

中文摘要

聽障是一種常見的感音神經異常疾病，導致聽障的原因可分為遺傳基因突變、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（即語言學習前期 *prelingual period*）罹患重度聽障 (*severe or profound*)。Connexins 是個龐大的家族，它所構成的 *gap junction channels* 負責調控生理和發育過程中，離子和小分子的交流。每六個 connexin 形成一個 hemichannel (*connexon*)，再由兩個 hemichannel 組成一個 *gap junction*，目前有 5 個 connexin 基因突變與聽障有關包括：*GJB2* (Cx26)、*GJB3* (Cx31)、*GJB6* (Cx30)、*GJB1* (Cx32) 和 *GJA1* (Cx43)。

Cx43 基因是 connexin α 家族中第一個被發現與非症候群聽障有關的基因，我們收集台灣地區 190 位語言學習前期聽障患者，及 130 位聽力正常人血液 DNA 做 *Cx43* 基因的分析。在本次 *Cx43* 基因的篩檢結果，我們發現了 1 個新的 *Cx43* 基因的多型性 (*polymorphism*)：112A→C (K38Q)，在正常 130 位聽力正常的人和 190 位聽障患者中此種多型性所佔的比例分別為：3/130 (2.3%) 和 7/190 (3.68%)。另外也發現三個突變點，包括一個 *silent* 突變：837C→T/wt (G291G)、一個 *missense* 突變：205T→C/wt (S69P) 以及一個 *deletion* 突變：932delC/wt，其突變人數分別所佔的比例為：0.53% (1/190)，0.53% (1/190) 及 6.3% (12/190)，所以根據實驗結果顯示，在台灣 *Cx43* 基因

突變以 932delC/wt 最為普遍，這些結果對此類聽障家屬可提供遺傳諮詢。

我們利用分子生物學的方法，建構正常及突變的 *Cx43* 質體表現於 HeLa 細胞，以了解 *Cx43* 突變基因的致病機轉，實驗結果證明 *Cx43* 蛋白的第 932 個核苷酸缺失後，無法形成 gap junction。因此對於 *Cx43* 基因及其它相關基因功能的研究(*Cx26*、*Cx30*、*Cx31* 及 *Cx32*) 是需要更深入的探討以了解 Cx 家族 (connexin family) 在整個聽障成因中的致病機轉。

Abstract

Hearing loss is one of the most common sensorineural abnormal diseases. The incidence of profound prelingual deafness is approximately one per 1000 at birth and the cause of this disease includes many known genetic and environmental factors. Connexins, a large family of membrane proteins, are components of gap junction channels that regulate a variety of physiologic and developmental processes through the exchange of ions or small molecules. Each gap junction channel is formed with two hemichannels that are composed of six connexin subunits. Mutations in five members of the connexin gene family, including *GJB2* [connexin 26 (Cx26)], *GJB3* (Cx31), *GJB6* (Cx30), *GJB1* (Cx32) and *GJA1* (Cx43), have been shown to lead to hearing loss.

Because *Cx43* gene is the first α connexin gene to be associated with non-syndromic deafness, we have sequenced the coding region of *Cx43* gene from 190 Taiwanese patients with prelingual deafness and 130 unrelated normal individuals. In the 190 deaf patients, 14 were found to have mutations in the *Cx43* coding region (7.37%). Twelve of these 14 patients were found to be heterozygous for 932delC (6.32%), one heterozygous for 205T→C (0.53%), and one heterozygous for 837 C→T (0.53%). Heterozygous 932delC was identified to be the most common type of mutation found in *Cx43* mutants in this study. In addition, new polymorphism 112A→C was observed in both deaf patients (3.68%) and normal individuals (2.3%).

To understand the role of 932delC in pathogenesis, two plasmids have been constructed to contain wild type *Cx43* gene and 932delC *Cx43*, respectively. These two plasmids were transferred into HeLa cells and

expressed. Our data indicate that the 932 delC in the *Cx43* gene may inhibit the formation of gap junction in HeLa cells. The abnormal protein function caused by Connexin gene mutation might provide an important insight into the mechanisms leading to hearing loss.

序論

(Introduction)

聽障可因遺傳基因突變或環境因素，或兩者兼之引起的，環境因子主要包括腦膜炎 (meningitis)、腮腺炎 (mumps)、週產併發症 (perinatal complications)、母子感染 (materofetal 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 等 1993)。另有 1/1000 到成年前聽障，此型較不嚴重且為漸進性，遺傳因素佔多少比例仍未清楚。另外為晚發型 (late onset)，聽力損失大於 65 分貝 (dBHL)，年齡 30~50 歲間佔全人之 0.3%，而 60~70 歲約佔 2.3%，一般認為此類型是遺傳與環境因素之共同作用而產生 (Kalatzis 和 Petit, 1998)。聽障依數個標準來分類，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 等., 2002)。

由於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)。如 *connexin(Cx)* 基因--- *connexin 26 (Cx26)*、*connexin 30 (Cx30)*、*connexin 31 (Cx31)*、*connexin 32(Cx32)* 及 *connexin 43(Cx43)* 等。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(Bruzzzone 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 、 β 和 γ 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 Bruzzzone, 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 (Bruzzzone 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) (Paricia 等 1998)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)(附圖一)。在內耳感覺神經上皮上，gap junction 在聽覺的傳導上將扮演一個重要角色，幫助 K⁺從毛細胞(hair cell)回到耳蝸內淋巴系統(cochlear endolymph)的再循環。(Kikuchi 等 1995)，故若是 gap junction 蛋白質的基因產生突變對聽力的敏感度具有重要的影響。因此我們實驗室將研究重心先著重在各種 Cx 基因的研究。在聽障患者中以 Cx26 基因盛行率最高，我們實驗室也已完成 Cx26 基因的篩檢，此部份結果已發表於歐洲遺傳雜誌 European Journal of Human Genetics (2002) 10, 495-498。本篇論文著重在另一個 Cx 基因---Cx43 基因的研究。

Cx43 基因位於染色體 6q21-q23.2 的位置 (Corcos 等 1993)，Cx43 基因可譯碼出(encode)含 382 個胺基酸的蛋白，其具有四個穿膜區域(transmembrane domain)及在細胞質內有單一細胞內環(single intracellular loop)和二個細胞外環(extracellular loops)，其胺基端區(amino terminal region)和羧基端區(carboxyl terminal region)皆位在細胞質內(Zhang and Nicholson 1994；Goodenough 等 1996)(圖七)。

Cx43 蛋白被發現表現在眼睛、牙齒(Murakami 等 2001)、指甲、心臟及耳蝸(Pazneka 等 2003, Murakami 等 2001, Britz-Cunningham 等 1995 and Liu 等 2001), 有 17 個被發現突變的位置與 ODDD (Oculodentodigital dysplasia)有關(Paznekas 等 2003); Cx43 若發生 S364P 的突變, 則會影響心臟的發育(Britz-Cunningham 等 1995); 而在 Cx43 靠近 N 端的位置倘若發生 V24A 及 L11F 的突變則會造成聽障(Liu 等 2001) (附表一), 這是 Connexin α group 中第一個被報導與聽障有關的基因。

依據文獻的探討, 可得知先天性聽障大多是語言學習前感音神經性重度聽障, 以 Cx 基因突變為主, 然而目前台灣地區並無任何關於 Cx 基因的研究(除了 Cx26 外), 因此, 為建立台灣地區聽力正常 Cx43 基因之多型性資料庫及分析 Cx43 基因突變, 是為此研究的動機。故收集 190 位語言學習前感音神經性中度至重度聽障患者, 針對 Cx43 基因進行序列分析及發展臨床分子診斷方法, 並研究 Cx43 基因突變在細胞內 Cx43 蛋白表現以更深入了解其致病機轉。

材料與方法

(Material and Method)

一、檢體來源：

1. 正常人的血液檢體係透過自願的方式，抽取周邊血液 5 ml，共有 130 位。
2. 病人資料：

收集 190 位台中啟聰學校學生，平均年齡為 2-18 歲，經家屬同意後，抽取周邊血液 5 ml。聽障學童經由中山醫學大學耳鼻喉科醫師詳細檢查，排除環境因素及學習後語言聽障 (postlingual deafness)，主要以非症候群學習語言前聽障 (nonsyndromic prelingual hearing loss) 為對象，此包含家族性聽障及偶發性個案 (sporadic deafness)，並依空氣導平均聽閾 (500, 1000 及 2000Hz) (ACPTA) 結果區分聽障輕重程度：

Degree	ACPTA range
Mild	$20 < \text{ACPTA} \leq 39$ dBHL
Moderate	$40 < \text{ACPTA} \leq 69$ dBHL
Severe	$70 < \text{ACPTA} \leq 89$ dBHL
Profound	$\text{ACPTA} \geq 90$ dBHL

二、細胞株來源：

人類子宮頸癌細胞(HeLa cell) 購自食品工業發展研究所菌種中心。

三、抗體來源：

(1) Human anti-mouse connexin 43 polyclonal antibody-購自 BD Biosciences 公司。

(2) Goat anti-mouse IgG fluorescein conjugated secondary antibody 購自 Chemicon 公司。

三、Genomic DNA 的抽取：

以含有 heparin 的 5 ml 血液，利用 PUREGENE DNA Isolation Kit(Gentra；方法參照附錄 A)進行 genomic DNA 的抽取。純化後的 genomic DNA 以光度比色儀(Spectrophotometer；DU-640，Beckman)測波長 260nm 的相對吸光值及 260nm/280nm 吸光比值，由此得知 DNA 的量與質，將此 genomic DNA 保存至-20°C。

五、Cx43 基因的突變篩選-DNA 單股構型多形性分析：

(Single Strand DNA Conformation Polymorphism; SSCP)

我們主要針對 Cx43 基因整個 coding region 進行突變點的

偵測篩選，CX43 基因全長 1148bp，我們將其分為 8 段，各用 8 對 primer 分別夾出，每個區段前後都 overlap 34 到 65bp 不等，各段 primer 序列如下：

CX43-1Forward: 5'-GGAGTTCAATCACCTTGGCGT-3'

CX43-1Reverse: 5'-CAGACTGCTCATCTCCCCAG-3'

CX43-2Forward: 5'-GGAAGGTGTGGCTGTCAGTA-3'

CX43-2Reverse: 5'-CACATAGAACACATGAGCCAGG-3'

CX43-3Forward: 5'-GGTCCTGCAGATCATATTTGTG-3'

CX43-3Reverse: 5'-CCTCGCATTTTCACCTTACC-3'

CX43-4Forward: 5'-TGCCCAAAGTATGGTGTC-3'

CX43-4Reverse: 5'-TGCAAGTGTAACAGCACTCAA-3'

CX43-5Forward: 5'-TATCCTCTTCAAGTCTATCTTTGAGGT-3'

CX43-5Reverse: 5'-GAGTTCAATGATATTCAAGGCC-3'

CX43-6Forward: 5'-TTTCCTCTCTCGCCCCAC-3'

CX43-6Reverse: 5'-GCAGCCATTGAAATAAGCAT-3'

CX43-7Forward: 5'-GACTGTGGGTCTCAAAAATATGC-3'

CX43-7Reverse: 5'-GTTAGAGATGGTGCTTCCCG-3'

CX43-8Forward: 5'-CAGAACAAAATCGAATGGGG-3'

CX43-8Reverse: 5'-TCTTGATGCTTTCAAGCCTGT-3'

運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以擴增出各段完整的 coding sequences，反應體積為 25 μ l，溶液濃度為 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)，50 mM KCl，1.5

mM MgCl₂ , dNTP 100 μM , 0.25 units/25 μl pro Taq DNA polymerase (Promega) , 200 μM primers , 4 % DMSO 及 100 ng genomic DNA , 將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行 , 反應條件依各片段大小及 primer 不同而有所變化。取反應溶液 5 μl 以 2 % 洋菜膠(agarose)電泳分析 , 以確定合成片段長度是否正確及 PCR 產物的品質 , 再運用 DNA 單股構型多形性分析(Single Strand DNA Conformation Polymorphism ; SSCP)來進行大量的篩選(圖一) , 當發現 DNA 單股構型中變異現象表示可能由於突變點造成 DNA 有不同的構型 , 再進一步針對疑似具有突變點之片段進行 DNA 序列分析 , 以突變型當做正的對照組 , 以已知正常檢體(已確定正常之定序)做為負的對照組 , 快速進行實驗對照組的篩選。因此將 20μl PCR 反應結束後的產物加入 10 μl formamide loading dye , 加熱 95 °C 10 min 後立即放置冰上 , 其目的在於將雙股的 DNA 打開成單股 , loading 20 μl 於含 5 % glycerol 、0.5 倍 TBE buffer 之 8 % Polyacrylamide (acrylamide:bisacrylamide =49:1) 膠體電泳 , 電泳條件為 12 °C 、15mAmp 、14 小時進行 DNA 片段的分離 , 電泳完成後將膠體使用 DNA Silver Staining Kit (Pharmacia Biotech) (方法參照附錄 J) , 膠體銀染呈色後放置室溫自然乾燥後存放。

六、Cx43 基因的分析：

我們主要針對 Cx43 基因整個 exons 進行突變點的偵測，Primer 採用 CX43-1Forward: 5'-GGAGT TCAA TCACC TTGGCGT-3'，以及 CX43-8Reverse:5'-TCTTGATGCTTTCA AGCCTGT-3'然後運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以擴增出各段完整的 coding sequences，反應體積為 25 μ l，溶液濃度為 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，dNTP 100 μ M，0.25 units/25 μ l pro Taq DNA polymerase (Promega)，200 μ M primers，4 % DMSO 及 100 ng genomic DNA，將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行，反應條件依 exons 不同而有所變化。取反應溶液 5 μ l 以 2 % 洋菜膠(agarose)電泳分析，以確定合成片段長度是否正確及 PCR 產物的品質，再使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)純化 PCR 產物(方法參照附錄 B)。定序使用 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems；方法參照附錄 C)及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)進行兩端序列比對並定序。

七、建構 Cx43 cDNA 載體：

取 100 ng genomic DNA ，使用 PCR 以擴增出整段的 coding sequences ，PCR3.1(invitrogen)質體(圖一)包含有 cytomegalovirus immediated early promoter (pCMV)使其能在哺乳類細胞表現及含 Ampicillin resistance 基因 。Primers 利用 forward primer 加上 *Hind* III 限制酶的切點(Cx43-*Hind* III : 5'ATG AAG CTT ATG GGT GAC TGG AGC GCC) ，reverse primer 加上 *Not* I 限制酶切點(Cx43-*Not* I : 5'ATG GCG GCC GCC TAG ATC TCC AGG TCA TCA) ，運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以擴增出整段完整 Cx43 coding region 從 start codon 至 stop codon 全長 1149 bp ，反應體積為 25 μ l ，溶液濃度為 10mM Tris-HCl(pH 9.0) ，50mM KCl, 1.5mM MgCl₂ ，dNTP₂ 200 μ M ，0.25 units/25 μ l pro Taq DNA polymerase (Promega) ，200 μ M primers ，4% DMSO 及 50 ng /25 μ l genomic DNA ，將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中 ，進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應 ，反應條件為 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘 ，94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、55 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘(30 個循環數) ，72 $^{\circ}$ C 20 分鐘 ，最後溫度維持在 4 $^{\circ}$ C 。再取 PCR 產物和 PCR 3.1(invitrogen)質體(圖一)之 5 : 1 的莫耳數比 ，反應總體積為 10 μ l ，利用 T4 DNA ligase(Gene Mark)在 25 $^{\circ}$ C 下作用 1 小時 ，取其產物 4 μ l 以 1% 洋菜膠 (agarose)電泳分析 ，剩下的 3 μ l 經 transformation 送入 XL1-blue

cell (competent cell；方法參照附錄 D)將其塗抹在含有抗生素(50 μ g/ml Ampicillin)的 Luria- Bertani 培養基(LB agar)上，利用抗生素篩選出含嵌入基因片段的質體，將培養基置於 37°C 過夜培養，再挑單一菌株到含抗生素(50 μ g/ml Ampicillin)的 5 ml LB 培養液中，於 37°C 培養 4 小時，再使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN；方法參照附錄 F)將質體抽出，利用相同的 primer 進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應作初步確認及限制酶 *Hind*III，*Not* I 作用 1 小時跑膠確認後，再利用 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems 及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer)(Applied Biosystems)進行兩端序列比對，確認質體無其它突變。

八. 建構突變的 *Cx43* cDNA 載體：

將已確認正常的 *Cx43* 質體，利用 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE；方法參照附錄 E)，做出 *Cx43* 突變的質體，然後取 3 μ l 經 transformation 送入 XL1-blue cell 將其塗抹在含有抗生素(50 μ g/ml Ampicillin)的 Luria-Bertani 培養基(LB agar)上，利用抗生素篩選出含嵌入基因片段的質體，將培養基置於 37°C 過夜培養，再挑單一菌株到含抗生素(50 μ g/ml Ampicillin)的 5 ml LB 培養液中，於 37°C 培養 4 小

時，再使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN；方法參照附錄 G)將質體抽出，利用限制酶 *Hind*III，*Not* I 于 37°C 作用 1 小時跑膠確認含有 Cx43 的片段後，然後以 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems 及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer)(Applied Biosystems)進行兩端序列比對，確認質體除我們做的 Cx43 定點突變以外無其它突變。

九 微脂粒法之基因轉殖感染實驗：

為了深入探討 Cx43 蛋白於細胞內的分佈情形，首先，將 HeLa 細胞大量培養於 25 cm² Flasche 中，在移至 3.5 cm² 培養皿中培養 (NUNC)，細胞培養液含 90% MEM with non-essential amino acids and Earle's BSS，10% Fetal bovine serum，1% Penicillin and streptomycin (GIBCO BRL)，當細胞濃度達到 0.9-4.0×10⁵ (方法參照附錄 E)，待細胞長至 80 % 時即可使用微脂粒法基因轉殖感染 (EffecteneTM Transfection Reagent Kit; QIAGEN；方法參照附錄 G)，將質體送入 HeLa 細胞，此培養皿置於 5 % CO₂，37°C 恆溫培養箱內培養 48 小時。

十 細胞免疫螢光染色

細胞在微脂粒法基因轉殖感染(Effectene™ Transfection Reagent Kit; QIAGEN)後的 24 小時，將細胞拆內含至 3 片 18mm² coverslip 的 3.5 cm² 培養皿中(NUNC)中，待 24 小時後移除舊培養液，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重覆 3 次，予 2 ml 4% paraformaldehyde 將細胞固定於室溫下作用 20 分鐘後，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重覆 3 次，繼加入 2ml 含 1% BSA- 0.1% Triton X-100 之 PBS 溶液對細胞進行通透，於室溫下作用 25 分鐘，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重覆 3 次，取 5 ng/ml 之 100 μ l mouse anti-Human connexin 43 antibody (BD biosciences)滴於細胞上置於 4°C 作用 16 小時後，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重覆 3 次，再取 20 ng/ml 之 100 μ l goat anti-mouse IgG fluorescein conjugated secondary antibody(Chemicon)滴於細胞上置於 37°C 作用 30 分鐘後，以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重覆 3 次，最後以 d₂H₂O 沖洗，以 Mounting medium(biomedica)封片，使用螢光顯微鏡 (Zeiss, Axioplam) (excitation =488; emission=507)觀察 connexin 在細胞內之分佈螢光位置及細胞型態。

結果

(Results)

本研究收集 130 位聽力正常人以及 190 位聽障患者先以 SSCP 的方法快速進行 *Cx43* 基因的篩檢(圖一)，若發現異常或基因多型性，則送定序作進一步的確認。在本次 *Cx43* 基因的篩檢結果，我們發現了 1 種新的 *Cx43* 基因的多型性 (polymorphism)：112A → C(K38Q)/wt、在正常 130 位聽力正常的人和 190 位聽障患者中此種多型性所佔的比例分別為：3/130 (2.3%)和 7/190(3.68%)(表一)。另外在本研究中經由序列分析的比對(NCBI NM-000165 Human)發現有兩個核苷酸位置的改變：1122A→G (R374R) 及 1127G→A(R376Q)，且這改變在我們所有做序列分析的正常人(26 人)和聽障患者中(90 人)皆有發現。

在本次 190 位聽障患者進行 *Cx43* 基因的篩檢比對中，發現有 3 個新的突變點：873C → T/wt(G291G)、205T → C /wt(S69P) 及 932delC/wt，其分別所佔的比例為：0.53% (1/190)，0.53%(1/190)及 6.3% (12/190) (表二、表四)。在 *Cx43* 第 873 個核苷酸由 C 變成 T，胺基酸並沒有改變是為 Silent mutation；而當第 205 個核苷酸由 T 變成 C 時，第 69 個胺基酸由 Serine 變成 Proline，所以為 Missence mutation；在 *Cx43* 基因 932delC 的突變點位置接近 C 端殘基，在本

次 190 位聽障患者進行 *Cx43* 基因的篩檢比對後，總共發現有 12 位有突變(6.3%)，且都屬於同一點的缺失突變 (deletion mutation)，在 932delC 的突變造成第 311 個胺基酸由 Alanine 變成 Valine 且後面整段 Frameshift，並在第 347 個 condon 停止(表三)。為能更深入了解 932delC 這個突變是否為遺傳性(inherited)亦或是偶發性(de novo)，故收集 7 個聽障家族(共 12 位患者家屬成員含 5 個聽障患者的雙親及 2 位患者的母親)進行 *Cx43* 基因分析(表五)。針對 932delC(heterozygous) 患者的雙親進行 *Cx43* 基因序列比對結果，發現除 THL184 患者之家族外，其餘 4 個 *Cx43* 基因 932delC 患者的父母親與 2 名患者的母親 *Cx43* 皆為正常，從這結果可得知在這 4 個 *Cx43* 基因 932delC 患者皆為 de novo (另 2 名由於僅母親接受篩檢，所以結果不計算在內)，由此結果可推論，在 *Cx43* 基因，僅單一條對偶基因發生 932delC，就會對其聽力造成影響。

針對 THL184 患者家族 *Cx43* 基因得篩檢發現，父親及患者同為 932delC/wt (heterozygous)、母親為正常，這樣的分析結果證明，THL184 患者的 *Cx43* 932delC 突變係遺傳自父親(表五)。

為了解 *Cx43* 在細胞內蛋白的表現與分佈，以及各個突變對 gap junction 是否有影響，我們建構了 *Cx43* cDNA 的載體(包括正常 *Cx43*; 205T→C 突變及 932delC 突變)經由微脂粒法基因轉殖入 (transient transfection) HeLa 細胞，因 HeLa 細胞不含內生性(endogene)

connexin 蛋白，故常被選擇用於 in vivo 表現 connexin 的細胞(George 等 1998)，將以被基因轉殖感染的 HeLa 細胞於 48 小時後，利用細胞免疫螢光染色法進行分析，此實驗方法所使用的第一抗體是將人類的 Cx43 蛋白中某一段細胞質內的 peptide 注入老鼠體內所產生的單株抗體，利用螢光顯微鏡觀察正常 Cx43 蛋白、205T→C(S69P)及 932delC 突變(A311V)蛋白在細胞內分佈的情形(圖六)，實驗結果發現正常 Cx43 的蛋白經過免疫螢光染色後，在細胞質內以及細胞膜上可發現螢光，且在細胞與細胞的連接處亦可發現相同的螢光，由此可知 Cx43 蛋白會被成功地運輸至細胞膜(plasma membrane)，並且可與鄰近的 HeLa 細胞形成 Gap junction(圖六)，而 932delC 突變的 Cx43 蛋白不論在細胞質內或細胞膜上都有發現綠色螢光，但未被發現有形成 Gap junction，然而在未被基因轉殖感染的 HeLa 細胞也有不明顯模糊的螢光訊號出現，這可視為背景的干擾而非真正蛋白的位置。

討論 (Discussion)

本研究是分析在台灣地區語言學習前期非症候群聽障患者的 *Cx43* 基因，總共收集 190 位聽障患者及 130 位聽力正常人，以建立 *CX43* 基因多型性的資料，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及優生保健。

五個常被報導與語言學習前期非症候群聽障有關的五個 connexin 家族的基因，包括四個 Gap junction β 家族的 *CX26* (GJB2; Kel 等 1997)，*CX31* (GJB3; Xia 等 1998 and Liu 等 2000)，*CX30* (GJB6; Girfa 等 1999)，*CX32* (GJB1; Ber 等 1993)，以及 1 個 Gap junction α 家族的 *CX43* (GJA1; Liu 等 2001)；在本次針對 *CX43* 基因所做的篩檢 190 位聽障孩童及 130 位聽力正常人中，並沒有發現已知正常 *Cx43* 之 32 個位置的多形性 (polymorphism)，反而在所有接受 *Cx43* 定序分析比對的受檢者中均發現 1122A→G/ (R374R) (正常人：26 人；聽障患者：90 人) 以及 1127G→A (R376Q) (正常人：26 人；聽障患者：90 人) 這兩個點的改變，因為在正常人及聽障患者都有發現這樣的改變且和 NCBI 發表的序列不一樣，所以我們可以推論所發現在 *Cx43* 這兩個點可能具有種族的特異性，而 1122A→G (R374R) 以及 1127G→

A (R376Q)這兩個點的族群特異性，目前尚無人發表，是故推論這兩個點的核苷酸改變，應當為台灣族群 *Cx43* 特有的特異性。

已知在非裔美國人族群中，找到 *Cx43* 基因與先天非症候群聽障有關兩個接近 N 端 Domain 的突變點: L11F 與 V24A(Liu et al.;2001)，在本次針對 190 位聽障孩童及 130 位聽力正常人 *CX43* 基因的篩檢並沒有發現類似的突變點，而 Oculodentodigital dysplasia (ODDD)中與症候群聽障有關的 8 個突變點: Y17S，S18P，G22E，K23T，L90V，Y98C，G138R 和 V216L (Paznekas 等 2003)，而我們所篩檢的皆為單純非症候群的聽障患者，因此在這次的篩檢中並沒有發現這些突變點。

在本研究分析 *Cx43* 基因共找 3 個位置發生核苷酸的改變：205T→C/wt、873C→T/wt、以及 932delC/wt。其中 205T→C/wt (1 位；0.53%)第 69 個胺基酸由 Serine 變為 Proline，是為 Missence mutation。已知在此位 205T→C/wt 突變的患者其家族中父親聽力正常、母親聽障，包含自己 6 個兄弟姊妹中有 3 個聽障，因無法取得其父母及兄弟姊妹的檢體而無法推知其突變是來自遺傳或是 de novo，由於兄弟姊妹中也有聽障，所以推論此點的突變來自遺傳的可能性較高。由於 *Cx43* 第 69 個胺基酸剛好坐落於蛋白穿過細胞膜外所形成的第一環的位置上，在 Connexin 細胞外的 2 個環關係到 Hemichannel 形成的關鍵，如果發生突變會影響到蛋白分子的穩定性(G.Dahl 等

1992, C.I Foote 等 1998, Vlidimir 等 2000), 在 Cx26 若發生 D66H (在細胞膜外第一環的位置上)的突變則會引起聽障 (E. Maestrini 等 1999), 另外 Cx43 的第 69 胺基酸 (Serine)在各物種間的 Cx43 基因具有高度的保留性 (如表六), 可見在 Cx43 此位置的胺基酸佔有重要的地位, 所以我們認為 Cx43 基因 205T→C/wt 的突變, 會造成聽障。

另一個新發現的 873C→T/wt (THL019), 已得知其雙親為聽力正常, 因無法取得其父母的檢體而無法推知其突變是否與遺傳有關或是 de novo。而此突變點其胺基酸並沒有改變 (G291G), 所以屬於 Silent mutation, 理論上在蛋白質的功能上不會造成影響, 然而在先前有研究報告指出 Silent mutation 會干擾 RNA splicing 的正確性與專一性而造成表現型 (phenotype)的不同 (Cartegin 等 2002), 因此我們所發現的這 silent mutation 是否會影響聽力, 尚待後續的研究來證明。

另外, Cx43 基因 932delC/wt (A311V)這個突變點, 是一種Cx43 C 端的缺失突變, 在本次的研究中發現所佔的比例最高 (12位, 6.3%)。從我們家族分析的結果可知有4位聽障患者是屬於de novo、1位聽障患者屬於遺傳性及5位聽障患者目前無法確定是de novo或遺傳性。在我們實驗室目前的研究中, 這12位Cx43基因 932delC/wt的聽障患者, 除了1位聽障患者 (THL184)還有其他基因的突變外, 其餘皆只有這個突變。根據這些研究結果我們認為單一 Cx43 基因 932delC/wt (Heterozygous)即可造成聽障。而在THL184患者在我們實驗室的研究

中其本身帶有 *Cx43* 932delC/wt (Heterozygous) 外，也帶有 *Cx26* 235delC/235delC (Homozygous)，分析其家族成員的結果得知其 *Cx43* 932delC/wt 的突變遺傳來自父親，*Cx26* 235delC/235delC 其中一條對偶基因遺傳來自父親而另一條來自母親。根據 Wang 等人(2002)的研究結果指出 *Cx26* 基因的 235delC/235delC (homozygous) 即可造成聽障。在 *Xenopus* 蛙類的研究中也指出，*Cx26* 和 *Cx43* 蛋白都有表現在皮膚的上皮細胞，而有缺陷的 *Cx26* 除了本身的失去作用以外，還會影響到正常 *Cx43* 的功能(Rouan 等2001)；相對的若 *Cx43* 發生突變，是否也會影響到 *Cx26* 的正常功能目前還不清楚，因此這兩種 Cx 蛋白之間的交互作用值得我們更進一步的探討。

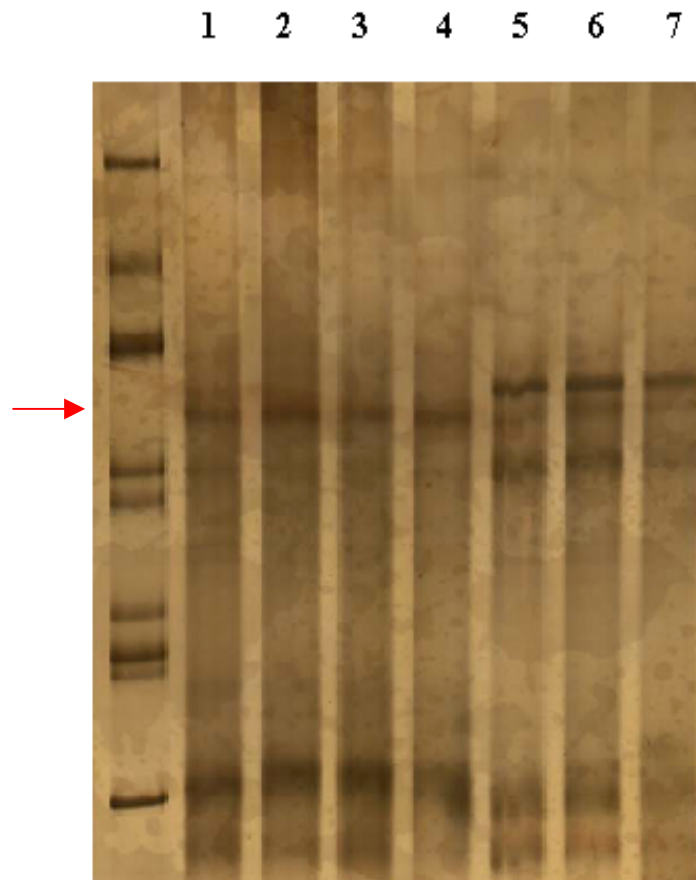
在 932delC/wt (A311V) 的突變主要會引起 frameshift，並在第 347 個核苷酸產生停止密碼(stop codon)而產生不完整的蛋白，而此種改變主要影響的 *Cx43* 蛋白的 C 端 (圖七)。在 Cx 家族裏 Cx 基因 C 端的殘基，除了 *Cx26* 較短比較不會影響其正常功能外，具有較長 C 端殘基的，例如 *Cx43* 和 *Cx46* 其 C 端殘基含有磷酸化的位置 (Phosphorylation site) (Vladimir 等 2000)。Britz-Cunningham (1995) 等人的研究指出 *Cx43* 靠近 C 端的胺基酸殘基若發生改變，例如 S364P 會影響 *Cx43* 蛋白的磷酸化進而造成心臟發育不完全，而且突變的 *Cx43* 蛋白亦會影響到正常 *Cx43* 的功能。所以我們推論這 12 位 *Cx43* 基因 932delC/tw 突變，雖然只有一條對偶基因發生突變，但是正常的

對偶基因很有可能受到突變對偶基因的影響而使其整體的功能下降。另外，932delC 的突變造成第 311 胺基酸 Alanine→Valine 的改變，而且後面整個 Frameshift，並在第 347 個胺基酸停止，是不是因此這 12 位患者除了造成聽障外，是否也會有心臟方面的問題，還有待進一步的追蹤研究。

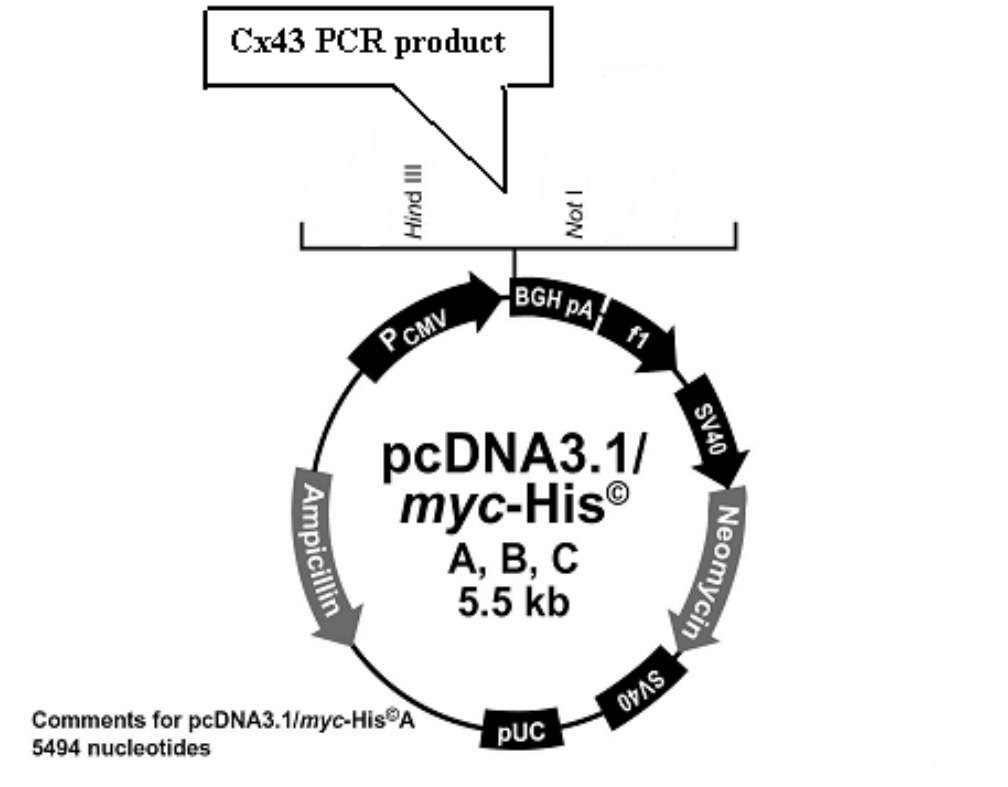
Ahmad (2001) 等人在 Cx32 基因的研究中發現其 C 端含有 Calmodulin-binding site，此區域的移除將影響其 Connexon 的形成，而在 COS7 細胞中，針對 Cx32 第 215 個胺基酸以後缺失(Cx32 C 端的缺失)的研究也發現將造成 Cx32 堆積在細胞內無法形成 gap junction，因此在 Cx 家族中其 C 端在 gap junction 的功能上可能扮演一定的角色。且 Cx43 基因第 311 胺基酸 (Alanine) 在各種物種和 Cx 家族中具有高度的保留性 (表六)，可見這胺基酸在演化上具有重要性，而 Cx43 932delC 在 311 胺基酸由 Alanine 變為 Valine 可能會對 Gap junction 形成產生影響。

本篇研究繼 Cx26 基因之後，建立台灣地區語言學習前期非症候群聽障患者的 Cx43 基因的資料庫，對於 Connexin 基因在聽障中的研究有重大意義，從研究中可得知語言學習前期非症候群聽障並非單基因遺傳，對於 Cx43 基因及其它相關基因研究(Cx30, Cx31, Cx32)是需要其它更深入的研究以了解致病機轉。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。

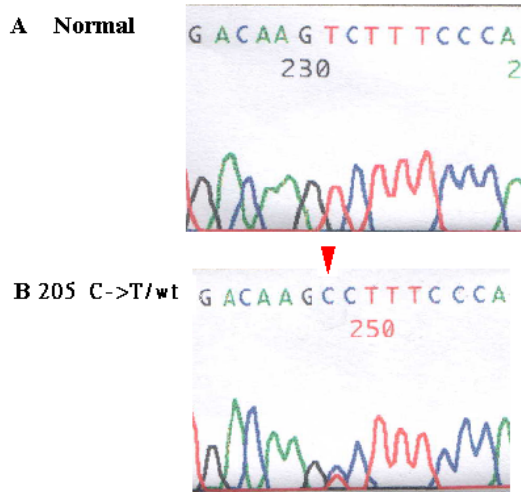


圖一 *Cx43* 基因之 DNA 單股構形多型性分析(Single Strand DNA Conformation Polymorphism, SSCP)。Lane 1、2、3、4：*Cx43* 基因 932delC 突變型；Lane 5、6、7：正常人 DNA。紅色箭頭指出正常與 932delC 突變兩種 DNA 在 8%Acrylamid 膠上跑出來的相異處(條件:14 毫安培,15°C,時間 15 小時)。



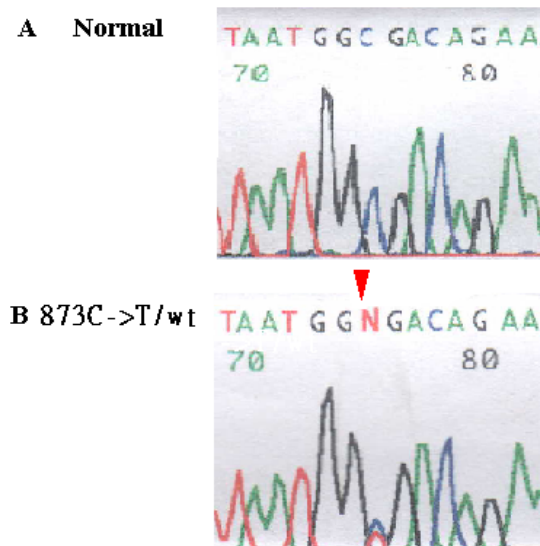
圖二 Cx43 蛋白表現質體的建構。

我們取 *Cx43* Normal 與 205C→T, 932delC 突變患者 genomic DNA，分別在 forward 及 reverse primer 分別加上 *Hind* III 限制酶的切點，進行 PCR 反應。擴增出來的 PCR 產物涵蓋整段 *Cx43* coding region 從 start codon 至 stop codon 全長 1149 bp，利用設計好的限制酶切點，進行 subclone 至 pcDNA 3.1 vector (Invitrogen)，由於 pcDNA 3.1 vector 上含有 CMV promoter 可以在細胞內表現蛋白。



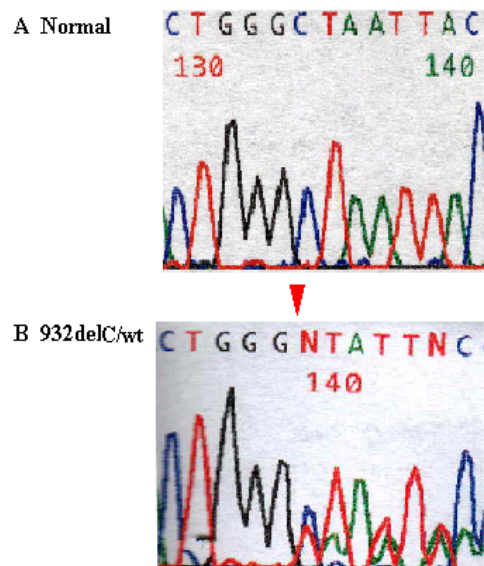
圖三 Cx43 基因突變的定序：205T→C/wt

A : Normal B :Hetrozygous 205T→C/wt。紅色箭頭所指為突變點，在 normal 原本是 T 變成 C，第 69 個胺基酸由 Serine 變為 Proline，是為 Missence mutation。



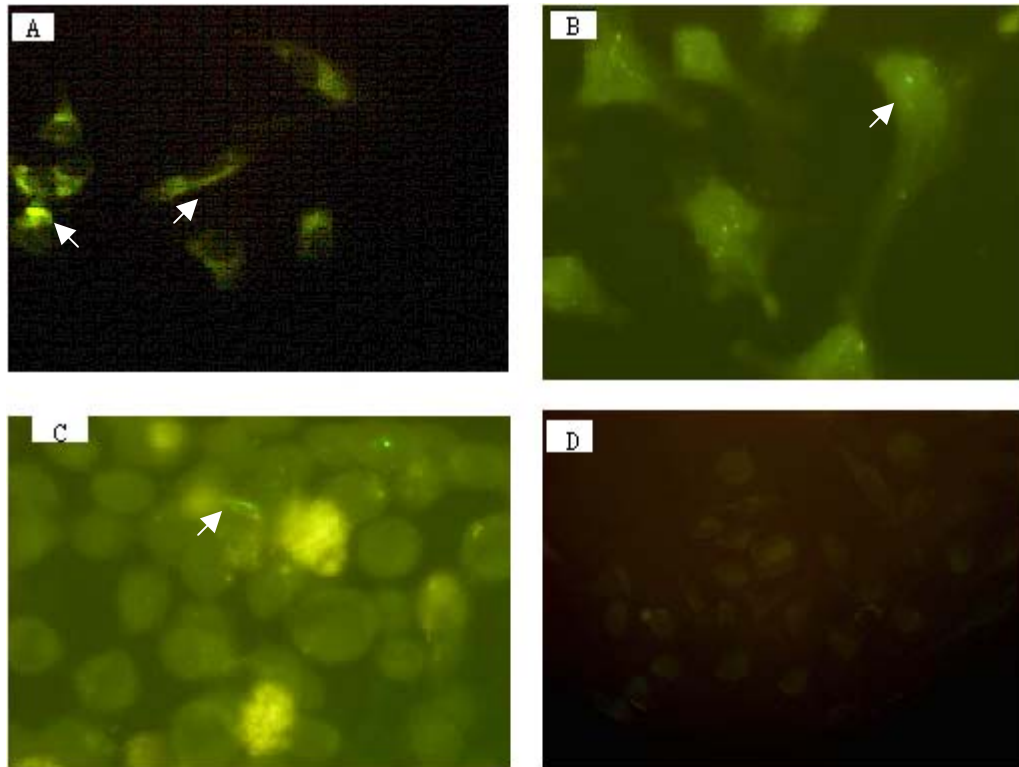
圖四 Cx43 基因突變的定序：873C→T/wt

A : Normal B :Hetrozygous 873C→T/wt。紅色箭頭所指為突變點，在 normal 原本是 C 變成 T 此突變為 Silent mutation，沒有造成胺基酸的改變。



圖五 Cx43 基因突變的定序：932delC/wt

A : Normal B : Hetrozygous 932delC/wt。紅色箭頭所指為突變點，在 normal 原本是 T 變成 C，造成 Cx43 蛋白 在 311 胺基酸由 Alanine 變為 Valine，且引起 frameshift，並在第 347 個核苷酸產生停止密碼(stop codon)而產生不完整的蛋白。



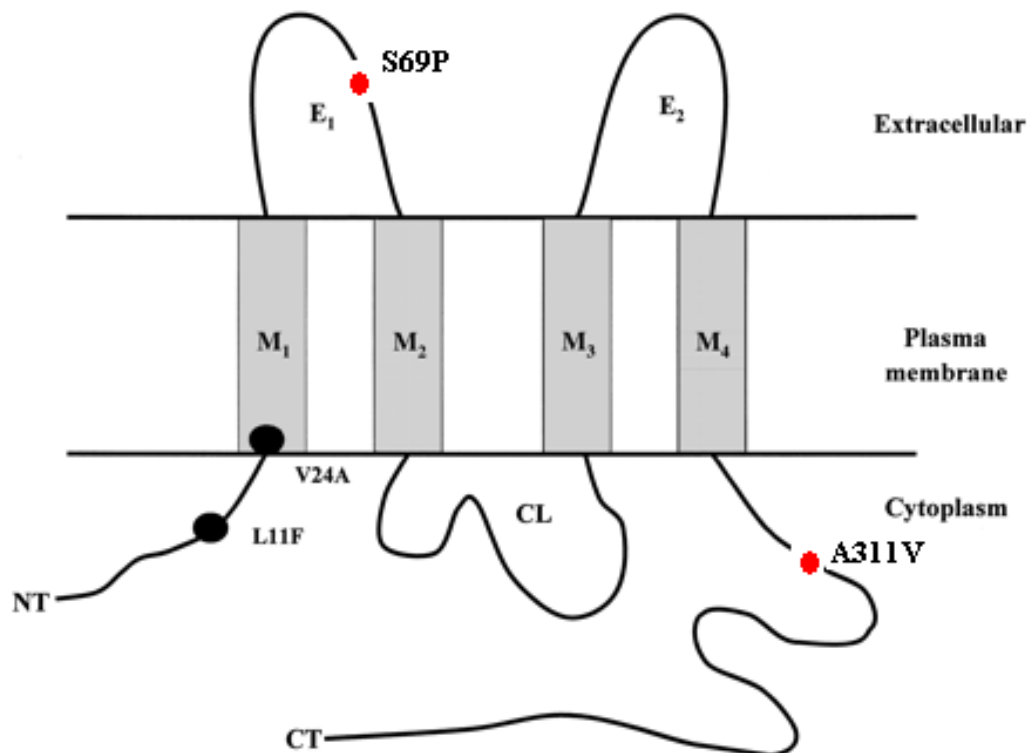
圖六 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內 Cx43 蛋白表現

A: 正常 Cx43 蛋白位於細胞膜。白色箭頭為 Cx43 蛋白表現位置，我們見到 Cx43 蛋白不只可表現在細胞膜還會與鄰近細胞的 Cx43 蛋白形成 Gap junction。

B: Cx43 112T to C 突變所生成的蛋白。可在細胞質內發現，但是卻沒有看到在細胞膜上也沒有與其他細胞形成 Gap junction 的情形。

C: Cx43 932delC 突變所生成的蛋白。可在細胞膜上發現，但是卻沒有看到與其他細胞形成 Gap junction 的情形。

D: 未被基因轉殖感染的 HeLa 細胞。



圖七 Cx43 的結構和 4 個與非症候群聽障的突變點

- Liu Z X et al., 2001 所發表的 Cx43 突變點，此 2 突變點與非症候群聽障有關。
- 205A→C(S69P) 與 932delC (A311V) 突變點。本次研究所發現的突變點 S69P 位於細胞外第一個環上，而 A311V 的突變位於 C 端。

表一. 於 130 位正常人及 190 位學習語言前感音神經性聽障患者中

Cx43 多型性的比例

	核苷酸位置改變 (Nucleotide change)	氨基酸改變 (Amino acid change)	人數	比例(%)
正常人	112A→C/wt	K38Q	3	2.3
患者	112A→C/wt	K38Q	7	3.68

表二 190 位聽障學童 Cx43 的突變比例

基因型(Genotype)	人數	比例(%)
205T→C/wt Heterozygous	1	0.53
873C→T/wt Heterozygous	1	0.53
932delC/wt Heterozygous	12	6.30
Total	14	7.36

表三 190 位聽障學童 Cx43 的突變基因頻率

核苷酸改變 (Nucleotide change)	氨基酸改變 (Amino acid change)	預測突變效應 (Predicted effect)	基因頻率 (Allele frequency) 染色體數目 (Chromosome No.)
205T→C/wt Heterozygous	S69P	Missense mutation	0.26 (1)
873C→T/wt Heterozygous	G291G No change	Silent mutation	0.26 (1)
932delC/wt Heterozygous	A311V	Frameshift, stop at condon 347	3.15(12)

表四 190 位學習語言前感音神經性聽障患者中 Cx43 基因突
變患者

Caes No.	Nucleotide change	Amino acid change	Predicted Effects
THL004	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL019	873C→T/wt	G291G	Silent mutation
THL020	932delC/wt	No change A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL032	205T→C/wt	S69P	Missense mutation
THL052	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL071	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL076	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL083	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL093	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL158	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL161	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL184	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL192	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347
THL197	932delC/wt	A311V	Frameshift, stop at condon 347

表五 分析 7 個聽障家族 Cx43 基因之突變

編號 (Case No.)	基因型 (Genotype)	編號 (Case No.)	基因型 (Genotype)	聽力狀況 (Hearing)
020	932delC/wt <	020Father	wt/wt	正常
		020Mother	wt/wt	正常
071	932delC/wt	071Mother	wt/wt	正常
076	932delC/wt <	076Father	wt/wt	正常
		076Mother	wt/wt	正常
083	932delC/wt <	083Father	wt/wt	正常
		083Mother	wt/wt	正常
★184	932delC/wt <	★184Father	932delC/wt	聽障
		★184Mother	wt/wt	聽障
192	932delC/wt	197Mother	wt/wt	正常
197	932delC/wt <	197Father	wt/wt	正常
		197Mother	wt/wt	正常

★ 184 <
Cx43 932delC/wt
Cx26 235delC/235delC

★ 184Father <
Cx43 932delC/wt
Cx26 235delC/299-300delAT

★184Mother <
Cx43 wt/wt
Cx26 235delC/235delC

表六 人類 Cx43 蛋白與其他物種 connexin 家族的比較

Protein	Species	Amino Acid Connexin 43 Number													
		11	17	22	23	24	38	69	90	98	138	216	311	367	
Cx43(<i>GJA1</i>)	human	L	Y	G	K	V	G	S	L	Y	G	V	A	R	
Cx43(<i>gjal</i>)	mouse	L	Y	G	K	V	G	S	L	Y	G	V	A	R	
Cx43(<i>gjal</i>)	rat	L	Y	G	K	V	G	S	L	Y	G	V	A	R	
Cx43(<i>gjal</i>)	chicken	L	Y	G	K	V	G	S	L	Y	G	V	A	R	
Cx43(<i>gjal</i>)	xenopus	L	Y	G	K	V	G	T	L	Y	G	V	A	R	
Cx46(<i>GJA3</i>)	human	L	H	G	K	V	G	A	L	H	S	V	A	-	
Cx33(<i>GJA7</i>)	human	L	H	G	K	V	G	A	L	Y	S	V	A	-	
Cx26(<i>GJB2</i>)	human	I	H	G	K	I	G	S	L	Y	-	V	A	-	
* Deafness Mutation		F	S	E	T	A	V	-	V	C	R	L	-		
<i>Cx43</i> 205T→C		I	Y	G	K	V	G	P	L	Y	G	V	A	R	
<i>Cx43</i> 932delC		I	Y	G	K	V	G	S	L	Y	G	V	V	-	

* Deafness Mutation : 已知與聽障有關的 *Cx43* 突變

Cx43 205T→C (S69P)

Cx43 932delC (A311V) and frameshift stop ,at condon 347

在 *Cx43* 蛋白第 69 及 311 的位置，與其他物種 Connexin 比較起來，都具有高度的保留性。

參考文獻

(Reference)

- Ahmad S, Martin PE, Evans WH.(2001) Assembly of gap junction channels: mechanism, effects of calmodulin antagonists and identification of connexin oligomerization determinants.*Eur J Biochem.* ;268(16):4544-52.
- Bergoffen, J. , Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. and Fischbeck, , Nature K.H. (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, **262**, 2039–2042.
- Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH.(1995) Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality.*N Engl J Med.* 18;332(20):1323-9.
- Bruzzone R, White TW, and Paul DL, (1996) Connections with connexins the molecular-basis of direct intercellular signalling. *Eur. J. Biochem.* 238:1-27.
- Cartegin L, Chew SL, and Kranier AR, (2002) Listening to silent and understanding nonsense: exonic mutation that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.*3:285-298.
- C.I. Foote, L. Zhou, X. Zhu, B.J. Nicholson. (1998)The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions, *J. Cell Biol.* 140: 1187–1197.
- Corcos IA, Meese EU, Loch-Carusio R.(1993)Human connexin43 gene locus, GJA1, sublocalized to band 6q21-->q23.2.*Cytogenet Cell Genet.* 64(1):31-2.
- Dermietzel R, Spary DC, (1993) Gap junction in the brain: where, what type, how many, and why ? *Trends. Neurosci.* 16:186-192.
- E. Maestrini, B.P. Korge, J. Ocana-Sierra, E. Calzolari, S. Cambiaghni, P.M. Scudder, A. Hovnanian, A.P. Monaco, C.S. Munro, (1999) A missense mutation in Connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness(Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families, *Hum. Mol. Genet.* 8: 1237–1243.

- G. Dahl, R. Werner, E. Levine, C. Rabadan-Diehl, (1992) Mutational analysis of gap junction formation, *Biophys. J.* 62: 172–180.
- George CH, Kartin PEM, and Evans WH, (1998) Rapid determination of gap junction formation using HeLa cell microinjection with cDNA encoding wild-type and chimeric connexin. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 247:785-789.
- Goodenough DA, Goliger JA, and Paul DL, (1996) Connexins, connexons and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65:475-502.
- 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
- Kelsell, D.P., Dunlop, J, Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R. F. and Leigh, I.M. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, **387**, 80–83.
- Kumar NM, Gilula NB, (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-8.
- Liu XZ, Xia XJ, Adams J, Chen ZY, Welch KO, Tekin M, Ouyang XM, Kristiansen A, Pandya A, Balkany T, Arnos KS, Nance WE. Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum Mol Genet.* 2001 Dec 1;10(25):2945-51
- 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
- Morton CC (2002) Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1229-1240
- Murakami S, Muramatsu T, Shimono M.(2001) Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat Embryol (Berl).* 203(5):367-74.
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW.(2003) Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 72(2):408-18.
- Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AM, Lucke TW, Paul DL, Munro CS, Uitto J, Hodgins MB, 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(Pt 11):2105-13.
- Vladimir Krutovskikh , Hiroshi Yamasaki .(2000) Connexin gene mutations in human genetic diseases .*Mutation Research* 462: 197–207
- White TW, Bruzzone R, (1996) Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and function consequences. *J.Bioenerg.Biomembr.* 28:339-350.
- Xia, J.H., Liu, C.Y., Tang, B.S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H.P., Zhang, B.R., Xie, W., Hu, D.X., Zheng, D. et al. (1998) Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat. Genet.*, **20**, 370–373.
- Zhang JT, Nicholson BJ, (1994) The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junction. *J. Membr. Biol.* 139:15-29.

附錄

(Appendixes)

I. 實驗方法(Procedure)

A. *PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra)*

1. Add 3 ml whole blood to a 15 ml centrifuge tube containing 9 ml **RBC Lysis Solution**. Invert to mix and incubate 10 minutes at room temperature.
2. Centrifuge at 2000 x g for 10 minutes. Remove supernatant leaving behind the white cell pellet.
3. Vortex the tube to resuspend the cells.
4. Add 3 ml **Cell Lysis Solution** to the resuspended cells.
5. Add 15 µl **RAase A Solution** to the cell lysate.
6. Mix the sample by inverting the tube and incubate at 37°C for 15-60 minutes.
7. Add 1 ml **Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
8. Vortex at high speed for 20 seconds.
9. Centrifuge at 2000 x g for 10 minutes
10. Pour the supernatant containing the DNA into a clean 15 ml centrifuge tube containing 3 ml **100 % Isopropanol**.
11. Mix the sample by inverting the tube.
12. Centrifuge at 2000 x g for 3 minutes.
13. Pour off supernatant and add 3 ml **70 % Ethanol** to invert tube several times to wash the DNA pellet.
14. Centrifuge at 2000 x g for 1 minutes.
15. Air dry for 10-15 minutes.
16. Add 250µl **DNA Hydration Solution**
17. Store DNA at -20°C for long term.

B. QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

1. Add 5 volumes of **Buffer PB** to 1 volume of PCR reaction and mix.
2. Apply the sample to the QIAquick spin column and centrifuge for 60 seconds.
3. Discard flow-through.
4. Add 750 μl **Buffer PE** to the QIAquick spin column and centrifuge for 60 seconds.
5. Discard flow-through.
6. Centrifuge for an additional 60 seconds at maximum speed.
7. Place QIAquick spin column in a 1.5 ml centrifuge tube.
8. Add 32 μl **Buffer EB** (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) to the center of the QIAquick membrane, let stand for 1 minute and centrifuge the column for 1 minute.

C. ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)

1. Sequencing Reaction :

Template DNA (ds)	200ng
Primer (10 p mole)	0.3 μl
DMSO	1 μl
Big Dye	2 μl
5x buffer	3 μl
d ₂ H ₂ O	11.7 μl
<hr/>	
Total	20 μl

2. Cycle Sequencing Program:

96°C, 10 seconds
50°C, 5 seconds
60°C, 4 minutes
4°C, hold

} 25 cycles

3. Purification of PCR Products for sequencing:

- 3-1 Take 2 µl of 3 M Sodium acetate (pH 4.6) and 50 µl of 95 % Ethanol.
- 3-2 Vortex and leave at room temperature for 15 minutes.
- 3-3 Centrifuge for 20 minutes at maximum speed (13000 rpm).
- 3-4 Discard the supernatant.
- 3-5 Add 1 ml 70 % Ethanol to invert tube several times to wash the DNA pellet.
- 3-6 . Centrifuge for 5 minutes and discard the supernatant.
- 3-7 Air dry the pellet.
- 3-8 Add 12µl of TSR to a vial containing dried DNA.
- 3-9 Heat for 2 minutes at 95°C.
- 3-10 Chill on ice for about 5 minutes. Transfer the sample to a vial and cover with a vial septa.

D. Preparation of competent cell

1. Take 7 µl competent cell *Escherichia coil* (XL 1-Blue) into 7ml LB (Luria-Bertani) broth, 37°C, overnight.
2. Take 200 µl bacterial broth into 10ml L B broth, at 37°C for 3hrs (O.D. ₆₀₀ nm about 0.5~0.6)

3. On ice for 15 minutes.
4. Centrifugation 4500 rpm for 10 minutes at 4°C .
5. Remove the supernatant. Add to the same volume deionized H₂O and invert several times.
6. Centrifugation 4500 rpm, for 10 minutes at 4°C .
7. Remove the supernatant. Add to 1/2 volume deionized H₂O and invert several times.
8. Centrifugation 4500 rpm for 10 minutes at 4°C .
9. Remove the supernatant. Add to 1/5 volume deionized H₂O and invert several times.
10. Centrifugation 4500 rpm for 10 minutes at 4°C .
11. Remove the supernatant. Vortex the sample pellet and add deionized H₂O to 720 µl.
12. Add glycerol 720 µl (144 µl +576 µl deionized H₂O) (This is stock).
13. Store at -80°C .

E. Transformation of *E. coil*

1. Add the 300µg DNA into competent cells, Mixed , ice for 30 min.
2. Heat shock at 42°C water bath for 1 mins and shake.
3. Quickly put into ice box, and shake 10 sec. Put on ice 5 mins.(add water in iced, and shack several sec.)
4. Add 2ml LB broth, incubated at 37°C for 60 mins.
5. Plating to LB/amp plates.(took 200µl/plate; 3 plates)
6. Cultured overnight in 37°C incubator.

F. *Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE)*

1. Synthesize two complimentary oligonucleotides containing the desired mutation, flanked by unmodified nucleotide sequence. Purify these oligonucleotide "primers" prior to use in the following steps .
2. Primers should be between 25 and 45 bases in length, and the meltingtemperature (T_m) of the primers should be greater than or equal to 78°C. The following formula is commonly used for estimating the T_m

of primers:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N$$

- N is the primer length in bases
- values for **%GC** and **% mismatch** are whole numbers

The primers optimally should have a minimum GC content of 40% and should terminate in one or more C or G bases.

3. Prepare the sample reaction(s) as indicated below:

5 μ l of 10 \times reaction buffer

0.5 μ l (50 ng) of dsDNA template

1.5 μ l (10pmole/ μ l) of oligonucleotide primer #1

1.5 μ l (10pmole/ μ l) of oligonucleotide primer #2

1 μ l of dNTP mix

ddH₂O to a final volume of 50 μ l

Then add 1 μ l of *PfuTurbo* DNA polymerase (2.5 U/ μ l)

4. If the thermal cycler to be used does not have a hot-top assembly, overlay each reaction with \sim 30 μ l of mineral oil.

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	30 seconds
2	18	95°C	30 seconds
		55°C	1 minute
		68°C	7 minute

5. Following temperature cycling, place the reaction on ice for 2 minutes to cool the reaction to $\approx 37^{\circ}\text{C}$.
6. Transformation of XL1-Blue supercompetent cell(see appendix E)

G *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*

1. Take 1ml of overnight culture of transformed E. coli strain XL1-Blue.
2. Centrifuge at 12000 rpm for 10 seconds.
3. Pour off supernatant as clean as possible.
4. Resuspend pelleted of bacterial cells in 250 μl of Buffer P1.
5. Add 250 μl of Buffer P2 and invert the tube 4-6 times to mix.
6. Add 350 μl of Buffer N3 and invert the tube 4-6 times to mix.
7. Centrifuge 10 minutes, place a QIAprep spin columns in 2 ml collection tubes and to remove the residual wash buffer.
8. Place QIAprep column in clean 1.5 ml tube. Add 50 μl Buffer EB (10mM Tris-HCl , pH 8.5) to the center of QIAprep column, let stand for 1 minute, and centrifuge for 1 minute.

H. *Estimation of cell number*

1. Culture adherent cells (HeLa cell) in growth medium (90 % MEM with non-essential A.A. and Earle's BSS, 10 % FBS, 1 % penicillin and streptomycin antibiotics).
2. AS the tissue culture flask (75 cm²) (TPP) filled 80 % confluent
Use pipettes to remove growth medium.
3. Quickly wash the cell with the equal medium volume of 1X phosphate-buffered saline (PBS). To release the cells, add 2 ml of 0.25 % trypsin-EDTA (75 cm²) and incubate 37°C and 5 % CO₂ for 2 minutes.
4. Add old growth medium to tissue culture flask. Pat the bottom of tissue culture flask to lose the cell, transfer the medium including cells to 12 ml microfuge tube.
5. Centrifuge 1000 x g for 10 minutes.
6. Pour off supernatant and resuspend pelleted of cells with 5ml in fresh growth medium.
7. Take 7 µl of cell suspension and 0.5% trypan-blue solution () 7µl to mix. Deliver sample into two sides the coverlipped hemocytometer by capillary action.
8. Count the total number of cells in four corner squares and the middle square in two chambers.
9. Add the number of cells to in a total of ten chambers to give the number of cells in 1×10^{-3} ml. ($1 \times 1\text{mm}$ with a depth of 0.1 mm = 1×10^{-4} ml/square \times 10 squares = a volume of 10^{-3} ml)

I. *EffecteneTM Transfection Reagent Kit*

1. Prepare 6-well plates. The day before transfection, seed $0.9-4.0 \times 10^5$ cells per well in 2 ml of growth medium.
2. Incubate cells at 37°C and 5% CO_2 , The cells should be 80% confluent on the day of transfection.
3. Pipet 3.2 μl of DNA in Buffer EC and add 25.6 μl of Enhancer (DNA:Enhancer=1:8) to mix mastermix tube by vortexing for 1 second. Incubate at room temperature for 5 minutes and spin down.
4. Add 20 μl Effectene and mix mastermix tube by vortexing for 10 seconds. Incubate at room temperature for 10 minutes and spin down.
5. For adherent cells, aspirate the growth medium from all wells and wash cells once with 2 ml PBS. Add 1.6 ml fresh growth medium.
6. Add 600 μl growth medium to tube containing DNA. Mix by pipetting and immediately add the total content onto the cells in the wells.
7. Incubate transfection plates at 37°C and 5% CO_2 to allow for gene expression.

J. *DNA Silver staining Kit (Pharmacia Biotech)*

1. Soak the gel in the fix solution for 30 minutes.
2. Replace fixing solution with 125ml silver solution for 30 minutes.
3. Pour off silver solution add water for 1 minute.
4. Pour off water, add 125ml developing solution for 6 minutes.

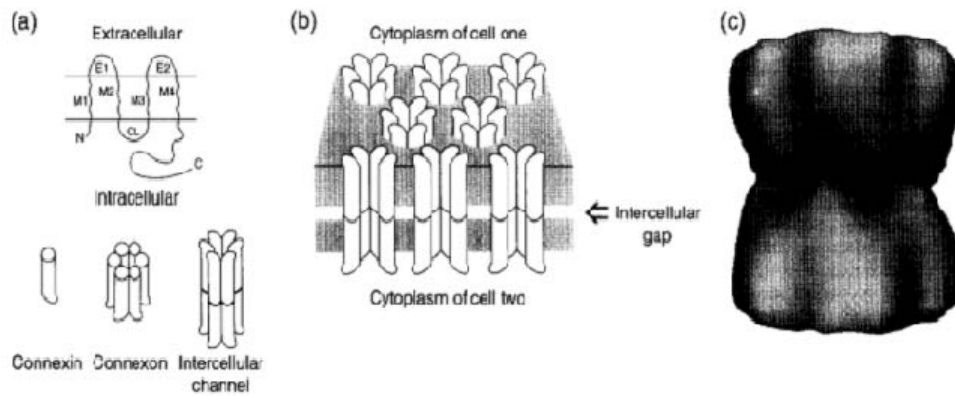
5. Soak gel in stopping and preserving solution and incubate 30 minutes.(All steps need to shake gently)

II 藥品製備(Preparation of reagents and buffer)

Solution	Method of preparation
0.5M EDTA (pH 8.0)	<p>186.1g disodium ethylene diamine tertacetate 2H₂O</p> <p>800 ml d₂H₂O</p> <p>Adjust pH to 8.0 with NaOH</p>
10X TBE	<p>108g Tris base</p> <p>55g boric acid</p> <p>40 ml 0.5M MDTA (pH 8.0)</p> <p>Bring the volume to1000ml</p>
50X TAE	<p>242g Tris base</p> <p>57.1g acetic acid</p> <p>100 ml 0.5M MDTA (pH 8.0)</p> <p>Bring the volume to1000ml</p>
10X DNA loading dye	<p>50 % glycerol</p> <p>12.5mM Tris-Cl (pH 8.0)</p> <p>60mM EDTA (pH 8.0)</p> <p>0.01 % bromophenol blue</p> <p>0.01 % xylene cyanol FF</p>
Luria-Bertani	<p>10 g tryptone</p>

<p>medium (LB broth)</p>	<p>5 g yeast extract</p> <p>10 g NaCl</p> <p>Bring the volume to 1000 ml</p> <p>Autoclave for 20 min</p>
<p>LB/Ampicilline plate,1L</p>	<p>10 g tryptone</p> <p>5 g yeast extract</p> <p>10g NaCl</p> <p>15g Agar</p> <p>Adjust the PH of medium to 7.2~7.4 and autoclave it.</p> <p>When the temperature of medium was lowered to 45° C, 250µl(100mg/ml) of Ampecilline was added.</p>
<p>0 mM KCl</p>	<p>1.86 g KCl in 100ml deionozed water</p>
<p>1 M MgCl₂</p>	<p>20.33 g MgCl₂ in 100 ml deionozed water</p>
<p>2 M glucose</p>	<p>36 g glucose in 100 ml deionozed water</p>
<p>SOC medium</p>	<p>950 ml LB broth</p> <p>10 ml 250 mM KCL</p> <p>10 ml 1 M MgCl₂</p> <p>When the temperature of medium was lowered to</p>

	<p>45°C, 10 ml (2 M) of glucose was added.</p> <p>Bring the volume to 1000ml</p> <p>Filter-sterilized this solution</p> <p>Store at 4°C</p>
PBS 500ml	<p>4g NaCl</p> <p>0.1g KCl</p> <p>0.72g Na₂HPO₄</p> <p>0.12g KH₂PO₄</p> <p>500ml d.d. H₂O</p> <p>Adjust the pH of buffer to 7.4 and autoclave it.</p>
4 % paraformaldehyde fixative solution	<p>2 g paraformaldehyde</p> <p>50λ 10N NaOH</p> <p>5 ml 10X PBS</p> <p>Bring the volume to 50 ml</p>



附圖一 Connexin 的蛋白結構與 Gap junction 的形成

- (a) 每 6 個 Connexin 組成一個 Connexon，再由 2 個 Connexon 構成一個離子通道。
- (b) 由 2 個 Connexon 構成的 Gap junction 是一個連結 2 個細胞間的通道。
- (c) Gap junction 為細胞與細胞間的連結處，負責離子與一些小分子的輸送。

附表一 現今已知 Cx43 的突變點

Nuclcotide Change	Amino Acid Change	Diseases	Reference
50A>C	Y17S	*ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
52T>C	S18P	ODDD	Judisch et al.; 1979
61G>A	G21R	ODDD	Paznekas et al.; 2003
65G>A	G22E	*ODDD	Traboulsi and Parks; 1990
68A>C	K23T	*ODDD	Gorlin et al.; 1963
119C>T	A40V	ODDD	Paznekas et al.; 2003
145C>A	Q49K	ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
154-156dupTTT	F52dup	ODDD	Gellis and Feingold 1974
226C>A	R76S	ODDD	Stanislaw et al.; 1998
268C>G	L90V	*ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
293A>G	Y98C	*ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
306G>C	K102N	ODDD	Paznekas et al.; 2003
389T>C	I130T	ODDD	Paznekas et al.; 2003
400A>G	K134E	ODDD	Paznekas et al.; 2003
412G>C	G138R	*ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
605G>A	R202H	ODDD	Paznekas et al.; 2003
646G>T	V216L	*ODDD	Boyadjiev et al.; 1999
1117 A>G	S373G	Heart malformations	Britz-Cunningham.; 1995
1090T>C	S364P	Heart malformations	Britz-Cunningham.; 1995
30C>T	L11F	Deafness	Liu et al.; 2001
71T>C	V24A	Deafness	Liu et al.; 2001

ODDD 全名 Oculodentodigital dysplasia

* ODDD : 伴隨有聽障問題

資料來源摘自 Paznekas et al.;2003, Britz-Cunningham.; 1995 及 Liu et al.2001