遞，就可以得知骨骼肌的電位變化傳遞有著相對較長距離的散佈區域，所以當大量細胞外離子流動出現時，局部性的離子濃度無法快速地散佈均勻。因此，本來隨著動作電位結束而出現的鉀離子電流在多次的動作電位之後，會出現局部性的鉀離子濃度不足的現象，而影響到鉀離子電流的平均膜電位，和使膜電位去極化。因應這個問題，所以在骨骼肌之中才會出現相當大量的氯離子電流來解決這個問題 (9, 10)。因為在細胞外的氯離子濃度相對於鉀離子濃度有著更高的濃度，這也使得不管有多少氯離子從細胞外流入細胞內，對細胞外的氯離子濃度和氯離子膜電位的影響都是可以被忽略的。同時氯離子電流也能打消因為鉀離子累積造成的細胞膜去極化現象 (10, 11)。所以當我們使用氯離子通道抑制劑，像是9-AC (Anthracene 9-carboxylic Acid)或CPP 2-(4-chlorophenoxy)propionic Acid)，來抑制骨骼肌中的氯離子通道時，就會有如先天的CIC-1 變異情況一樣，出現肌強直 (Myotonia) 現象。我們皆熟知鎘是一個鈣離子通道抑制劑會抑制神經系統的傳訊(抑制神經傳導物質的釋出)。而鎘 (氯化鎘) 被發現另外具有抑制氯離子通道而產生肌無力的現象 (2)，這是比較特殊的，推測可能與鈣離子的結合位競爭。但CIC-1 是氯離子通道而非鈣離子通道，是否有鈣離子的結合位尚不得而知。鎘對於CIC-1 蛋白的結合位更難以預測，而近來文獻也證實了9-AC，鋅的結合位 (3, 12)，並參考其它金屬離子在蛋白質上結合位的預測 (13)找出四個可能的位點進行變異，再經由實驗驗證程序希望能夠得到結果。

材料與方法

人類氯離子通道基因 CLC-1 質體之建構

使用 human CLC-1/pTLN 質體來進行此計畫未來的基因變異質體的建構。建構完成的質體包含人類CLC-1 coding region 序列，以及非洲爪蟾球蛋白(globin) 5'端的非轉譯區 (untranslated region; UTR)，此段區域能幫助轉錄 (transcription) 出來的RNA順利且穩定地在非洲爪蟾卵母細胞中轉譯 (translation) 成蛋白質。另外在3'的未轉譯區，此段區域含有 poly-A 序列，能維持RNA 的穩定，增加RNA 的存在時間。

人類氯離子通道基因 CLC-1-pcDNA3.1 質體之建構

利用CLC-1/pTLN質體上CLC-1基因序列5端的 與3端的 限制酶便是序列，進行此選殖至pcDNA3.1 vector上，成為CLC-1-pcDNA3.1質體，此部分實驗委託明欣生物科技有限公司執行。

位置導向點突變技術(Site-directed point mutation)

利用建構好的質體hCLC-1/pTLN 作為模板，再依據生物資訊方法預測出來的位點，設計出中央具有突變點的primer先設計出中央具有突變點的primer，primer的兩端以GC序列為佳，請生技公司進行primer的合成，合成規模為40 n mole，以膠回收的方式進行純化。利用PCR的方式並使用QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 進行突變點的製備。

1. 加入 1µl dNTP、dsDNA template 1 µl(500 ng)、Primer(Forward)1 µl、Primer(Reverse)1 µl、DMSO 1.5 µl、10X reaction buffer 5 µl、ddH₂O 40.5µl共50 µl。
2. 加入30 µl礦物油。
3. 加入1 µl Pfu Turbo DNA polymerase 1 µl，混合均勻。
4. 放入PCR machine 進行PCR thermal cycle 。
5. PCR結束後，加入1 µl DpnI，在37 °C下反應2小時，切掉不含突變點的template DNA。
6. 進行轉型。

DH5α大腸桿菌之轉型

使用Real Biotech Corporation HITTM Competent Cells (Non Heat Shock Transformation) 之DH5α菌株

1. 將選殖用含 Ampicillin LB Agar plate 放入 37 °C放在培養箱中回溫。
2. 從-80 °C冰箱取出含 50 µl DH5α Competent Cell 的 eppendorf，置於冰桶上待其融解至三分之一體積。
3. 加入 5 µl 欲轉殖之質體溶液，並以 vortex 震盪 1 秒鐘。
4. 置於冰上 10 分鐘。

5. 將 DH5α Competent Cell 溶液全部加入選殖用的 LB Agar plate 上，並用消毒過的 L 型玻璃棒將 DH5α Competent Cell 溶液在 plate 上均勻推開。
6. 將 LB Agar plate 置於 37 °C 培養箱中培養 12~16 小時。
7. 挑選菌落培養，並進一步定序。

質體純化(Plasmid Purification)

將含有欲純化質體的 *E. coli* 於 4 ml LB 培養液 (10 g NaCl, 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 1 L ddH₂O, 0.1 mg/ml Ampicillin) 在 37 °C 培養箱中培養 12~16 小時，再使用 GeneMark Plasmid Miniprep Plus purification kit 進行質體純化。

1. 吸取菌液入 2 ml eppendorf 離心 13,000 rpm 1 分鐘進行回收菌塊，倒除上清液後可見黃褐色的菌塊。
2. 加入 200 µl Solution I 並以 vortex 震盪溶開菌塊。
3. 加入 200 µl Solution II 將菌體溶解，溫和緩慢的翻轉 eppendorf 5~10 次，可見內容物由混濁到略呈透明並帶有黏稠感。
4. 加入 200 µl Solution III 進行蛋白質的變性以及細菌 Genomic DNA 和 plasmid 分離，溫和緩慢的翻轉 eppendorf 5~10 次，可見內容物較明顯的分層，上為白色稠狀物下為澄清液。
5. 離心 13,000 rpm 5 分鐘。
6. 取上清液至質體回收管柱，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
7. 加入 500 µl endotoxin removal buffer，靜置 2 分鐘後將管柱以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除殘餘液。
8. 加入 600 µl wash buffer，將管柱以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除殘餘液，並重複此步驟一次。
9. 將管柱以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，排除殘餘的液體。
10. 將質體回收管柱拔除底部，並換置入 1.5 ml eppendorf。
11. 加入 30 µl Elution buffer 至質體回收管柱中，靜置 2 分鐘後以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，即可得到純化的質體。

DNA 膠體電泳(Gel electrophoresis)

使用 1X TAE buffer (50X TAE stock solution: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 配置 1% Agarose gel 以電泳進行質體的分子量確認。

HEK293t 細胞培養(cell culture)

使用 DMEM 培養液 (DMEM+10% FBS+1% L-glutamine+1% P/S) 並在 37 °C，5 % CO₂ incubator 進行培養，HEK293t 細胞株為黏附型細胞株，所以其脫離 37 °C 太久會造成細胞懸浮，需特別注意。

細胞株在無菌操作台下操作：

細胞解凍

1. DMEM medium以37 °C水浴槽回溫取出冷凍管立刻放入37 °C水浴槽在1~3分內全部融化。

2. 抽取細胞放入新鮮medium的培養皿中，培養24 hr後以顯微鏡觀察細胞型態。

繼代培養

1. 將DMEM medium、Buffer PBS放到 37 °C水浴槽。

2. 將舊的培養液吸除。

3. 加入PBS 2 ml至細胞培養皿中，並輕搖細胞培養皿，使PBS均勻沖洗細胞皿底部。

4. 加入Trpsin-EDTA 1 ml。

5. 將含Trpsin-EDTA得培養皿放於37 °C incubator靜置5分鐘。

6. 取出培養皿並於顯微鏡下觀察細胞是否懸浮完全，可輕彈培養皿。

7. 加入DMEM medium 2ml中止trypsin作用。

8. 將培養皿中含懸浮細胞的溶液全部吸取並放入15 ml離心管。

9. 轉速1000 rpm離心5分鐘

10. 倒除上清液，並小心的吸除離心管底部的殘餘溶液。

11. 加入1 ml的DMEM培養液，並使用1000 µl的微量吸管以抽吸的方式使細胞懸浮。

12. 取30 µl溶液+30 µl Trypan Blue Stain，約取15λ放在血球計數盤上計算細胞數目。

13. 將所需的培養的細胞數目接種至新的細胞培養皿中。

轉染(Transfection)

本實驗使用FuGENE HD Transfection reagent的脂小體(liposome)之暫時性轉染法(transient transfection)。

1. 在transfection前一天準備好 2×10^5 個細胞放入3.5 cm的細胞培養皿中。

2. 將培養皿中的medium補足到2 ml。

3. 將3µg CIC-1質體和8µg transfection reagent以及無血清補足至100 µl。

4. 混合後，在室溫下等15分鐘。

5. 以滴狀方式加入3.5 cm的細胞培養皿中，並輕搖使其均勻。

6. 培養24~48小時後，細胞可進行全細胞電位鉗定測量。

全細胞電位鉗定(Whole cell patch-clamp)

使用FuGENE HD Transfection reagent轉染24~48小時後，將HEK293t細胞進行全細胞電位鉗定的測量。以AXON Instruments Digidata 1440A數位類比轉換器連接AXON Instruments Multi Clamp 700B鉗定放大器與pClamp9.0(AXON Instruments)軟體，並將所記錄電流訊號以數位型式儲存於電腦中。

1. 將轉染後的HEK293t細胞取 10^5 放入24×32 mm SUPÉRIOR Micro Cover Glasses蓋玻片上(此蓋玻片已先放入6 cm培養皿中)，加完後將細胞放入37 °C培養箱中待40分鐘使細胞貼附在蓋玻片上。

2. 取出培養皿並先用細胞外溶液(140mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10

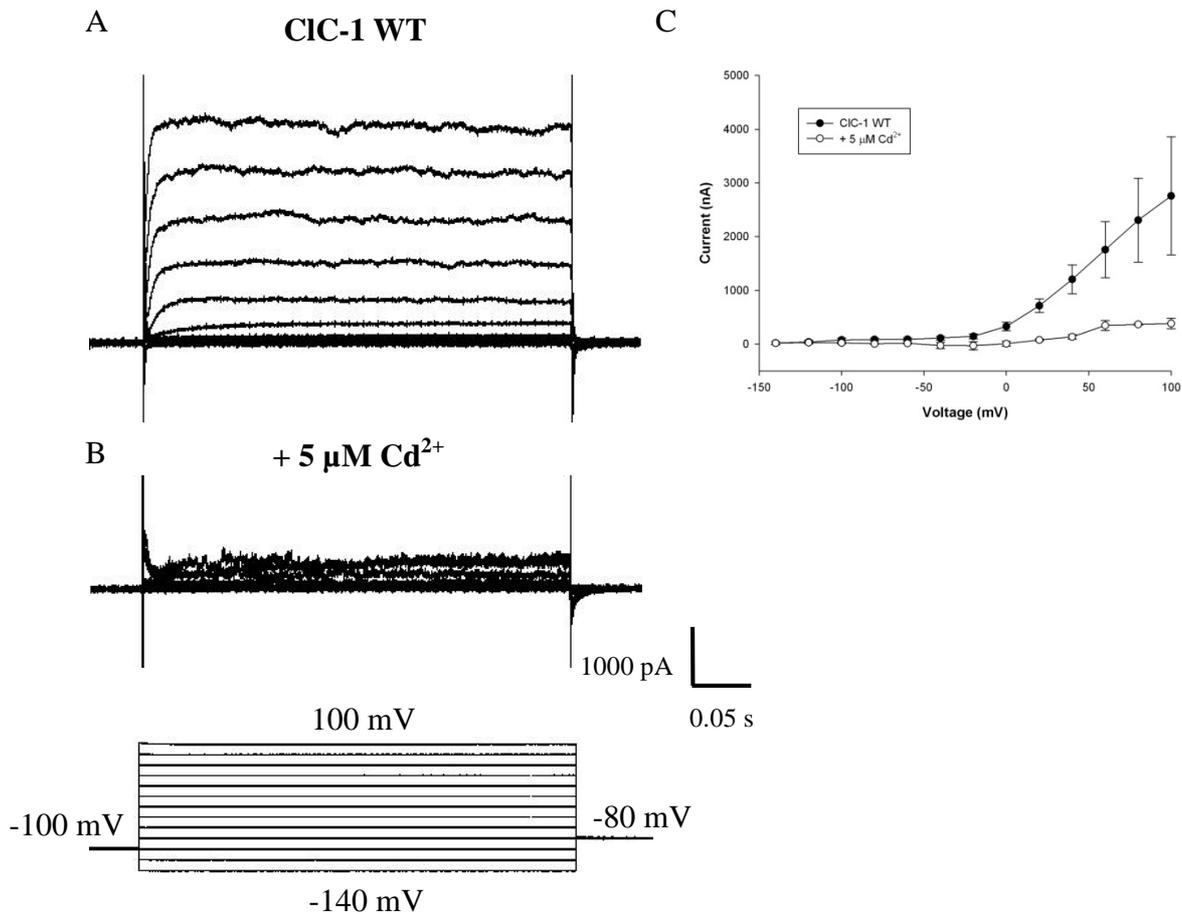
mM HEPES)洗掉蓋玻片上的培養液，之後再將蓋玻片組裝到自製壓克力記錄盤(chamber)，在chamber中加入3 ml記錄用細胞外溶液。

3. 使用拉針器將玻璃管(Warner Instruments Inc. PATCH GLASS)以適當條件拉出1.6~4 M Ω 阻抗的玻璃電極。
4. 使用燒針器使玻璃管口平整，並在此玻璃管裝填細胞內溶液(110 mM KCl, EGTA 10 mM, 30 mM KOH, 5.1 mM CaCl₂, 2.8 mM MgCl₂, 1.6 mM ATP, 10 mM HEPES)。
5. 將玻璃管組裝成玻璃電極並架到機械手臂(headstage)上。
6. 在顯微鏡下尋找適當細胞，並移動玻璃電極，使其接近細胞的視野下。
7. 當玻璃電極接近細胞時，微調往下使玻璃電極針尖接觸細胞(觀察電阻變化)。
8. 給一段負壓，使玻璃電極針尖和細胞緊密吸附(形成G Ω)
9. 再給一段負壓吸破細胞形成whole cell狀態。
10. 將測到的電流記錄下來並進行分析。

結果

Cd^{2+} 對於野生型 CIC-1 的作用：

將野生型 CIC-1 基因表達於 HEK293t 經 24-48 小時後測量其所產生的電流(圖 1A), 此電流會受到 Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$) 的抑制 (圖 1B) 電流與電位關係圖如圖 1C 所示。



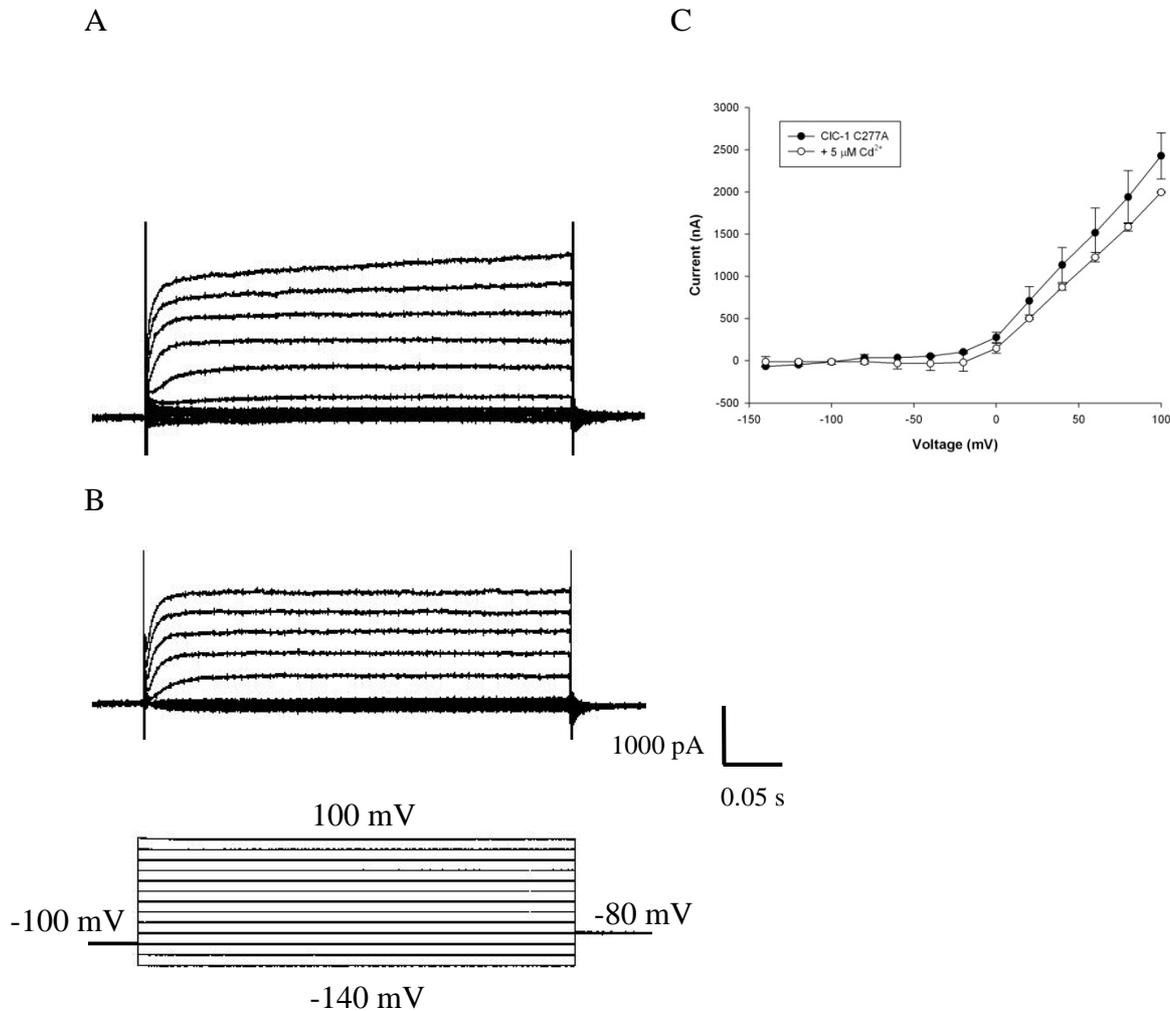
圖一(Figure 1):

HEK293t 細胞經全細胞電位鉗定技術所記錄之離子通道電流

(A). CIC-1 氯離子通道受到 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 WT 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 24~48 小時後所測得的電流, 再加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 作用五分鐘後, 可以看出 CIC-1 電流受到 Cd^{2+} 的抑制作用 (B)。全細胞電位鉗定技術所使用之電位鉗定流程見下圖. (C). CIC-1 WT 加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 前後的 I-V curve, 可以看出隨著電位的增加電流受到抑制的現象。

Cd^{2+} 對於CIC-1 C277A變異型的作用：

將變異型CIC-1 C277A基因表達於HEK293t經 24-48小時後測量其所產生的電流(圖2A),此電流對於 Cd^{2+} (5 μM)的抑制較不明顯 (圖2B) 電流與電位關係圖如圖2C所示.



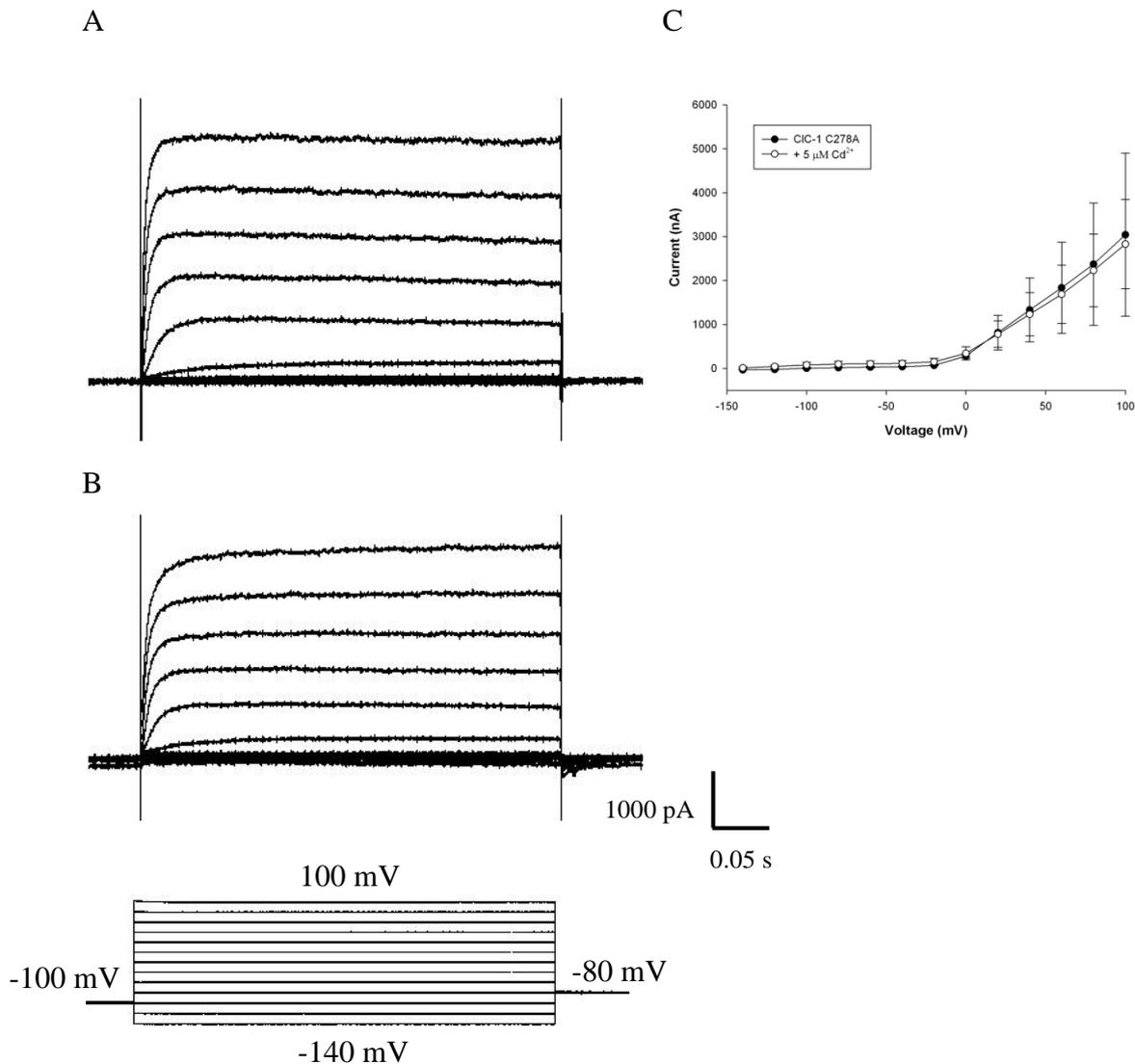
圖二(Figure 2):

HEK293t 細胞經全細胞電位鉗定技術所記錄之離子通道電流

(A) CIC-1 單點突變 C277A，氯離子通道受到 5 μM Cd^{2+} 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 277A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 5 μM Cd^{2+} 作用五分鐘後 (B)，可以看出 CIC-1 電流受到 Cd^{2+} 的抑制作用，但抑制的程度不如 WT 明顯，大約抑制了 17% 的電流。全細胞電位鉗定技術所使用之電位鉗定流程見下圖。(C) CIC-1 C277A 加入 5 μM Cd^{2+} 前後的 I-V curve，以看出隨著電位的增加電流受到抑制的現象，但抑制不明顯。

Cd^{2+} 對於 CIC-1 C278A 變異型的作用：

將變異型 CIC-1 C278A 基因表達於 HEK293t 經 24-48 小時後測量其所產生的電流 (圖 2A), 此電流對於 Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$) 的抑制較不明顯 (圖 2B) 電流與電位關係圖如圖 2C 所示。



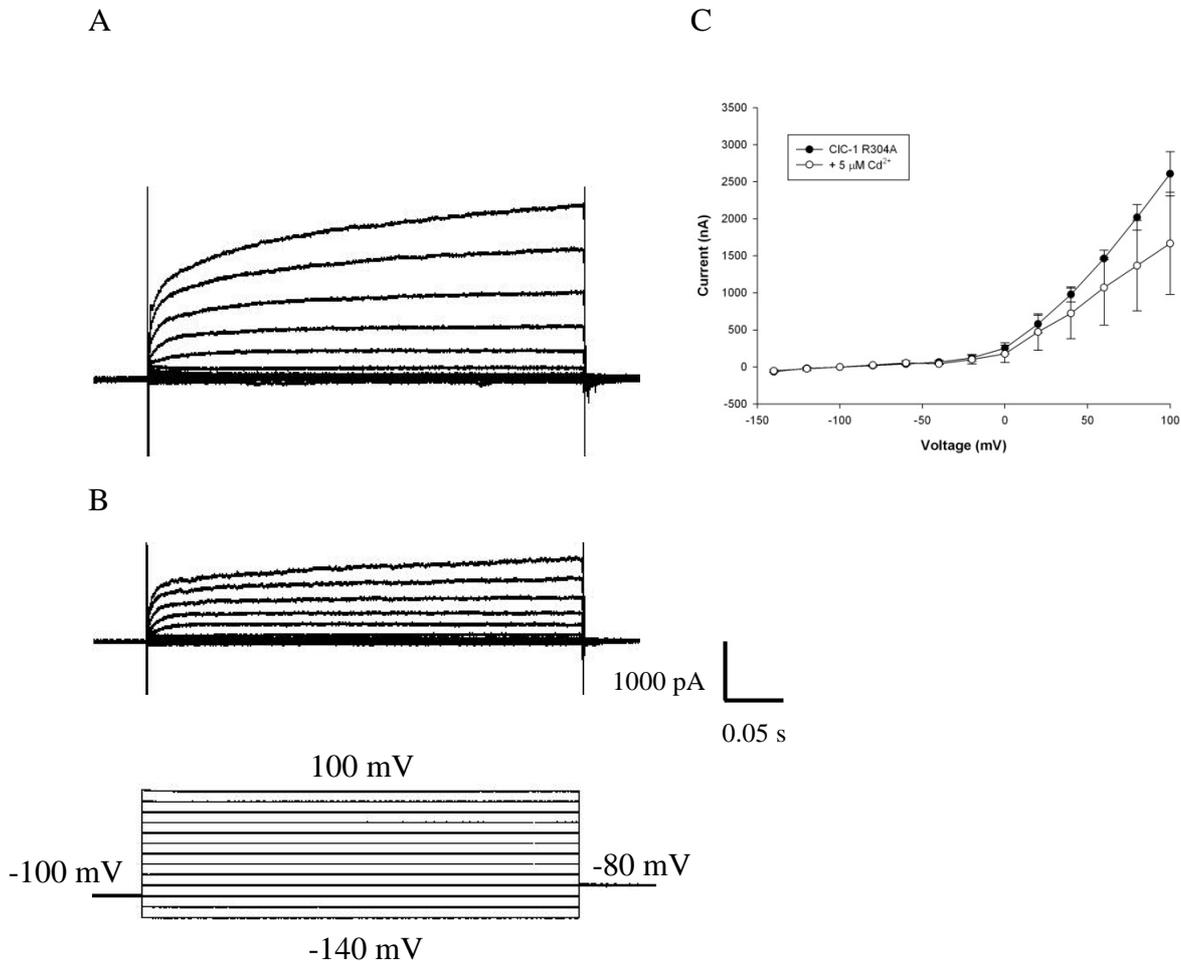
圖三(Figure 3):

HEK293t 細胞經全細胞電位鉗定技術所記錄之離子通道電流

(A) CIC-1 單點突變 C278A，氯離子通道受到 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 278A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 作用五分鐘後(B)，電流大小似乎沒有顯著的差異性。全細胞電位鉗定技術所使用之電位鉗定流程見下圖。(C) CIC-1 C278A 加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 前後的 I-V curve，從 error bar 的重疊程度 Cd^{2+} 在氯離子通道的作用似乎沒有造成顯著的差異。

Cd^{2+} 對於 CIC-1 R304A 變異型的作用：

將變異型 CIC-1 C278A 基因表達於 HEK293t 經 24-48 小時後測量其所產生的電流 (圖 4A), 此電流對於 Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$) 的抑制較不明顯 (圖 4B) 電流與電位關係圖如圖 4C 所示。



圖四 (Figure 4):

HEK293t 細胞經全細胞電位鉗定技術所記錄之離子通道電流

(A) CIC-1 單點突變 R304A, 氯離子通道受到 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 R304A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流, 再加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 作用五分鐘後 (B), 可以看出 CIC-1 電流受到 Cd^{2+} 的抑制作用, 但抑制的程度不如 WT 明顯, 約抑制了 36% 的電流。全細胞電位鉗定技術所使用之電位鉗定流程見下圖。(C) CIC-1 R304A 加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 前後的 I-V curve, 從 0 mV 到 100 mV, 可以看出電位增加的愈多抑制的程度愈明顯。

Cd^{2+} 對於 CIC-1 V321A 變異型的作用：

將變異型 CIC-1 V321A 基因表達於 HEK293t 經 24-48 小時後測量其所產生的電流 (圖 5A), 此電流對於 Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$) 的抑制較不明顯 (圖 5B)

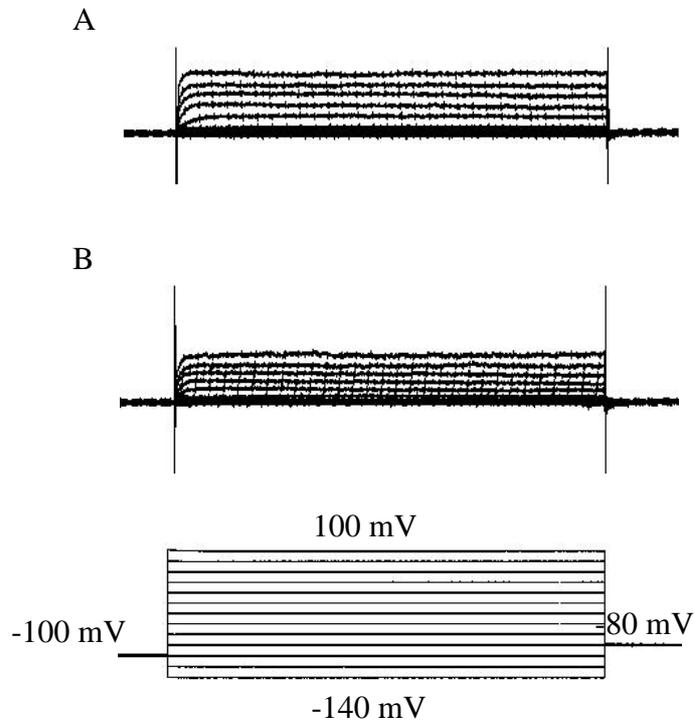


Figure 5:

HEK293t 細胞經全細胞電位鉗定技術所記錄之離子通道電流

(A) CIC-1 單點突變 V321A，氯離子通道受到 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 V321A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流比其他突變點的電流小，再加入 $5 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 作用五分鐘後(B)，抑制的程度並不明顯，大約抑制了 20% 的電流。全細胞電位鉗定技術所使用之電位鉗定流程見下圖

結論

與CIC-1 同家族的氯離子通道CIC-0位於電鰻電器官上，研究發現鋅離子會抑制此離子通道蛋白，電鰻的CIC-0 212C位胺基酸位點突變會使鋅離子抑制效力消失，而在CIC-1蛋白(主要位於哺乳類細胞)其二價離子鎘的結合位過去並未有探討或發表。我們得知CIC-0的 212C相當於CIC-1的 277位置。在我們的研究中發現CIC-1 C277A在鎘 (5 μ M)的作用下，電流有被抑制17 %，所以這裡可以得知鎘和鋅的結合位置在CIC-1 C277是不同的。使用多重序列比對的公用軟體clustalw來比對人類CIC-1 和電鰻CIC-0 的高度保留序列。比對結果發現幾個可能二價鋅離子的位點，除了CIC-0 C212 位置相似的CIC-1 C277，此外還有CIC-1的C278A和R304A，而V321是會促進鋅離子結合的。我們實驗中CIC-1 C278A 的結果發現電流大小並沒有顯著差異，此數據和鋅作用在CIC-1 C278S電流不會受到抑制(5)的結果相符。這篇研究也指出CIC-1 V321S電流有被抑制的現象，電流大小大約被抑制了75 %，而在我們實驗中，基於不希望會去影響到CIC-1蛋白而將突變點設計成簡單的氨基酸結構-Alanine，數據中發現CIC-1 V321電流也有20 %的抑制程度此與鋅離子可促進V321的抑制不同，可以看出其兩者間的抑制程度有差異。也有研究指出在大鼠CIC-1 R304E加入鎘並不會去抑制電流，在我們的實驗中CIC-1 R304A在鎘的作用下電流大小大約被抑制了36 %。因此在我們的實驗中顯示鎘的結合位可能位於278C的位置。

參考文獻

1. Hagino N. (1957), About investigations on Itai- itai disease. J. Toyama Med Ass. 21, 7.
2. W. M. Fu, S. Y. Day and S. Y. Lin-Shiau (1988). Studies on cadmium-induced myotonia in the mouse diaphragm. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 340,191-195.
3. Chen TY (1998). Extracellular zinc ion inhibits CIC-0 chloride channels by facilitating slow gating. J Gen Physiol 112, 715–726.
4. .Lin YW, Lin CW & Chen TY (1999). Elimination of the slow gating of CIC-0 chloride channel by a point mutation. J Gen Physiol 114, 1–12.
5. Duffield MD, Rychkov GY, Bretag AH, and Roberts ML (2005). Zinc inhibits human

CLC-1 muscle chloride channel by interacting with its common gating mechanism. *J Physiol* 568: 5–12.

6. Plassart-Schiess E, Gervais A, Eymard B, Lagueny A, Pouget J, Warter JM, et al (1998). Novel muscle chloride channel (CLC-1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology* 50:1176–9.
7. Klocke R., Steinmeyer K., Jentsch T. J., Jockusch H (1994). Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel CLC-1. A study on normal and myotonic muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 27635-27639.
8. Pusch M (2002). Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLC-1. *Hum. Mutat.* 19: 423-434.
9. Bretag AH (1987). Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* 67: 618-724.
10. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. A (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels . *Physiol. Rev.* 82: 503-568.
11. Waldegger S., Jentsch T.J (2000). From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels . *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1331-1339.
12. Estévez R, Schroeder BC, Accardi A, Jentsch TJ & Pusch M (2003). Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in CLC-1. *Neuron* 38,47–59.
13. Gregory DS, Martin AC, Cheetham JC, Rees AR (1993). The prediction and characterization of metal binding sites in proteins . *Protein Engineering* 6: 29-35.