

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討 connexin 基因 beta 群在學習語言前非症候群性聽障 中所扮演的功能角色 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-044-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：楊建洲、洪惠媚
碩士班研究生-兼任助理：張嘉真
大學生-兼任助理：張絹鈺

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年10月31日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

探討connexin基因 beta 群在學習語言前非症候群性聽障中所扮演的功能角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-040-044-

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：楊建洲、洪惠媚、張嘉真、張絹鈺

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

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 96 年 10 月 31 日

中文摘要

目前已知有 59 個基因的突變會導致聽障，各基因的致病機制不盡相同，非常複雜。Cx 基因族在耳蝸內影響離子濃度恆定性和造成遺傳性聽障上扮演重要角色。因此本計畫的研究動機是探討 Cx 基因族 beta 群基因(Cx26 和 Cx30 基因)的突變後對其功能的影響和彼此之間所造成的影響，以瞭解 Cx 基因族 beta 群基因在聽障中的致病機制。

本次研究結果在 Cx26 和 Cx30 基因方面我們發現 Cx26 551G>A (R184Q)和 Cx30 119C>T (A40V)突變都會影響到 gap junction 的形成，其突變蛋白都無法運送到細胞膜，而堆積在高基氏體(Golgi)，進一步利用共同轉染實驗(co-transfection)和 Tet-on 蛋白表現系統來研究，我們發現此兩個突變點都有 dominant negative 的作用，

另外 Cx26 368C>A (T123N)突變蛋白則會表現在細胞膜，與正常 Cx 蛋白表現位置相同，並不會對 Cx26 蛋白運輸造成影響。綜合以上結果顯示，Cx26 R184Q 及 Cx30 A40V 這兩個突變點有 dominant negative effect。而 Cx26 T123N 的突變並不會影響 Cx 蛋白的運輸，但對於 gap junction 功能是否有影響仍需進一步實驗來探討。

關鍵詞：語言學習前聽障、Cx26、Cx30、功能研究

Abstract

To date, 59 auditory genes have been identified, among which are those involved in K⁺ recycling and maintenance. The importance of K⁺ recycling and maintenance is underscored by the fact that mutations in each of connexin gene family leads to deafness in human. In the proposed project, we will focused on study of the effect on function in connexin gene family beta group, Cx26 and Cx30 genes, when mutations occur.

Our results indicated that 551G>A missense mutation of Cx26 (R184Q) and 119C>T missense mutation of Cx30 (A40V) resulted in the accumulation of Cx protein in Golgi apparatus instead of targeting to cytoplasmic membrane. When either Cx26/Cx26 551G>A or Cx30/Cx26 551G>A mutant protein are co-expressed, the heteromeric connexon accumulated at Golgi apparatus. In addition, when either Cx30/Cx30 119C>T or Cx26/Cx30 119C>T mutant protein are co-expressed, the heteromeric connexon also accumulated at Golgi apparatus. In contrast, Cx26 protein derived from 368C>A missense mutation (T123N) gave results similar to wild-type Cx26 with junctional plaques at zones of cell-to-cell apposition.

In summary, Cx26 551G>A and Cx30 119C>T had dominant negative effect on both normal Cx26 and Cx30 resulting in accumulation of the Cx protein in Golgi apparatus that impaires formation of the gap junction. Cx26 368C>A did not affect the trafficking of Cx protein, but its functional significance remains unknown. In this part we need more analysis to explain.

Keywords: hearing loss, Cx26, Cx30, functional study

前言

針對 K^+ 再循環(recycling)相關基因，在過去幾年我們針對這些基因—*Cx families* (*Cx26*、*Cx29*、*Cx30*、*Cx30.3*、*Cx31* 和 *Cx43*) 及 *CLAUDIN 14* 基因進行分析在語言學習前聽障患者及部分家屬中我們找到了一些的突變點，但這些突變點對於聽障的影響機制我們不是很清楚。在最近的一些學者研究發現同一基因在不同位置的突變常會產生功能上的差異，以 *Cx26* 基因發生的突變為例，Marziano, et al., (2003)證實當 *Cx26* 發生G66H和G59A的突變主要造成 *Cx26* 的突變蛋白在運送到細胞膜的過程中就受到阻礙而使這些突變的蛋白堆積在細胞質中，而Wang et al., (2003)發現當 *Cx26* 發生R127H 突變時，此突變的蛋白還是可以正常的運送到細胞膜形成通道，但此通道利用 dye transfer實驗證明是缺乏功能的。由此可知同一基因不同位置突變後所產生的影響可能不同，另外在相同的基因族內的不同基因彼此也會有影響如在老鼠或人類內耳的研究證明了 *Cx26* 和 *Cx30* 會共同表現在相同區域且會形成heteromeric connexon並造成彼此的影響 (Lautermann, et al., 1998 ; Forge, et al., 2002 ; Marziano, et al., 2003)。另外的研究也發現 *Cx30.3* 需要在 *Cx31* 的存在下才會形成gap junction (Plantard, et al., 2003)。

然而最近的研究也發現不同的基因族上的基因也會互相的影響如 *Cx26* 在Caco-2 細胞內會調控gap junction促進 *Claudin 4* 的表現而強化tight junction的屏障(barrier)的功能(Morita, et al., 2004)。由此可知對於這些牽涉 K^+ 再循環(recycling) 基因的功能和彼此之間的影響機制尚未清楚，而這些基因在整個造成聽障的致病機轉上是相當的複雜，值得我們進一步的去探討。

研究目的

在先前的研究中我們發現在台灣地區非症候群聽障患者中 *Cx26* 和 *Cx30* 突變點但這些突變點對於聽障基因所致病基轉是如何?我們還不是很清楚，因此在本計畫中我們將探討我們實驗室在語言學習前聽障患者中所發現 *Cx26* 和 *Cx30* 突變後對功能和彼此之間的影響，以瞭解 *Cx26* 和 *Cx30* 基因在聽障中的致病機制。

文獻探討

聽障可因遺傳基因突變或環境因素，或兩者兼之引起的。約有 1/1000 嬰兒在出生時或在小孩早期（即語言學習前時期 prelingual period）罹患重度聽障(severe or profound)，在已開發國家約有 60 % 個案是遺傳因素(Marazita et al., 1993)。聽障可依數個標準來分類，如耳朵缺陷種類、優耳聽障程度、發病年齡與其他症狀有否關聯等來分類，在遺傳學上常以是否與

其他症候群有關聯來區分為兩大類：症候群聽障(syndromic hearing loss)依估計語言學習前聽障(prelingual deafness)30% 是屬於此類，有數十種症候群涉及，除聽障外尚有各種異常(如眼睛、肌肉、骨骼、腎臟、神經和色素的異常)，此型有許多型之遺傳方式，包含源自粒線體突變之母系遺傳。另一類是非症候群聽障(nonsyndromic hearing loss)此型僅有聽障而沒有其他症候群出現佔 70%，DFN 表示性聯遺傳，DFNA 表示體染色體顯性遺傳(autosomal dominant form)，DFNB 表示體染色體隱性遺傳(autosomal recessive form)，在語言學習前聽障(prelingual deafness)中 DFNB 佔 77% 的個案，而 DFNA 佔 22%，DFN 約 1% 為粒線體基因突變(Kalatzis 和 Petit 1998, Morton 2002)。體染色體隱性遺傳之聽障常是最嚴重的，大部分為先天性重度聽障(congenital deafness)，幾乎是因耳蝸缺陷(cochlear defect)而產生之感音神經(sensorineural)聽障，而語言學習後聽障(postlingual deafness)由許多家族譜(pedigrees)判斷可能為體染色體顯性遺傳或因粒線體基因突變之母系遺傳，隱性遺傳非常稀少，主要也是感音神經缺陷的且常為漸進性(progressive)。在晚發型(late-onset form)，耳硬化為聽障最普遍之原因(約佔成人族群 0.2~1%)。

過去幾年，非症候群聽障 (nonsyndromic hearing loss, NSHL) 的基因座 (loci) 被定位 (mapped) 及聽障基因 (deafness genes) 的選殖 (cloning) 有顯著的進展。至今，非症候群聽障的基因座 (loci) 有七十七個。四十個體染色體顯性 (Autosomal dominant)，三十個體染色體隱性 (Autosomal recessive) 和七個 X-linked (Hereditary hearing homepage) 而有 59 個聽障基因已被鑑定出：17 個為體染色體顯性，14 個為體染色體隱性，1 個性聯遺傳，6 個粒線體基因和至少 33 個症候群聽障基因 (Morton 2002, Naz et al., 2002)。

耳蝸是一種非常精緻的器官，耳蝸管腔分成三個空間，分別是耳蝸前庭腔(scala vestibuli)、耳蝸中膈(scala media)及耳蝸鼓腔(scala tympani)。在耳蝸中膈內有聽覺的感受器——科蒂氏器(organ of Corti)。在耳蝸前庭腔和耳蝸中膈之間是Reissner's membrane，它位於科蒂氏器的上方，科蒂氏器則座落於基底膜(basilar membrane)上。Reissner's membrane和基底膜是相連的，它們都是由卵形窗延伸而來的，這個膜也延伸到前庭和耳蝸管外側，而這整個膜就是構成膜性迷路(membranous labyrinth)的膜。在耳蝸前庭腔(scala vestibuli)和耳蝸鼓腔(scala tympani)及耳蝸中膈(scala media)分別充滿著外淋巴液(perilymph)和內淋巴液，針對這兩種淋巴液的成分分析發現外淋巴液跟一般細胞外液(extracellular fluids)一樣具有高 Na^+ 及低 K^+ 濃度，但是內淋巴液(endolymph)具有高濃度 K^+ 和低濃度 Na^+ 的特性，因此在內淋巴液中相對於外淋巴液產生了+ 80~90mV 內淋巴電位endolymphatic potential (EP)，此電位(EP)降低會減少

聽覺刺激的敏感度，因而當此EP減少至零，會造成耳聾 (Steel et al., 1987)。

在涉及聽覺的基因中，有許多基因所編碼的蛋白質 (encoded protein) 會在耳蝸中表現。因此在聽覺中耳蝸的功能扮演十分重要的角色，而在耳蝸內的許多聽障基因主要會影響離子的恒定性 (ionic homeostasis)，由於聽覺的產生與內淋巴需具有高 K^+ 和EP的特性有極大的關係，因此 K^+ 循環機制的進行和維持在整個聽障中扮演重要的角色。我們已知 K^+ 泵進入 (pumped into) 內淋巴液並不是來自 stria vascularis 之血液供應 (Konish et al., 1978, Wada et al., 1979)。有學者認為 K^+ 離子可能是在耳蝸管 (Cochlear duct) 之再循環 (再循環(recycling)) (Kikuch et al., 1995, Spicer & Schulte 1998)。 K^+ 離開毛細胞會被柯蒂氏器之支持細胞攝取，運回 stria vascularis，再泵回 (pump back) 內淋巴液。 K^+ 再循環 (再循環(recycling)) 有幾條路徑。(1) 側面途徑 (lateral route)：經由支持細胞間的網狀 gap junction 流到 spiral ligament 的 fibrocyte，再回到 stria vascularis (Kikuch et al., 1995)，(2) 在內淋巴液部位的上下經由 perilymph 到達 spiral ligament，然後再到 stria vascularis (Schulte & Steel 1994)，(3) 利用中間支持細胞 (medial supporting cell)，spiral limbus fibrocyte 及 interdental cell 間的 gap junction 而在 interdental cell 膜上 $Na^+-K^+-ATPase$ pumps 泵出，進入 endolymph (Kikuch et al., 1995, Spicer & Schulte 1998, Schulte & Steel 1994)。在整個 K^+ 再循環(recycling)牽涉的基因很多，包括(1)形成 gap junction 的基因---*connexin(Cx)* 基因族--- *connexin 26 (Cx26)*、*connexin 29 (Cx29)*、*connexin 30 (Cx30)*、*connexin 30.3 (Cx30.3)*、*connexin 31 (Cx31)*及*connexin 43(Cx43)*；(2).形成 tight junction 的基因--- *CLAUDIN 11* 和 *CLAUDIN 14*；(3). *KCNQ4* 基因。在內耳 gap junction 主要是細胞間離子通過的管道，而內耳內的外淋巴和內淋巴需要特殊的保護機制而將他們完全的區隔以維持高 K^+ 和EP，為維持內淋巴高靜止電位，有很多研究已經發現在內淋巴的周圍細胞間須用各種 tight junction 將其緊密連接起來 (Anderson and van Itallie 1995; Schneeberger and Lynch 1992; Tsukita et al., 2001)。

各種 *Cx* 基因表現出來的蛋白稱為 *Cx* 蛋白是形成 Gap junction 的最小組成單位。目前在哺乳類動物中已知有 20 種 *Cx* 蛋白 (Bruzzone et al., 1996)，在人類的 *Cx* 蛋白可依據其核苷酸和胺基酸序列的相似性區分為 α (如 *Cx43*)、 β (如 *Cx 26*、*Cx30*、*Cx30.3* 和 *Cx31*) 和 γ (如 *Cx29*) 三種群體 (groups)。Gap junction 是細胞與鄰近細胞間的通道，其功能在於運送細胞間的離子 (ions)、代謝物 (metabolite) 及第二訊息物 (second messengers) 例如 cyclic AMP、inositol (Dermietzel and Spray 1993；White and Bruzzone 1996；Kumar et al., 1996)。Gap junction 是由 *Cx* 蛋白經一連串的組合過程 (assembly processes) 而形成 (Bruzzone et al., 1996)，*connexin* 在內

質網(endoplasmic reticulum)被製造並被完成正確折疊(folding)並經由聚合過程(oligomerizing)將六個 connexin 次單位(subunits)聚合成半通道(half channel)，稱之 connexon，將完成組合的 connexon 插入內質網膜上，再與鈣離子結合蛋白(calcium-binding protein)結合運送至高基氏體(Golgi body)後繼續被運送至細胞膜上(plasma membrane)排列，且與鄰近細胞的 connexons 直線排列成一完整細胞間之通道(intercellular channel)。在形成 gap junction 的大部分細胞中常表現出不只一種 Cx 蛋白，因此在細胞內可能會形成具有不同生理功能的 gap junction (Kumar et al., 1996)，另外在形成 connexon 時有可能是由相同的(homomeric)或不同的(heteromeric)Cx 蛋白所組成，且在相鄰兩細胞的 connexon 的結合形成 gap junction 也有可能是同質性(homotypic junction)或異質性(heterotypic junction)的 connexon 所組成(Falk 2000 a,b)。到目前為止大部分的研究發現正常只有單一群的 Cx 會彼此互相結合形成 gap junction，不同的群並不會互相結合，就是說 α 群只會和 α 群結合， β 群只會和 β 群結合。在最近的研究有發現 Cx43 (α 群)和 Cx26 (β 群)共同表現在 rat 的耳蝸內(Suzuki et al., 2003)，然而 α 群和 β 群的 Cx 蛋白是否互相影響目前還不清楚。最近對於兩個 Cx 基因之間的交互作用有一個新的研究方法---Tet-On 蛋白表現系統(Tet-On inducible expression system)(Koreen et al., 2004)，此方法是利用在一個表現質體上(pBI vector, clontech)同時接上兩個不同的基因，而利用 Doxycycline 來調控這兩個基因的表現量，因此我們將可利用這方法來瞭解不同基因或異型結合子(heterozygous)的突變所造成的交互影響。

綜合以上所述，針對 Cx 基因 β 群 (Cx26 和 Cx30)蛋白的功能研究，我們擬利用以螢光蛋白表現系統(GFP 和 DsRed 螢光蛋白)和 Tet-On 蛋白表現系統(Tet-On inducible expression system) 來探討 Cx26 和 Cx30 基因突變後的功能研究以瞭解我們在聽障患者中所發現的 Cx26 和 Cx30 突變點造成聽障的致病機轉。

研究方法

為了要瞭解Cx26和Cx30基因突變後功能的影響，我們利用基因重組技術將基因轉接在含螢光蛋白的質體和Tet-on蛋白表現系統pBI雙向表現質體上，在將這些表現質體利用基因轉殖(transfection)技術送到HeLa或Tet-on HeLa細胞中。利用G418抗生素的篩檢來建立穩定表現Cx蛋白的細胞株細胞，同時也利用免疫螢光染色技術和倒立顯微鏡及共軛焦顯微鏡來觀察實驗結果。。

結果與討論

(1) 以螢光蛋白表現系統(GFP 和 DsRed 螢光蛋白)來探討 Cx26 和 Cx30 基因突變後的功能研究

在先前針對Cx26 和Cx30 基因篩檢的研究中我們發現了一個 551G>A (R184Q)異型結合子的錯意突變(missense mutation)，這個錯意突變位在Cx26 的 2nd extracellular loop(E2)上；及一個位於Cx30 的 first transmembrane domain (M1)位置的異型結合子的錯意突變(missense mutation)---119C>T (A40V)。因此在本研究中我們想要瞭解這些突變點會不會對gap junction形成的功能上造成影響，爲了進一步了解這些Cx gene family突變點對聽障的影響，我們建立了一個細胞模式來研究gap junction的功能，我們建構了含螢光蛋白(GFP或DsRed)正常的Cx26 和Cx30 蛋白表現質體及Cx26 551G>A (R184Q)及Cx30 119C>T (A40V)兩個突變點的含GFP螢光蛋白表現質體，並轉殖到HeLa細胞中，來分析這些Cx26 和Cx30 突變蛋白的表現位置及彼此功能上的影響。

結果發現 Cx26 基因 R184Q 轉殖的 HeLa 細胞，其變異蛋白並無法和正常的 Cx26 蛋白一樣運送到細胞膜形成 gap junction，其突變蛋白都堆積在細胞質 (Figure 1)。另外在 Cx30 基因的研究我們發現 A40V 轉殖的 HeLa 細胞，其突變蛋白也都堆積在細胞質 (Figure 2)。

在 co-transfect Cx26 和 Cx30 重組基因實驗中發現 Cx26 和 Cx30 可共同表現在相同的位置。而且在基因突變分析中我們發現 Cx26R184Q 和 Cx30A40V 都是 heterozygous 的突變，因此我們將探討這兩個突變點對正常的 Cx26 和 Cx30 的蛋白有何影響。結果我們發現 Cx30A40V 的突變，會同時影響到正常的 Cx30 和 Cx26 蛋白無法運送到細胞膜而堆積在 Golgi body (Figure 3)。而 Cx26R184Q 只有影響到正常的 Cx26 運送功能，相反的 Cx26R184Q 突變蛋白表現位置會部分會被 Cx30 正常的蛋白改變，由 Golgi body 送到細胞膜上 (Figure 4)。

Cx26 R184Q這個錯意突變位在Cx26 的 2nd extracellular loop(E2)上，這突變可能破壞了gap junction管道的形成，在前人的報告在Cx26 相同的位置產生不同的突變(R184W或R184P)確實造成了Cx26 蛋白功能的影響(Wilcox et al., 2000; Denoyelle et al., 1997)。而在我們的功能研究也發現R184 突變為Q時確實影響了Cx26 蛋白的功能，同時我們也證明了R184Q Cx26 蛋白有 dominant negative的影響。相反的部分的Cx26 R184Q卻會被Cx30 恢復Cx26R184Q突變蛋白的運輸功能。

A40 的胺基酸在 Cx 基因族中主要位於 first transmembrane domain (M1)，其主要的功能為 Cx 蛋白正確運輸到細胞膜上所必須(Leube et al., 1995)。先前的研究已經有報告指出在 Cx32 基

因的 A39V、A39P 和 A40V 突變會造成 Cx32 蛋白堆積在 HeLa 細胞的內質網(ER)或高基氏體(Golgi) (Kleopa et al., 2002; Yum et al., 2002)。在本研究中我們發現 Cx30 A40V 也造成突變蛋白堆積在高基氏體(Golgi)，此結果和之前的報告相類似，另外我們也發現 Cx30 A40V 會對 Cx26 和 Cx30 蛋白有 dominant negative 的影響。

(2) 以 Tet-on 蛋白表現系統來探討 Cx26 和 Cx30 基因突變後的功能研究

以往對於兩個基因的交互作用或 heterozygous 的功能分析大都使用 co-transfection 的方式，即同時送入兩個載體再觀察所造成的影響(Rouan et al., 2001)。然而經由此種方式送入載體並無法控制兩種載體送入細胞的比例。同一種細胞中可能會發生其中一個載體送入較多，另一個載體送入較少的情形，而這種量的差異很可能會影響實驗結果。以上述看到的 dominant negative effect 現象為例，有可能是因為帶有突變基因的載體被送入細胞內的數目遠大於帶有正常基因的載體所造成現象。

最近對於兩個 Cx 基因之間的交互作用出現一個新的研究方法---Tet-on 蛋白表現系統(Tet-On inducible expression system)(Koreen et al., 2004)。這系統是先建立一個含有 Tet-on vector 的穩定表現細胞株，當有 doxycycline(Dox)存在下可誘導 Tet-on vector (pBI vector)上的 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) protein 表現。再建構一個可雙向表現的載體，利用此載體分別插入兩種基因於其兩邊的 multiple cloning site 中。pBI vector 上帶有一段 tetracycline-response element(TRE)，位於兩種欲表現基因序列 promoter 上游。將建構好的載體送進 Tet-on HeLa 後，加入 Dox 即可誘導 rtTA 蛋白產生，結合在 pBI vector 上 TRE 的位置啟動轉錄作用，同時表現兩種不同基因。此種方式可避免傳統 co-transfection 送入載體不等量的疑慮。經 Dox 誘導後，只需 30 分鐘即可偵測到蛋白的表現，表現的程度甚至可提高到 10000 倍。而此調節的 DNA 序列(TRE)是不存在真核生物的 genomes 中，故可專一性的誘導欲表現的基因。藉此方法對探討 heterozygous 或不同基因間的交互作用將有很大的幫助。

因此本研究也利用 Tet-on 蛋白表現系統來探討 Cx26 和 Cx30 基因突變後所造成的功能影響。經實驗結果證實，Cx26 R1Q84 突變蛋白會導致 Cx 蛋白堆積在高基氏體 (Figure 5)。將 Cx26 R184Q 突變蛋白分別與 Cx26 或 Cx30 共同組成 heteromeric connexon 後，Cx26 R184Q 突變蛋白會影響正常 Cx26 或 Cx30 蛋白而堆積在高基氏體 (Figure 6 和 7)。Cx30 A40V 突變蛋白也會導致 Cx 蛋白堆積在高基氏體 (Figure 8)。Cx30 119C>T 突變蛋白分別與 Cx26 或 Cx30 共同組成 heteromeric connexon 後，Cx30 A40V 突變蛋白也會影響正常 Cx26 或 Cx30 蛋

白而堆積在高基氏體 (Figure 9 和 10)。不同於上述情形，Cx26 T123N 突變蛋白則會表現在細胞膜，與正常 Cx26 蛋白表現位置相同 (Figure 11)。利用 Tet-on 蛋白表現系統所得到的結果和以螢光蛋白表現系統所得到的結果大致是相符的，唯有在 Tet-on 蛋白表現系統並沒有發現 Cx26 R184Q 卻會被 Cx30 恢復 Cx26R184Q 突變蛋白的運輸功能。這結果可能的原因是如我們前面所述在 co-transfection 的實驗中因為帶有正常基因的載體被送入細胞內的數目遠大於帶有突變基因的載體所造成現象。然而這一個發現值得我們進一步的研究來釐清 Cx26 R184Q 的致病機制。

綜合以上所述我們認為 Cx26 R184Q 和 Cx30 A40V 這兩個突變點有 dominant negative effect。且這兩個突變點確實會影響到 Cx 蛋白的運輸功能，進而造成 gap junction 功能的喪失。而 Cx26 T123N 的突變並不會影響 Cx26 蛋白的運輸，但對於 gap junction 功能是否有影響仍需進一步實驗來探討 (Yang and Li 2006; Chang and Li 2007)。

四. 計劃成果自評:

本篇研究結果對於我們研究 Cx 基因族在聽障的致病機轉有進一步的了解，尤其對於我們在聽障病人中所發現的 Cx26 和 Cx30 基因的突變點所造成功能的影响，有更直接的證據來證實這些突變點確實會造成聽覺障礙。此研究成果也符合我們當初對於計畫內容所要追求的目標。另外針對 Cx 基因族功能分析模式和一些研究技術的建立將可讓我們能更進一步的瞭解和探討到一些聽障基因在聽障中的角色。

在我們先前的一些研究中可得知語言學習前期非症候群聽障並非單一基因遺傳，所以我們將持續的研究並進行其功能性探討將可建立台灣地區學習語言前非症候群感音神經性聽障新的流行病學資料，以期有效降低聽力障礙所造成的影響。亦可以讓我們對於遺傳性聽障的成因有更深入的了解。並對於聽障之患者和家族，將可提供一個遺傳諮詢模式服務。

參考文獻

- Anderson JM, and van Itallie CM. (1995) Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269, G467-G475.
- Bruzzone R, White TW, and Paul DL, (1996) Connections with connexins the molecular-basis of direct intercellular signalling. *Eur. J. Biochem.* 238:1-27.
- Chang CC, and Li SY. (2007) Functional study of Cx26 and Cx30 mutants in nonsyndromic deafness by using Tet-on system. Master Thesis, Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University.
- Denoyelle F, Weil D, and Maw MA. (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Gen.* 6, 2173-2177.
- Dermietzel R, and Spary DC. (1993) Gap junction in the brain: where, what type, how many, and

- why ? Trends. Neurosci. 16:186-192.
- Falk MM. (2000a) Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. cell Biol.* 79, 564-574
- Falk MM. (2000b) connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J.cell.sci.* 113, 4109-4120
- Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, and Nickel R. (2002) Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol. Neurootol.* 7, 141-145
- Kalatzis V and Petit C (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1589-1597
- Kleopa KA, Yum SW, and Scherer SS. (2002) Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. *J. Neurosci. Res.* 68, 522-534.
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL and Adams JC (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 191, 101-118
- Konishi T, Harick DE and Walsh PJ (1978) Ion transport in guinea pig cochlea. I. Potassium and sodium transport. *Acta Otolaryngol* 86, 22-34
- Koreen IV, Elsayed W, Liu YJ, and Harris AL. (2004) Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells. *Biochem J.* 383, 111-119.
- Kumar NM, and Gilula NB. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-8.
- Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, and winterhager E.(1998) Expression of the gap-junction *connexins 26* and *30* in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 294,415-420
- Leube RE. (1995) The topogenic fate of the polytopic transmembrane proteins, synaptophysin and connexin, is determined by their membrane-spanning domains. *J. Cell. Sci.* 108, 883–894.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawling B, Remington E, Amos KS and Nance WE. (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S school-age population. *Am. J. Med. Genet.* 46, 486-491
- Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. (2003) Mutations in the gene for *connexin 26 (GJB2)* that cause hearing loss have a dominant negative effect on *connexin 30*. *Hum Mol Genet.* 12(8):805-812
- Morton CC (2002) Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1229-1240
- Morita H, Katsuno T, Hoshimoto A, Hirano N, Saito Y, and Suzuki Y. (2004) Connexin 26-mediated gap junctional intercellular communication suppresses paracellular permeability of human intestinal epithelial cell monolayers. *Experimental Cell Research* 298, 1– 8
- Naz S, Giguere CM, Kohrman DC, Mitchem KL, Riazuddin S, Morell RJ, Ramesh A, Srisailpathy S, Deshmukh D, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Smith RJH and Wilcox ER (2002)

- Mutations in a novel gene, *TMIE*, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 632-636
- Plantard L, Huber M, Macari F, Meda P, and Hohl D. (2003) Molecular interaction of connexin 30.3 and connexin 31 suggests a dominant-negative mechanism associated with erythrokeratoderma variabilis. *Human Molecular Genetics* 24, 3287–3294
- Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AM, Lucke TW, Paul DL, Munro CS, Uitto J, Hodgins MB, and Richard G. (2001) trans-dominant inhibition of *connexin-43* by mutant *connexin-26*: implications for dominant *connexin* disorders affecting epidermal differentiation *J. Cell Sci.* 114, 2105-2113.
- Schneeberger EE, and Lynch RD. (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* 262, L647-L661.
- Spicer SS and Schulte BA (1998) Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cell. *Hear Res.* 118, 1-12
- Steel KP, Barkway C, and Bock GR. (1987) Strial dysfunction in mice with cochleo-saccular abnormalities. *Hear. Res.* 27, 11-26
- Suzuki T, Takamatsu T, and Oyamada M. (2003) Expression of Gap Junction Protein Connexin43 in the Adult Rat Cochlea: Comparison with Connexin26. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51(7), 903–912
- Tsukita SH, Furuse M. and Itoh M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285-293.
- Wada J, Kambayashi J, Marais DC and Thaimann R, (1979) Vascular perfusion of the cochlea: effect of potassium-free and rubidium-substituted media. *Arch Otorhinolaryngol* 225, 79-81
- Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH, Wu CY, Chen MS, Huang PC. (2003) Functional analysis of *connexin-26* mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem.* 84(4):735-42
- White TW, Bruzzone R, (1996) Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and function consequences. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28:339-350
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, Gardner RJM, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HHM. (2000) High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum. Gene.* 106(4), 399-405
- Yum SW, Kleopa KA, Shumas S, and Scherer SS. (2002) Diverse trafficking abnormalities of connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol. Dis.* 11, 43-52.
- Yang JJ, and Li SY. (2006) Study of the etiology of prelingual non-syndromic sensorineural deafness. Doctor Dissertation, Institute of Medicine, Chung Shan Medical University.

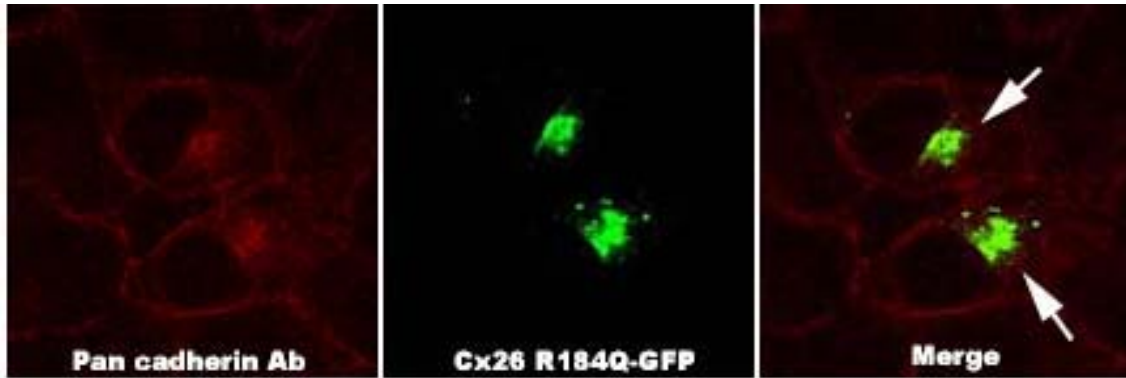


Figure 1. Cx26R184Q 突變蛋白於 HeLa 細胞內的表現情形

將帶有Cx26R184Q突變基因的pGFP 載體(pGFP-Cx26_{R184Q})轉殖到HeLa細胞中，利用細胞膜抗體anti-Pan Cadherin 抗體來定位細胞膜的位置(紅螢光)。結果我們發現Cx26R184Q的突變蛋白(綠色螢光)是堆積在細胞核周圍，並沒有運送到細胞膜上。箭號指的是Cx26 蛋白的表現位置。

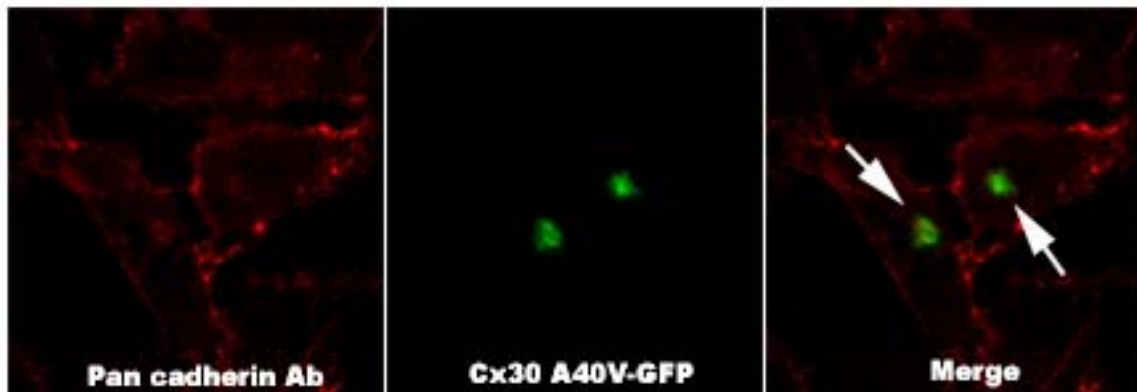


Figure 2. Cx30A40V 突變蛋白於 HeLa 細胞內的表現情形

將帶有Cx30A40V突變基因的pGFP 載體(pGFP-Cx30_{A40V})轉殖到HeLa細胞中，利用細胞膜抗體anti-Pan Cadherin 抗體來定位細胞膜的位置(紅螢光)。結果我們發現Cx30A40V的突變蛋白(綠色螢光)是堆積在細胞核周圍，並沒有運送到細胞膜上。箭號指的是Cx30 蛋白的表現位置。

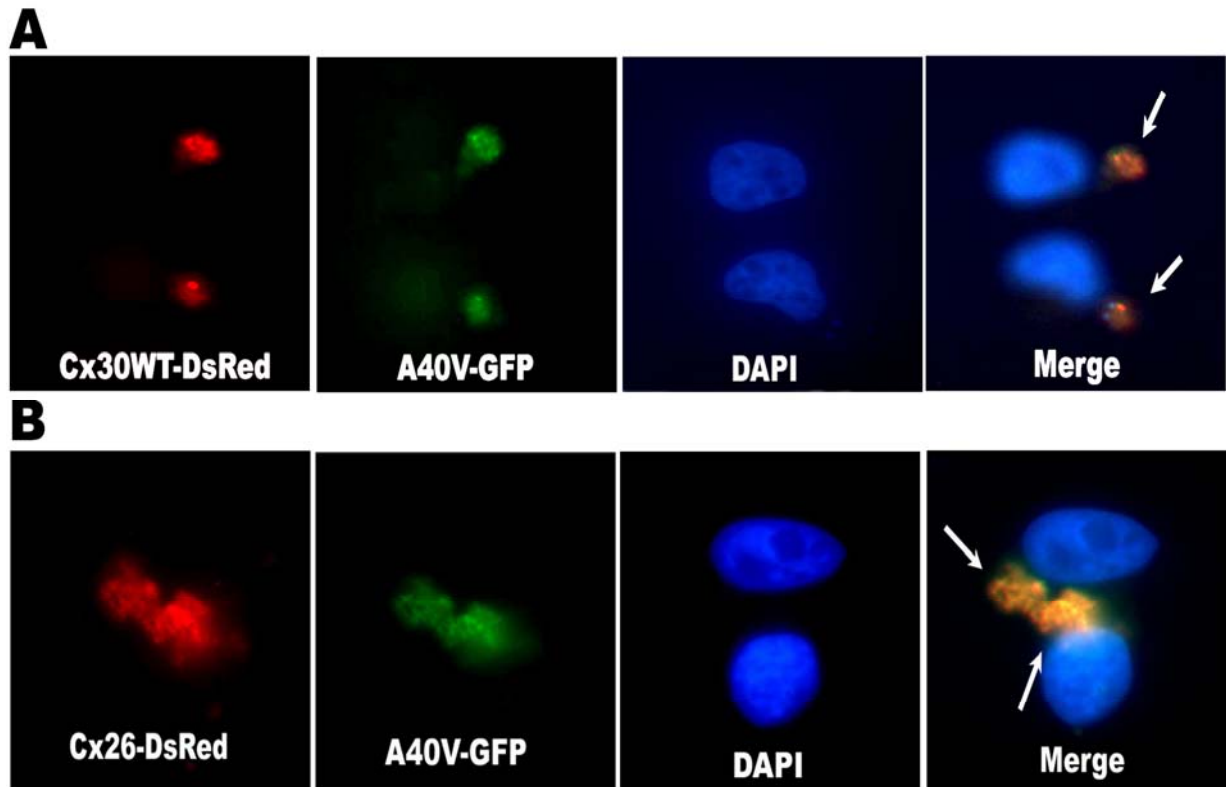


Figure 3. Cx30A40V 突變蛋白與正常 Cx30 或 Cx26 蛋白共同於 HeLa 細胞內的表現情形

(A) 將帶有Cx30A40V突變基因的pGFP 螢光蛋白表現質體(pGFP-Cx30_{A40V}; 綠色螢光)與等量的含正常Cx30 基因的pDsRed螢光蛋白表現質體(pDsRed-Cx30_{Wt}; 紅色螢光)共同轉殖到HeLa細胞中。(B) 將帶有Cx30A40V突變基因的pGFP 螢光蛋白表現質體(pGFP-Cx30_{A40V}; 綠色螢光)與等量的含正常Cx26 基因的pDsRed螢光蛋白表現質體(pDsRed-Cx26_{Wt}; 紅色螢光)共同轉殖到HeLa細胞中。結果我們發現Cx30A40V的突變，會同時影響到正常的Cx30 和Cx26 蛋白無法運送到細胞膜而堆積在細胞和周圍。另外我們利用 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI,來定位細胞核。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

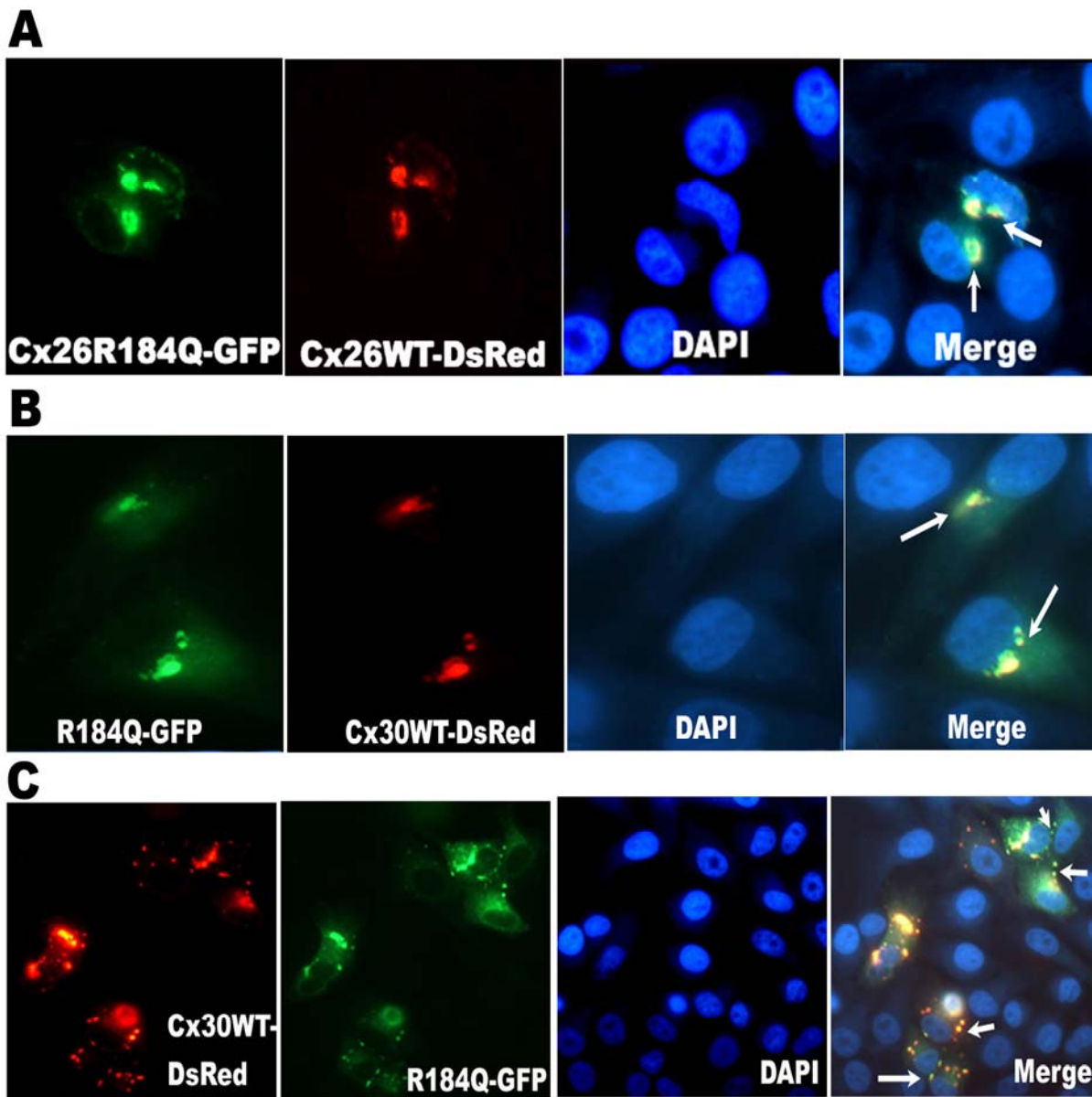


Figure 4. Cx26R184Q 突變蛋白與正常 Cx26 或 Cx30 蛋白共同於 HeLa 細胞內的表現情形

(A)將帶有Cx26R184 突變基因的pGFP 螢光蛋白表現質體(pGFP-Cx26_{R184Q}；綠色螢光)與等量的含正常Cx26 基因的pDsRed螢光蛋白表現質體(pDsRed-Cx26_{wt}；紅色螢光)共同轉殖到HeLa細胞中。結果我們發現Cx26R184Q的突變，會影響到正常的Cx26 蛋白無法運送到細胞膜而堆積在細胞和周圍。(B和C) 將帶有Cx26R184 突變基因的pGFP 螢光蛋白表現質體(pGFP-Cx26_{R184Q}；綠色螢光)與等量的含正常Cx30 基因的pDsRed螢光蛋白表現質體(pDsRed-Cx30_{wt}；紅色螢光)共同轉殖到HeLa細胞中。結果我們發現Cx26R184Q的突變，會影響到正常的Cx30 蛋白無法運送到細胞膜而堆積在細胞和周圍 (B)，然而有部分的Cx26R184Q 突變蛋白和 Cx30 蛋白共同表現在細胞膜上(C)。另外我們利用 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI,來定位細胞核。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

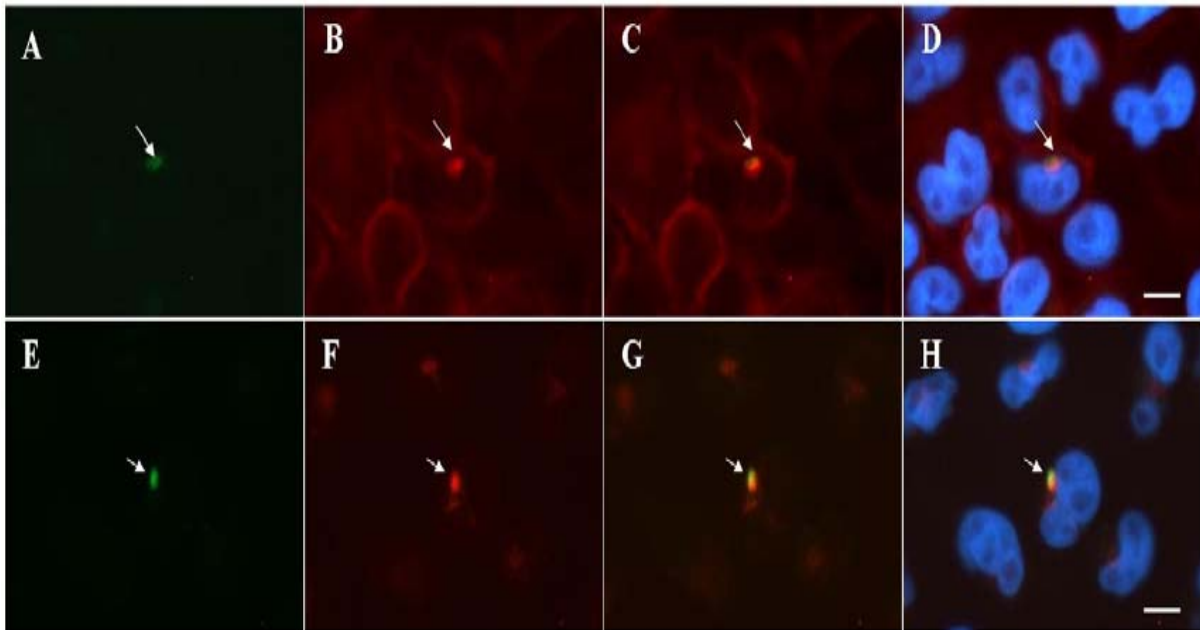


Figure 5、利用雙重免疫螢光染色偵測Cx26 R184Q突變蛋白於細胞內的表現情形

將帶有Cx26 R184Q 突變基因的pBI載體利用送入Tet-on HeLa中，使用anti-His抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin抗體分別偵測Cx26 R184Q突變蛋白的表現(A)及細胞膜(B)。結果可以看到Cx26R184Q突變蛋白會堆積在細胞質的區域(C和D)。進一步使用Cx26抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx26的表現(E)及高基氏體(F)，同樣將兩種影像重疊(G)並套上細胞核染劑DAPI(H)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon 堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

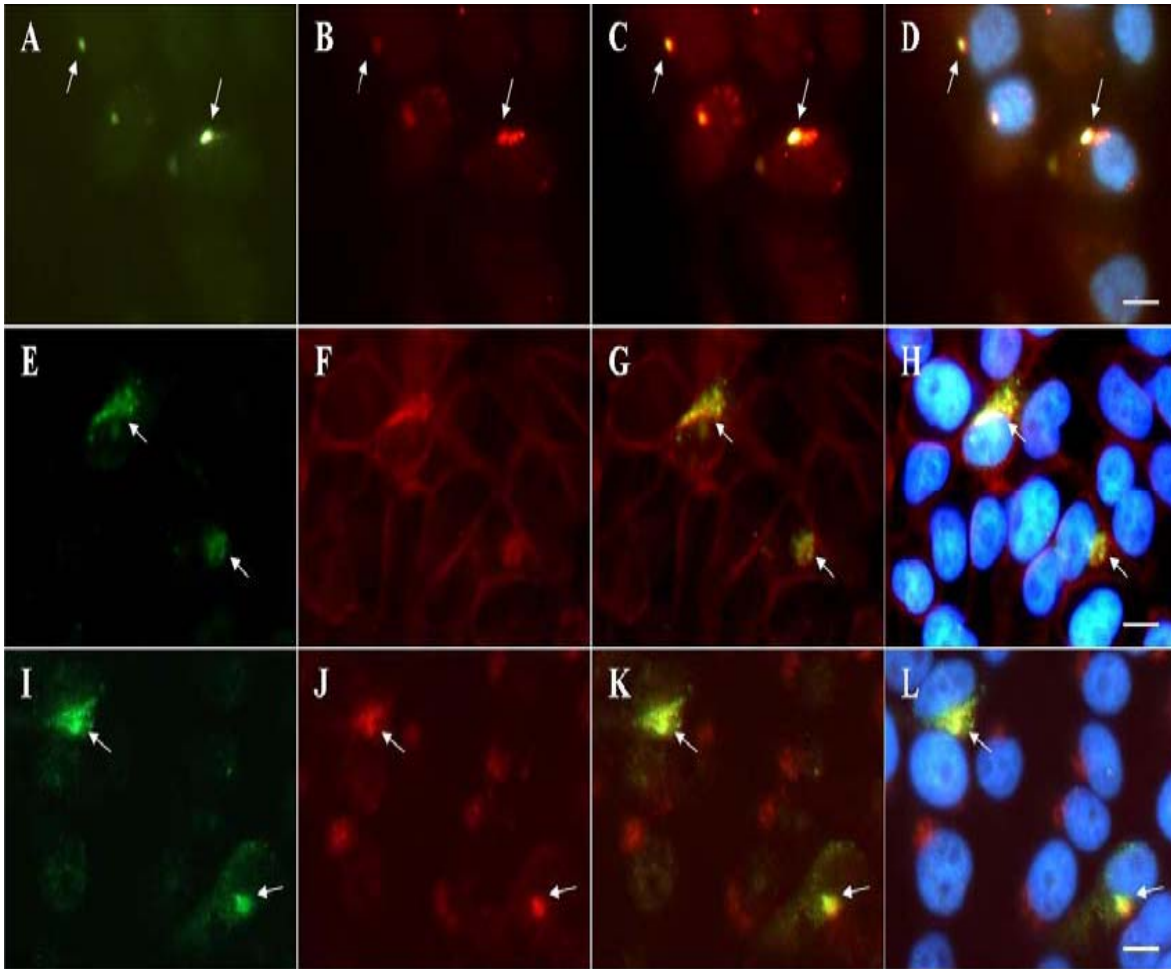


Figure 6、利用雙重免疫螢光染色偵測正常Cx26和Cx26 R184Q突變蛋白於細胞內的表現情形

將帶有正常Cx26 和Cx26R184Q基因的pBI 載體送入Tet-on HeLa 中，使用anti-His 抗體和Cx26抗體分別偵測Cx26R184Q (A)及Cx26(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx26與表現Cx26R184Q的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx26和Cx26 R184Q共同堆積的情形。使用anti-His 抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin 分別偵測Cx26R184Q突變蛋白的表現(E)及細胞膜(F)。在同一視野下，將表現Cx26R184Q突變蛋白與細胞膜的影像重疊(G)，並套上染細胞核的染劑DAPI(H)，可以看到Cx26R184Q突變蛋白會堆積在細胞質的區域。進一步使用Cx26抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx26的表現(I)及高基氏體(J)，同樣將兩種影像重疊(K)並套上細胞核染劑 DAPI(L)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon 堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

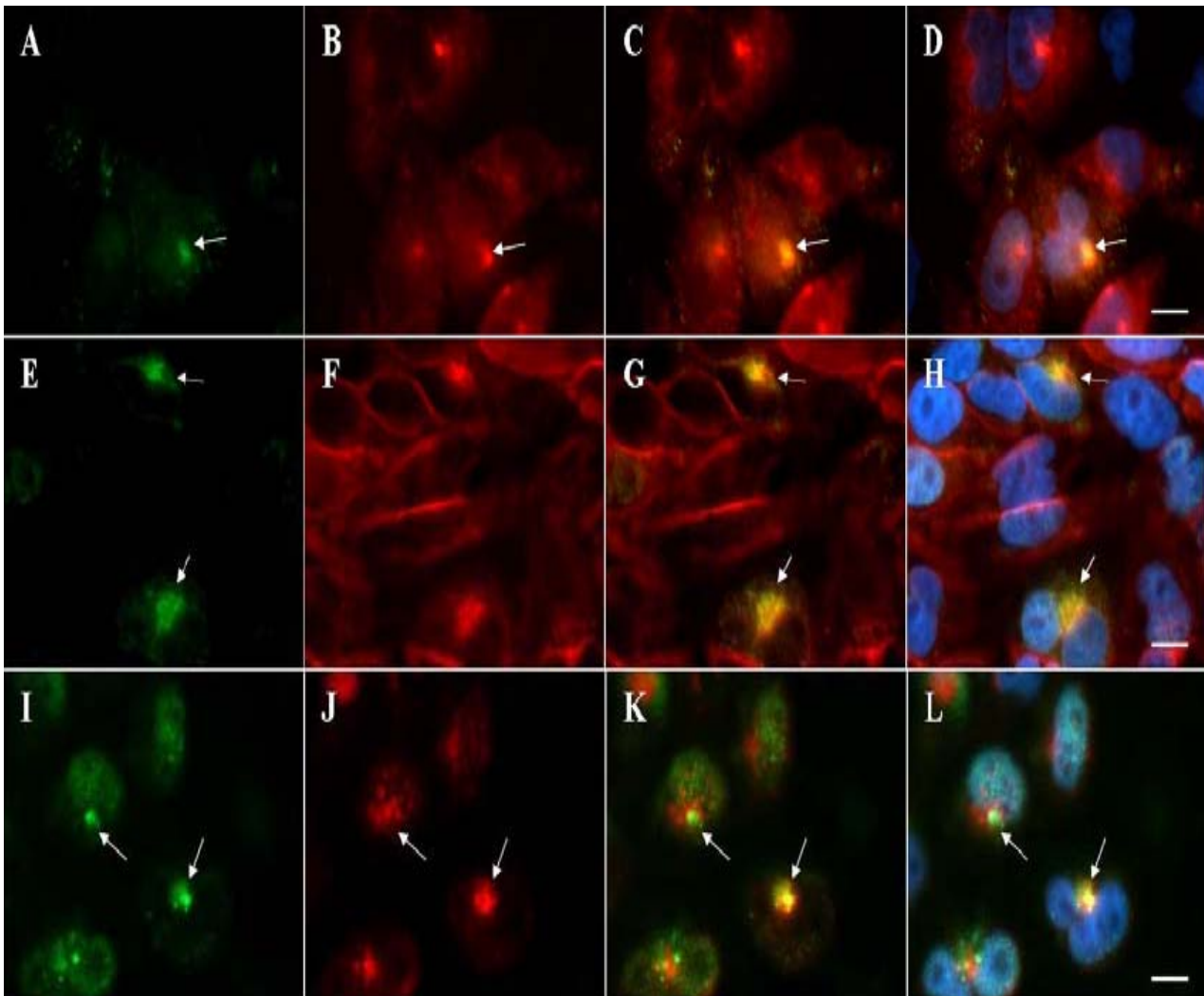


Figure 7、利用雙重免疫螢光染色偵測正常Cx30和Cx26R184Q突變蛋白於細胞內的表現情形
 將帶有正常Cx30和Cx26R184Q基因的pBI載體送入Tet-on HeLa 中，使用anti-His抗體和Cx30抗體分別偵測Cx26R184Q(A)及Cx30(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx30與表現Cx26R184Q的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx30和Cx26R184Q共同堆積的情形。使用anti-His 抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin分別偵測Cx26R184Q突變蛋白的表現(E)及細胞膜(F)。在同一視野下，將表現Cx26R184Q突變蛋白與細胞膜的影像重疊(G)，並套上染細胞核的染劑DAPI(H)，可以看到Cx26R184Q突變蛋白會堆積在細胞質的區域。進一步使用Cx30抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx30的表現(I)及高基氏體(J)，同樣將兩種影像重疊(K)並套上細胞核染劑 DAPI(L)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon 堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

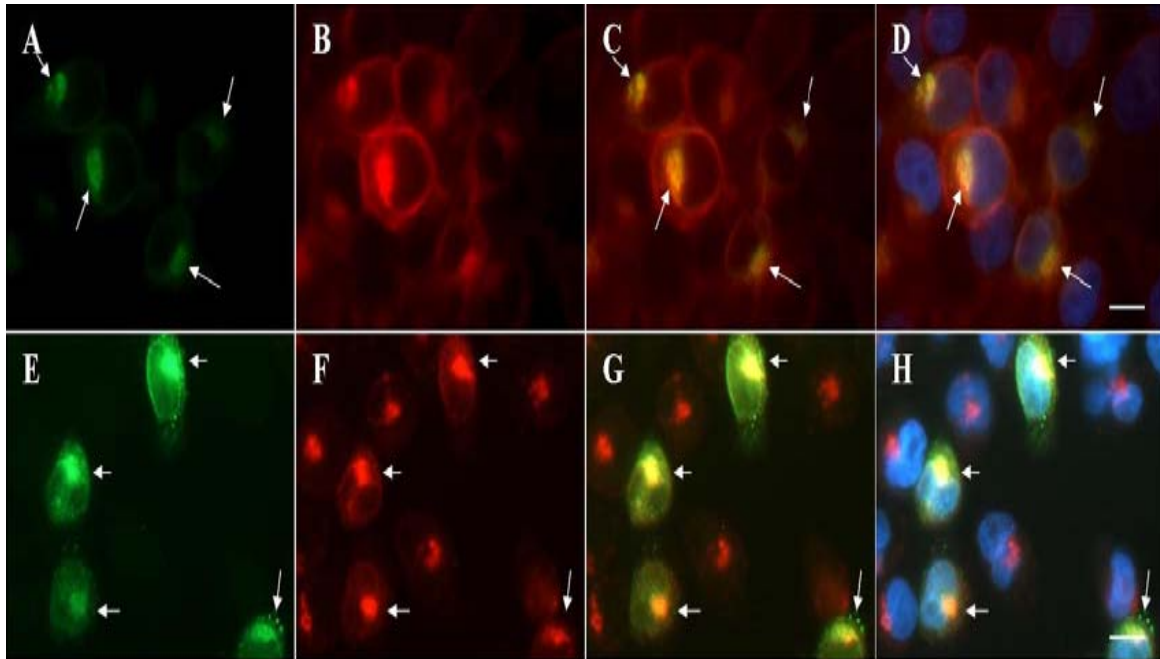


Figure 8、利用雙重免疫螢光染色偵測Cx30A40V突變蛋白於細胞內的表現情形

將帶有Cx30A40V突變基因的pBI載體送入Tet-on HeLa中，使用anti-His抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin抗體分別偵測Cx30A40V突變蛋白(A)及細胞膜(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx30A40V突變蛋白與細胞膜的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx30A40V突變蛋白會堆積在細胞質的區域。進一步使用Cx30抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx30的表現(E)及高基氏體(F)，同樣將兩種影像重疊(G)並套上細胞核染劑 DAPI(H)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon 堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

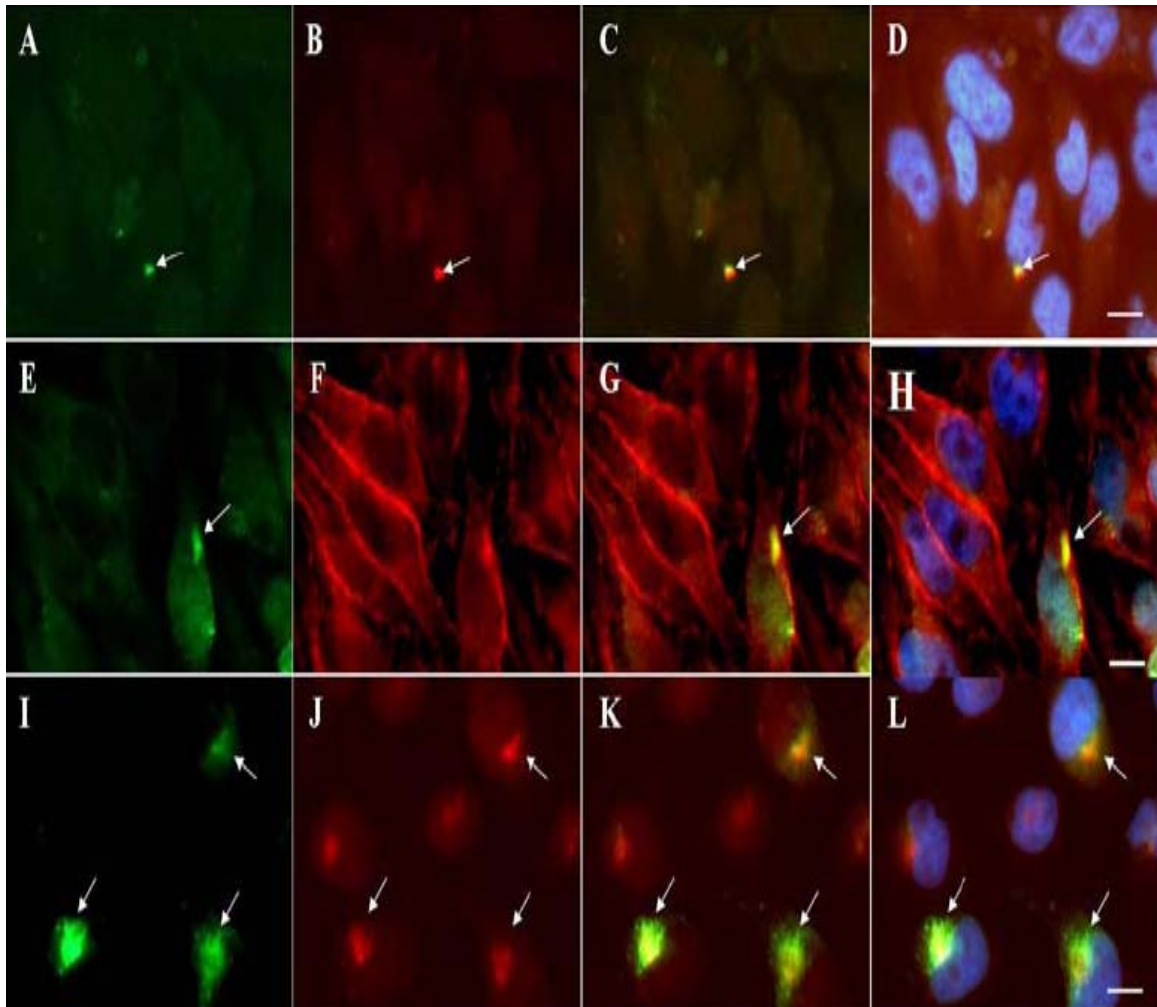


Figure 9、利用雙重免疫螢光染色偵測正常Cx30和Cx30A40V突變蛋白於細胞內的表現情形

將帶有正常Cx30和Cx30A40V基因的pBI載體送入Tet-on HeLa中，使用anti-His抗體和Cx30抗體分別偵測Cx30A40V (A)及Cx30(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx30與表現Cx30A40V的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx30和Cx30A40V共同堆積的情形。使用anti-His抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin分別偵測Cx30A40V突變蛋白的表現(E)及細胞膜(F)。在同一視野下，將表現Cx30A40V突變蛋白與細胞膜的影像重疊(G)，並套上染細胞核的染劑DAPI(H)，可以看到Cx30A40V突變蛋白會堆積在細胞質的區域。進一步使用Cx30抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx30的表現(I)及高基氏體(J)，同樣將兩種影像重疊(K)並套上細胞核染劑DAPI(L)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon 堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

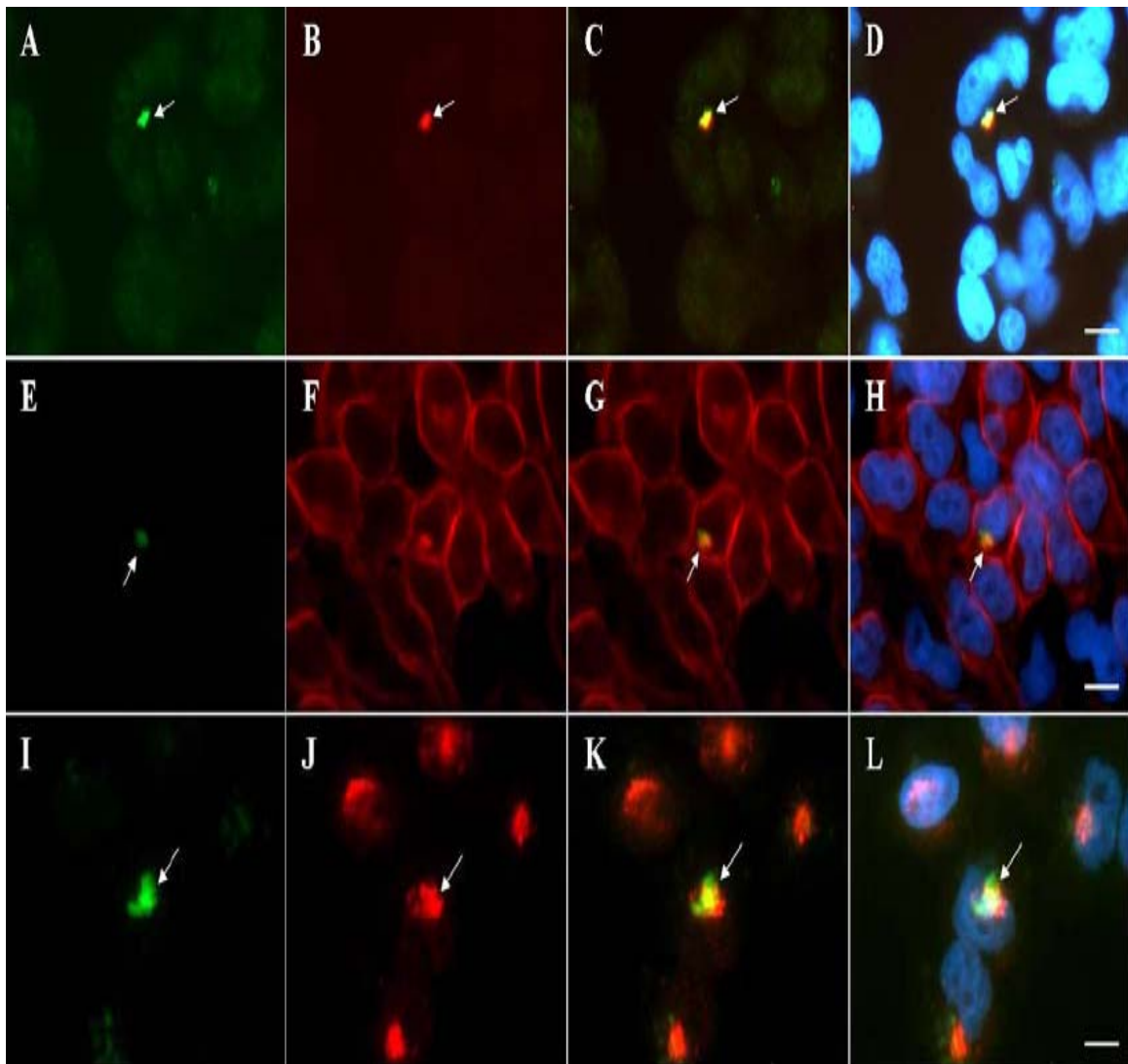


Figure 10、利用雙重免疫螢光染色偵測正常Cx26和Cx30A40V突變蛋白於細胞內的表現情形
 將帶有正常Cx26和Cx30A40V基因的pBI 載體送入Tet-on HeLa中，使用anti-His抗體和Cx26抗體分別偵測Cx30A40V (A)及Cx26(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx26與表現Cx30A40V的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx26和Cx30A40V共同堆積的情形。使用anti-His抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin分別偵測Cx30A40V突變蛋白的表現(E)及細胞膜(F)。在同一視野下，將表現Cx30A40V突變蛋白與細胞膜的影像重疊(G)，並套上染細胞核的染劑DAPI(H)，可以看到Cx30A40V突變會堆積在細胞質的區域。進一步使用Cx26抗體及高基氏體抗體分別偵測Cx26的表現(I)及高基氏體(J)，同樣將兩種影像重疊(K)並套上細胞核染劑DAPI(L)，可觀察到共同組成的heteromeric connexon堆積在高基氏體的現象。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。

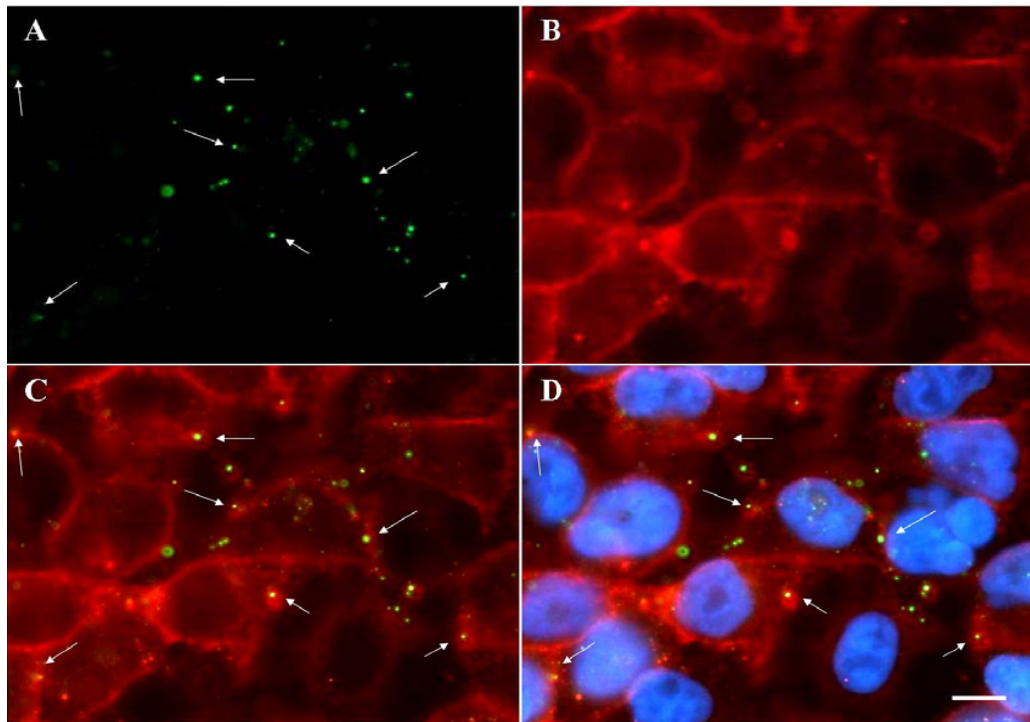


Figure 11、利用雙重免疫螢光染色偵測Cx26T123N突變蛋白於細胞內的表現情形

將帶有Cx26T123N突變基因的pBI載體送入Tet-on HeLa中，使用anti-His抗體和細胞膜抗體anti-Pan Cadherin抗體分別偵測Cx26T123N突變(A)及細胞膜(B)的表現。在同一視野下，將表現Cx26T123N突變蛋白與細胞膜的影像重疊(C)，並套上染細胞核的染劑DAPI(D)，可以看到Cx26T123N突變蛋白表現於細胞膜上。圖中比例尺長度為10 μ m。箭號指的是Cx蛋白共同的表現位置。