

東海大學生命科學系 碩士論文

指導教授：陳仁祥

Ren-Shiang, Chen, Ph.D.

鈣離子通道 γ 次單元對人類 Cav3.2 T 型
鈣通道的調節作用

Regulation of human Cav3.2 T-type calcium
currents by calcium channel γ subunits

研究生：林宜君

LIN, YI-JYUN

中華民國 106 年 07 月 27 日

東海大學生命科學系碩士論文

鈣離子通道 γ 次單元對人類 Cav3.2 T 型鈣
通道的調節作用

Regulation of human Cav3.2 T-type calcium
currents by calcium channel γ subunits

研究生：林宜君

LIN, YI-JYUN

指導教授：陳仁祥

Ren-Shiang, Chen, Ph.D.

中華民國 106 年 07 月 27 日

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 林宜君 君所撰寫之論文

(中文)

鈣離子通道 γ 次單元對人類 Cav3.2 T 型鈣通道的調節作用

(英文)

Regulation of human Cav3.2 T-type calcium current by calcium
channel subunits

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

林玉霞

(簽名)

委員

陳建璋

陳仁祥

中華民國106年 7 月 5 日

致謝

決定申請五年一貫的這兩年半來，要感謝的人真的很多，謝謝陳仁祥老師對我的包容和體諒，在我困難的時候給予我空間和時間。我的導師就是我的指導老師，大學期間就對老師實驗室的研究內容非常感興趣，不只是因為電生理在我的認知中是非常新穎的事物，更因為在學習的過程中可以不斷的增廣見聞，增加不同領域的學習，我喜歡沉浸在腦力激盪的思維當中，有種打通任督二脈的感覺。這期間仁祥老師給予我許多的啟發，更讓我在這裡深刻學習到對實驗的負責與自我規劃，更謝謝老師從來不會因為我犯的錯誤而放棄或兇我，老師辛苦了，謝謝您。同時也感謝隔壁實驗室的林玉雯老師在我低落的時候，不僅給予我許多實驗上的幫助，更給予我許多信仰上的提醒，真的很感謝老師。這其中也要感謝不吝給予我分生技術指導的蔡玉貞老師，感謝老師忘我的指導。也謝謝中研院陳建璋老師不僅提供我實驗材料，更在口試時給予我強而有力的建議。過程中不僅受到許多老師的幫忙，更感謝當中和我共患難的夥伴們，希望在未來的學校大家都能夠發光發熱。也謝謝新進實驗室的學弟妹們在口試前的幫忙。最後感謝緊要關頭支持我的家人和好友們，謝謝大家陪伴我一起完成我生命中的第一個小成就。願神祝福每一位幫助過我以及陪伴我的人們。

目錄

表目與圖目	3
摘要	4
Abstract.....	5
前言	7
材料與方法	11
大鼠 γ_6 、TMEM114 和 TMEM235 質體放大與萃取.....	11
大鼠 γ_6 、TMEM114 和 TMEM235 基因選殖(cloning).....	12
細胞培養與基因轉染(cell culture and transfection).....	12
全細胞膜片箝制技術(whole-cell patch-clamp)	13
數據分析.....	15
結果	16
基因選殖與質體內容確認	16
細胞培養與基因轉染(cell culture and transfection).....	17
大鼠 γ_6 抑制人類 Cav3.2 T 型鈣通道電流.....	18
討論	20
大鼠 γ_6 抑制人類 Cav3.2 T 型鈣通道電流.....	20
TMEM114 及 TMEM235 之演化及功能	21
酵素切點設計	21

細胞生長速度之控制	22
未來工作.....	22
參考文獻	24
附表與附圖	28
個人資料	45

表目與圖目

表 一、大鼠 γ_6 引子設計表	28
表 二、大鼠 TMEM114 引子設計表	29
表 三、 TMEM235 引子設計表	30
圖 一、 鈣離子通道結構示意圖	32
圖 二、 γ 蛋白演化親緣關係樹	33
圖 三、 質體放大之基因序列	34
圖 四、細胞基因轉染示意圖	35
圖 五、 全細胞膜片箝制技術	36
圖 六、 全細胞膜片箝制技術之實驗架設 (set-up)	37
圖 七、 Cav3.2 質體酵素切割電泳膠圖	38
圖 八、 大鼠 γ_6 subunit 酵素切割電泳膠圖	39
圖 九、 大鼠 TMEM114 限制酵素切割電泳膠圖	40
圖 十、 TMEM235 限制酵素切割電泳膠圖	41
圖 十一、 單顆 HEK293 細胞之 Cav3.2 電流記錄	42
圖 十二、 人類 Cav3.2 通道電流-電壓關係曲線	43
圖 十三、 人類 Cav3.2 通道之不活化與電壓關係圖	44

摘要

鈣離子通道電流能調控許多重要的細胞反應，而鈣離子通道功能失調可能導致例如：癲癇、肺高壓、心律不整等疾病。鈣離子通道至多由四個次單元組成，分別是 α_1 、 β 、 $\alpha_2\delta$ 和 γ 。 α_1 次單元主要形成篩選鈣離子通過的孔洞， β 和 $\alpha_2\delta$ 兩次單元則可以幫助 α_1 次單元鑲嵌到細胞膜上、增加通道開啟的機率以及減緩通道的不活化。相較於其他三種次單元，並非所有 γ 次單元的功能都已得到明確的證實。近年來科學家發現了兩種新的 γ 次單元(TMEM114 和 TMEM235)，其中 TMEM114 被指出可能與眼睛的發育有關。過去的文獻指出在 HEK 細胞中大鼠的 γ_6 能夠抑制大鼠的 Cav3.1 之通道電流，而在心肌細胞中也能夠抑制 T 型鈣離子通道之電流，但大鼠之 γ_6 對於人類鈣通道之調控仍待證實。我的研究被設計於在 HEK293 細胞中，測試三種 γ 次單元 (γ_6 及 TMEM114 和 TMEM235) 與 Cav3.2 T 型鈣通道之交互作用。我已將兩種 TMEM235 及 TMEM114 基因選殖入哺乳類細胞可表達之 pcDNA 載體內。應用細胞膜箝制技術進行電生理測定結果，發現 Cav3.2 通道與 γ_6 次單元共同表達在 HEK 細胞株時，電流密度顯著地減少。本研究結果將會提升人們對於 γ 次單元的認知且有助於 T 型鈣離子通道相關疾病治療的藥物開發。

Abstract

The current conducted by calcium channels mediate many important cellular processes. The dysfunction of calcium channel can cause disorders including epilepsy, arrhythmia and pulmonary hypertension. The voltage-gated calcium channel has up to four subunits (α_1 , β , $\alpha_2\delta$ and γ). The α_1 subunit forms the calcium-selective channel pore. The β and $\alpha_2\delta$ subunits help the α_1 subunit insert into the plasma membrane, increasing channel open probability and decreasing channel inactivation. In contrast, γ subunits are much less studied. Recently, the γ subunits have added two new members, TMEM114 and TMEM235. Some evidence suggests that TMEM114 may be related to the eye development. The γ_6 has been shown to reduce rat Cav3.1 current in HEK cell line and T-type calcium currents in cardiomyocytes, but its regulatory effect on human channels remains elusive. My study was designed to determine whether the rat γ_6 , TMEM114 and TMEM235 can interact with the transfected human Cav3.2 channel in the HEK293 cells. Four of TMEM235 and TMEM114 constructs were successfully cloned into pcDNA3.1 vectors. Electrophysiological recordings of the Cav3.2 channel current with and without the co-expression of rat γ_6 subunit in HEK cells indicated that γ_6 subunit significantly reduced Cav3.2 current density. The results of interactions

between Cav3 channels and these three subunits will contribute to our knowledge of their biological functions, as well as provide therapeutic strategies for treating T-type channel related diseases.

前言

鈣離子在生理中扮演著重要的角色，調控許多細胞及分子層次的機轉，能使心臟節律細胞維持放電、與肌鈣蛋白(Troponin C)作用導致肌肉收縮、刺激神經細胞釋放神經傳導物質及內分泌細胞分泌內分泌物質等 (Catterall, 2011)。因此，鈣離子通道功能失調可能產生嚴重的疾病，例如癲癇、心律不整、心室肥大等 (Nelson et al., 2006; Cribbs, 2010)。

電壓敏感型的鈣離子通道分為 L、N、P/Q、R、T 五種類型。L 型鈣離子通道電流開啟後會緩慢進入不活化狀態，且通道活性會被 DHP 類型的藥物抑制。N、P/Q、R 皆為神經中發現的電壓敏感型鈣離子通道，通道活性會被蜘蛛毒與蝸牛毒素抑制(Catterall, 2011)。但 T 型鈣離子通道相較於其他類型，研究相對較少，且在臨床上唯一針對 T 型鈣離子通道的抑制劑 mibefradil 也在 1998 年因為與其他藥物合併使用對人體產生之副作用而由廠商(Roche)全面下架(Glasser, 1998; Levine et al., 2000)。近年來雖然陸續開發了一些 T 型鈣通道的專一抑制劑，如 TTA-A2 等(Kraus et al., 2010)，但尚未進入臨床使用階段。T 型鈣通道主要控制細胞的節律，可以使細胞規律地自主放電，因此在心臟節律與腦內海馬迴等區域具有重要的調節功能。T 型鈣離子通道失調可導致幾種常見疾病，如癲癇、肺高壓、心律不整等等。過去研究中曾顯示當視丘中

的 T 型通道過度活躍時，會導致癲癇小發作(absence seizure)的發生 (Rajakulendran and Hanna, 2016)。

鈣離子通道為細胞膜上的穿膜蛋白，至多可由四個次單元(α 、 $\alpha_2\delta$ 、 β 、 γ)所組成 (圖一)。 α_1 次單元負責在細胞膜上形成讓鈣離子可以進出的孔洞， $\alpha_2\delta$ 和 β 這兩種次單元則是幫助整個通道蛋白鑲嵌到細胞膜上並增加通道的開啟機率 (Lacerda et al., 1991)。然而，並非所有 γ 次單元的功能皆獲得實驗證據支持 (Chen et al., 2007; Maher et al., 2011)。 γ 次單元具有四個穿膜區塊 (transmembrane segments)，目前為止科學家已找到 10 種鈣離子通道 γ 次單元 (γ_1 - γ_8 ，TMEM114 及 TMEM235，如圖二)。在 γ_1 缺失的小鼠中，曾被發現肌肉細胞的 L 型鈣離子通道電流增加，且使細胞能在更去極化的膜電壓下才進入不活化態，顯示 γ_1 對於肌肉細胞中 L 型鈣離子通道具有抑制電流的效果；而在 2004 年 Hansen 等人發現大鼠的 γ_6 能夠抑制大鼠本身 Cav3.1 T 型鈣離子通道電流。故在 10 個成員中只有兩種 γ (γ_1 和 γ_6) 次單元是真正的鈣離子通道調節蛋白，可以在生理環境中抑制鈣離子通道的電流 (Freise et al., 2000; Hansen et al., 2004; Held et al., 2002; Lin et al., 2008)。而 γ_2 、 γ_3 、 γ_4 、 γ_8 、 γ_5 、 γ_7 則被認為是中樞神經系統中 AMPA 接受器的調控蛋白 (Tomita et al., 2003; Nicoll et al., 2006)。TMEM114 及 TMEM235 則是近年新發現

的鈣離子通道次單元 (Maher et al., 2011; Gai et al., 2014)，其功能仍然未知。

由於大鼠 γ_6 在大鼠自身的 Cav3.1 T 型鈣離子通道上證實能夠抑制其電流，2008 年科學家更進一步找出 γ_6 第一穿膜區塊(TM1)上的 GXXXX 的氨基酸片段即具有抑制通道電流的效果(Lin et al., 2008)，因此實驗合成 GXXXX 區塊附近的小片段胺基酸序列的胜肽，並以投藥方式測試此胜肽對於通道電流的影響，結果顯示該小片段胜肽對於 Cav3.1 T 型鈣離子通道具有抑制的作用(Chen and Best, 2009)。此研究所使用之通道為大鼠的 Cav3.1 通道，然而此胜肽是否同樣能夠抑制人類 T 型通道電流仍未被證實。

大鼠 γ_6 不僅在大鼠的 Cav3.1 T 型鈣離子通道上具有抑制的效果，同樣地，在大鼠 Cav3.2 T 型鈣離子通道也具有抑制效果(未發表)。近年來 Cav3.2 T 型鈣離子通道與疾病的研究日漸增加，許多研究指出 Cav3.2 T 型鈣離子通道與疼痛相關，研究顯示缺乏 Cav3.2 T 型鈣離子通道的小鼠，疼痛反應會降低(Choi et al., 2007)，因此我們將先確認 Cav3.2 T 型鈣離子通道與大鼠 γ_6 是否具有交互作用的關係。若能夠證實大鼠 γ_6 對人類 Cav3.2 T 型鈣離子通道同樣具有抑制效果，本研究將有助於 T 型鈣離子通道相關疾病的治療藥物研發。

此外，為了釐清鈣離子通道次單元的功能，本實驗室先前利用演化的親緣關係分析，發現在不同物種中 TMEM114 及 TMEM235 的演化分支介於已知的鈣離子通調節次單元與 AMPA 接受器調節次單元間，也從演化關係上了解 γ_1 和 γ_6 確實在演化上為同一分支 (未發表)。前人研究已指出 γ_1 可以調控骨骼肌細胞上的鈣離子通道 (Freise et al., 2000; Held et al., 2002)，而 γ_6 則被證實可以抑制大鼠心房細胞中的 T 型鈣電流及 HEK293 細胞中的 Cav3.1 電流 (Hansen et al., 2004; Lin et al., 2008)。此外，前人研究發現利用 Morpholino 抑制 TMEM114 之表達，可以在非洲爪蟾眼睛發育上造成小眼症 (microphthalmia) (Maher et al., 2011)，但其分子機制仍然未知。TMEM114 和 TMEM235 是否如同 γ_1 或 γ_6 同樣具有調節鈣離子通道之功能？因此本研究所欲探討的另一重點是將大鼠 TMEM114 和 TMEM235 基因進行分子轉接入 pcDNA3.1 載體中，以便將來於哺乳動物細胞中進行此二蛋白功能性質之測試。

材料與方法

大鼠 γ_6 -TMEM114 和 TMEM235 質體放大與萃取

大鼠 γ_6 TMEM114 和 TMEM235 皆透過廠商(量子，Invitrogen)完成全基因合成(如圖三)，將基因序列保存於 pMA 載體內。利用電菌方式將質體轉殖入 XL1-Blue 菌株中，再將恢復 40 分鐘之菌液塗於 2 %的 Agar 盤(含 2.5 %的 LB)上培養 16-18 小時並觀察，篩選出轉殖成功並長成 1-2mm 大小的單一菌落，再 Agar 盤上選取單一菌落於 LB 液中，並加入 1000 倍稀釋的 Ampicillin 抗生素，培養 16-18 小時。

16-18 小時後取單一菌落培養液 1 ml 進行質體萃取，將菌落高速離心 30 秒後倒除上清液，加入 100 μ l 的 solution I 並震盪使菌落均勻分散在液體中。再沿微量離心管壁緩緩加入 200 μ l solution II，輕輕的上下倒置 4-5 次，靜置 1-2 分鐘。同樣沿微量離心管壁緩緩加入 150 μ l solution III，輕輕的上下倒置 4-5 次，靜置 1-2 分鐘。最後加入 100 μ l 24:1 的 Chloroform : IAA，搖晃均勻並將微量離心管離心 15 分鐘，抽取上清液 400 μ l 加入 800 μ l 的 100 % EtOH，劇烈搖晃並將離心管靜置於- 20 度冰箱內 20-30 分鐘，再次以 4 度離心 15 分鐘，去除上清液留下沉澱的白色 DNA pellet，以 37 度乾浴烘乾 pellet 至半透明狀，加入 pH 8.0 TE buffer 及 RNase 10 mg/ml 回溶 DNA，並保存於- 20 度冰箱。

大鼠 γ_6 、TMEM114 和 TMEM235 基因選殖(cloning)

本實驗使用之 Cav3.2 T 型鈣離子通道的 pcDNA3.1 質體由中央研究院陳建璋老師的實驗室取得。pcDNA3.1 是一種能夠在哺乳類動物細胞中表達的載體。應用適當的引子(見表一)經由 PCR 技術放大後，首先將 PCR 產物接入 pGEM - T vector 中(Promega)進行定序。待定序確認序列正確後，利用 EcoRI 和 XbaI 切點將 γ_6 基因轉接入 pcDNA3.1 載體內，並且再次定序確認序列及基因長度。然而，為了在日後能夠確認 γ_6 蛋白是否表達，我們也以引子設計的方式產生另一個質體，將基因尾端的 stop codon 去除，使 γ_6 之 C 端融合一段 6X His 和 myc 標幟蛋白，以利後續使用西方墨點法確認蛋白表達。加上標幟蛋白之 γ_6 基因同樣利用 EcoRI 和 XbaI 酵素切點接入 pcDNA3.1 載體中。

大鼠 TMEM114 與 TMEM235 這兩個基因分別由廠商(量子，Invitrogen)合成於 pMA 載體後，接著以 PCR 技術放大其中的基因片段並將 PCR 產物接入 pGEM - T vector (Promega)中，待定序確認序列正確後，利用 EcoRI 等酵素切割後轉接入 pcDNA3.1 載體內。

細胞培養與基因轉染(cell culture and transfection)

本實驗使用 HEK293 細胞株進行鈣通道的表達。細胞培養於含有 1% Penicillin/Streptomycin (100X)、4.5g/L glucose、3.7g/L NaHCO₃ 以及

10% FBS 的 DMEM (gibco) 中。當 T25 flask(Orange 或 Corning) 中長滿細胞時，以 1:4 比例繼代培養於新的 T25 flask 中。為了減緩細胞分裂的速度及增加每顆細胞可獲致之質體數，對於電生理紀錄所使用的細胞則以 1:32 之稀釋比例種至 35-mm petri dish (FALCON) 中的蓋玻片上，使細胞呈現單顆狀態，並將培養液之 FBS 降低至 5%，讓細胞貼附兩天後，再以 GFP:Cav3.2: γ_6 = 1:1:3 的 molar ratio (mass ratio = 1:3:3 μg)，使用 5 μl Lipofectamine 3000 reagent (Invitrogen) 於 1 ml 的新鮮培養液中轉染 4 小時，之後清洗並更換為含有 5% FBS 之新鮮培養液，繼續培養 36-48 小時。

全細胞膜片箝制技術(whole-cell patch-clamp)

Cav3.2 鈣通道電流以全細胞膜片箝制技術(whole-cell patch-clamp) 記錄(Hamill et al., 1981)。記錄電極使用 P-97 拉針器(Sutter)加熱玻璃毛細管(Borosilicate)製成，並將電極前端以 Narishige MF830 鍛燒器鍛燒得圓潤以利其貼附於細胞膜上 (圖五)。細胞外液的成份為(單位 mM)：137 NaCl，1 MgCl_2 ，2 CaCl_2 ，10 glucose，10 HEPES，20 Sucrose，pH 值為 7.3 至 7.4。細胞內液之成份為(單位 mM)：137 NaCl，10 EGTA，2 MgCl_2 ，1 CaCl_2 ，10 HEPES，pH 值同樣為 7.3 至 7.4。記錄時將細胞內液填充於電極內，在顯微鏡監視下將電極前端下降置於培養皿內的細胞外液中，

手動操作使電極靠近細胞，同時給予一定電壓刺激並監測其電流。電流訊號由 DIGIDATA 1440A 和 700B 訊號放大器(Molecular Devices, Sunnyvale CA) 與電腦做紀錄，取樣頻率為 10 kHz，紀錄時 8-pole Bessel 濾波器設定於 4 kHz。電腦記錄軟體(Clampex 10.6)顯示電流下降至約一半時(電極已碰到細胞膜)，迅速利用針筒給予負壓使細胞膜緊密貼於電極上，當電阻大於 10^9ohm 時，代表細胞膜與電極已形成穩定之貼合，稱為 Gigaohm seal。此時給予細胞瞬間稍大的吸力將電極前端的細胞膜吸破，形成一個與電極相通但與外界隔絕的孔洞(如圖五 b)，用軟體測定電極之電阻及細胞電容，並進行補償(R-C compensation)，此時給予電壓刺激使得細胞膜上鈣離子通道開啟，並記錄細胞電流。

實驗時得到 Gigaohm seal 後，吸破細胞所需之力道須謹慎拿捏，以免細胞與電極接觸之 seal 破裂，導致細胞漏流過大，影響電流記錄。顯微鏡下之實際狀況如圖五(c)所示。實驗裝置包含電極、鹽橋、petri dish 內放上有細胞的蓋玻片，如圖六。

記錄時挑選視野下具綠螢光之細胞，形成 Gigaohm seal 並吸破細胞後，將膜電壓維持在 -100 mV (holding potential)，給予一系列由 -100 mV 至 +50 mV 的膜電壓(間隔為 10 mV)，第一階段膜電壓維持 300 ms，接著跳躍至 -30 mV(最多通道開啟之電壓)維持 150 ms。藉由測定前 300 ms 以及後 150 ms 之電流峰值，可分別得到通道之電流-電壓關係曲線

(IV curve)以及不活化曲線(inactivation curve)。電壓波型每兩秒重複一次。

數據分析

利用全細胞膜片箝制技術(whole-cell patch-clamp)記錄到之細胞電流透過 Clampfit 10.6 軟體分析，擷取不同膜電壓下所得之通道電流大小，製作鈣離子通道電流密度與電壓之關係圖(IV curve)。對於-30 mV 之電流密度，以 two sample t-test 比較只有鈣離子通道表達或鈣離子通道和 γ_6 共同表達之間是否有差異。電流密度大小除特別說明外，以平均值 \pm 標準誤(mean \pm SEM) 表示。

結果

基因選殖與質體內容確認

我們由中央研究院陳建璋老師獲取之 Cav3.2 T 型鈣離子通道的 pcDNA3.1 質體，總長度為 13186 bp，含有 HindIII 及 KpnI 酵素切點。以 KpnI 酵素單切，顯示質體總長 13186 bp，出現於 10 kbp ladder 上方。以 HindIII 及 KpnI 兩酵素切割後，電泳圖顯示長度為 7495 bp 之 Cav3.2 基因片段出現於 8 kbp 位置附近；載體長度為 5691 bp，出現於 5 kbp 和 6 kbp 位置之間 (圖七)。

大鼠 γ_6 由廠商合成於 pMA 載體內(如圖三)，經由 PCR 技術放大後利用 EcoRI 和 XbaI 切點將 γ_6 基因轉接進 pcDNA3.1 載體內。我們共設計兩種質體，一為帶有 stop codon 的 γ_6 質體，經由 EcoRI 與 XbaI 酵素切割後，可見 803 bp 的 band 出現於 800 bp ladder 水平位置附近(圖八)；載體長度則為 5.5 kbp，載體位置下方的 band 可能是由過量而未反應完全的 supercoiled form 質體所形成。另一個質體中，則將基因尾端的 stop codon 去除，使基因能和載體上 6X His 或 myc 標幟蛋白基因相連，以利後續使用西方墨點法作蛋白表達之確認。加上標幟蛋白 γ_6 之基因序列長度為 802 bp，並同樣利用 EcoRI 和 XbaI 將序列接入 pcDNA3.1 載體中，電泳膠圖中亦可看到載體為 5.5 kbp (圖八)。以上兩個質體皆經由定序服務確認序列內容。

大鼠 TMEM114 由廠商合成並保存於 pMA 載體中，經由 EcoRI 和 NotI 將序列接入 pcDNA3.1 載體內，帶有 stop codon 之質體經兩種酵素切割後基因長度為 683 bp，載體大小為 5.5 kbp (圖九)。同樣地，為了後續能夠確認 TMEM114 蛋白是否表達，利用 PCR 引子之設計(見表二)將序列末端 stop codon 去除，經由 EcoRI 和 XbaI 限制酵素切點接入 pcDNA3.1 載體內，末端接續 6X His 和 myc 序列。以 EcoRI 和 XbaI 雙切所得之序列長度為 682 bp (圖九)。

大鼠 TMEM235 同樣由廠商合成保存於 pMA 載體中，經由 EcoRI 和 ApaI 接入 pcDNA3.1 載體內，帶有 stop codon 之質體經兩酵素切割後長度為 650 bp，且載體大小為 5.5 kbp (圖十)。為了能夠確認後續 TMEM235 蛋白是否表達，也利用 PCR 引子之設計(見表三)，將序列末端 stop codon 去除，利用經由 EcoRI 和 XbaI 限制酵素切點接入 pcDNA3.1 載體內，其序列長度為 649 bp，載體大小為 5.5 kbp。以上四個 TMEM 質體皆經由定序確認序列內容。

細胞培養與基因轉染(cell culture and transfection)

細胞經由 Lipofectamine 3000 轉染 36 至 48 後，在顯微鏡螢光視野下，挑選單顆細胞且具有綠螢光之細胞。前期實驗中我們發現表達過多綠螢光蛋白之細胞較表達少的細胞不健康，並且不容易得到穩定之

記錄。因此實驗操作時，我們的目標是以最低綠螢光蛋白表達且不影響細胞電流情況下，轉染通道、 γ 次單元和綠螢光蛋白之質體到 HEK293 細胞中。經過反覆測試，我們將細胞轉染率控制在 30 % 左右。

大鼠 γ_6 抑制人類 Cav3.2 T 型鈣通道電流

由圖十一可看到 -100 mV 到 +50 mV 刺激 300 ms 下(間隔為 10 mV) 有不同電流峰值產生。由於細胞膜電容大小正比於細胞表面積，因此將細胞電流除以細胞測得之電容值可代表細胞膜表面之通道電流密度。由圖十二可見到在 -30 mV 電壓下，Cav3.2 和加入 γ_6 之組別皆可觀察到電流峰值達到最大值，並看到電流密度由 -33.34 (pA/pF) 下降至 -17.43 (pA/pF)。利用 two tail t-test 統計檢定確認 -30 mV 膜電壓下兩組電流密度具顯著差異，p 值為 0.0298 (兩組 n 皆為 8)。

為了測量 Cav3.2 通道隨膜電壓改變之不活化情形，我們在不同電壓刺激 300 ms (第一階段)後，馬上給予 -30 mV，150 ms (第二階段)的電壓刺激，強制細胞膜上尚未不活化之通道打開。我們發現第二階段之電流峰值隨第一階段電壓刺激由 -100 mV 至 +50 mV 而減小。我們將圖十一中於(第二階段)-30 mV 時所取得的電流峰值最大值減去最小值後進行標準化，並各取三組數據繪製成 Cav3.2 通道之不活化曲線(圖十三)。由於 Cav3.2 不活化情形在不同細胞間相當的歧異，無論是 Cav3.2 或加

上 V_6 兩個組別，都並未觀察到一致性的不活化曲線。我們未來將增加不活化曲線記錄的細胞數目，再進行統計分析。

討論

大鼠 γ_6 抑制人類 Cav3.2 T 型鈣通道電流

本實驗結果顯示大鼠 γ_6 與人類 Cav3.2 通道共同表達於 HEK293 細胞株會降低人類 Cav3.2 通道電流大小，此結果與先前文獻中大鼠 γ_6 具有抑制 Cav3.1 通道電流的結果一致(Hansen et al., 2004; Lin et al., 2008)。由於目前的文獻並未證實大鼠的 γ_6 能夠抑制人類 Cav3 通道電流，本實驗結果為第一個顯示大鼠的 γ_6 對人類 Cav3 T 型鈣電流具有抑制效果的研究。大鼠與人類的 γ_6 基因 DNA 序列同源性(homology)達到 90%，相符度(identity)亦高達 85%以上，因此藉由前人文獻及本實驗結果可以推測大鼠的 γ_6 無論在人類或大鼠本身通道上，皆具有抑制 Cav3 通道的功能。進一步使用大鼠 γ_6 和人類 Cav3.1 通道進行實驗將可以測試這項假說。

Mibefradil 是臨床上唯一曾被用來做為 T 型鈣通道阻斷劑的藥物，然而其已於 1998 由於嚴重副作用被羅氏藥廠 (Roche) 主動下架 (Glasser, 1998; Levine et al., 2000)。因此目前並沒有臨床可用的 T 型鈣通道阻斷劑。2009 一篇研究顯示源自大鼠 γ_6 第一個穿膜區塊 (TM1) 上帶有 GXXXA 序列的小片段胜肽，即具抑制大鼠 Cav3.1 通道的效果(Chen and Best, 2009)。本實驗結果確認大鼠的 γ_6 對人類 Cav3.2 通道具有抑制作用後，我們推測該小片段胜肽應該也具有抑制人類 Cav3.1 及 Cav3.2

通道之功能。因此本研究可做為日後 T 型鈣通道相關疾病之動物實驗及藥物學研究的參考。

TMEM114 及 TMEM235 之演化及功能

本實驗室先前之演化分析，發現在脊椎動物出現後鈣離子通道 γ 次單元明顯地分為三大類群，一為真正的鈣離子通道次單元，另一為 AMPA 接受器之調節蛋白，最新發現之 TMEM114 及 TMEM235 又自成另一分支(賴彥明，東海大學碩士論文，未發表)。由於演化結果顯示 TMEM114 及 TMEM235 之親緣關係介於鈣離子通道次單元與 AMPA 接受器調節蛋白之間。因此 TMEM114 和 TMEM235 也可能具有調節鈣離子通道或 AMPA 受體之功能。為了進一步測試此假說，未來的實驗應測試 Cav 通道或 AMPA 受體與 TMEM114 或 TMEM235 共同轉染於 HEK293 細胞株時是否對這兩類通道之功能有所影響，無論實驗結果顯示 TMEM114 及 TMEM235 是否與鈣離子通道或 AMPA 受體有交互作用，皆能增進我們對於 TMEM114 及 TMEM235 功能的瞭解。

酵素切點設計

前期實驗中我們發現帶有 stop codon 的 TMEM114 及 TMEM23 質體無法以 XbaI 酵素切割，經由定序檢查後發現 stop codon 之 TGA 與 XbaI 酵素切點之序列 TCTAGA 緊鄰會形成 GATC 的序列。此序列在 *E. coli* 中

增殖時會被 DAM 甲基酶甲基化，導致酵素無法辨識切割位置的序列。因此我們重新尋找 T vector 與 pcDNA3.1 載體上共同具有的酵素切點進行切割。由於 TMEM114 序列本身具有 Apal 切點，因此我們選擇 NotI 為新的酵素切點，而 TMEM235 則直接選擇鄰近 XbaI 的 Apal 切點。往後我們遇到相似問題可在基因序列與酵素切點中間隨機加上幾個核苷酸序列，避免甲基化導致酵素無法辨識之問題。

細胞生長速度之控制

細胞轉染前將細胞貼附於蓋玻片上兩天有利於細胞穩定貼附，並且在加入轉染試劑時不易被溶液沖起。然而貼附兩天中細胞數量大幅增加並開始死亡。解決的方法是對於用來進行電生理記錄的細胞，將培養液更換為含 5% FBS 之培養液，降低培養液中營養來源，減緩細胞分裂速度，同時減緩細胞分裂導致個別細胞內轉染入的 DNA 量減少。

未來工作

我們實驗室未來將繼續研究大鼠 γ_6 是否能夠抑制人類 Cav3.1 鈣電流，這項工作對於臨床上 T 型鈣通道藥物的研發相當重要。此外，我們也將繼續探討 TMEM114 及 TMEM235 與 Cav3.1 或 Cav3.2 通道蛋白可能的交互作用。這項工作不但可能幫助我們了解這兩個蛋白分子的生

物功能，亦可協助科學家釐清鈣離子通道 γ 次單元家族的演化歷程及功能分化。

參考文獻

- Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a003947.
- Chen, R.S., and P.M. Best. 2009. A small peptide inhibitor of the low voltage-activated calcium channel Cav3.1. *Mol Pharmacol.* 75:1042-1051.
- Chen, R.S., T.C. Deng, T. Garcia, Z.M. Sellers, and P.M. Best. 2007. Calcium channel gamma subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys.* 47:178-186.
- Chu, P.J., H.M. Robertson, and P.M. Best. 2001. Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene.* 280:37-48.
- Cribbs, L. 2010. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels (Austin).* 4:447-452.
- Freise, D., B. Held, U. Wissenbach, A. Pfeifer, C. Trost, N. Himmerkus, U. Schweig, M. Freichel, M. Biel, F. Hofmann, M. Hoth, and V. Flockerzi. 2000. Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties. *J Biol Chem.* 275:14476-14481.

- Gai, D., J. Nicholl, W. Waters, C.P. Barnett, and S. Yu. 2014. Interstitial deletion at chromosome 16p13.2 involving TMEM114 (transmembrane protein 114) in a boy and his father without cataract. *Am J Med Genet A*. 164A:834-836.
- Glasser, S.P. 1998. The relevance of T-type calcium antagonists: a profile of mibefradil. *J Clin Pharmacol*. 38:659-669.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391:85-100.
- Hansen, J.P., R.S. Chen, J.K. Larsen, P.J. Chu, D.M. Janes, K.E. Weis, and P.M. Best. 2004. Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol*. 37:1147-1158.
- Held, B., D. Freise, M. Freichel, M. Hoth, and V. Flockerzi. 2002. Skeletal muscle L-type Ca(2+) current modulation in gamma1-deficient and wildtype murine myotubes by the gamma1 subunit and cAMP. *J Physiol*. 539:459-468.

Lacerda, A.E., H.S. Kim, P. Ruth, E. Perez-Reyes, V. Flockerzi, F. Hofmann, L. Birnbaumer, and A.M. Brown. 1991. Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature*. 352:527-530.

Levine, T.B., P.J. Bernink, A. Caspi, U. Elkayam, E.M. Geltman, B. Greenberg, W.J. McKenna, J.K. Ghali, T.D. Giles, A. Marmor, L.H. Reisin, S. Ammon, and E. Lindberg. 2000. Effect of mibefradil, a T-type calcium channel blocker, on morbidity and mortality in moderate to severe congestive heart failure: the MACH-1 study. Mortality Assessment in Congestive Heart Failure Trial. *Circulation*. 101:758-764.

Lin, Z., K. Witschas, T. Garcia, R.S. Chen, J.P. Hansen, Z.M. Sellers, E. Kuzmenkina, S. Herzig, and P.M. Best. 2008. A critical GxxxA motif in the gamma6 calcium channel subunit mediates its inhibitory effect on Cav3.1 calcium current. *J Physiol*. 586:5349-5366.

Maher, G.J., E.N. Hilton, J.E. Urquhart, A.E. Davidson, H.L. Spencer, G.C. Black, and F.D. Manson. 2011. The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane

proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS Lett.* 585:2187-2192.

Nelson, M.T., S.M. Todorovic, and E. Perez-Reyes. 2006. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr Pharm Des.* 12:2189-2197.

Nicoll, R.A., S. Tomita, and D.S. Brecht. 2006. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science.* 311:1253-1256.

Tomita, S., L. Chen, Y. Kawasaki, R.S. Petralia, R.J. Wenthold, R.A. Nicoll, and D.S. Brecht. 2003. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol.* 161:805-816.

附表與附圖

表 一、大鼠 γ_6 引子設計表

下表為大鼠 γ_6 基因放大之引子設計，引子共分為兩組，順向引子共用，反向引子分為將 stop codon 去除並接上 6X His 和 myc tag 的序列與帶有 stop codon 的序列。粗體字代表酵素切割點。

	Sequence 5'→3'	Length	Tm	Amplicon Size
γ_6 Forward primer	AGA ATT CAT GAT GTG GTC TAA CTT CTT CAT GCA AGA GG	31+7	62.7°C	
γ_6 Reverse primer Myc his tag	CTC TAG ACT GGC AGT TGG GCC TTG ACC CCG	23+7	62.8°C	802 bp
γ_6 Reverse primer	CTC TAG ACT AGG CAG TTG GGC CAC CCC G	21+7	64.2°C	803 bp

表 二、大鼠 TMEM114 引子設計表

下表為大鼠 TMEM114 基因放大之引子設計，引子共分為兩組，順向引子共用，反向引子分為將 stop codon 去除並接上 6X His 和 myc tag 的序列與帶有 stop codon 的序列。粗體字代表酵素切割點。

	Sequence 5'→3'	Length	Tm	Amplicon Size
TMEM114 Forward primer	TGA ATT CAT GCG GGT GCG CCT GGG	17+7	62.5°C	
TMEM114 Reverse primer Myc his tag	CTC TAG ACT GAT GGC TTG CTC TTG CCT CTG GC	25+7	67.0°C	682 bp
TMEM114 Reverse primer	CTC TAG ATC AGA TGG CTT GCT CTT GCC TCT GGC	26+7	66.9°C	683 bp

表 三、 TMEM235 引子設計表

下表為大鼠 TMEM235 基因放大之引子設計，引子共分為兩組，順向引子共用，反向引子分為將 stop codon 去除並接上 6X His 和 myc tag 的序列與帶有 stop codon 的序列。粗體字代表酵素切割點。

	Sequence 5'→3'	Length	Tm	Amplicon Size
TMEM235 Forward primer	TGA ATT CAT GGC CCT GCT AGC CGC GTT	20+7	62.8°C	
TMEM235 Reverse primer Myc his tag	CTC TAG ACT GAG GAT GAC AGA GTG AGG CAT TCC TGG	29+7	67.9°C	649 bp

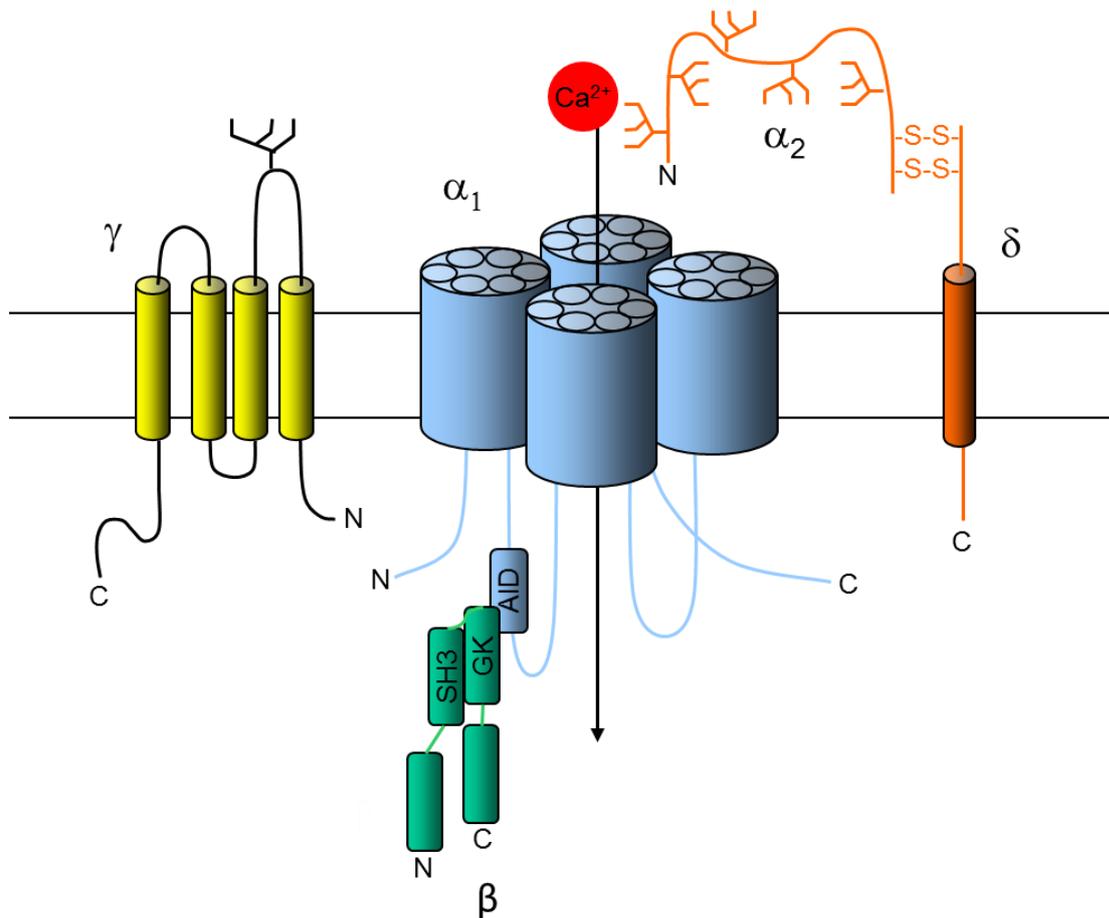
TMEM235
Reverse primer

CTC TAG ATC AGA GGA TGA CAG AGT GAG GCA TTC CTG G

30+7

67.8°C

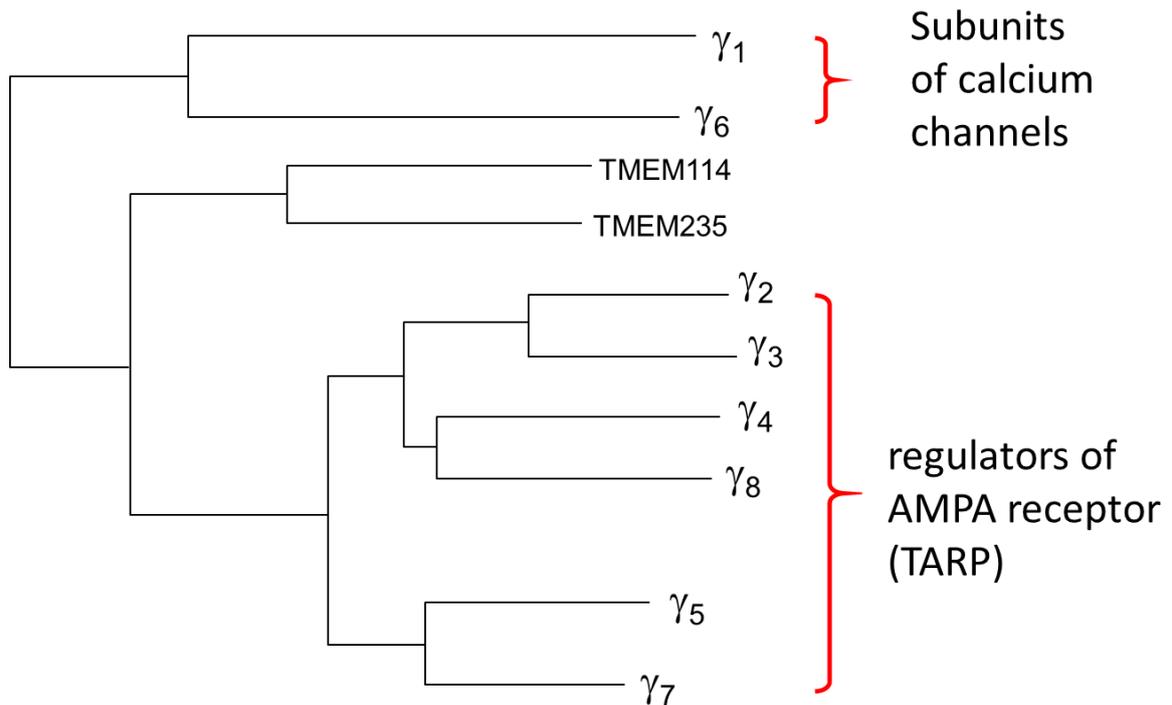
650 bp



圖一、鈣離子通道結構示意圖

鈣離子通道由四個次單元所組成(α_1 、 $\alpha_2\delta$ 、 β 、 γ)， α_1 次單元負責在細胞膜上形成讓鈣離子可以進出的孔洞， $\alpha_2\delta$ 和 β 這兩種次單元則是負責幫助整個通道蛋白鑲嵌到細胞膜上並增加通道的開啟， γ 則是抑制鈣離子通道之電流。

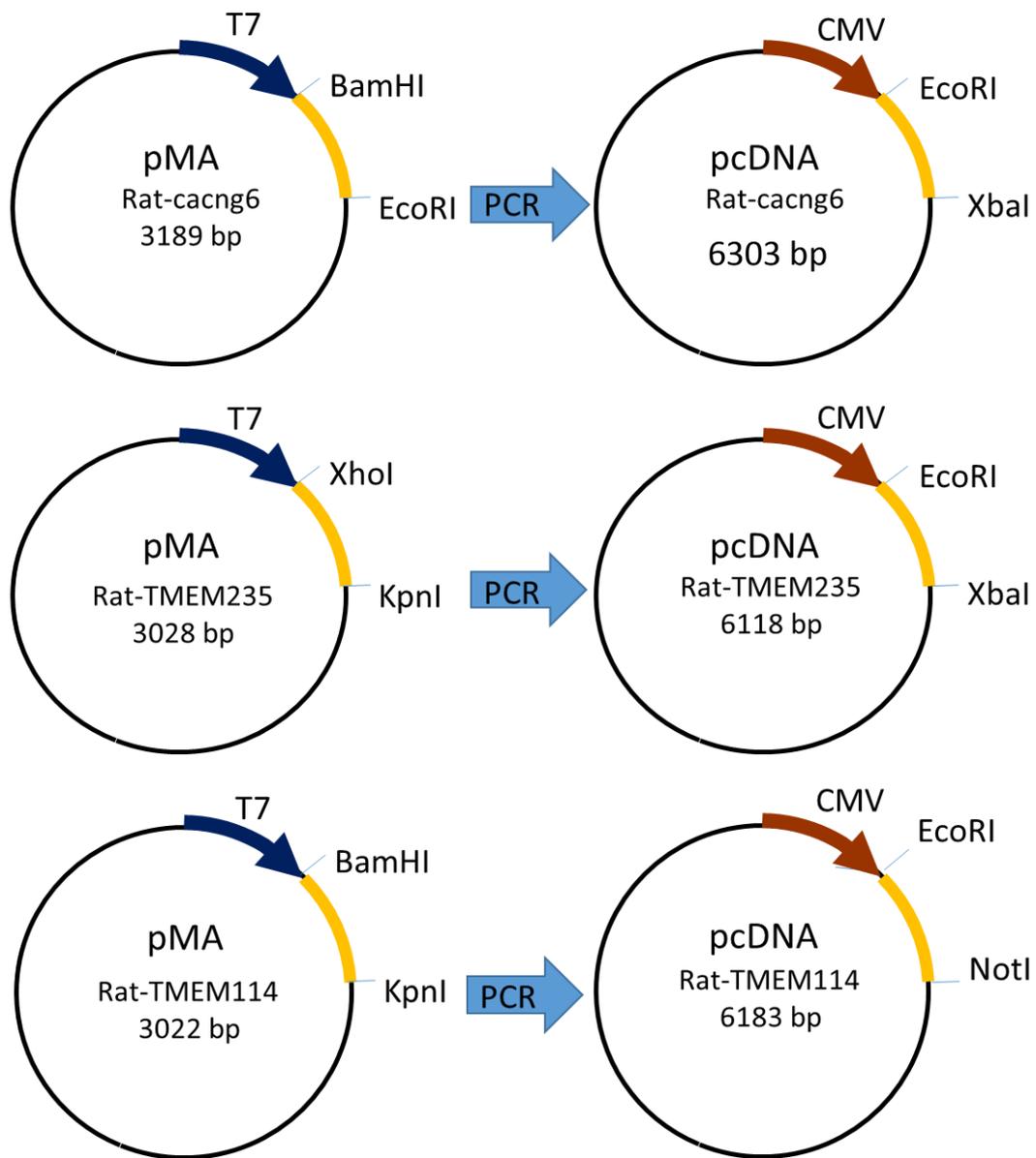
(圖由東海大學陳仁祥老師同意下取得)



圖二、 γ 蛋白演化親緣關係樹

目前為止科學家找出 10 種鈣離子通道次單元($\gamma_1 - \gamma_8$ 和 TMEM114 及 TMEM235)，其中只有兩種 γ (γ_1 和 γ_6)次單元在生理條件下具有調節鈣離子通道電流的功能(Chu et al., 2001)。而 γ_2 、 γ_3 、 γ_4 、 γ_8 、 γ_5 、 γ_7 則是中樞神經系統中調控 AMPA 接受器的次單元(Nicoll et al., 2006)。

TMEM114 及 TMEM235 則是近年新發現鈣離子通道次單元，功能未知。



圖三、質體放大之基因序列

由廠商合成攜帶大鼠 γ_6 、大鼠 TMEM114 或大鼠 TMEM235 之 pMA 質體，經由適當引子放大後，利用特定酵素切位，轉接入可於哺乳類細胞中表達之 pcDNA3.1 載體內。

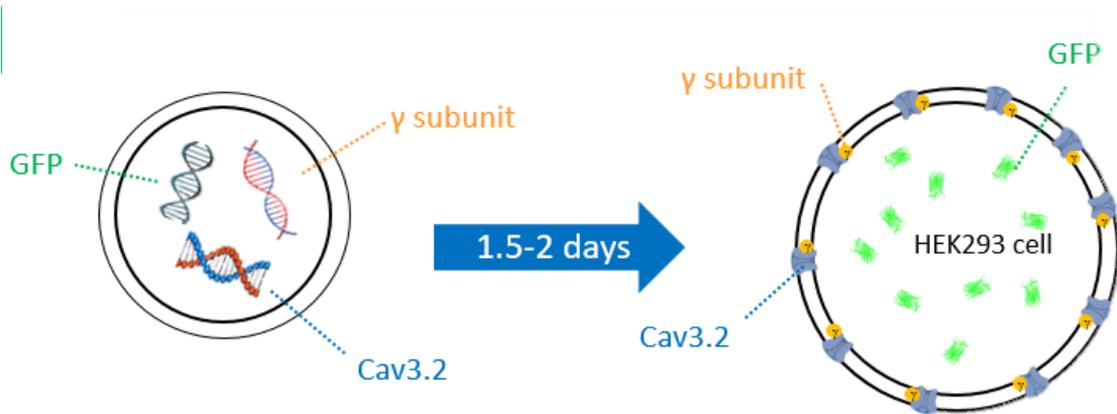
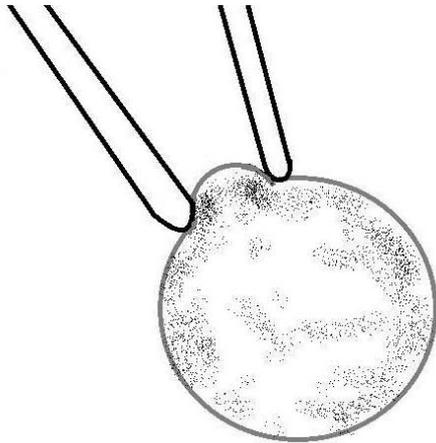


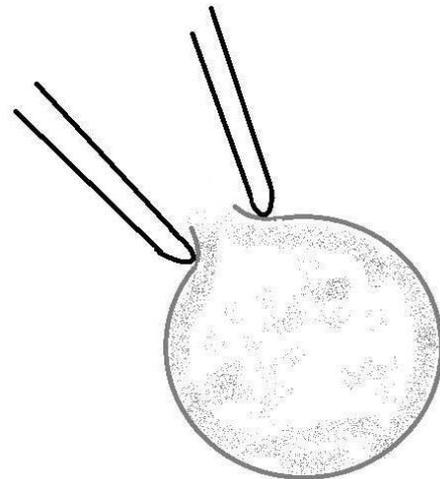
圖 四、細胞基因轉染示意圖

實驗中以 GFP : Cav3.2 : γ_6 = 1 : 3 : 3 的 mass ratio (μg) 將 DNA 混合於 100 μl 的 DMEM only 中，並於另一管 100 μl DMEM only 中加入 5 μl 的 Lipofectamine 3000，兩管分別均勻混合，靜置 20 分鐘後加入 petri dish 中均勻搖晃，在轉染 4 小時後更換新鮮培養液，並等待 36 至 48 小時進行記錄，如圖所示細胞將表達出 Cav3.2 通道和 γ 蛋白於細胞膜上，以及 GFP 綠螢光蛋白於細胞質內，使我們能夠選擇帶有綠色螢光之細胞以全細胞膜片箝制技術(whole-cell patch-clamp)紀錄細胞電流。

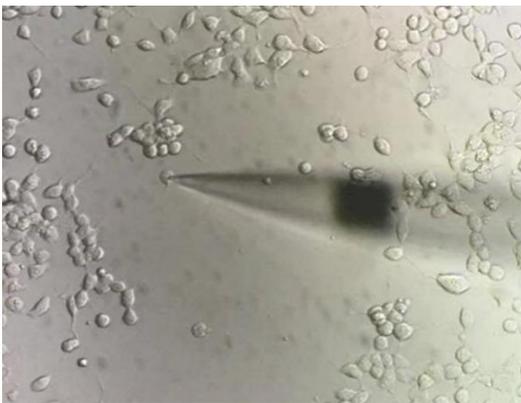
(a)



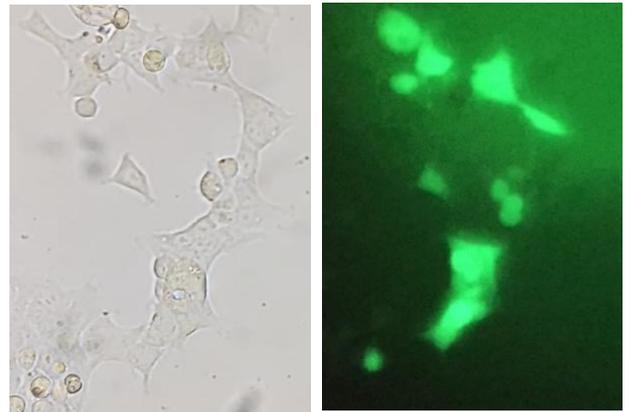
(b)



(c)

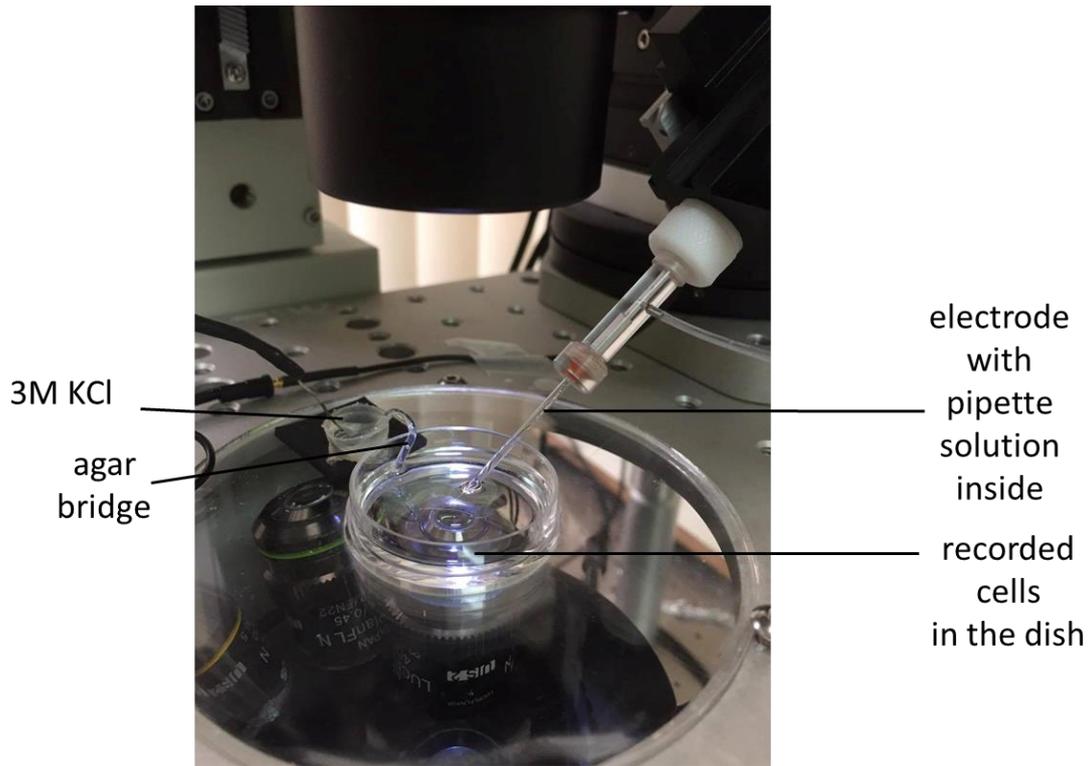


(d)



圖五、全細胞膜片箝制技術

(a)顯示玻璃電極與細胞膜表面形成緊貼時的狀態。(b)細胞從 Gigaohm seal 的狀態被吸破後，細胞質與電極內部連通的示意圖。(c)顯微鏡下之全細胞膜片箝制技術圖。(d)明視野與螢光下細胞分布之對照圖。



圖六、全細胞膜片箝制技術之實驗架設 (set-up)

記錄細胞電流時之儀器架設，包含培養皿及其內擺放欲記錄電流的細胞。電極架設於機械手臂上以微調手臂控制，鹽橋連接正負極形成通路，內含 3M KCl 溶液。

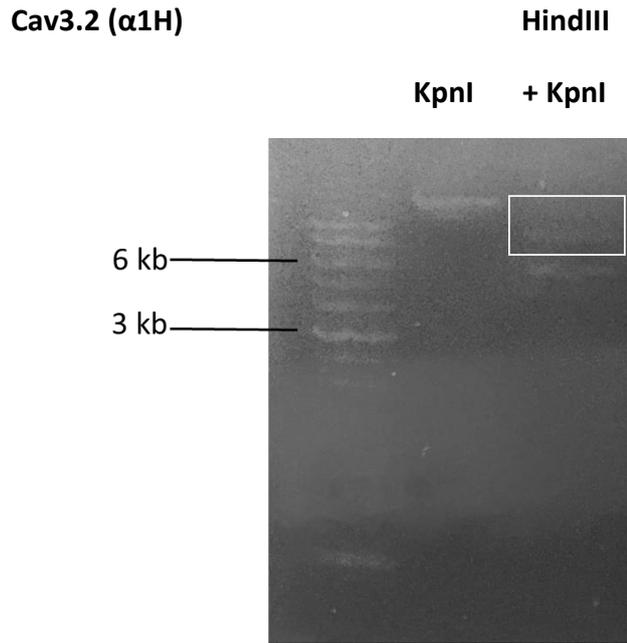


圖 七、 Cav3.2 質體酵素切割電泳膠圖

Cav3.2 接於 pcDNA3.1 載體全長為 13186 bp，以 KpnI 酵素單切後，質體出現於 10 kbp 位置上方。以 HindIII 及 KpnI 兩酵素切割後，基因片段 (7495 bp) 出現於 8 kbp 位置附近，載體 (5691 bp) 則出現在 5 kbp 及 6 kbp 之間。

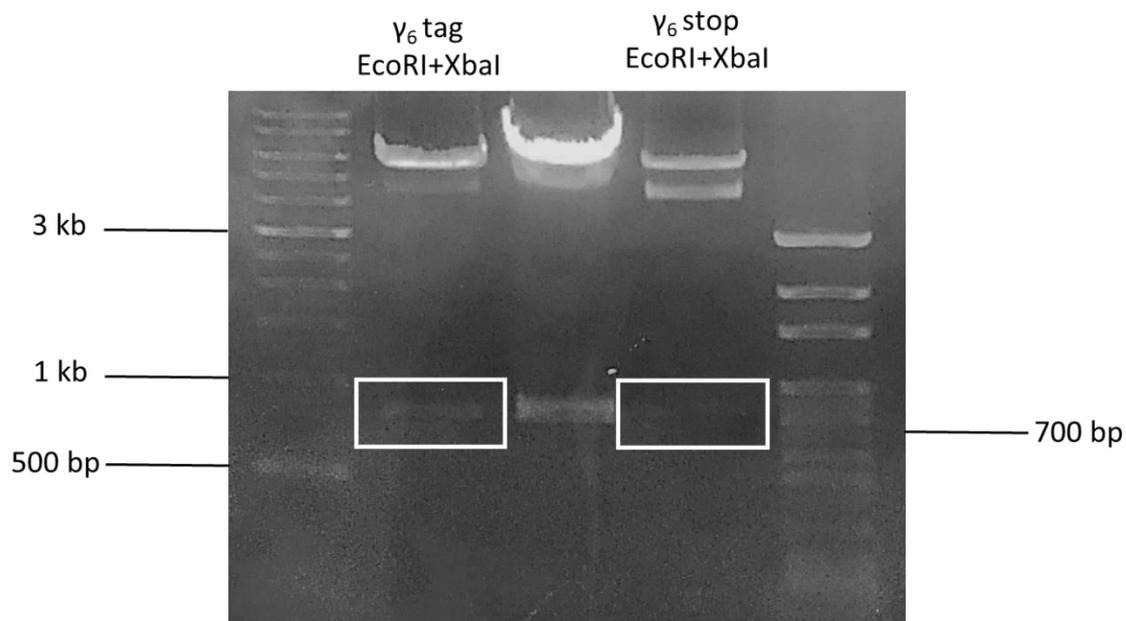
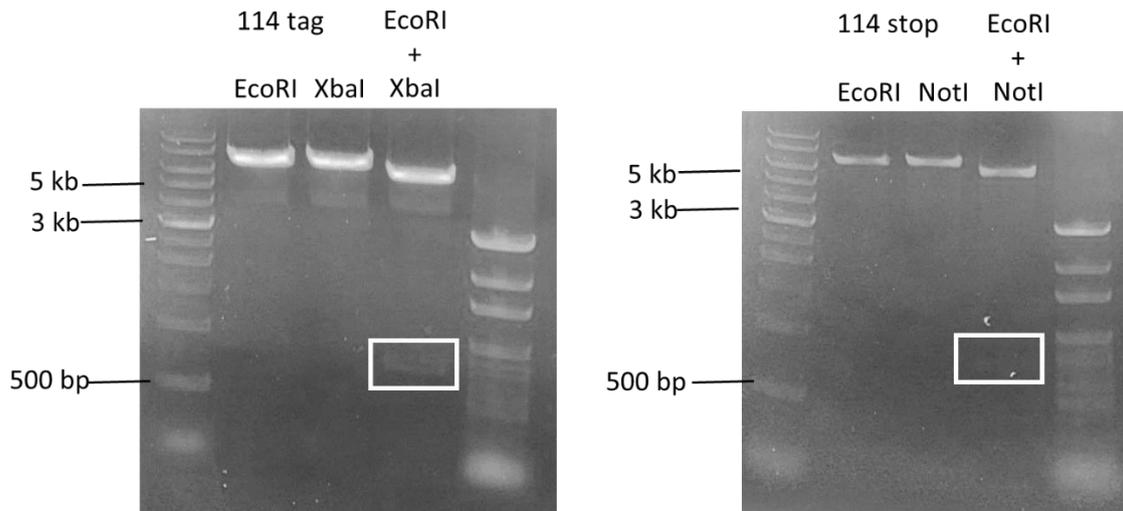


圖 八、 大鼠 γ_6 subunit 酵素切割電泳膠圖

大鼠 γ_6 接入 pcDNA3.1 哺乳類可表達載體，以 EcoRI 及 XbaI 酵素切割，帶有 tag 的 γ_6 序列長度為 802 bp，約出現在 800 bp 位置附近，載體長度為 5.5 kbp。帶有 stop codon 的 γ_6 序列為 803 bp，圖中位置顯示位於 800 bp 位置附近，載體長度亦為 5.5 kbp。



圖九、大鼠 TMEM114 限制酵素切割電泳膠圖

左圖：帶有 6X His 和 myc tag 的 TMEM114 clone 利用 EcoRI 和 XbaI 分別單切得到的產物長度為 6182 bp，出現於 6 kbp 位置附近。由兩酵素共雙切所得之序列長度為 682 bp，位於 700 bp ladder 附近；載體大小為 5.5 kb，出現於 5 kbp 及 6 kbp 位置之間。右圖：帶有 stop codon 的 TMEM114 clone 全長為 6183 bp，由 EcoRI 與 NotI 分別單獨切割的 DNA 皆出現在 6 kbp 位置附近。而由兩酵素共雙切所得之序列長度為 683 bp，出現於 700 bp 位置附近；載體大小為 5.5 kb，出現於 5 kbp 及 6 kbp 位置之間。

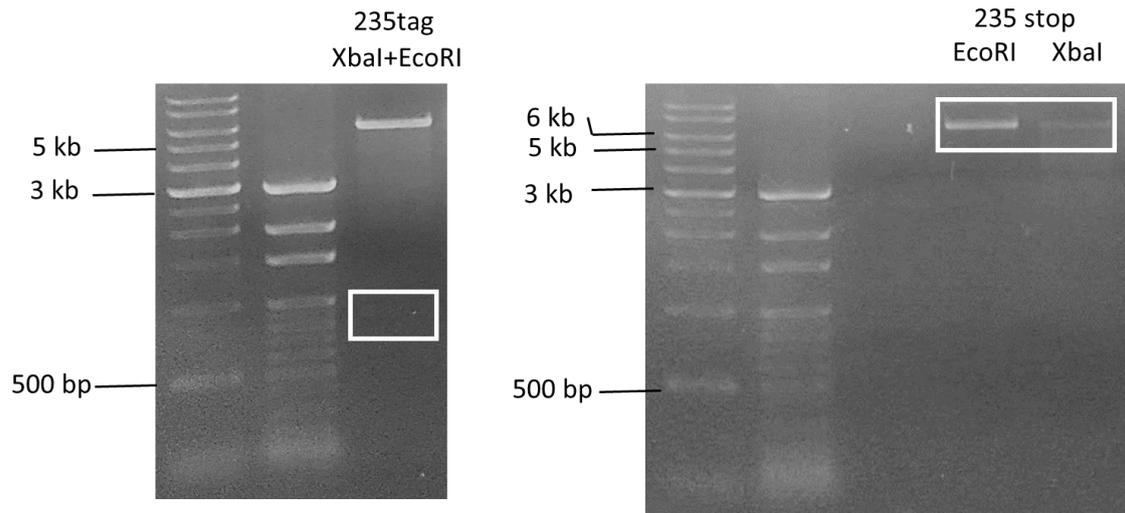


圖 十、 TMEM235 限制酵素切割電泳膠圖

左圖：帶有 6X His 和 myc tag 的 TMEM235 clone 利用 EcoRI 和 XbaI 分別單切得到的產物長度為 6149 bp，出現於 6 kbp 位置附近。由兩酵素共雙切所得之序列長度為 649 bp，位於 700 bp ladder 附近；載體大小為 5.5 kb，出現於 5 kbp 及 6 kbp 位置之間。右圖：帶有 stop codon 的 TMEM235 clone 全長為 6150 bp，由 EcoRI 與 ApaI 分別單獨切割的 DNA 皆出現在 6 kbp 位置附近。

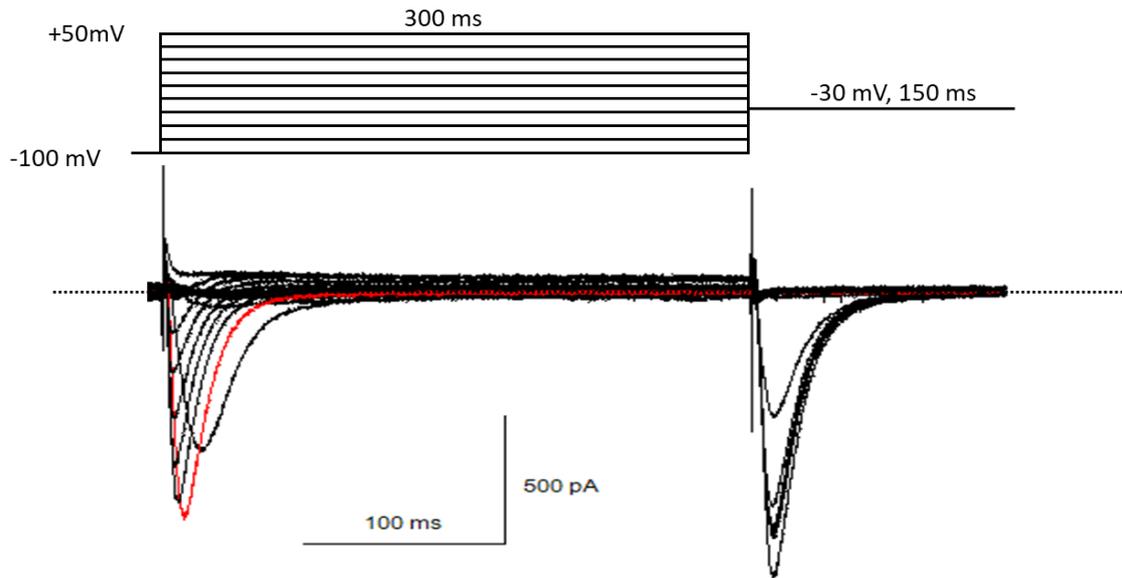


圖 十一、 單顆 HEK293 細胞之 Cav3.2 電流記錄

細胞膜電位由 -100 mV (holding membrane potential) 跳至 -100 mV 到 +50 mV 之間(上圖，間隔為 10 mV)時，所記錄到不同大小的鈣電流(下圖)。最大電流峰值出現於 -30 mV(紅色電流標記)電壓下。第一段刺激維持 300 ms，緊接著給予第二段 150 ms 的 -30 mV 電壓刺激，將細胞膜上尚未開啟的通道強制打開。電壓波型每兩秒重複一次。

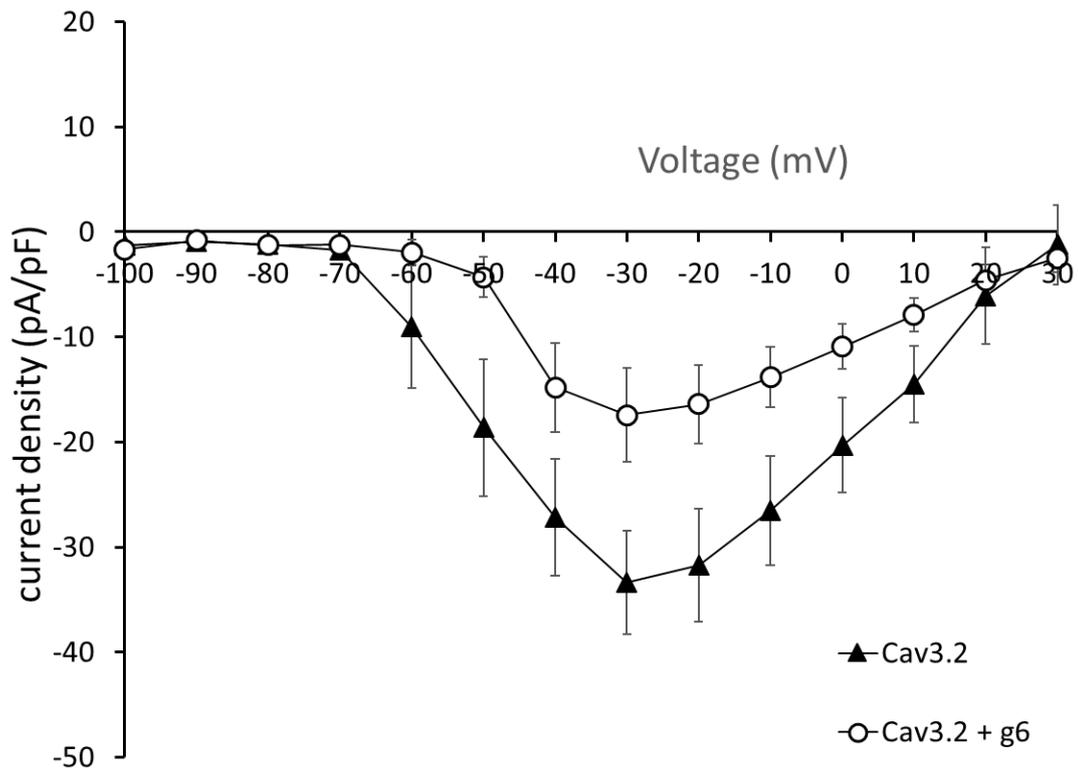
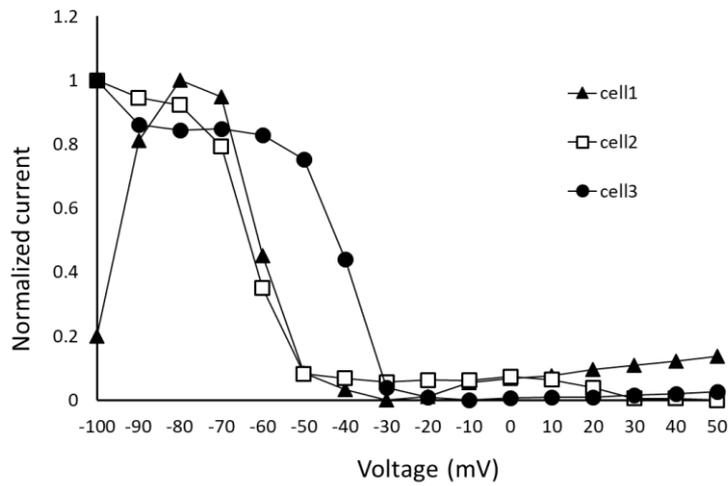


圖 十二、 人類 Cav3.2 通道電流-電壓關係曲線

由-100 mV 至+30 mV 的膜電壓下，Cav3.2 通道電流密度峰值的平均值。

Cav3.2 通道所產生之電流密度以三角形標示 (n=8)，Cav3.2 加上 γ_6 之電流密度則以空心圓圈標示 (n=8)。加上 γ_6 後，各電壓下之最大電流皆被抑制，電流密度由-33.34 pA/pF 降低至-17.43 pA/pF。

(a) Cav3.2



(b) Cav3.2 + γ_6

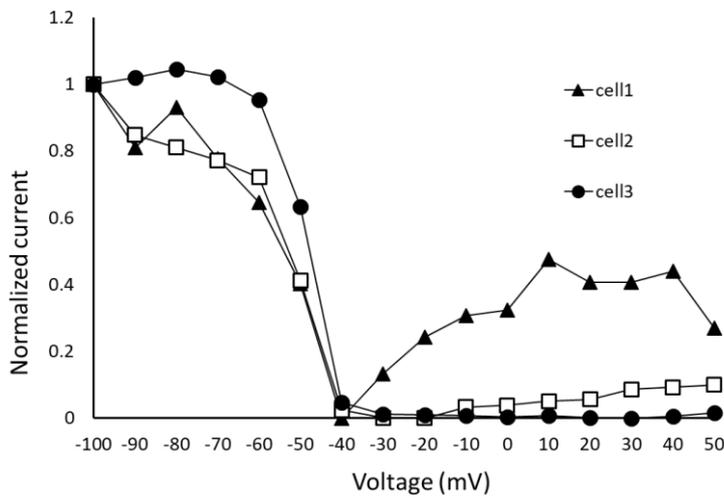


圖 十三、 人類 Cav3.2 通道之不活化與電壓關係圖

在-100 mV 至+50 mV 的電壓維持 300 ms 後(第一階段)，緊接著跳至-30 mV 電壓維持 150 ms(第二階段)，在此階段所得之電流峰值以最大值扣除最小值後並標準化，對第一階段之電壓作圖。(a) Cav3.2 通道之不活化曲線。(b) Cav3.2 通道加上 γ_6 後之不活化曲線。