

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

學習語言前非症候群感音神經聽障病因的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-055-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學生命科學系

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：楊建洲， 廖珮如， 溫文綺， 許惠茹

報告類型：精簡報告

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 93 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 92-2320-B-040-055

執行期限：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

主持人：李宣佑 中山醫學大學生命科學系

計畫參與人員：楊建洲、廖珮如、溫文綺、許惠茹

一、中文摘要

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，到目前為止已知有 59 個基因發生突變而造成遺傳性聽障。我們針對 240 位聽障患者包括 214 位台中啟聰學校學生及 26 位門診聽障患者經耳鼻喉科醫師檢查確定為非症候群聽障 (non-syndromic hearing loss)患者，作 *Cx29*、*KCNQ4* 和 *TMIE* 基因分析發現有 7 位聽障學童在 *Cx29*、*KCNQ4* 和 *TMIE* 基因有異常所佔的比例為 2.92% (7/240)。在這 7 位病人中，有 3 位是 *Cx29* 基因的突變所佔的比例為 42.86% (3/7) 及 4 位是 *KCNQ4* 基因的突變所佔的比例為 57.14% (4/7)，而 *TMIE* 目前並沒有突變點的發現。

在 *Cx26* 和 *Cx30* 基因功能析方面我們利用細胞免疫螢光染色法分析發現正常的 *Cx26* 和 *Cx30* 蛋白可以在 HeLa 細胞株形成 gap junction，並且發現兩種蛋白可以共同形成 gap junction。然而突變的 *Cx26* 蛋白並無法形成 gap junction 而堆積在高基氏體上。另外針對 *KCNQ4* 基因的功能分析我們也成功建立利用 cRNA 顯微注射的方式打入爪蟾卵母細胞來測量 K^+ 的電流。

這些資料庫的建立和功能分析系統的建立將有助我們對聽障的致病成因和機轉

有更進一步的瞭解。

關鍵詞：語言學習前聽障、*Cx29* 基因、*TMIE* 基因、*KCNQ4* 基因

Abstract

Approximately 1 in 1000 children at birth or before 2 years of age (the prelingual period) are affected by severe deafness, the prelingual non-syndromic deafness. In developed countries, 60% of children with such deafness has been determined to be genetic origin.

In order to evaluate the extent to which the *Cx29*, *TMIE* and *KCNQ4* genes contributes to non-syndromic prelingual deafness in Taiwan, we have searched for mutations of these genes in 240 patients with hearing loss. Of which 214 were schoolchildren of National Taichung Deafness School and 26 were diagnosed clinically. Those children have also been referred to genetic counseling for deafness at Chung Shan Medical university Hospital.

In current study, 240 children with prelingual non-syndromic deafness were screened for the presence of gene mutations in *Cx29*, *TMIE*, and *KCNQ4* gene, respectively. Of the 240 children with deafness, 7 patients show mutations in *these* genes. We found that 3 patients possess

mutations in the *Cx29* gene. In the case of *KCNQ4* gene, we found that 4 patients carry point mutations. However, We were unable to identify any mutation in *TMIE* gene.

The intracellular communication channels of gap junction involves in a series of events leading to formation of connexon in plasma membrane that docks with that of neighboring cell. We have made constructs expressing *Cx26* gene of either wild types or various versions of mutations (235 delC, 299-300 delAT, and 551 G to A) in HeLa cell to facilitate our understanding of the function of *Cx26* gene. Our result demonstrates the formation of gap junction is affected by these mutations on *Cx26* gene. Co-immunostaining confirms that *Cxs* 26 and 30 are part of the same gap junction plaques. In addition, to study *KCNQ4* gene function, we successfully established a method that allows microinjection of cRNA into frog Oocytes.

Our data are clearly useful in our understanding of the weight of genetic factors in prelingual non-syndromic sensorineural deafness in Taiwan and in genetic counseling of hearing loss. In

Keywords: prelingual hereditary hearing loss, *Cx29*, *TMIE*, *KCNQ4*

二、緣由與目的

聽障可因遺傳基因突變或環境因素，或兩者兼之引起的，環境因子主要是腦膜炎 (meningitis)、腮腺炎 (mumps)、週產併發症 (perinatal complications)、母子感染 (maternofetal infection) 【如：毒漿體 (toxoplasma)、德國麻疹 (rubella) 和巨細胞病毒 (cytomegalovirus) 感染】、聽覺

創傷 (acoustic trauma) 及耳毒藥品 (ototoxic drug)。約有 1/1000 嬰兒再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 等 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：

(一) 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的母系遺傳。

(二) 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%)。

過去六年，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，包含數十種細胞及正常聽力所需的特化區域。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)。毛細胞之上半部表面浸在內淋巴液 (endolymph) 具有高濃度 K^+ 和低濃度 Na^+ ，在老鼠是維持正靜止電位的 +100mv，此種高靜止電位是正常毛細胞功能所需，因為當此靜止電位減少至零，會造成耳聾 (Steel et al., 1987)。柯蒂氏器 (organ of Corti) 包括感音毛細胞和支持細胞 (supporting cells) 座落於較有通透性的基膜 (basilar membrane) 上，在此基膜下面為內含 perilymph 之管道，具有高 Na^+ 及低 K^+ 濃度，很像正常的細胞外液 (extracellular

fluid)。在柯蒂氏器內，內毛細胞 (inner hair cells) 的基側膜 (basolateral membrane) 為支持細胞所包圍，但外毛細胞 (outer hair cell) 則暴露於 Cortilymph， K^+ 離子濃度，略高於 perilymph 內之 K^+ 離子濃度，當大的聲音 (loud sound) 傳到毛細胞，Cortilymph 內之 K^+ 濃度會累積，其他圍繞在內毛細胞之外細胞液也有較高之 K^+ 濃度。毛細胞的特殊離子環境對其功能是非常重要的，因為影響內淋巴液 (endolymph) 之離子濃度的基因突變會導致聽障。

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 (Konishi, 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 (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 (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^+ recycling 牽涉的基因很多，其中 connexin (Cx) 基因族 --- connexin 26 (Cx26)、connexin 30 (Cx30)、connexin 31 (Cx31)、connexin 29 (Cx29) 及 connexin 43 (Cx43) 等佔有很重要的角色。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 等 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 和Cx31)和 γ (如Cx29)三種次群體(sub 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 等 1996)。Gap junction 是由 Cx 蛋白經一連串的組合過程(assembly processes)而形成(Bruzzone 等 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, M.M. 2000a,b)。到目前為止大部分的研究發現正常只有單一次群的 Cx 會彼此互相結合形成 gap junction，不同的次

群並不會互相結合，就是說 α 次群只會和 α 次群結合， β 次群只會和 β 次群結合。在最近幾年在老鼠或人類內耳的研究也證明了Cx26 通常和 Cx30 都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)。

另外一個與 K^+ recycling有關的基因--*KCNQ4* 也被發現突變後造成非症候群聽障(nonsyndromic hearing loss)。*KCNQ4* 所造成的遺傳性聽障是一種體染色體顯性遺傳(autosomal dominant；DFNA)，在一個法國的家庭已經被發現*KCNQ4* 的P loop 上有一個missense突變(G285S)因而造成非症候群聽障(nonsyndromic hearing loss) (Kubisch et al., 1999)。另外也有報告4個DFNA2 的家庭有*KCNQ4* mutant，兩個在P-loop domain的missense突變、一個在第六個transmembrane domain發生missense突變和一個在第一個transmembrane domain發生 13 bp的deletion致使它產生一個truncated的蛋白質 (Couck et al., 1999)。*KCNQ4* 產生的蛋白質是一個新的控制鉀離子通道的閥門屬於*KCNQ*家族之一員。在耳蝸*KCNQ4* 是被表現在感音外毛細胞(sensory outer hair cell)，*KCNQ4* 有六個transmembrane domains、一個P loop介於S5 和S6 transmembrane domain 和兩個cytoplasmic domains。*KCNQ4* 基因位於chromosome 1p34，含有14個exons，表達出695個amino acid。4個*KCNQ4* 次單元(subunits)結合形成一個功能性的通道。在*In vivo*的實驗中成功的利用爪蟾卵母細胞(Xenopus Oocyte)來探討*KCNQ4* 的電生理功能 (Kubisch et al., 1999)。

針對 K^+ recycling相關基因，在三年多前我們開始針對這些基因—Cx families (Cx26、Cx30、Cx31 and Cx43)分析120為

聽力正常人的基因多型性 (polymorphism) 及 190 位語言學習前聽障患者及部分家屬，目前已獲得一些初步的結果。然而目前對於這些牽涉 K^+ recycling 基因的功能和彼此之間的影响機制並不是很清楚，且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。

因此，為更加入深入瞭解台灣地區語言學習前感音神經聽障患者之成因，是為此研究的動機。在本年度的計畫我們將繼續篩檢與 K^+ recycling有關的基因—Cx29、KCNQ4 和TMIE, 及進行聽障相關基因的功能分析以瞭解這些基因突變在學習語言前非症候群感音神經性聽障中所扮演的角色。

三、結果與討論

本篇研究主要分為兩部分：聽障基因的篩檢和功能分析。

(一)聽障基因篩檢的結果:

本研究一共分析 120 位聽力正常人和 240 位聽障患者包括 214 位台中啟聰學校學生及 26 位門診聽障患者經耳鼻喉科醫師檢查確定為非症候群聽障 (non-syndromic hearing loss)患者，其結果分述如下：

(1)聽障基因(Cx29、TMIE 及 KCNQ4)的多型性(polymorphism)

針對此次研究中共篩檢出 7 種多型性 (polymorphism) (表一和表二)。包括 2 種 Cx29 基因的多型性 ---780+63 C →

T/wt(Heterozygous) 及 840+2 T → G/wt(Heterozygous)，在正常人和聽障患者中所佔的基因頻率分別為 0.84 % (1/120)、1.68%(2/120) 和 3.34% (8/240)、1.68% (4/240)；5 種 TMIE 基因的多型性---1-74 A→T/wt(Heterozygous) 、 1-74 A→T (Homozygous) 、 1-44 G → A/wt (Heterozygous) 、 524-527 delGAA /wt (Heterozygous) 及 524-527 delGAA (Homozygous)，其所佔比例在 120 位聽力正常人分別為：34.17% (41/120) 、3.33 % (4/120)、0.83%(1/120)、51.67% (62/120) 及 39.17% (47/120)；而在 240 位聽障患者中所佔的比例分別為：23.75 % (57/240) 、3.33 % (8/240) 、0.42 % (1/240) 、38.75% (93/240) 及 30.42% (73/240) 。

(2) 聽障基因(Cx29、TMIE 及 KCNQ4)的突變

在本次研究中我們分析了 240 位非症候群聽障患者在 Cx29 基因分析中我們發現了三個突變點分別為 807A→T/wt、780+15 C→T/wt 及 780+10 C→G/wt，皆為 Heterozygous 所佔的比例都為 0.43% (1/240)(表三和圖一)。其中 780+10 C→G/wt、780+15 C→T/wt 的突變點都在 intron 1 (IVS 1)，由於Cx29 基因有兩個 exon 因此這兩個突變點是否會影響 splicing 我們將進一步的探討才能夠清楚的瞭解。而在 807A→T/wt 突變是第 807 個核苷酸由 A 變為 T 時，造成第 269 個胺基酸由 Glutamine 變為 Aspartic acid，是一種 missence mutation 可能會影響到該基因的功能。

另外對於 KCNQ4 基因的研究分析在 240 位非症候群聽障患者我們發現了 4 個突變點分別為 1091C→A/wt、1210G→A/wt、1212A→G/wt 和 1503C→T/wt，所佔

的比例皆為 0.41% (1/240)。(表三和圖二) 當 *KCNQ4* 基因第 1091 核苷酸由 C 變為 A 時，造成第 364 個胺基酸由 Alanine 變為 Aspartic acid，是一種 missence mutation，而 1210 核苷酸由 G 變為 A 時，造成第 404 個胺基酸由 Valine 變為 Isoleucine，也是一種 missence mutation，另外二個突變點 (1212A→G/wt 和 1503C→T/wt) 並沒有造成胺基酸的改變因此是一種 silent mutation。然而在 *TMIE* 基因的分析中目前並無發現任何的突變點。

(二)功能分析結果:

在過去幾年和本年度的研究中我們已建立了台灣地區非症候群聽障患者 K^+ recycling 有關的基因如 Cx 基因族 (*Cx26*、*Cx30*、*Cx31*、*Cx30.3*、*Cx29* 及 *Cx43*)、*TMIE* 及 *KCNQ4* 的資料庫，也發現了一些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，因此爲了進一步了解這些基因突變所造成的影響在我們將進行這些基因的功能分析。

(1)Cx 基因族功能分析結果:

在本研究中我們利用 HeLa 細胞株來進行功能研究。我們也建立了兩種染色系統:1. 利用特異性抗體;2. 利用 FIASH-EDT₂ Fluorescent Labeling 系統來探討正常和異常 Cx 基因表現蛋白在細胞內的表現位置。

在我們的研究中我們已經製造出 3 種特異性兔子抗體分別用來偵測 *Cx30*、*Cx30.3* 及 *Cx31* 三種蛋白。首先我將建構好的正常 *Cx26* 和 *Cx30* 的表現質體利用微脂粒基因轉殖方法感染 HeLa 細胞，以免疫螢光染色觀察 *Cx26* 和 *Cx30* 蛋白質在細胞內的分布 (localization) 情形。結果發現正常的 *Cx26* 蛋白質被運送到細胞膜(與先前我們實驗室所看到的結果一致)，同樣的利用 FIASH-EDT₂ Fluorescent Labeling 系統也觀

察到相同的結果(圖三)。在 *Cx30* 方面我們用我們自備的抗體和 FIASH-EDT₂ Fluorescent Labeling 系統也看到了正常的 *Cx30* 蛋白質被運送到細胞膜形成 gap junction(圖四)。

而針對 *Cx26* 突變點 (235delC、299-300delAT 和 551G→A) 和兩個和國外報告不同的 polymorphism (109G→A (V37I)，compound heterozygans 79G→A/341A→G (V27I / E114G)) 在免疫螢光染色方面我們發現帶有 *Cx26* 235delC、299-300delAT 和 551G→A 等突變表現質體的 HeLa 細胞其表現的但蛋白都堆積在細胞質並不會送至細胞膜形成 gap junction 我們也利用 Golgi 抗體作免疫螢光染色發現這些突變的蛋白都堆積在高基氏體(圖五)而兩個 polymorphism 則可順利的將蛋白質送到細胞膜形成 gap junction (圖六)。另外我們也證明了 *Cx26* 和 *Cx30* 可以共同形成 gap junction(圖七)。

(2) *KCNQ4* 基因功能分析結果:

KCNQ 家族本身也是一類的鉀離子管道，*KCNQ* 家族所表現的蛋白可在腦部，骨骼肌及內耳組織見到。其中 *KCNQ4* 是表現在耳蝸的外毛細胞，而 *KCNQ4* 的突變會造成人類非症候群體染色體的顯性遺傳聽障 (DFNA2)。爲了探討正常和突變 *KCNQ4* 形成通道的功能我們利用爪蟾卵母細胞來測量其鉀離子電流來瞭解蛋白功能性的變化。首先利用 in vitro 的方式製造出 *KCNQ4* cRNA 再以顯微注射的方式打入爪蟾卵母細胞經過 48~72 小時測量電流。我們已經成功的建立了這個分析模式將正常的 *KCNQ4* cRNA 打入爪蟾卵母細胞並偵測到其電流的情形(圖八)。

四.計劃成果自評:

本篇研究加上之前的研究我們已建立

台灣地區語言學習前期非症候群聽障孩童與K⁺ recycling有關的基因如Cx基因族(Cx26、Cx30、Cx31、Cx30.3、Cx29及Cx43)、TMIE及KCNQ4的基因多型性的資料庫,對於這些基因突變的研究有重大意義。分子診斷技術的發展可對已知遺傳成因的學習語言前期非症候群聽障家屬提供遺傳諮詢,對優生保健具有實質幫助及深遠影響。另外我們也建立了針對Cx基因族和KCNQ4基因功能的分析模式,這些模式的建立將可讓我們瞭解到這些基因在聽障中的致病機轉

目前已知五十九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。在本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瞭解。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。

五、參考文獻

- Bruzzone R, White TW, and Paul DL, (1996) Connections with connexins the molecular-basis of direct intercellular signalling. Eur. J. Biochem. 238:1-27.
- Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, Kunst H, Schatteman I, Van Velzen D, Meyers J, Ensink RJ, Verstreken RJ, Verstreken M, Declau F, Marres H, Kastury K, Bhasin S, McGuirt W, Smith RJH, Cremers CWRJ, Van de Heyning P, Willems PJ, Smith SD, and Van camp G.. (1999) Mutation in the *KCNQ4* gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. Hum. Mol. Genet. 8, 1321-1328
- Dermietzel R, Sparty 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
- 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
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S. Petit C. and Jentsch TJ (1999) *KCNQ4*, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. Cell 96, 437-446
- Kumar NM, 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
- 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
- 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
- Schulte BA and Steel KP (1994) Expression of α and β subunit isoforms of Na, K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the W^v or Si^d loci. *Hear. Res.* 78, 65-76
- 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
- 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.

表一. 120 位正常人 *Cx29*、*TMIE* 和 *KCNQ4* 的多型性比例

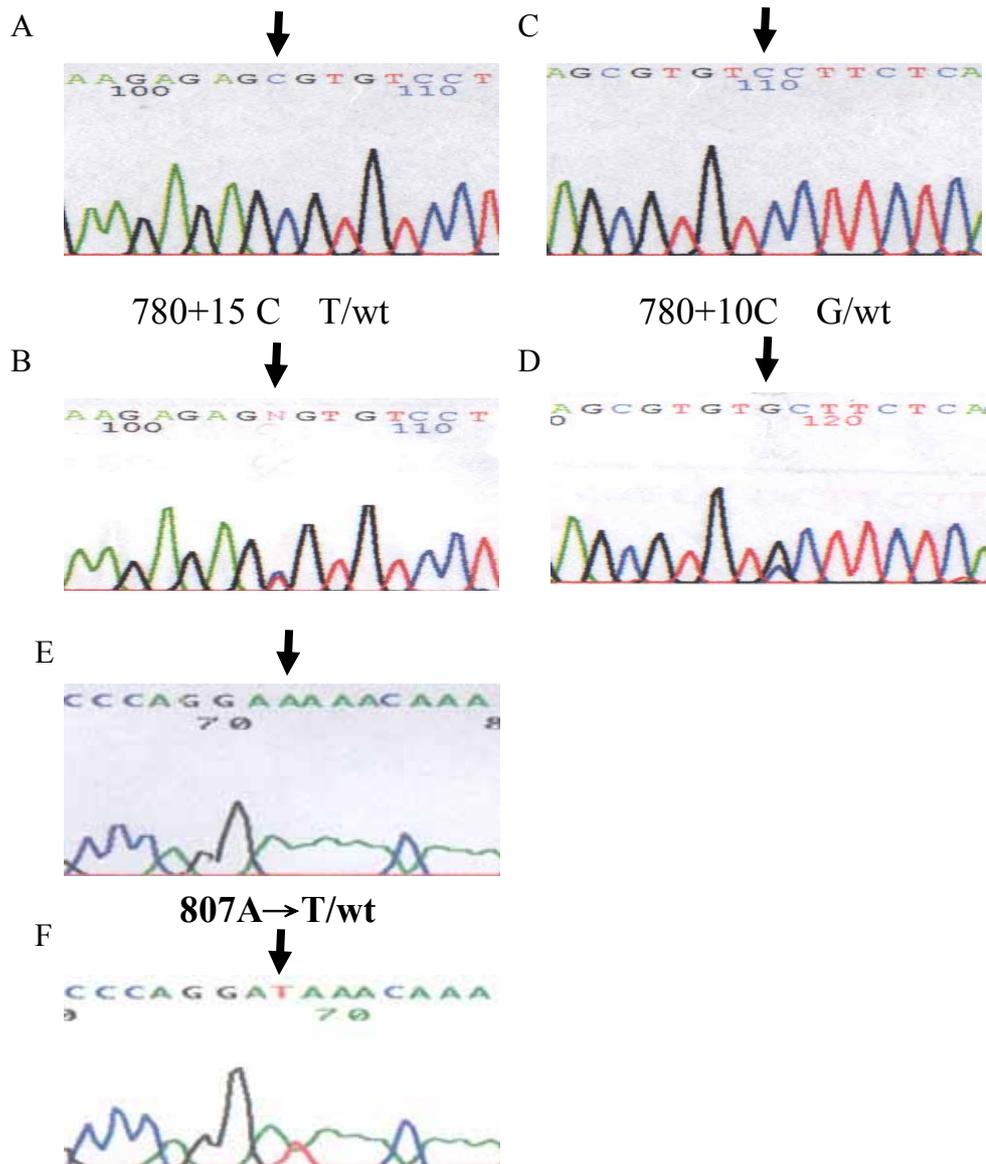
基因	基因型	人數	百分比
Cx29	780+63 C T Heterozygous	1	0.83%
	840+2 T G Heterozygous	2	1.67%
TMIE	1-74 A→A/T (Heterozygous)	41	34.17%
	1-74 A→T (Homozygous)	4	3.33%
	1-44 G→A/G (Heterozygous)	1	0.83%
	524-527 delGAA /wt (Heterozygous)	62	51.67%
	524-527 delGAA (Homozygous)	47	39.17%

表二 240 位聽障學童 *Cx29*、*TMIE* 和 *KCNQ4* 的多型性比例

基因	基因型	人數	百分比
Cx29	780+63 C T Heterozygous	8	3.33%
	840+2 T G Heterozygous	4	1.67%
TMIE	1-74 A→A/T (Heterozygous)	57	23.75%
	1-74 A→T (Homozygous)	8	3.33%
	1-44 G→A/G (Heterozygous)	1	0.42%
	524-527 delGAA /wt (Heterozygous)	93	38.75%
	524-527 delGAA (Homozygous)	73	30.42%

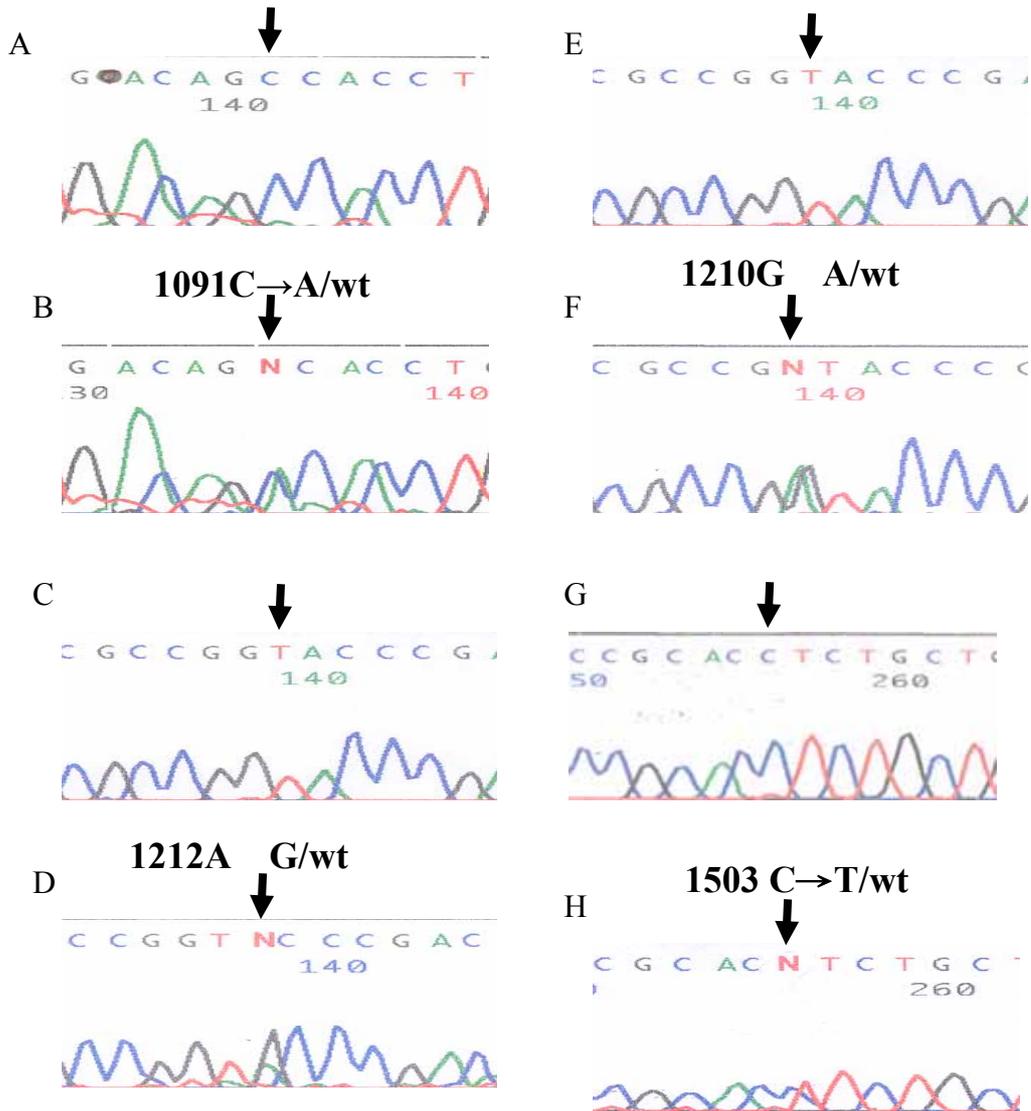
表三. 240 位聽障學童中 Cx29 突變之盛行率(prevalence)

基因	基因型	氨基酸改變	預測突變效應	人數	百分比
Cx29	807A T/wt	Glu 269 Asp	Missense mutation	1	0.42%
	780+15 C T/wt	Mutation on intron		1	0.42%
	780+10 C G/wt	Mutation on intron		1	0.42%
KCNQ4	1091C C/A	Ala 364 Asp	Missense mutation	1	0.42%
	1210G G/A	Val 404 Ile	Missense mutation	1	0.42%
	1212A A/G	Val 404 Val	Silence mutation	1	0.42%
	1503C C/T	Thr 501 Thr	Silence mutation	1	0.42%
總計				7	2.91%



圖一 Cx29 基因突變定序結果

A、 C 和 E：正常的序列；B：Hetrozygous 突變：780+15 C T/wt；D：Hetrozygous 突變：780+10C G/wt；F Hetrozygous 突變：807A->T/wt；箭頭指的是突變的位置



圖二 *KCNQ4* 基因突變定序結果

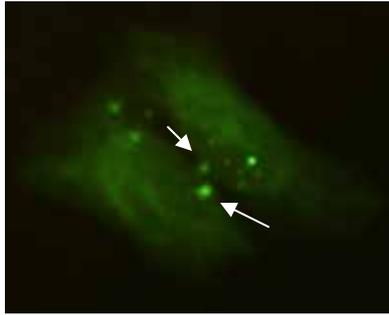
A、C、E 和 G：正常的序列；B：Heterozygous 突變：

1091C→A/wt；D：Heterozygous 突變：1212A G/wt；F：

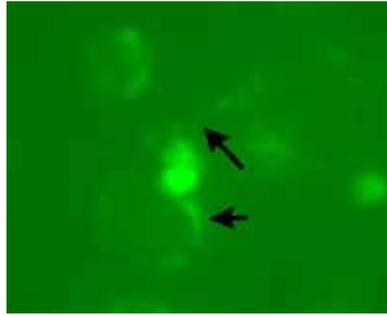
Heterozygous 突變：1210G A/wt；H：Heterozygous 突變：1503

C→T/wt；箭頭指的是突變的位置

A



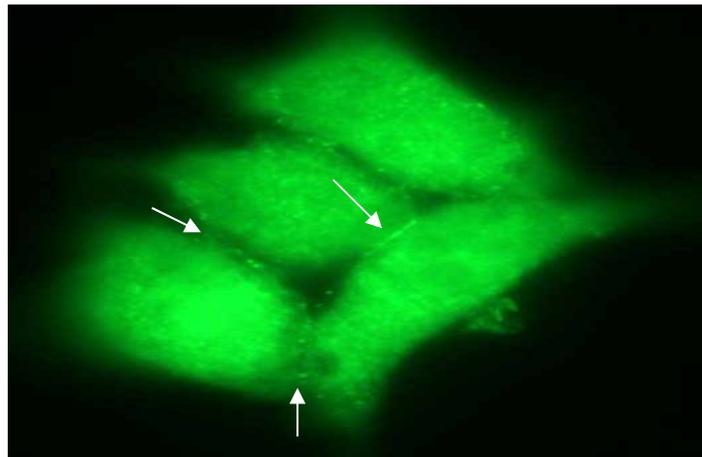
B



圖三 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內正常 Cx26 蛋白表現

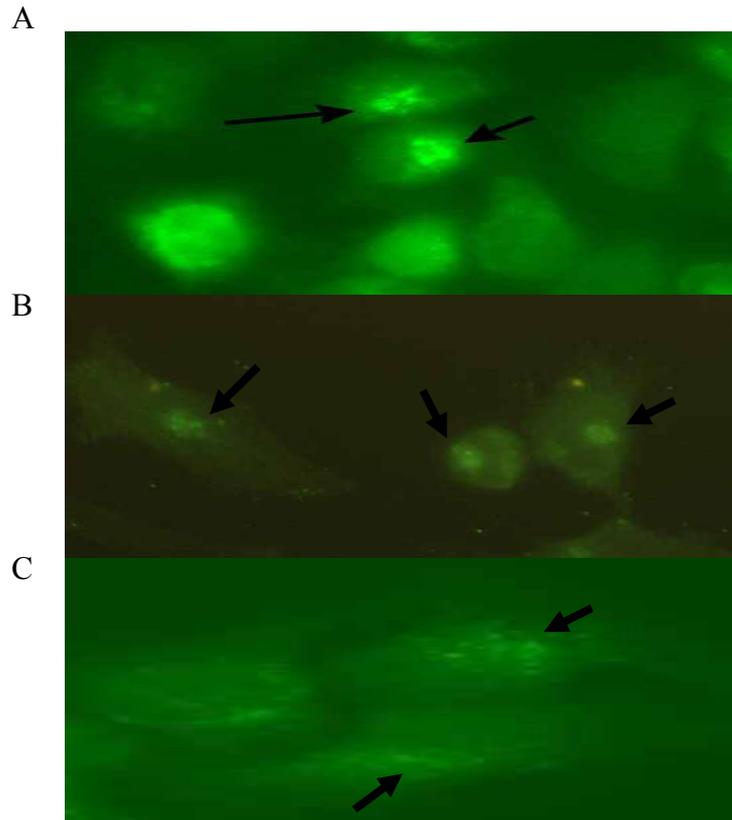
A: 利用抗體的偵測發現正常 Cx26 蛋白位於細胞膜(白色箭頭為 Cx26 蛋白表現)

B. 利用 FIAsH-EDT₂ Fluorescent Labeling 系統來偵測發現正常 Cx26 蛋白位於細胞膜 (黑色箭頭為 Cx26 蛋白表現)



圖四 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內正常 Cx30 蛋白表現

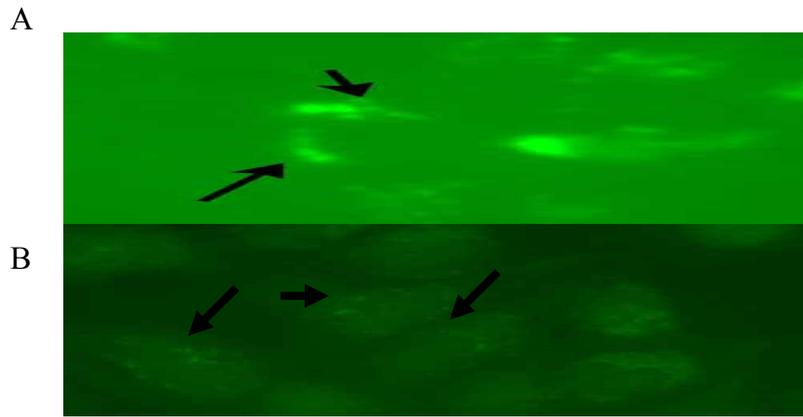
利用 anti-Cx30 rabbit 抗體來偵測發現正常 Cx30 蛋白位於細胞膜 (白色箭頭為 Cx30 蛋白表現)



圖五 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內突變 Cx26 蛋白表現

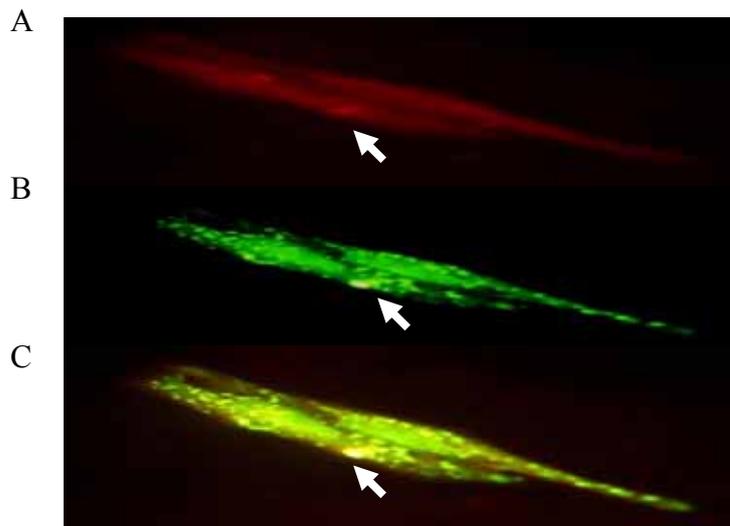
- A. Cx26 551G→A mutation 蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形
- B. Cx26 235 delC mutation 蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形
- C. Cx26 299-300delAT mutation 蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形

(箭頭指的是蛋白表現的位置)



圖六 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內 polymorphism Cx26 蛋白表現

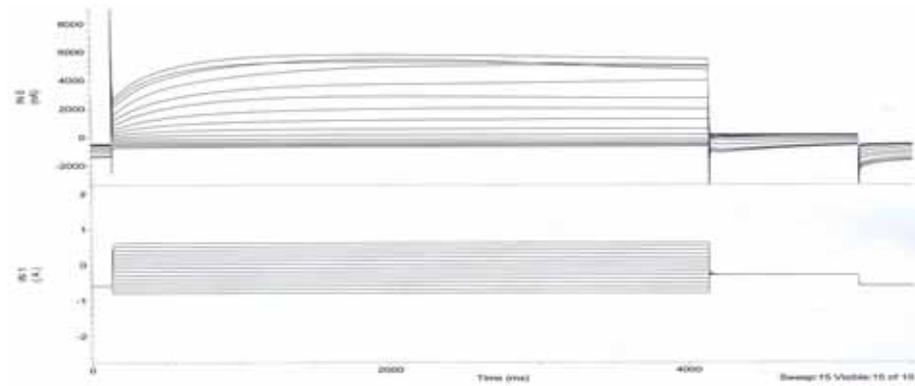
- A. Cx26 109G→A (polymorphism)蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形
- B. Cx26 compound heterozygous 79G→A/341A→G (polymorphism)蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形 (箭頭指的是蛋白表現的位置)



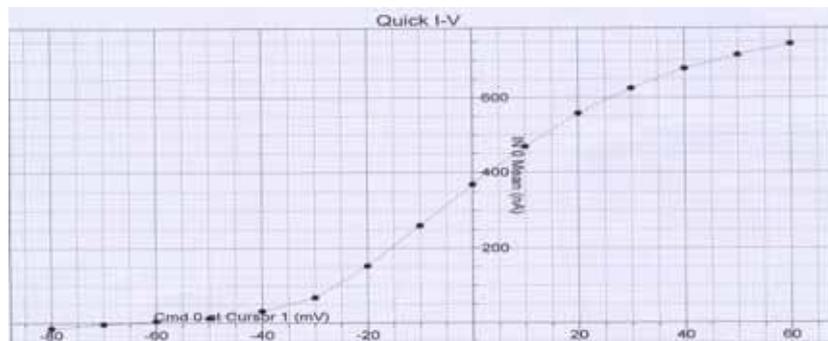
圖七 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內 co-transfection Cx26 and Cx30 蛋白表現

- A. Cx26 蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形(紅色)
- B. Cx30 蛋白表現在 HeLa 細胞株的情形(綠色)
- C. A 和 B 圖重疊的結果(黃色)

A



B



圖八 Electrophysiological Properties of KCNQ4 Currents

- (A) Two-electrode voltage-clamp current traces from a *Xenopus* oocyte injected with KCNQ4 cRNA. From a holding potential of -60 mV, cells were clamped for 4 s to voltages between -80 to -60mV in 10 mV steps, followed by a constant pulse to +30 mV.
- (B) Apparent open probability (p_{open}) as a function of voltage determined from tail current analysis of currents as in (A)