

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  
\* : 利用多點突變探討 C1C-1 蛋白功能性的磷酸化位置  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 陳玠汝  
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-026-B  
研究期間： 100 年 07 月 01 日至 101 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 101 年 04 月 27 日

## 摘要

CIC-1 蛋白為負責骨骼肌正常功能的重要蛋白，CIC-1 蛋白的變異會造成肌無力 (myotonia) 的現象即先天性人類肌強直症，從過去的研究與報告我們知道，蛋白質磷酸化激酶丙 (Protein kinase C) 可以調控人類 CIC-1 蛋白功能，但其磷酸化位置尚未確知。利用生物資訊學的方式使用線上軟體 KinasePhos 2.0 和 Netphos 2.0 進行 CIC-1 蛋白可能被 PKC 磷酸化的位置，其中序列 Thr-890-Thr891-Ser892-Thr-893 是可能的區段，我們使用 CIC-1 pTLN 質體去建構人類 CIC-1 pcDNA3.1 質體，再以多位點突變的方式建構出多種變異質體，並使用人類胚胎腎細胞 (HEK293t) 表達變異的 CIC-1 蛋白，用細胞電位鉗定方式來測量這些變異的 CIC-1 功能蛋白所產生的電流，觀察在蛋白質磷酸化激酶丙活化劑 Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 作用下是否會失去抑制作用或抑制效力。結果顯示 CIC-1 蛋白在兩點突變 (T890AT891A) 對 PMA 會產生敏感性，但在三點突變 (T891AS892AT893A) 電流和 CIC-1 野生型相比下受 PMA 的抑制程度不明顯，因此推測出 Thr891-Ser892-Thr-893 仍為最可能的磷酸化位點。

## 序論

目前我們對ClC-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。ClC-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，ClC-1 Cl<sup>-</sup> 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。ClC-1 Cl<sup>-</sup> channel是一個長度大約988 個胺基酸的哺乳類動物膜蛋白，主要表現在骨骼肌之中。其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)。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 (進而無力)。其成因就是因為ClC-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 ( $G_{Cl}$ , Cl<sup>-</sup> 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  $G_{Cl}$ 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ClC-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。而CIC-1蛋白的磷酸化作用可以調控其功能，在某種情況下磷酸化作用過度的情況下會影響骨骼肌的功能因而造成肌強直的現象，因此此計畫將以表達多重變異蛋白的方式來探討蛋白激酶丙的磷酸化位點。

## 材料與方法

### 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Hind III與3端的Rho I 限制酶辨識序列，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/pcDNA3.1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 1 $\mu$ l dNTP、dsDNA template 1  $\mu$ l(500 ng)、Primer(Forward)1  $\mu$ l、Primer(Reverse)1  $\mu$ l、DMSO 1.5  $\mu$ l、10X reaction buffer 5  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 40.5 $\mu$ l共50  $\mu$ l。
2. 加入30  $\mu$ l礦物油。
3. 加入1  $\mu$ l Pfu Turbo DNA polymerase 1  $\mu$ l，混合均勻
4. 放入PCR machine 進行PCR thermal cycle  
95 °C 30 s  
18 cycles  
95 °C 30 s  
55 °C 1 min  
68 °C 10 min  
68 °C 5 min  
4 °C  $\infty$
5. PCR結束後，加入1  $\mu$ l 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

### DH5 $\alpha$ 大腸桿菌之轉型

使用Real Biotech Corporation HIT<sup>TM</sup> Competent Cells (Non Heat Shock Transformation) 之DH5 $\alpha$ 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  $\mu$ l DH5 $\alpha$  Competent Cell 的 eppendorf，置於冰桶上待其融解至三分之一體積。
3. 加入 5  $\mu$ l 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 DH5 $\alpha$  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 DH5 $\alpha$  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 ddH<sub>2</sub>O, 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  $\mu$ l Solution I 並以 vortex 震盪溶開菌塊。
3. 加入 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 % CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l的微量吸管以抽吸的方式使細胞懸浮。
12. 取30  $\mu$ l溶液+30  $\mu$ l Trypan Blue Stain ，約取15 $\lambda$ 放在血球計數盤上計算細胞數。
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 $2 \times 10^5$ 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3 $\mu$ g CIC-1 質體和8 $\mu$ g transfection reagent以及無血清補足至100  $\mu$ l。
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。

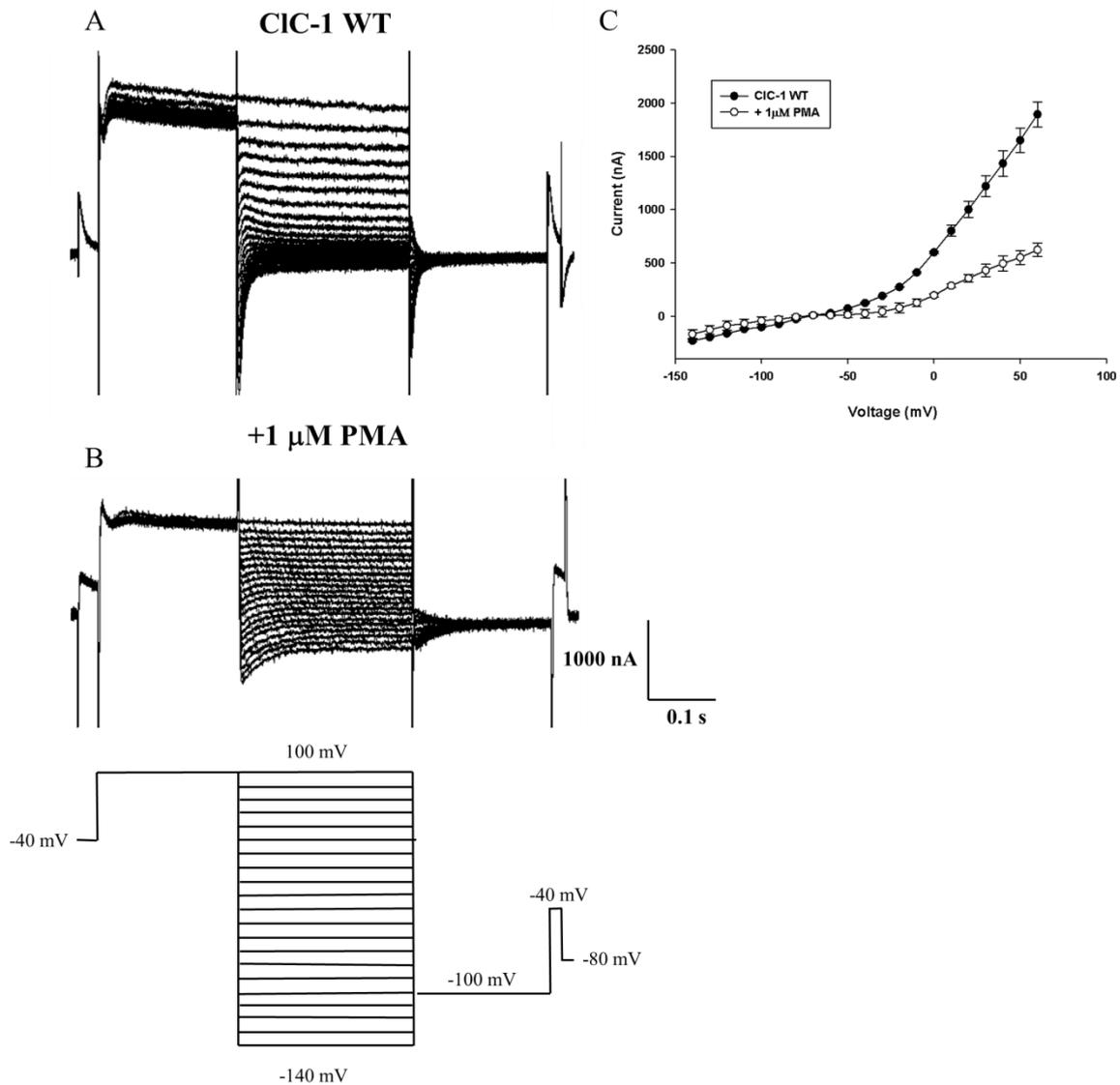
1. 將轉染後的HEK293t細胞取 $10^5$ 放入24x32 mm SUPE $\acute{O}$ RIOR Micro Cover Glasses 蓋玻片上(此蓋玻片已先放入6 cm培養皿中)，加完後將細胞放入37 °C培養箱中待40分鐘使細胞貼附在蓋玻片上。
2. 取出培養皿並先用細胞外溶液(140mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES)洗掉蓋玻片上的培養液，之後再將蓋玻片組裝到自製壓克力記錄盤(chamber)，在chamber中加入3 ml記錄用細胞外溶液。
3. 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 $\Omega$ 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 CaCl<sub>2</sub>, 2.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 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GΩ)
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

### PMA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 PMA (1  $\mu$ M)的抑制 (圖 1B) 電流與電位關係圖如圖 1C 所示。



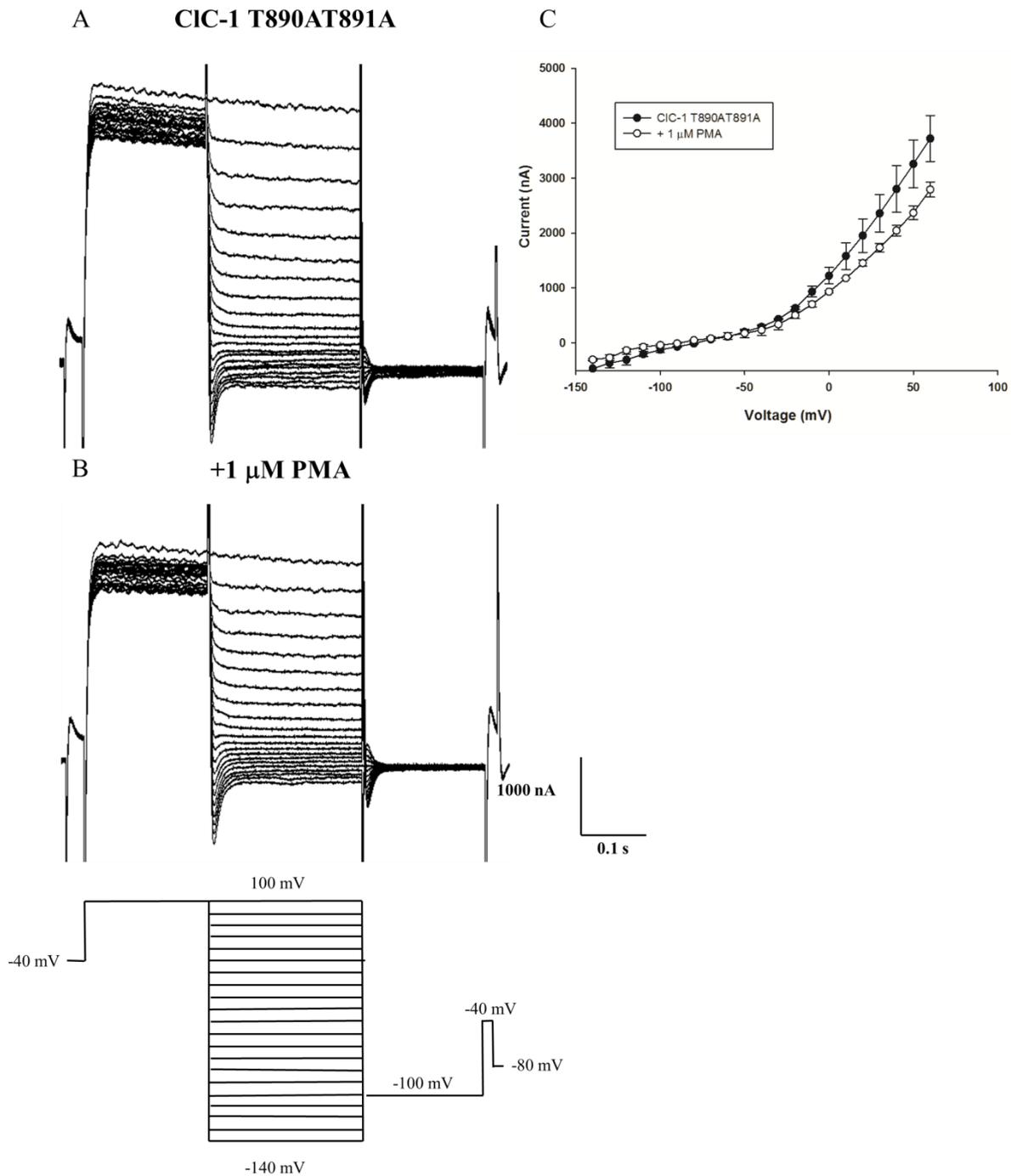
圖一(Figure 1):

#### 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 1  $\mu$ M PMA 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 WT 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 1  $\mu$ M PMA 作用五分鐘後，看出 CIC-1 電流受到 PMA 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 1  $\mu$ M PMA 前後的 I-V curve，可以看出隨著電位的增加電流受到明顯的抑制現象。

## PMA對於變異型CIC-1 T890AT891A的作用：

將變異型CIC-1 T890AT891A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 PMA(1  $\mu$ M)的抑制較不明顯 (圖2B) 電流與電位關係圖如圖 2C所示.



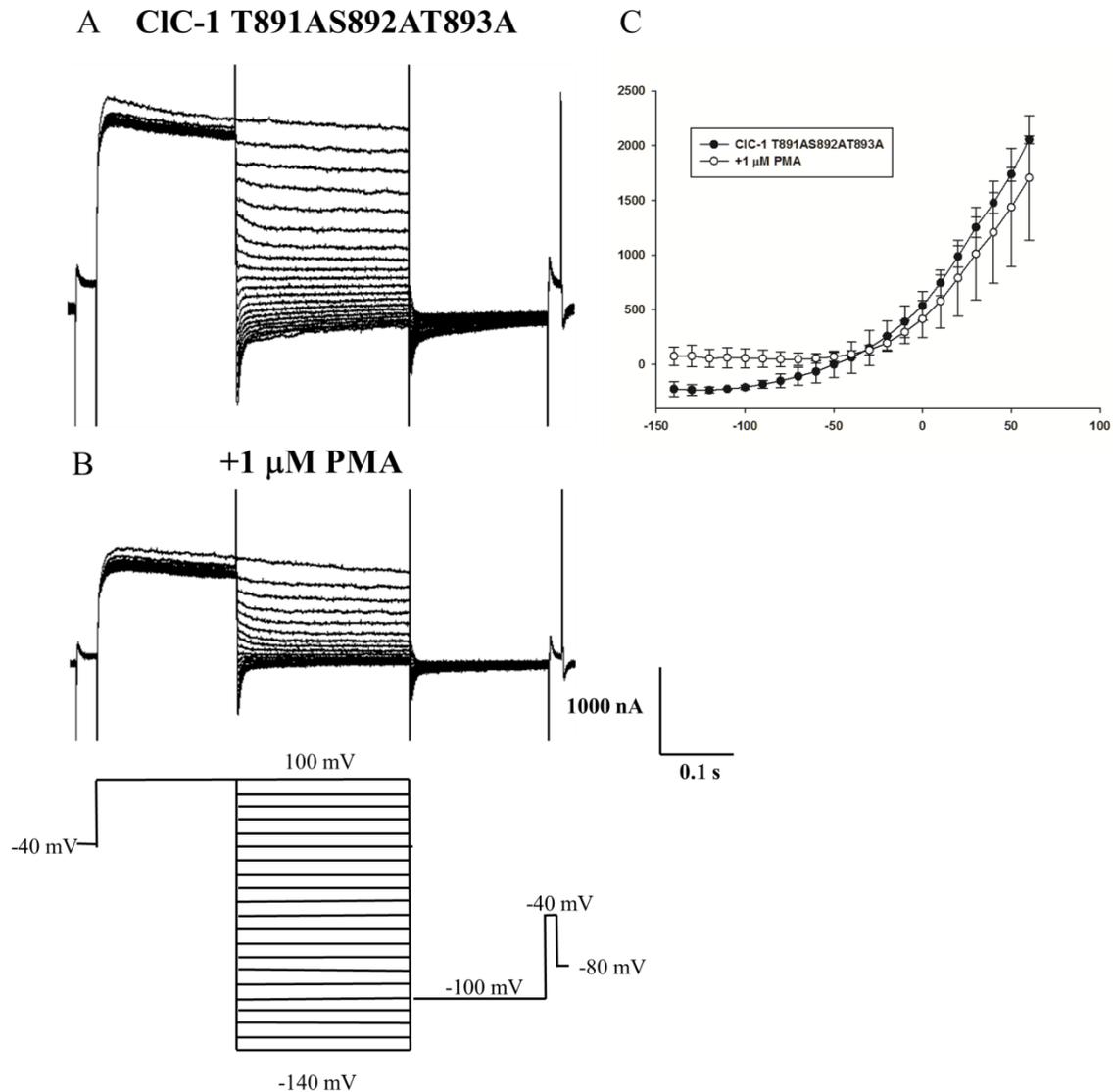
圖二(Figure 2):

### 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 雙點突變 T890AT891A，氯離子通道受到 1  $\mu$ M PMA 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 T890AT891A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 1  $\mu$ M PMA 作用五分鐘後 (B)，可以看出 CIC-1 電流受到 PMA 的抑制作用，但抑制的程度不如 WT 明顯，大約抑制了 25 % 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 T890AT891A 加入 1  $\mu$ M PMA 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，但抑制不明顯。

## PMA對於CIC-1 T891AS892AT893A變異型的作用：

將變異型 CIC-1 T891AS892AT893A 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 1  $\mu$ M PMA 的抑制較不明顯 (圖 2B) 電流與電位關係圖如圖 2C 所示。



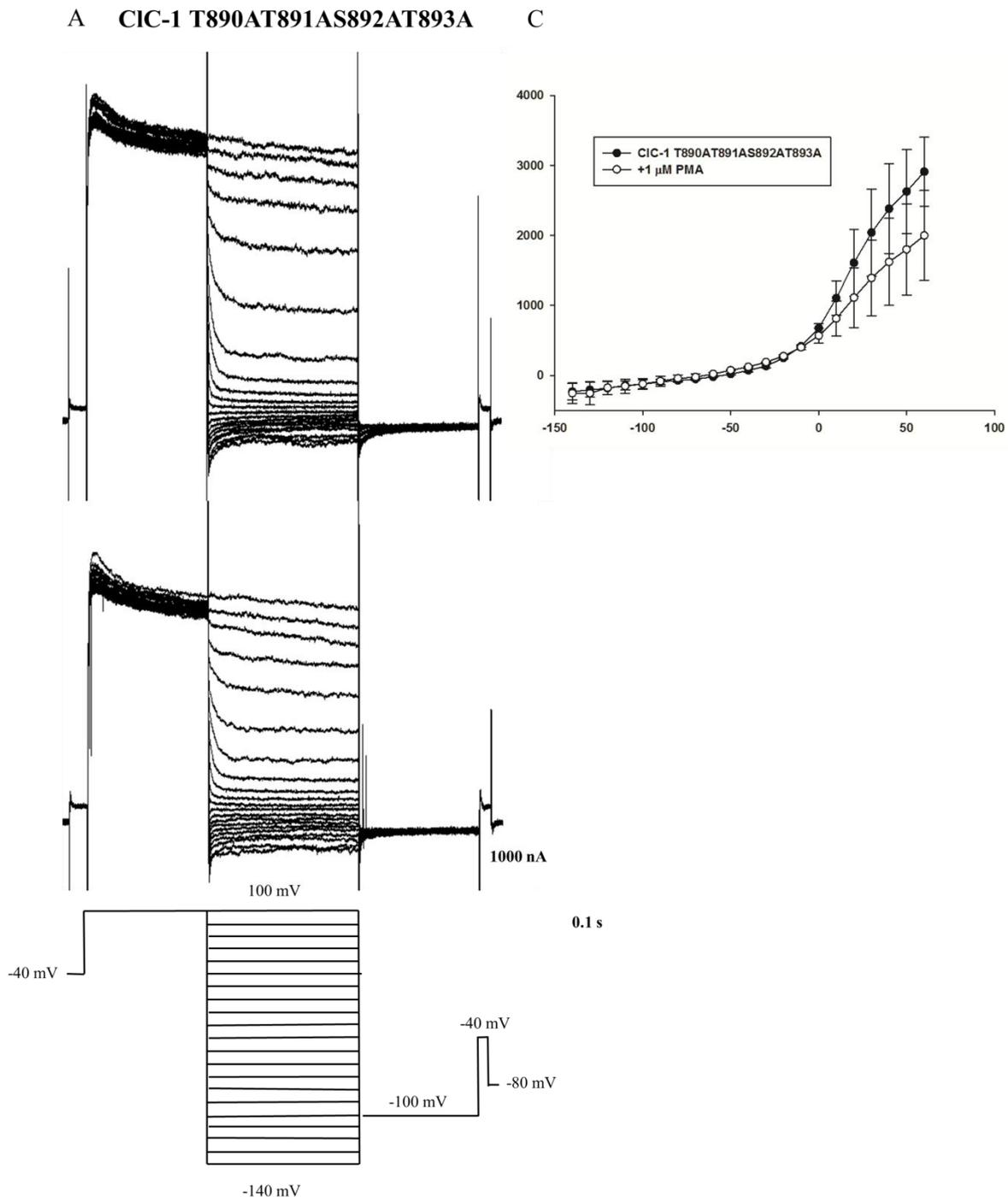
圖三(Figure 3):

### 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 三點突變 T891AS892AT893A，氯離子通道受到 1  $\mu$ M PMA 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 T891AS892AT893A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 1  $\mu$ M PMA 作用五分鐘後(B)，可以看出 CIC-1 電流受到 PMA 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 T891AS892AT893A 加入 1  $\mu$ M PMA 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，但抑制不明顯。

## PMA對於T890AT891AS892AT893A變異型的作用：

將變異型 CIC-1 T890AT891AS892A 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 PMA(1  $\mu$ 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 四點突變 T890AT891AS892T893A，氯離子通道受到 1  $\mu$ M PMA 影響前後的差異。可以看到 CIC-1 T890AT891AS892AT893A 為 CIC-1-pcDNA 3.1 經 transfection 48 小時後所測得的電流，再加入 1  $\mu$ M PMA 作用五分鐘後(B)，可以看出 CIC-1 電流受到的抑制作用，但抑制的程度不如 WT 明顯，約抑制了 31%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 1  $\mu$ M PMA 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。

## 結論

研究指出在ClC-1氯離子通道異源性表達在非洲爪蟾卵母細胞的系統中，在序列Thr891-Ser892-Thr-893為可能的磷酸化位點(5)，其結果顯示ClC-1蛋白在兩點突變下對PMA均產生抗性，如T891AS892A、S892AT893A、T891AT893A。但本研究的兩點突變ClC-1 T890AT891A變異型表達在人類胚胎腎細胞(HEK293t)中卻對PMA產生敏感性。PMA對於野生型及三點突變ClC-1 T891AS892AT893A變異型的作用相比較下，PMA對於三點突變的作用較不敏感，因此推測可能的磷酸化位點存在序列Thr891-Ser892-Thr-893。在ClC-1四點突變的變異型在PMA的作用下抑制程度約有31%，在連續突變四個相鄰胺基酸後仍尚未失去被磷酸的功能，推測可能是兩點的突變位點會造成結構改變而失去被磷酸化的功能，但如果又多兩點的突變後會將結構又變回原來類似野生型的結構，因此在連續四點突變的變異型中對PMA較具敏感性。不管是在爪蟾卵母細胞的系統或是在人類胚胎腎細胞(HEK293t)的系統下，其可能的磷酸化位點是相符的。

## 參考文獻

1. Rosenbohm A, Rudel R, Fahlke C. Regulation of the human skeletal muscle chloride channel hClC-1 by protein kinase C. *J Physiol* 1999; 514:677-685.
2. Rosenbohm A, George, A.L., Rüdell, R. and Fahlke Ch.: Effect of activators of protein kinase C (PKC) on the muscle chloride channel, ClC-1, studied in native and heterologous expression systems. *Pflügers Archiv* 1995; 428:R25.
3. Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y, Nishizuka Y: Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1985; 260:12492-12499.
4. Woodgett JR, Gould KL, Hunter T. Substrate specificity of protein kinase c. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur J Biochem* 1986; 161:177-184.
5. Kuang-Ming Hsiao, Ren-Yu Huang, Pei-Hua Tang and Min-Jon Lin. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25:687-694
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* 1998; 50:1176–9.

7. Klocke R., Steinmeyer K., Jentsch T. J., Jockusch H. 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.* 1994; 269: 27635-27639.
8. Pusch M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLC-1. *Hum. Mutat.* 2002; 19: 423-434.
9. Bretag AH. Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* 1987; 67: 618-724.
10. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 503-568.
11. Waldegger S., Jentsch T.J. From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11: 1331-1339.
12. Estévez R, Schroeder BC, Accardi A, Jentsch TJ & Pusch M. Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in CLC-1. *Neuron* 2003; 38,47–59.
13. Gregory DS, Martin AC, Cheetham JC, Rees AR. The prediction and characterization of metal binding sites in proteins. *Protein Engineering* 1993; 6:29-35.