

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用細胞和動物模式探討 connexin26 和 connexin29 基因 突變造成聽障之機制(第 3 年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-016-MY3
執行期間：100 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：楊建洲
共同主持人：潘惠錦
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：徐靜軒
碩士班研究生-兼任助理人員：柯姿羽
大專生-兼任助理人員：董豪
博士班研究生-兼任助理人員：張簡如

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：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 101 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且每個基因的致病機制皆不盡相同。gap junction 在聽力功能上扮演的角色已被許多研究所確認，其在鉀離子再循環、耳蝸內離子平衡及聽力形成過程皆扮演重要的角色。本研究計畫目的主要是著重於探討 GJC3 (CX30.2/CX31.3) 基因和 GJB2 (CX26) 基因突變對其功能的影響及建立斑馬魚為模式動物以探討聽障的成因，藉此瞭解 GJB2 和 GJC3 基因於聽覺形成過程中所扮演的角色並瞭解其致病機制。本研究計畫我們發現 CX30.2/CX31.3 蛋白與 ZO-1 蛋白間有交互作用，在細胞內主要是依賴高基氏體的修飾，再藉由肌動蛋白絲或微管運送至細胞膜上連續表現而形成 gap junction，具有類似於 pannexin 或 mouse Cx23 蛋白所組成之 hemichannels 的釋放 ATPase 功能。另外我們也證實 GJC3 基因的 p. R15G 和 p. L23H 兩個錯意突變所轉譯之突變蛋白並不影響其運輸到細胞膜上，但兩突變蛋白卻喪失釋放 ATPase 的功能，而 p. W77S 和 p. E269D 突變蛋白則發現堆積於內質網中，具有 dominant-negative effect 現象。在 GJB2 (CX26) 基因之研究成果我們發現 CX26 蛋白在細胞膜上所形成之 gap junction 具有通透染劑的能力，而 p. T123N 錯意突變雖不會影響突變蛋白被運輸到細胞膜上而形成斑塊，但不具有通透染劑的能力。另外 p. G4D 及 p. R75Q 兩個突變蛋白則被發現堆積於高基氏體和溶酶體，不具有 dominant-negative effect 現象。在斑馬魚模式動物的建立方面，我們發現三個同源於 GJB2 和 GJC3 基因的斑馬魚 connexin 基因 (zfcx27.5、zfcx30.3 及 zfcx43.4)，利用 RT-PCR 和全胚體原位雜交技術進行基因於胚胎和組織的表現分析，同時我們利用自製的 zfcx30.3 抗體偵測到 zfcx30.3 於內耳的表現位置，另外我們利用 morpholino 抑制斑馬魚的內生性 zfcx30.3 基因可發現胚胎發生心臟水腫的比率增加、耳石距縮短或耳囊發育遲緩等現象。我們也發現 zfcx27.5 正常蛋白會堆積於 HeLa 細胞的細胞質中，而 zfcx30.3 正常蛋白與 CX26 蛋白相同可被運送到細胞膜上表現 gap junction 斑塊。在本研究計畫我們也完成建立 Tol2 斑馬魚基因轉殖系統，目前已篩選到兩個螢光蛋白表現於耳囊聽斑及側線的轉殖基因魚以用於未來研究。

中文關鍵詞： 基因、突變、聽障、功能研究、斑馬魚

英文摘要： In the proposed project, we will focus on the study of the effect on function of GJB2 and GJC3 genes with mutation. Simultaneously, we will create a zebrafish model to investigate the mechanisms of hearing loss. Our results indicated that CX30.2/CX31.3 gap junction

was transported in the Golgi-dependent pathway and the actin filament or microtubule may be an important component in the process of CX30.2/CX31.3 channels. In addition, we also found that although p.R15G and p.L23H mutants do not decrease the trafficking of CX proteins, mutations in GJC3 genes result in a loss of ATPase release function of CX30.2/CX31.3 protein. However, p.W77S and p.E269D mutant proteins are concentrated in the cytoplasm and exhibited the dominant-negative effect. In the study of GJB2 (CX26) gene, we found that intercellular localization of wild-type and p.T123N mutant CX26 were shown the typical punctuate pattern of gap junction channel between neighboring expression cells. In contrast, p.G4D and p.R75Q mutants showed impaired trafficking of the protein to the plasma membrane and accumulation in the lysosome and Golgi apparatus rather than in the plasma membrane. In zebrafish model, we have analyzed zfcx27.5, zfcx30.3 and zfcx43.4 gene expressions in during embryogenesis and adult tissues using RT-PCR and whole-mount in situ hybridization. Simultaneously, our results reveal zfcx30.3 was detected in the inner ear of zebrafish using zfcx30.3 antibody in the immunohistochemistry (IHC) analysis. We knocked down zfcx30.3 by morpholino oligonucleotide (MO) and zfcx30.3 morphants showed the heart edema, shorten distance between two otoliths, delayed development of otic vesicle and abnormal somite phenotype. Then, we also found intercellular localization of zfcx27.5 was shown concentration in the cytoplasm, and zfcx30.3 was docked in the plasma membrane of transiently transfected HeLa cells. The results suggest zfcx30.3 is more similar to human GJB2 (CX26) than zfcx27.5. In addition, we have been established a Tol2 system to create the transgene zebrafish lines expressing GFP fusion proteins in the macula and lateral line for further study.

英文關鍵詞： GJB2, GJC3, mutation, hearing loss, gap junction, zebrafish

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

利用細胞和動物模式探討connexin26和connexin29基因突變造成聽障之機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040-016-MY3

執行期間： 98 年 08 月 01 日至 101 年 7 月 31 日

計畫主持人：楊建洲

共同主持人：潘惠錦

計畫參與人員：張簡如、簡國軒、徐靜軒、柯姿羽、董豪

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 101 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且每個基因的致病機制皆不盡相同。gap junction在聽力功能上扮演的角色已被許多研究所確認，其在鉀離子再循環、耳蝸內離子平衡及聽力形成過程皆扮演重要的角色。本研究計畫目的主要是著重於探討*GJC3* (*CX30.2/CX31.3*)基因和*GJB2* (*CX26*)基因突變對其功能的影響及建立斑馬魚為模式動物以探討聽障的成因，藉此瞭解*GJB2*和*GJC3*基因於聽覺形成過程中所扮演的角色並瞭解其致病機制。本研究計畫我們發現*CX30.2/CX31.3*蛋白與ZO-1蛋白間有交互作用，在細胞內主要是依賴高基氏體的修飾，再藉由肌動蛋白絲或微管運送至細胞膜上連續表現而形成gap junction，具有類似於pannexin或mouse Cx23蛋白所組成之hemichannels的釋放ATPase功能。另外我們也證實*GJC3*基因的p.R15G和p.L23H兩個錯意突變所轉譯之突變蛋白並不影響其運輸到細胞膜上，但兩突變蛋白卻喪失釋放ATPase的功能，而p.W77S和p.E269D突變蛋白則發現堆積於內質網中，具有dominant-negative effect現象。在*GJB2* (*CX26*)基因之研究成果我們發現*CX26*蛋白在細胞膜上所形成之gap junction具有通透染劑的能力，而p.T123N錯意突變雖不會影響突變蛋白被運輸到細胞膜上而形成斑塊，但不具有通透染劑的能力。另外p.G4D及p.R75Q兩個突變蛋白則被發現堆積於高基氏體和溶酶體，不具有dominant-negative effect現象。在斑馬魚模式動物的建立方面，我們發現三個同源於*GJB2*和*GJC3*基因的斑馬魚connexin基因(*zfcx27.5*、*zfcx30.3*及*zfcx43.4*)，利用RT-PCR和全胚體原位雜交技術進行基因於胚胎和組織的表現分析，同時我們利用自製的*zfcx30.3*抗體偵測到*zfcx30.3*於內耳的表現位置，另外我們利用morpholino抑制斑馬魚的內生性*zfcx30.3*基因可發現胚胎發生心臟水腫的比率增加、耳石距縮短或耳囊發育遲緩等現象。我們也發現*zfcx27.5*正常蛋白會堆積於HeLa細胞的細胞質中，而*zfcx30.3*正常蛋白與*CX26*蛋白相同可被運送到細胞膜上表現gap junction斑塊。在本研究計畫我們也完成建立Tol2斑馬魚基因轉殖系統，目前已篩選到兩個螢光蛋白表現於耳囊聽斑及側線的轉殖基因魚以用於未來研究。

關鍵詞：基因、突變、聽障、功能研究、斑馬魚

Abstract

In the proposed project, we will focus on the study of the effect on function of *GJB2* and *GJC3* genes with mutation. Simultaneously, we will create a zebrafish model to investigate the mechanisms of hearing loss. Our results indicated that CX30.2/CX31.3 gap junction was transported in the Golgi-dependent pathway and the actin filament or microtubule may be an important component in the process of CX30.2/CX31.3 channels. In addition, we also found that although p.R15G and p.L23H mutants do not decrease the trafficking of CX proteins, mutations in *GJC3* genes result in a loss of ATPase release function of CX30.2/CX31.3 protein. However, p.W77S and p.E269D mutant proteins are concentrated in the cytoplasm and exhibited the dominant-negative effect. In the study of *GJB2* (*CX26*) gene, we found that intercellular localization of wild-type and p.T123N mutant CX26 were shown the typical punctuate pattern of gap junction channel between neighboring expression cells. In contrast, p.G4D and p.R75Q mutants showed impaired trafficking of the protein to the plasma membrane and accumulation in the lysosome and Golgi apparatus rather than in the plasma membrane. In zebrafish model, we have analyzed *zfcx27.5*, *zfcx30.3* and *zfcx43.4* gene expressions in during embryogenesis and adult tissues using RT-PCR and whole-mount in situ hybridization. Simultaneously, our results reveal *zfcx30.3* was detected in the inner ear of zebrafish using *zfcx30.3* antibody in the immunohistochemistry (IHC) analysis. We knocked down *zfcx30.3* by morpholino oligonucleotide (MO) and *zfcx30.3* morphants showed the heart edema, shorten distance between two otoliths, delayed development of otic vesicle and abnormal somite phenotype. Then, we also found intercellular localization of *zfcx27.5* was shown concentration in the cytoplasm, and *zfcx30.3* was docked in the plasma membrane of transiently transfected HeLa cells. The results suggest *zfcx30.3* is more similar to human *GJB2* (*CX26*) than *zfcx27.5*. In addition, we have been established a Tol2 system to create the transgene zebrafish lines expressing GFP fusion proteins in the macula and lateral line for further study.

Keywords: *GJB2*, *GJC3*, mutation, hearing loss, gap junction, zebrafish

前言

目前約有1/1000比例的嬰兒於出生或幼年時期罹患中重度聽障，在已開發國家中發現60%的個案為遺傳因素所造成。近期針對262位非症候群聽障患者進行基因篩檢研究，我們發現在*GJB2*(CX26)或*GJC3*(老鼠Cx29；同義於人類CX30.2/CX31.3)基因上有發生新的突變，此結果已發表在*Audiology & Neurotology* 2007;12:198-208。然而目前對於這些基因突變所產生之突變蛋白對功能所造成的影響和其致病機制並不清楚，且同一基因在不同位置的突變常會產生蛋白功能影響上的差異，因此本計畫的研究動機之一即是利用已建立好的細胞模式探討*GJB2*和*GJC3*基因的新突變點對其功能的影響以及彼此間所造成的影響，同時再利用動物模式來探討人類及動物疾病，此亦為生物醫學的一個重要方向。因此本計畫的另一個研究動機則是建立和利用斑馬魚為模式動物以探討*GJB2*和*GJC3*基因突變造成聽障的機制，期望藉由上述兩個模式的建立和探討以釐清這兩個基因在非症候群聽障中的致病機制。

研究目的

本研究的目的為：(1)進一步探討 *GJB2* 基因和 *GJC3* 基因突變後對其功能的影響，藉由探討這些問題以瞭解 *GJB2* 基因和 *GJC3* 基因在聽覺形成過程中所扮演的角色，並瞭解其致病機制。(2) 近幾年 *GJC3* 基因才自老鼠中被選殖(clone)出來，是一個相當新的 Cx 基因家族成員，因此目前主要的功能尚未清楚，本研究就此加以研究探討。(3)建立一個以斑馬魚為模式動物，利用生物資訊學方法尋找斑馬魚基因庫中與 *GJB2* 或 *GJC3* 基因之同源基因或相同基因，再利用分子生物學、螢光活體染色法、全胚胎原位雜交法、組織原位雜交法，基因 knockdown 技術 (loss of function)和基因轉殖(transgene; gain of function)技術來探討 *GJB2* 和 *GJC3* 基因突變造成聽障的機制。

文獻探討

耳蝸(Cochlea)內充滿液體，由基底膜(Basilar membrane)和覆膜 (Reissner's membrane) 畫分成三個充滿液體的腔室，當聲波傳入耳蝸，會產生像水波的振動，因基底膜向覆膜的垂直移動，活化位於基底膜上的柯蒂氏器內的內毛細胞，產生電化學物質傳送到聽神經，使聽神經傳遞訊息至大腦而產生聽覺。此過程是將聲波轉換成電神經衝動(electrical nerve impulses)，其中涉及許多離子的進出(Coulogigner *et al.*, 2006)。耳蝸(Cochlea)是一個很複雜的器官，由數十種細胞及特化的區域組成，有許多與聽覺相關的基因，部份顯示其影響了耳蝸管內的離子恆定(ion homeostasis)，如果發生突變，鉀離子和鈉離子濃度不正常，造成聽障。在老鼠，內淋巴有高鉀離子及低鈉離子濃度，並保留在高正靜止電位約+100mV，這個高靜止電位是正常

毛細胞功能所必須，當電位還原成零時，耳聾即發生(Steel *et al.*, 1987)。Gap junction和 tight junction在聽力功能上的重要角色已被許多研究確認，其在鉀離子循環、耳蝸內離子平衡及聽力產生的過程中扮演重要的角色。

在人類已發現約20種connexin gene 家族成員(Willecke *et al.*, 2002)，每個都由不同的基因編譯，並根據其分子量(molecular weight in kDa)給予命名，再基於核酸及胺基酸層級上的相似性分成 α 、 β 、 ϵ 子群體(Sohl and Willecke,2003)，相同(homomeric)或不同的(heteromeric) connexins可以組成多種不同的connexon isoforms，由於所組成的蛋白大小及電荷不同，因此也會改變通道(channel)對分子的選擇性及調節的敏感度，如：正常CX26蛋白所形成的gap junction可使Leucifer yellow (457 Da)通過，但在CX26與CX30形成heteromeric connexon時，細胞只能使neurobiotin (287 Da)通過(Marziano, *et al.*, 2003)。

GJC3 (CX29)基因(2007年CX29已被從*GJE1*更名為*GJC3*基因)近幾年才在老鼠中被選殖(clone)出來(Altevogt *et al.*, 2000; Sohl *et al.*,2001)，是相當新的Cx蛋白家族成員，人類的*GJC3*基因(CX30.2/Cx31.3)，座落於染色體7q22.1，包含兩個 exons，840bp 開放式讀碼框(open reading frame)，其表現的蛋白含 279 個胺基酸，分子重約為 29kDa (Yang *et al.*, 2005)。*GJC3* mRNA 在中樞及周邊神經系統(central and peripheral nervous systems)都有表現，而在周邊神經系統表現特別豐富(Sohl *et al.*,2001)。以免疫螢光標定發現多分布在坐骨神經(sciatic nerve)的雪旺細胞(Schwann cells)(Sohl *et al.*,2001)、寡突神經膠質細胞(oligodendrocyte)和髓鞘(myelinating)的膠質細胞(glial cell) (Altevogt *et al.*, 2002)，另外CX29和其他的 connexin 基因族成員如 CX32、CX47 在寡突神經膠質細胞(oligodendrocyte)中會共同表現(Kleopa *et al.*,2004)。在 Ahmad *et al.*,2003 研究報告中，首度指出 *GJC3* mRNA 亦存在於老鼠耳蝸，且其表現量僅次於 *GJB2*。而我們實驗室先前的研究，以免疫組織染色法(Immunohistochemistry) 和雷射顯微擷取法(Laser Capture Microdissection)觀察 Cx29 的蛋白在老鼠耳蝸存在的組織部位，發現 Cx29 表現在耳蝸神經(cochlear neurons)、螺旋勒帶(spiral ligament)、螺旋紋(spiral limbus)、柯蒂氏器(organ of Corti)及血管紋(stria vascularis)，而這些組織對耳蝸內淋巴高鉀離子及低鈉離子濃度有重大的影響(Yang *et al.*, 2005)。*GJC3* 也高度表現在耳蝸的雪旺細胞(Schwann cells)，且為耳蝸正常功能所必須(Tang *et al.*, 2006)。另外在先前文獻指出正常CX26蛋白在細胞膜所形成的 gap junction channel 可使較大的分子 Cascade blue (548 Da)和 Leucifer yellow (457 Da)通過，但在CX26與CX30形成 heteromeric connexon時，改變了通道的特性，使 channel 無法讓 Leucifer yellow 通過，只能讓分子較小的 neurobiotin (287 Da)通過 gap junction 轉移到鄰近的細胞(Marziano, *et al.*, 2003)。然而對於CX30.2/Cx31.3的功能目前並不清楚，值得我們進一步探討。

最近對於兩個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。

利用動物模式來探討人類及動物疾病，是生物醫學的一個重要方向。發現、確認及開發一種人類疾病的動物模式可以對疾病之發生、防治有更深入的了解。而目前為止啮齒類動物(小鼠或大鼠) 在全世界的動物實驗中佔了百分之八十以上，是最常用來研究遺傳疾病的材料，藉由基因的剔除(knockout)或基因轉殖(transgene)來瞭解基因在疾病上所扮演的角色。不例外的在國內外的研究裡，以老鼠(mouse)為動物模式來探討基因在內耳的發育和遺傳性聽障是大部分研究者所採用的，且大多數的研究者也認為老鼠(mouse)是一個理想的動物模式來發現新的聽障基因在造成聽障所扮演的角色(Friedman *et al.*, 2007)。目前針對牽涉到維持耳蝸內淋巴液高 K^+ 低 Na^+ 環境的基因(即參與 K^+ 循環的相關基因)有突變鼠動物模式的包括(1) gap junction 基因：*Cx26/GJB2* 基因(Cohen-Salmon *et al.*, 2002; Kudo *et al.*, 2003)和 *Cx30/GJB6* 基因(Teubner *et al.*, 2003)；(2) tight junction 基因：*Claudin 14 (Cldn 14)* 基因 (Ben-Yosef *et al.*, 2003)；(3) K^+ 通道：*kcne1* 基因(Vetter *et al.*, 1996; Nicolas *et al.*, 2001), *kcnq1* 基因(Lee *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2001; Rivas and Francis, 2005)和 *kcnq4* 基因(Kharkovets *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2006)。另外 *Cx29* 基因也有兩個團隊發展出突變鼠的動物模式(Eiberger *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006)。雖然這麼多團隊都利用老鼠當動物模式，但在 Krogh's principal 中有提到一個概念”針對一個生物醫學的問題，必須去觀察、研究與實驗多種的模式生物，然後將不同模式生物所提供的資訊，互相比較對照，以求得單一種模式生物無法提供的資訊(Editoria, 2003)，加上老鼠是屬於體內受精和體內發育，這特性會令許多胚胎早期即需發揮功能的蛋白質在 gain of function 及 loss of function 的情況下無法順利的著床發育。因此我們認為尋找另一種模式動物來探討聽障的機制是有其必要性。

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)具有兩種 mechanosensory 器官，一種是內耳—主要負責聽覺和平衡，另一種側線(lateral line)器官—主要牽涉在決定水的動態上。科學家研究發現，若按照魚類聽覺能力的好壞來區分，可分為聽覺特化型與普通型兩大類。聽覺特化型的代表種類為鯉魚及鱈魚(都是屬於骨鰓魚類)，牠們的聽覺音頻範圍可以從 200 赫茲(Hz, 每秒的週波數)到 8000 赫茲，而最靈敏的聽覺閾值約在 60 分貝左右。聽覺普通型的代表如吳郭魚的鯛類，牠們的音頻範圍局限於 200-1000 赫茲，而最靈敏的聽覺閾值則高達 90 分貝以上。聽覺特化型的魚類之所以有較好的聽覺，主要是透過一串由脊椎骨特化的小骨連接內耳與氣鰓，當氣鰓裡的氣體受到穿透身體的音波而壓縮及膨脹後，會產生共振波，經由連接的小骨傳送到內

耳；沒有這種助聽構造的魚類，聽力就較差(嚴宏洋, 2007)。斑馬魚像其他魚類一樣並無外耳構造，但具有複雜的內耳構造，然而這也不像人類或老鼠具有明顯特化性的內耳如耳蝸(cochlea)來產生聽覺。斑馬魚像一般的骨鰾魚類(如鯉魚及鯰魚)一樣具有 3~4 塊小骨組成的韋伯氏器(Weberian ossicles)，這個組織連接於充滿氣體的魚鰾(swim bladder)和內耳之間，負責將顫動(水下聲波)從魚鰾(swim bladder)傳遞至內耳(Moorman, 2001; Bang *et al.*, 2001)。

斑馬魚的聽覺主要是藉有內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測外來顫動(水下聲波)的刺激而產生(Moorman, 2001)。斑馬魚的內耳可分為兩部分---1. 上半部(pars superior)包括兩個垂直和一個水平共三個半規管(semicircular canals)連接到卵形囊(utricle)的區域，三個半規管稱為膜迷路(labyrinthus membranaceus)，膜迷路內充滿內淋巴液(endolympha)；2. 下半部(pars inferior)包括球形囊(sacculle)和小囊(lagena)，而球形囊(sacculle)是一個主要的聽覺器官(primary auditory organs) (Bever and Fekete, 2002)。卵形囊(utricle)、球形囊(sacculle)和小囊(lagena)內各有一塊耳石(otolith)，當聲音穿透過內耳時，因重量與惰性的差異耳石不會有移動，但位於聽斑(macula)上毛細胞(hair cell)頂端的動毛(kinocilium)，則會因受震動而彎曲與耳石產生磨擦從而產生聽覺(Popper and Platt, 1993)。此機制類似於人類聽覺的產生機制，當聲波傳進傳遞到耳蝸中膈(scala media)，造成耳蝸中膈內淋巴的移動，再經由 organ of Corti 上的 stereocilia 來接收震動，當 stereocilia 受到震動時，位於纖毛頂端的機械訊號傳導通道(mechanotransduction channels)會被打開，此時內淋巴液中 K^+ 會流經這些通道導致細胞膜去極化，並以神經衝動形式將此帶電訊息經由聽神經傳至中樞神經系統的大腦皮層聽覺中樞(Roberts *et al.*, 1998; Pickles and Corey, 1992)。另外在斑馬魚的內耳構造，經顯微分析後發現在內耳聽斑區(macula)和側線(lateral line)上的毛細胞構造類似於人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相類似的(Popper and Platt, 2003)，同樣的在斑馬魚內耳中上皮細胞內襯(epithelial lining)也和人類耳蝸內上皮細胞內襯(epithelial lining)一樣有各種細胞所組成的，目前為止至少有 granular 和 ionocytes 細胞牽涉其中(Mayer-Gostan *et al.*, 1997; Pisam *et al.*, 1998)。但是哺乳類動物和斑馬魚在內耳毛細胞的發育是不一樣的，在斑馬魚毛細胞的數目會隨著魚體的成長而增加，一般數目可增加到大約 10 個月大，然而這毛細胞數目的增加並沒有影響到聽覺的敏感度和頻率寬度，而哺乳類動物則在出生時，毛細胞數目已決定，當毛細胞受損後是不能再生的(Higgs *et al.*, 2001)。

關於以斑馬魚為模式動物來研究聽覺的形成機制，在國外事實上早在 1996 年就有研究學者利用大量篩檢內耳發育缺陷的斑馬魚突變種來瞭解基因突變造成內耳缺陷的關係，在這研究中找的了 58 種內耳缺陷的突變斑馬魚(Whitfield *et al.*, 1996)。甚至於在這之前也有部分探討基因與魚類內耳發育的相關報告被提出(Whitfield, 2002, review)。在 1998 年 Nicolson 等人，

已經在斑馬魚發現幾個基因與 mechanosensory 毛細胞的功能有關，如 *orbiter*、*mercury* 和 *gemin1* 基因的突變其具有正常的毛細胞形態但對於 acoustic-vibrational 的刺激並沒反應和 *sputnik* 及 *mariner* 基因的突變會影響到毛細胞 bundle 的正常發育。在 2000 年 Ernest 等人在研究中發現 *mariner* 的突變是由於基因表現出缺陷的 *Myosin VIIA*，因而造成毛細胞 bundle 的發育異常，此情形和人類的 *MYO VIIA* 基因異常所產生的情形類似，加上此基因(*mariner*)和各物種間的 *Myo VIIA* 基因具有高度的同源性(homologous; 與人類約 85%相似度)，此研究發現了 *Myo VIIA* 的功能在脊椎動物的演化過程中具有高度的保留性，因此他們建立了斑馬魚來探討人類遺傳性聽障的動物模式。最近一個人類聽障基因 *TMIE* 的同源基因(*tmie*)在斑馬魚被選殖出來，這基因主要表現在受精後 24 到 51 小時之間，且在斑馬魚內耳前庭和側線毛細胞的發育扮演著重要角色，此結果和以老鼠為動物模式所看到的情形是一樣的(Shen *et al.*, 2008)。在國內對於利用斑馬魚來探討聽覺機制形成的研究，首推中研院細胞與個體生物學研究所副所長黃鵬鵬特聘研究員的研究團隊和嚴宏洋研究員，在它們最近的研究計畫裡，因斑馬魚內耳的耳石和毛細胞會隨著魚體的成長而增加，所以他們結合了聽覺腦幹反應的測試方法與控制耳石增長或縮小的方法，來探討魚類的聽覺能力是從什麼時候開始產生的、耳石在聽力形成過程中所扮演的角色和耳石形成過程的研究。然而目前在國內很少有研究團隊利用斑馬魚為模式動物來探討基因與聽障之間的關係。因此我們想在現有對聽障基因的研究基礎上建立一個以斑馬魚為模式動物來探討聽障基因造成聽障的機制，尤其以 *CX* 基因族為主要對象。加上現在國內外並沒有以斑馬魚為模式動物來探討 *CX* 基因族與聽覺的報告。根據上述的相關資訊我們認為以斑馬魚為模式生物來探討 *CX* 基因族突變造成聽障的機制是一個值得、重要且可行的方案。

研究方法

一、HeLa細胞模式

1. 建構正常及突變的 *Connexin (CX)* 基因於螢光表現載體
2. 基因轉殖(transfection)至 HeLa 細胞株表現
3. 利用細胞免疫螢光染色技術觀察正常或突變 *CX* 蛋白於細胞內的表現位置
4. 建立持續穩定表現正常或突變 *CX* 蛋白的 HeLa 細胞株
5. 利用抑制劑破壞胞器以探討 *CX* 蛋白的運輸及降解路徑

二、Tet-on蛋白表現系統(Tet-on inducible expression system)

1. 建立穩定表現 pTet-on 的 HeLa 細胞株

2. 建構正常和突變的CX基因於pBI雙向表現載體
3. 基因轉殖(transfection)至Tet-on HeLa (T-HeLa)細胞株表現
4. 利用細胞免疫螢光染色技術來觀察正常或突變CX蛋白在細胞內的表現位置

三、正常及突變CX蛋白所組成之gap junction (gap junction intercellular communication; GJIC)的通透功能性探討

1. 染劑轉移技術(scrape loading dye transfer assay)
2. 顯微注射染劑技術(microinjection dye transfer assay)
3. 利用拮抗抑制劑(pharmacological blockers)以抑制gap junction或hemichannel功能

四、斑馬魚的飼養與胚胎操作

1. 斑馬魚(*Danio rerio*)之飼育
2. 斑馬魚胚胎的受精與培養
3. 胚胎卵膜脫除及胚胎脫水固定保存
4. 草履蟲與豐年蝦的飼養

五、斑馬魚zebrafish connexin (zfcx)基因的選殖

1. 多重序列比對及演化樹分析
2. 抽取total RNA並活體外轉錄為cDNA
3. reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)
4. 選殖斑馬魚zfcx27.5、zfcx30.3及zfcx43.4基因於螢光表現載體

六、斑馬魚zfcx基因的表現分析

1. 抽取胚胎及組織的total RNA
2. 建構斑馬魚zfcx27.5、zfcx30.3及zfcx43.4基因於pGEM-T載體
3. 合成zfcx27.5、zfcx30.3及zfcx43.4基因的RNA探針(RNA probe)
4. 全胚體原位雜交(whole-mount in situ hybridization)
5. 自製斑馬魚zfcx抗體
6. 組織切片技術(tissue sectioning)
7. 利用免疫組織染色技術觀察zfcx蛋白於斑馬魚內的表現位置
8. 利用morpholino (MO)抑制斑馬魚內生性基因的表現以觀察胚胎發育之影響

七、轉殖基因斑馬魚的建立

1. 建立Tol2基因轉殖系統
2. 建構Tol2表現質體
3. 合成*transposase* cRNA
4. 顯微注射(microinjection)
5. 世代有性交配

結果與討論

一、*GJC3*基因(*CX30.2/CX31.3*)突變之研究

我們在此研究計畫中已完成正常及突變 *GJC3* 基因的選殖，並分別將其建構於螢光表現載體上(Table 1、2)。針對 *GJC3* 基因 p.E269D 突變點的研究，我們也結合先前的研究成果證實此突變點所轉譯之突變蛋白會堆積於內質網，且有顯性抑制效應 (dominant-negative effect)現象，此結果已發表在 **Human Genetics 2010;127:191-199**。其他突變點的初步研究結果發現 p.R15G 和 p.L23H 兩個錯意突變並不會影響突變蛋白被運輸到細胞膜上，但在細胞膜上是否也具有和正常蛋白相同的功能仍需進一步分析。另外 p.W77S 突變蛋白則和 p.E269D 突變蛋白一樣被發現堆積於內質網(ER)上，且發現皆有 dominant-negative effect 現象(Fig.1~Fig.4)，此初步結果亦於**第 25 屆(2010)生物醫學聯合學術年會**壁報發表。

二、*GJC3*基因(*CX30.2/CX31.3*)功能之研究

針對 *GJC3*(*CX30.2/CX31.3*)基因功能的研究，我們發現此蛋白與 CX26、CX30 或 CX43 蛋白於細胞間所形成之 gap junction 斑塊(plaque)不同，*CX30.2/CX31.3* 蛋白為連續環繞表現於整個細胞膜上(Fig.5)，且經由藥物(Brefeldin A、Nocodazole 及 Cytochalasin B)分別或同時破壞不同胞器試驗後，推測此蛋白在細胞內的運送過程中主要是依賴高基氏體的修飾，再藉由肌動蛋白絲或微管快速地運送至細胞膜上表現，而非遵循著傳統的 Golgi-dependent 分泌路徑(Fig.6~Fig.10)，上述初步結果亦於**第 27 屆(2012)生物醫學聯合學術年會**壁報發表。另外我們也藉由免疫螢光染色法初步證實 *CX30.2/CX31.3* 蛋白和 ZO-1 蛋白質間具有交互作用(Fig.11)。當細胞的肌動蛋白絲或微管被藥物破壞後，雖然 *CX30.2/CX31.3* 蛋白仍可表現於細胞膜上，但我們發現此蛋白在細胞膜上為不規則狀表現，因此 ZO-1 蛋白質是否與此蛋白質的穩定性有關，且肌動蛋白絲或微管是否會影響此蛋白與其他蛋白質分子(如：ZO-1 等)間的交互作用，進而影響此蛋白於細胞膜上表現

的穩定性則有待進一步探討。

我們同時發現 CX30.2/CX31.3 蛋白被運送到細胞膜上所形成之 gap junction 並無法通透一些常見於通透其他 CX 蛋白所形成之 gap junction 的染劑(如：lucifer yellow 等)(Fig.12)，且經由半通道抑制劑 18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA)及 Carbenoxolone (CBX) 的試驗後，推測此蛋白類似於 pannexin 或 mouse Cx23 蛋白具有(hemi)channels 的功能，於低鈣濃度環境下可釋放 ATP 至細胞外(Fig.13~ Fig.14)，此結果已發表在國際期刊 **Cell Biochem Biophys 2011;61:189-197**。另外在本研究計畫中針對 *GJC3* 基因 p.R15G 和 p.L23H 兩個突變點的研究，我們證實此兩個突變點所轉譯之突變蛋白雖然不影響其運輸到細胞膜上的能力，但研究卻發現此兩突變蛋白的 ATP 釋放功能是喪失的，此初步結果亦於 **第 27 屆(2012)生物醫學聯合學術年會** 壁報發表，且目前正在投稿中。

我們在此研究計畫中亦發現 p.W77S 突變蛋白無法持續穩定表現於 HeLa 細胞中，螢光表現量隨著時間逐漸減少，但未發現轉殖細胞有明顯的 DNA 片段化現象且 p.W77S 的 mRNA 表現量也無明顯變化(Fig.15~ Fig.16)，推測此突變蛋白的減少並非轉錄轉譯功能異常或是誘發細胞凋亡所造成，因此我們有待將來繼續探討 p.W77S 突變蛋白無法持續穩定表現於 HeLa 細胞中的因素以釐清其造成聽障的機制。

三、*GJB2*基因(*CX26*)突變之研究

我們在此研究計畫中已將先前針對台灣 516 位非症候群聽障患者所篩檢到的四個 *GJB2* 基因錯意突變點 p.G4D、p.R75Q、p.T123N 和 p.R184Q 以及正常 *GJB2* 基因完成選殖，並分別將其建構於螢光表現載體上(Table 3)。針對 *GJB2* 基因 p.R184Q 突變點的研究，我們結合先前的研究成果證實此突變點所轉譯之突變蛋白會堆積於高基氏體(Golgi apparatus)，無法被正常運送到細胞膜以形成 gap junction，且此突變蛋白會影響正常 CX26 及 CX30 蛋白的運送，具有顯性抑制效應(dominant-negative effect)現象，上述結果已發表在 **European Journal of Human Genetics 2010;18:1061-1064**。其他突變點的初步研究結果發現 p.T123N 錯意突變並不會影響突變蛋白被運輸到細胞膜上而形成班塊，但在細胞膜上是否也具有和正常蛋白相同的功能仍需進一步分析。另外 p.G4D 以及 p.R75Q 兩個突變蛋白皆被發現堆積於高基氏體和溶酶體，且在與正常 CX26 蛋白共同表現下發現兩個突變蛋白皆會被運送到細胞膜上而與正常蛋白共同表現，不具有顯性抑制效應現象(Fig.17~Fig.21)，但在細胞膜上所組裝形成的異質性通道(heterozygous gap junction)是否具有正常功能仍有待進一步探討，此初步結果亦於 **第 27 屆(2012)生物醫學聯合學術年會** 壁報發表。我們同時使用 Tet-on 雙向誘導表現系統等量表現正常及突變 CX26 蛋白以模

擬患者 heterozygous 的表現型態，並觀察兩者於 Tet-on HeLa 細胞中的表現位置是否與共同轉殖表現時相同，目前我們已完成建構融合螢光蛋白的正常及突變 *GJB2* 基因於 pBI 載體上(Table 4)。

四、*GJB2*基因(*CX26*)功能之研究

針對 *GJB2*(*CX26*)基因功能的研究，我們發現此蛋白與 *CX30* 或 *CX43* 蛋白皆可於細胞間形成 gap junction，在本研究計畫中我們已完成建構正常及突變 *CX26* 蛋白穩定表現的 HeLa 細胞株(Table 5)，經由 scrape loading dye transfer 試驗後證實正常 *CX26* 蛋白被運送到細胞膜上所形成之 gap junction 具有通透常見於通透其他 *CX* 蛋白所形成之 gap junction 的染劑 lucifer yellow (443 Da, -2 charge)。而在本計畫中針對 *GJB2* 基因 p.T123N 突變點的研究，我們也初步證實此突變蛋白雖然不影響其運輸到細胞膜上的能力，但其所形成之 gap junction 卻不具有通透染劑的能力(Fig.22)，目前我們正在進行利用顯微注射的方式將染劑直接注射至表現正常及 p.T123N 突變 *CX26* 蛋白的單顆細胞中，以進一步確認 gap junction 的通透功能性。

另外在本研究計畫中針對 *GJB2* 基因 p.G4D 和 p.R75Q 兩個突變點的研究，我們發現兩種突變蛋白無法被運送到細胞膜上形成 gap junction 而大量堆積於高基氏體和溶酶體，但經由溶酶體抑制劑 Chloroquine (CQ)作用後仍然沒有發現突變蛋白有明顯增加的現象，因此 p.G4D 和 p.R75Q 兩個突變點造成聽障的機制仍有待進一步分析探討。

五、斑馬魚動物模式的建立

在本研究計畫的第一年我們已利用生物資訊學方式自 Ensembl (ZFIN: The Zebrafish Model Organism Database (http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mlval=aa-ZDB_home.apg)以及 NCBI 兩個資料庫中比對斑馬魚的 *GJB2*(*CX26*)和 *GJC3*(*CX30.2/CX31.3*)同源基因，結果發現人類與小鼠 *GJC3*(*Cx30.2/Cx31.3*)基因相似於斑馬魚的 *cx43.4*(*zfcx43.4*)基因，而人類與小鼠 *GJB2*(*CX26*)基因則相似於斑馬魚的 *cx30.3* (*zfcx30.3*)和 *cx27.5* (*zfcx27.5*)兩種基因，我們已將序列進行多重比對及演化樹分析(Fig.23)。針對 *zfcx27.5*、*zfcx30.3*和 *zfcx43.4* 三個基因在斑馬魚發育上的表現情形，我們藉由 RT-PCR 分析瞭解三個基因分別在不同胚胎發育時期及不同成魚組織中的表現量，結果證實 *zfcx43.4* 基因自胚胎發育 1.5 hpf 到 96 hpf 有持續性地大量表現，而 *zfcx27.5* 基因在胚胎發育 1.5 hpf 到 3 hpf 僅有微量表現，發育 6 hpf 到 96 hpf 才開始大量表現，但 *zfcx30.3* 基因在胚胎發育 9 hpf 後才開始偵測到微量表現，另外我們也證實 *zfcx27.5* 和 *zfcx43.4* 基因除了在肝臟有少量表現外，也大量表現於內耳等

各種組織中，而*zfcx30.3*基因發現則主要表現於卵巢，內耳為少量表現(Fig.24~Fig.25)。

我們在此研究計畫中已將三個斑馬魚同源基因*zfcx27.5*、*zfcx30.3*和*zfcx43.4*完成選殖，並分別將其建構於pGEM-T-Easy載體上並合成探針(probe)以進行全胚體原位雜交(whole-mount in situ hybridization)，結果發現*zfcx43.4*基因表現於72 hpf胚胎的中腦頂蓋(tectum)、後腦(hindbrain)、眼(retina)、鰓弓(Branchial arches)和胸鰭(pectoral fin)，而*zfcx27.5*和*zfcx30.3*基因則是表現於胚胎耳囊(otic vesicle)，且心臟也發現*zfcx30.3*基因的表現訊號(Fig.26)，上述結果已於第26屆(2011)生物醫學聯合學術年會壁報發表。

另外在本研究計畫中我們也自製*zfcx30.3*及*zfcx27.5*多株抗體(Fig.27~Fig.28)，並利用自製抗體和免疫組織染色技術偵測到*zfcx30.3*表現於72 hpf胚胎的心臟及耳囊聽斑(macula)，於成魚則是偵測到內耳的球形囊(sacculle)及卵形囊(utricle)聽斑有*zfcx30.3*的表現，且表現於支持細胞和毛細胞彼此的細胞核間(Fig.29~Fig.31)，目前我們正在利用*zfcx27.5*多株抗體進行免疫組織染色以偵測*zfcx27.5*蛋白於胚胎及組織中的表現。針對*zfcx30.3*基因在斑馬魚胚胎發育上的功能研究，我們利用morpholino (MO)抑制斑馬魚內生性的*zfcx30.3*基因，結果發現胚胎發生心臟水腫的比率增加且胚胎耳囊會發現耳石間距縮短或耳囊發育遲緩等現象(Fig.32~Fig.34)，此結果也於(2011)台灣斑馬魚研討會壁報發表。

六、轉殖螢光斑馬魚的建立

在本研究計畫中我們已經完成Tol2基因轉殖系統的建立(Fig.35)，且已將可專一性調控基因表現於內耳的*pvalb3b*啟動子活性區域完成選殖以及完成建構Tol2相關質體(Table 6)。另外我們進一步利用先前已建立的顯微注射技術將Tol2表現質體注射至斑馬魚受精胚胎中，並進行世代有性交配以取得基因轉殖螢光斑馬魚，目前我們在此研究計畫中已經篩選到F2世代的*pvalb3b:TagGFP*基因轉殖魚以及F0世代的*pvalb3b:CX26-TagGFP*基因轉殖魚，兩者螢光蛋白皆表現於斑馬魚耳囊聽斑和側線(Fig.36~Fig.37)。未來我們將繼續建立不同的轉殖基因斑馬魚，並建立魚類聽覺偵測系統及行為模式檢測技術以幫助我們瞭解這些CX基因與聽覺形成間的關係，以及突變CX基因造成聽障的機制。

七、斑馬魚同源基因*zfcx27.5*及*zfcx30.3*之研究

在本研究計畫中我們將同源於人類與小鼠*GJB2(CX26)*基因的斑馬魚*zfcx27.5*以及*zfcx30.3*基因完成選殖，並分別將其建構於螢光表現載體上，結果發現斑馬魚*zfcx27.5*正常蛋白會堆積於HeLa細胞的細胞質中，而*zfcx30.3*正常蛋白與CX26蛋白相同可被運送到

細胞膜上表現gap junction斑塊(Fig.38)，因此推測zfcx30.3基因與GJB2基因的相似性較高，但其在細胞膜上所形成之gap junction是否也具有通透物質的功能仍有待進一步分析。

計劃成果自評:

我們已將本計畫的研究成果已發表三篇文章於國際期刊，且另有兩篇相關的文章正在投稿中，兩篇正在撰寫中。同時連續在第25屆(2010)生物醫學聯合學術年會、第26屆(2011)生物醫學聯合學術年會、第7屆(2011)歐洲斑馬魚國際會議、(2011)台灣斑馬魚研討會以及第27屆(2012)生物醫學聯合學術年會…等會議以壁報方式發表與計畫相關之研究共計13篇壁報(包含4篇國外，9篇在國內)。在本研究計畫中我們已證實正常及突變GJC3 (CX30.2/CX31.3)和GJB2 (CX26)基因在細胞內的表現情形及功能。另外在斑馬魚系統的建立上，我們完成選殖與人類及小鼠GJC3和GJB2基因相似的斑馬魚connexin基因 (zfcx27.5、zfcx30.3、zfcx43.4)，且自備zfcx27.5和zfcx30.3多株抗體以偵測兩者在斑馬魚組織中的表現情形，更藉由morpholino (MO)瞭解zfcx30.3基因在斑馬魚耳囊發育上所扮演的角色，同時我們也完成建立Tol2基因轉殖魚系統，目前我們已經篩選到pvalb3b:TagGFP和pvalb3b:hCX26-TagGFP 兩種品系的基因轉殖斑馬魚，綜合上述的研究成果為符合我們當初對於計畫內容所追求的目標，也提供相關的資訊可作為後續研究GJB2和GJC3基因造成非症候群聽障致病機轉的參考。

參考文獻

- Ahmad S, Chen S, Sun J, and Lin X (2003) Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307:362-368.
- Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS and Paul DL. (2002) Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J neurosci* 22:6458-6470.
- Bang PI, Sewell WF and Malicki JJ (2001) Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish. *J Comp Neuro* 438, 173-190
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Vanitallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ and Wilcox ER (2003) Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12: 2049-2061
- Bever MM and Fekete DM (2002) Atlas of the Developing Inner Ear in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 223, 536-543

- Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, Vary JC, JR, Greene AE, Franz MR, Grinberg A, Huang SP and Pfeifer K (2001) Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2526-2531
- Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, and Willecke, K (2002) Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 12: 1106-1111
- Coulognier V, Sterkers O and Ferrary E (2006) What's new in ion transports in the cochlea? *Eur J Physiol* 453:11-22.
- Editorial (2003) Krogh's principal for a new era. *Nature genetics* 34, 345
- Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, Schober A, Bussow H, Wessig C, Djahed S, Reucher H, Koch DL, Lautermann J, Moser T, Winterhager E and Willecke K (2006) Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia* 53, 601-611
- Ernest S, Rauch GJ, Haffter P, Geisler R, Petit C and Nicolson T (2000) Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum Mol Gene* 9(14) 2189-2196
- Friedman LM, Dror AA and Avraham KB (2007) Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol* 51, 609-631
- Higgs DM, Souza MJ, Wilkins HR, Presson JC and Popper AN (2001) Age- and Size-Related Changes in the Inner Ear and Hearing Ability of the Adult Zebrafish (*Danio rerio*) *JARO* 03, 174-184
- Kharkovets T, Dedek K, Maier H, Schweizer M, Khimich D, Nouvian R, Vardanyan V, Leuwer R, Moser T and Jentsch TJ (2006) Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *Embo J* 25: 642-652
- Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL and Scherer SS (2004) Unique Distributions of the Gap Junction Proteins Connexin29, Connexin32, and Connexin47 in Oligodendrocytes. *Glia* 47:346-357.
- 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.
- Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y and Aoki Y (2003) Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 12: 995-1004
- Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD., Brandenburg SA, Litzi TJ,

- Bunton TE and Limb C (2000) Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106: 1447-1455
- Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL and 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.
- Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P and Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 289, 53–61
- Moorman ST (2001) Development of Sensory Systems in Zebrafish (*Danio rerio*) *ILAR* 42, 292-298
- Nicolas M, Dememes D, Martin A, Kupersmidt S and Barhanin J (2001) KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear Res* 153, 132-145
- Nicolson T, Rusch A, Friendrich RW, Granato M, Ruppertsberg JP, and Christiane NV (1998) Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation:the zebrafish circler mutants. *Neuron* 20, 271-283
- Pickles JO and Corey DP (1992) Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci* 15, 254-259
- Pisam M, Payan P, LeMoal C, Edeyer A, Boeuf G and Mayer-Gostan N (1998) Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima* *Cell and Tissue Research* 294, 261-270
- Popper AN and Platt C (2003) Inner ear and lateral line. Chapter 4 of *The Physiology of fishes* Boca Raton: CRC Press, c1993 Evans, David H., (David Hudson),1940 [ISBN0849380421]
- Rivas A and Francis HW (2005) Inner ear abnormalities in a *Kcnq1* (*Kvlqt1*) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Otol Neurotol* 26: 415-424
- Roberts WM, Howard J and Hudspeth AJ (1998) Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear. *Annu. Rev. Cell Biol* 4, 63-92
- Shen YC, Jeyabalan AK, Wu KL, Hunker KL, Kohrman DC, Thompson DL, Liu D and Barald KF (2008) The transmembrane inner ear (*tmie*) gene contributes to vestibular and lateral line development and function in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Dyn* 237(4), 941-952
- Steel P, Barkway C and Bock GR (1987) Strial dysfunction in mouse with ochleo-saccular abnormalities. *Hear Res* 27:11–26.
- Sohl G, Eiberger J, Jung YT, Kozak CA, and Willecke K (2001) The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *J Biol Chem* 382:973-978.

- Sohl G and Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10:173–180.
- Tang W, Zhang Y, Chang Q, Ahmad S, Dahlke I, Yi H, Chen P, Paul DL, and Lin X (2006) Connexin29 is highly expressed in cochlear Schwann cells, and it is required for the normal development and function of the auditory nerve of mice. *J Neurosci* 26(7): 1991-1999.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP (2003) Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 12, 13-21
- Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F, Marcus DC, Lazdunski M, Heinemann SF and Barhanin J (1996) Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 17, 1251-1264
- Whitfield TT (2002) Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol* 53(2), 157-171
- Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJM, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996) Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241-254
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U and Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725–737.
- Winter H, Braig C, Zimmermann U, Geisler HS, Franzer JT, Weber T, Ley M, Engel J, Knirsch M and Bauer K (2006) Thyroid hormone receptors TRalpha1 and TRbeta differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells. *J Cell Sci* 119, 2975-2984
- Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC and Li SY (2007) Identification of mutations in members of *connexin* gene family to associate with hearing loss in Taiwanese prelingual nonsyndromic sensorineural deaf patients. *Audiology & Neurotology* 12:198-208.
- Yang JJ, Liao PJ, Su CC, and Li SY (2005) Expression patterns of connexin 29 (GJE1) in mouse and rat cochlea. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 723–728.
- 嚴宏洋 (2007) 魚兒求生六技 科學人 9, 2~5

Table 1. Completed plasmid constructs expressing *GJC3* (*CX30.2/CX31.3*) gene used in cell model.

Gene	Vector	Fluorescent protein	Constructed plasmid name
<i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>	pDsRed	DsRed	pDsRed:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>
	pEGFP	EGFP	pEGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>
	pTagRFP	TagRFP	pTagRFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>
<i>CX30.2/CX31.3_{R15G}</i>	pEGFP	EGFP	pEGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{R15G}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{R15G}</i>
<i>CX30.2/CX31.3_{L23H}</i>	pEGFP	EGFP	pEGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{L23H}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{L23H}</i>
<i>CX30.2/CX31.3_{W77S}</i>	pEGFP	EGFP	pEGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}</i>
<i>CX30.2/CX31.3_{E269D}</i>	pEGFP	EGFP	pEGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX30.2/CX31.3_{E269D}</i>

Table 2. Completed plasmid constructs expressing *GJC3* (*CX30.2/CX31.3*) gene used in Tet-on system.

Vector	Gene	Fluorescent protein	Constructed plasmid name
pBI-Tet	<i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>	TagRFP	pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagRFP</i>
	<i>CX30.2/CX31.3_{wt}</i>	TagGFP	pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{R15G}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{L23H}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{E269D}-TagGFP</i>
	<i>CX30.2/CX31.3_{R15G}</i> <i>CX30.2/CX31.3_{L23H}</i> <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}</i> <i>CX30.2/CX31.3_{E269D}</i>	TagRFP and TagGFP	pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagRFP/</i> <i>CX30.2/CX31.3_{R15G}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagRFP/</i> <i>CX30.2/CX31.3_{L23H}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagRFP/</i> <i>CX30.2/CX31.3_{W77S}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX30.2/CX31.3_{wt}-TagRFP/</i> <i>CX30.2/CX31.3_{E269D}-TagGFP</i>

Table 3. Completed plasmid constructs expressing *GJB2 (CX26)* gene used in cell model.

Gene	Vector	Fluorescent protein	Constructed plasmid name
<i>CX26_{WT}</i>	pTagRFP	TagRFP	pTagRFP:: <i>CX26_{WT}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX26_{WT}</i>
	pLEGFP	EGFP	pLEGFP:: <i>CX26_{WT}</i>
<i>CX26_{G4D}</i>	pTagRFP	TagRFP	pTagRFP:: <i>CX26_{G4D}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX26_{G4D}</i>
	pLEGFP	EGFP	pLEGFP:: <i>CX26_{G4D}</i>
<i>CX26_{R75Q}</i>	pTagRFP	TagRFP	pTagRFP:: <i>CX26_{R75Q}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX26_{R75Q}</i>
	pLEGFP	EGFP	pLEGFP:: <i>CX26_{R75Q}</i>
<i>CX26_{T123N}</i>	pTagRFP	TagRFP	pTagRFP:: <i>CX26_{T123N}</i>
	pTagGFP	TagGFP	pTagGFP:: <i>CX26_{T123N}</i>
	pLEGFP	EGFP	pLEGFP:: <i>CX26_{T123N}</i>

Table 4. Completed plasmid constructs expressing *GJB2* (*CX26*) gene used in Tet-on system.

Vector	Gene	Fluorescent protein	Constructed plasmid name
pBI-Tet	<i>CX26_{WT}</i>	TagRFP	pBI:: <i>CX26_{WT}-TagRFP</i>
	<i>CX26_{WT}</i> <i>CX26_{G4D}</i> <i>CX26_{R75Q}</i> <i>CX26_{T123N}</i>	TagGFP	pBI:: <i>CX26_{WT}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX26_{G4D}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX26_{R75Q}-TagGFP</i>
			pBI:: <i>CX26_{T123N}-TagGFP</i>
	TagGFP and TagRFP	pBI:: <i>CX26_{WT}-TagRFP/CX26_{G4D}-TagGFP</i>	
		pBI:: <i>CX26_{WT}.TagRFP/CX26_{R75Q}-TagGFP</i>	
		pBI:: <i>CX26_{WT}-TagRFP/CX26_{T123N}-TagGFP</i>	

Table. 5. Wild-type and missense mutant of *GJB2* (*CX26*) gene were expressed in stably transfected HeLa cells.

Vector	Gene	Constructed plasmid name	Intercellular localization
pTagGFP	<i>CX26_{WT}</i>	pTagGFP:: <i>CX26_{WT}</i>	membrane
	<i>CX26_{G4D}</i>	pTagGFP:: <i>CX26_{G4D}</i>	cytoplasm
			Golgi apparatus 231/1065=21.7%
	Lysosome 583/1012=57.6%		
<i>CX26_{R75Q}</i>	pTagGFP:: <i>CX26_{R75Q}</i>	cytoplasm	
Golgi apparatus 436/1019=43.7%			
Lysosome 904/1044=86.6%			
<i>CX26_{T123N}</i>	pTagGFP:: <i>CX26_{T123N}</i>	membrane	

Table 6. Completed plasmid constructs used in zebrafish model.

Entry clone	Completed plasmid name
5' entry clone	pDONRP4-P1r::pvalb3b (0.6 kb)
Middle entry clone	pDonr221::TagGFP
	pDonr221::hCX26 _{WT} -TagGFP
	pDonr221::zfcx30.3 _{WT} -EGFP
	pDonr221::zfcx30.3 _{G4E} -EGFP
	pDonr221::zfcx30.3 _{R75H} -EGFP
	pDonr221::zfcx30.3 _{R186K} -EGFP
3' entry clone	p3E-polyA
Expression clone	pDestTol2pA:: pvalb3b-TagGFP-polyA
	pDestTol2pA:: pvalb3b-hCX26 _{WT} -TagGFP-polyA
	pDestTol2pA:: pvalb3b-zfcx30.3 _{WT} -EGFP-polyA

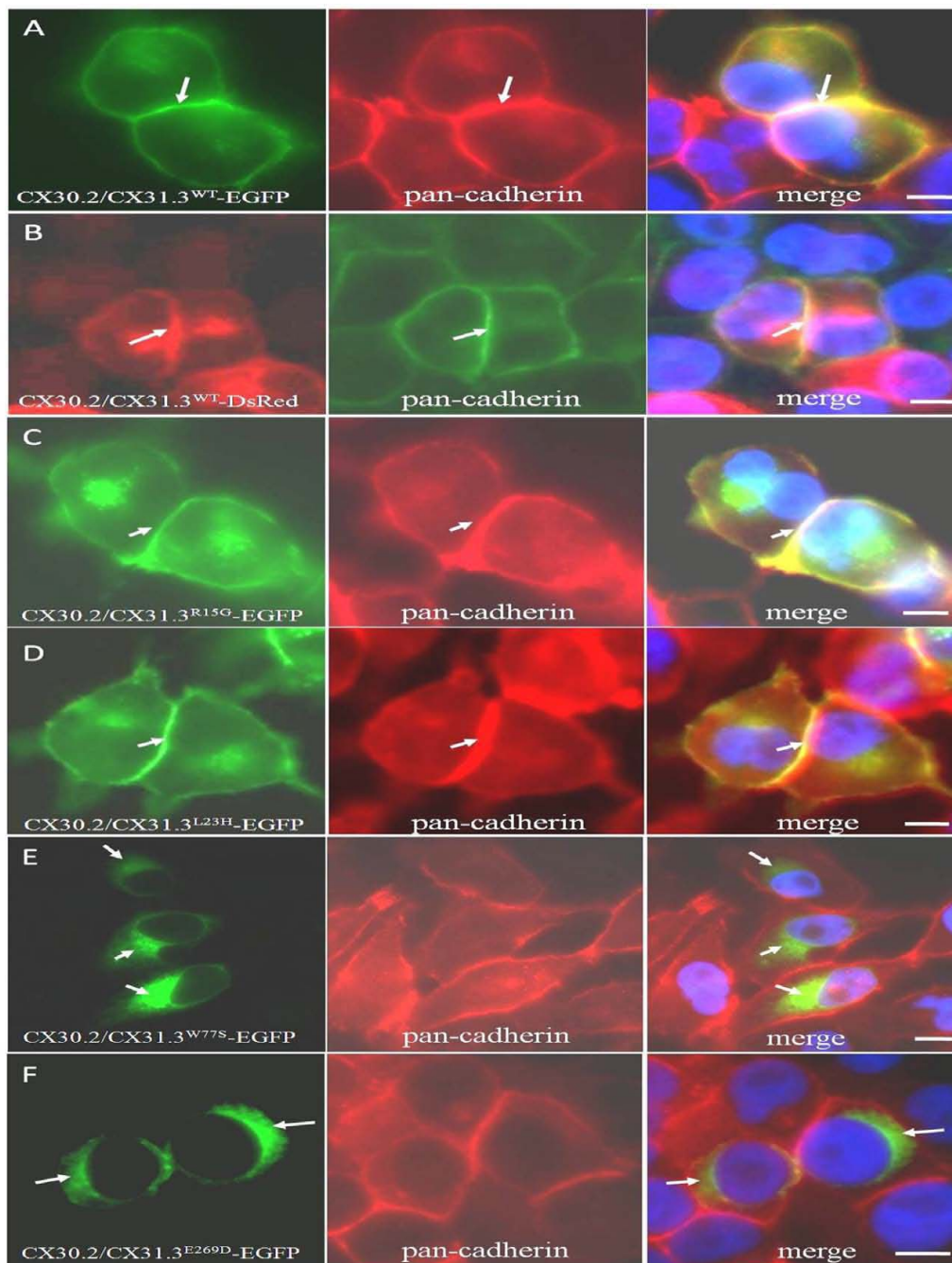


Fig. 1. Analysis of missense mutant CX30.2/CX31.3 expression in transiently transfected tet-on HeLa cells by immunocytochemistry using pan-cadherin antibody.

Fluorescence microscopy of tet-on HeLa cells expressing CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP (A), CX30.2/CX31.3^{WT}-DsRed (B), CX30.2/CX31.3^{R15G}-EGFP (C), and CX30.2/CX31.3^{L23H}-EGFP (D) exhibited a uniform pattern which is continuous fluorescence along the apposed cell membranes, respectively. The CX30.2/CX31.3^{W77S} (E), and CX30.2/CX31.3^{E269D} (F) transfected tet-on HeLa cells show impaired trafficking and concentration near the nucleus. Arrows indicate expression of CX30.2/CX31.3 protein. The cells were counterstained with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

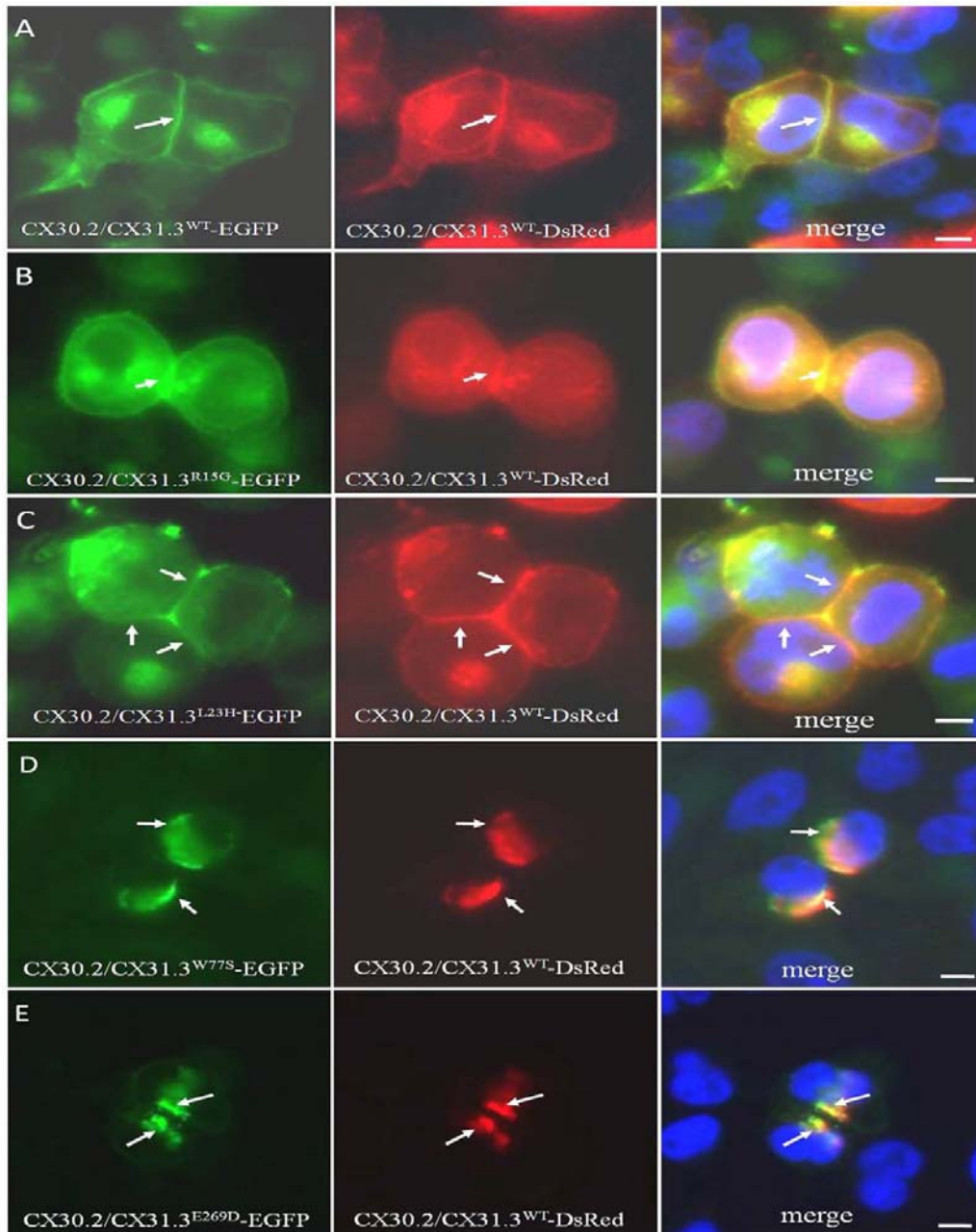


Fig. 2. Co-expression of mutant proteins with CX30.2/CX31.3^{WT} using tet-on protein expression system.

Tet-on HeLa cells co-expressing CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP and CX30.2/ CX31.3^{WT}-DsRed (A) revealing co-localization of the two proteins at the plasma membrane. CX30.2/CX31.3^{R15G}-EGFP (B) or CX30.2/CX31.3^{L23H}-EGFP (C) co-expressing with CX30.2/CX31.3^{WT}-DsRed exhibited the same pattern as homozygous WT. CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP (D) or CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP (E) co-expressing with CX30.2/CX31.3^{WT}-DsRed displayed both of them were perinuclear localization. Arrows indicate co-expression protein. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

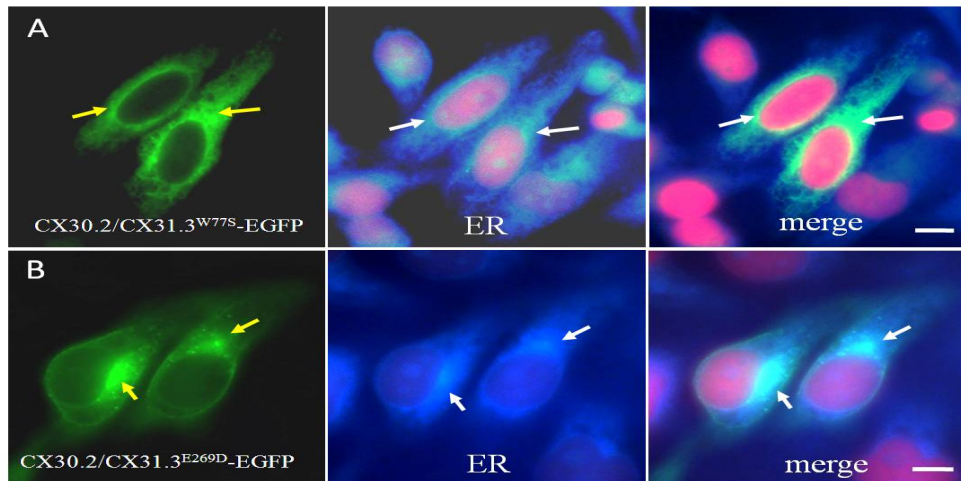


Fig. 3. Intercellular localization of the missense mutant CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP and CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP protein. Photomicrograph of tet-on HeLa cells transiently transfected with CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP (A) or CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP (B) cDNA and immunostained for use as markers of ER. The staining results for mutant CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP and CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP showed substantial co-localization in the ER (White). Yellow arrows indicate the localization of ER. The cells were counterstained with PI (red) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

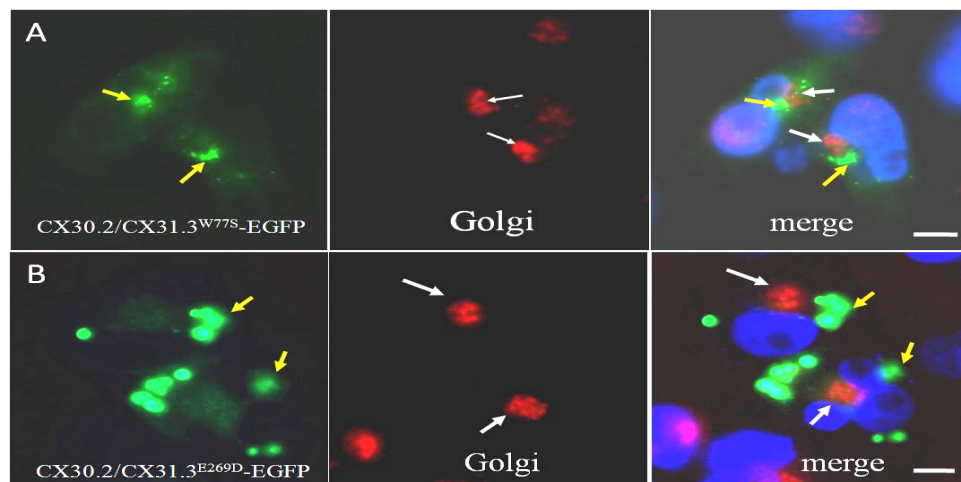


Fig. 4. Intercellular localization of the missense mutant CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP and CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP protein. Photomicrograph of tet-on HeLa cells transiently transfected with CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP (A) or CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP (B) cDNA and immunostained for use as markers of Golgi apparatus. The staining results for mutant CX30.2/CX31.3^{W77S}-EGFP and CX30.2/CX31.3^{E269D}-EGFP showed the different localization from Golgi apparatus. Yellow arrows indicate the localization of CX30.2/CX31.3 mutant protein. White arrows indicate the localization of Golgi apparatus. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

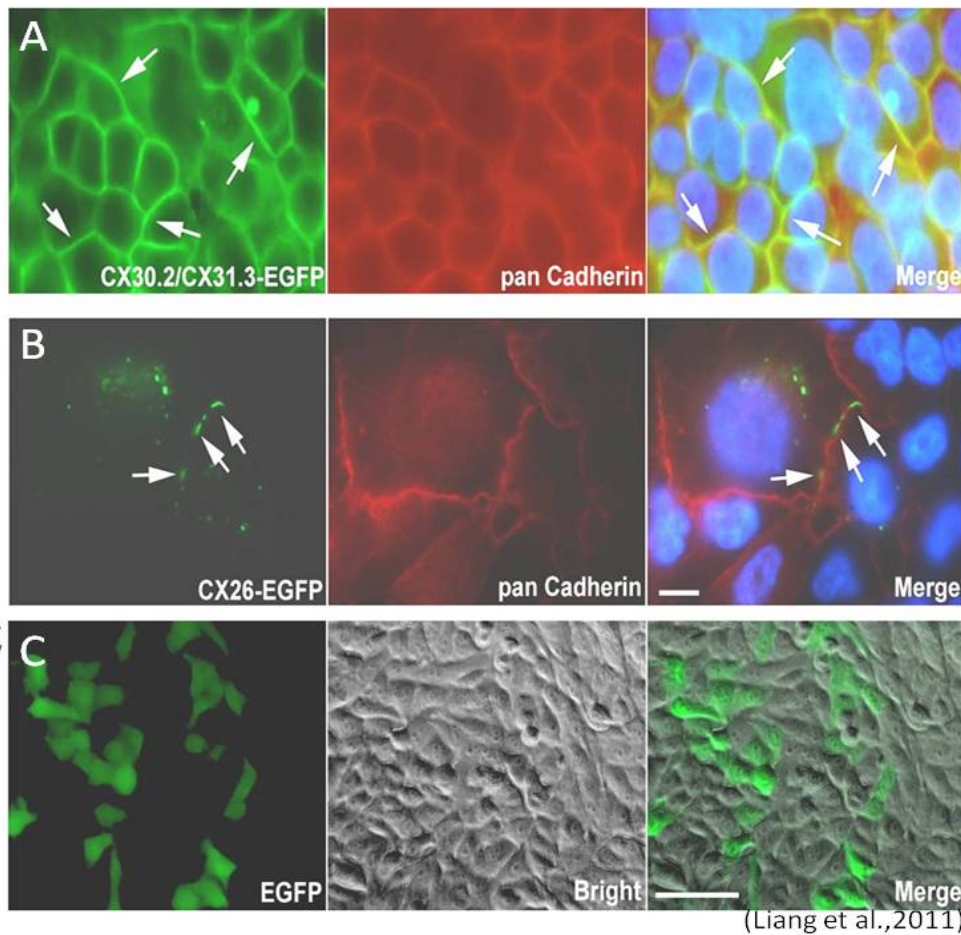


Fig. 5. Analysis of expression of CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in stably transfected HeLa cells by immunocytochemistry using pan Cadherin antibody. (A) Fluorescence microscopy of CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in stably transfected HeLa cells revealed continuous fluorescence along cell membrane. (B) HeLa cells transfected with CX26^{WT} EGFP showed typical punctate of GJ channel between neighboring cells. (C) Fluorescence microscopy of EGFP. The cells were counterstained with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

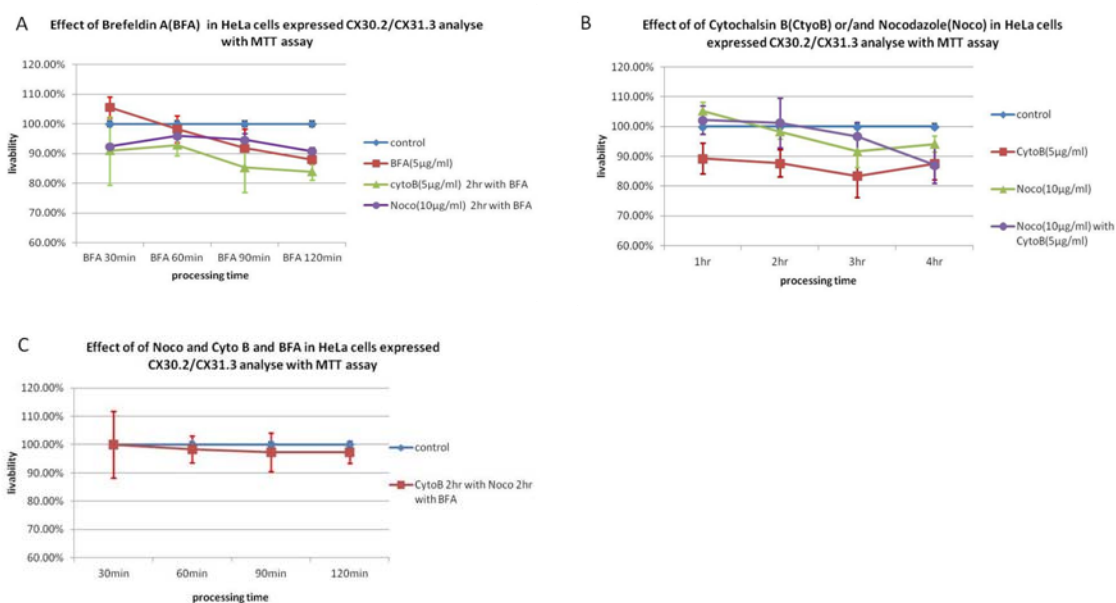


Fig. 6. MTT assay of cell survival rate after pharmacological compounds include Brefeldin A (BFA) to disrupted the Golgi apparatus, Cytochalsin B (CytoB) to depolymerized actin filaments, and Nocodazole (Noco) to disassembled the microtubules treated with HeLa cells stably expressing CX30.2/CX31.3^{wt}-EGFP. (A) CytoB or Noco 2hr and BFA in 30, 60, 90 ,and 120min. (B) CytoB or/and Noco in 1, 2, 3, and 4hr. (C) CytoB, Noco 2hr and BFA in 30, 60, 90 ,and 120min. (n=3)

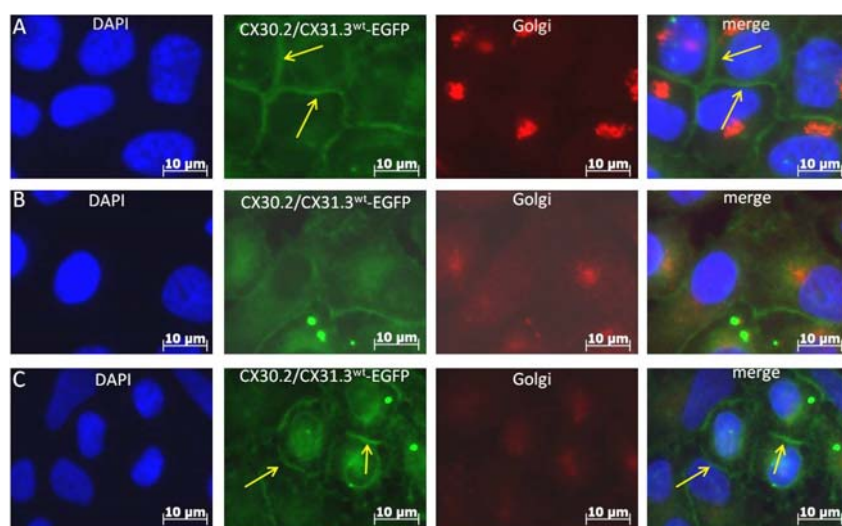


Fig. 7. Effect of Brefeldin A (BFA) in stably express CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP HeLa cells and immunocytochemistry using anti-Golgi antibody. (A) Methanol treated with cells 1hr. (B) BFA (5µg/ml) treated with cells 1hr to disrupted the Golgi appartus. (C) BFA (5µg/ml) treated with cells 1hr to disrupted the Golgi appartus. Arrows indicate formation of gap junction channel with neighboring cells. The cells were counterstained with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 µm.

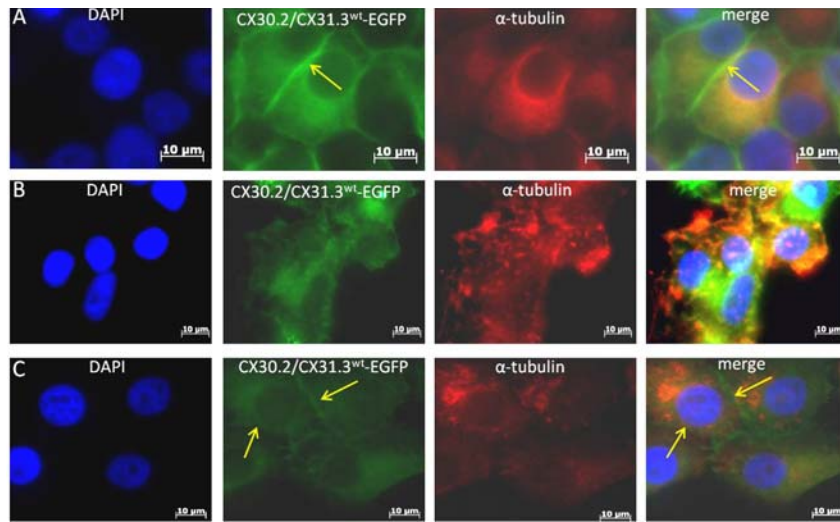


Fig. 8. Effect of Nocodazole (Noco) in stably express CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP HeLa cells and immunocytochemistry using anti-tubulin antibody. (A) DMSO treated with cells 2hr. (B) Nocodazole (10μg/ml) treated with cells 1hr to disassembled the microtubules. (C) Nocodazole (10μg/ml) treated with cells 1hr to disassembled the microtubules. Arrows indicate formation of gap junction channel with neighboring cells. The cells were counterstained with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μm.

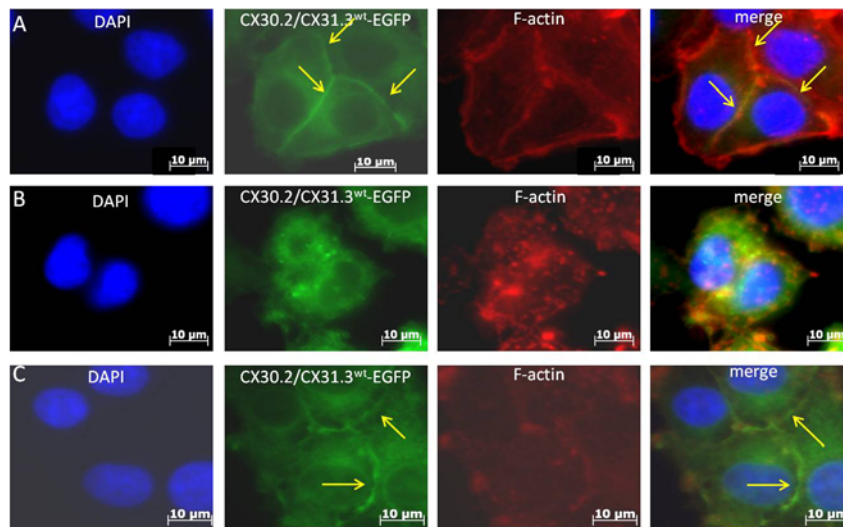


Fig. 9. Effect of Cytochalasin B (CytoB) in stably express CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP HeLa cells and immunocytochemistry using Phalloidin staining. (A) DMSO treated with cells 2hr. (B) Cytochalasin B (10μg/ml) treated with cells 1hr to disassembled the microtubules. (C) Cytochalasin B (10μg/ml) treated with cells 1hr to disassembled the microtubules. Arrows indicate formation of gap junction channel with neighboring cells. The cells were counterstained with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μm.

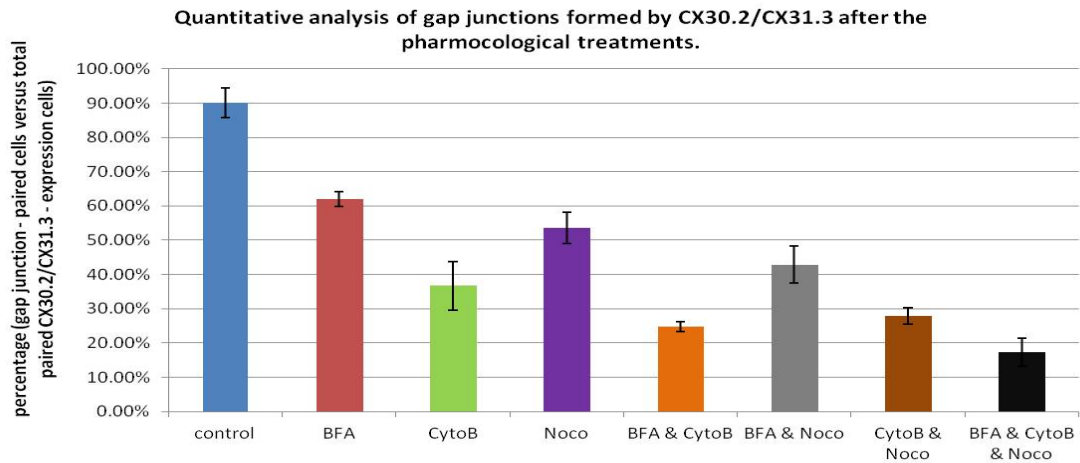


Fig. 10. Quantitative analysis of gap junctions formed by CX30.2/CX31.3^{WT} after the pharmacological treatments. Data represent \pm SD of the percent, after the pharmacological treatments, cells expressing gap junctions versus the total of paired CX30.2/CX31.3^{WT}-expressing cells. (Cells number of control or treatments are 1500.)

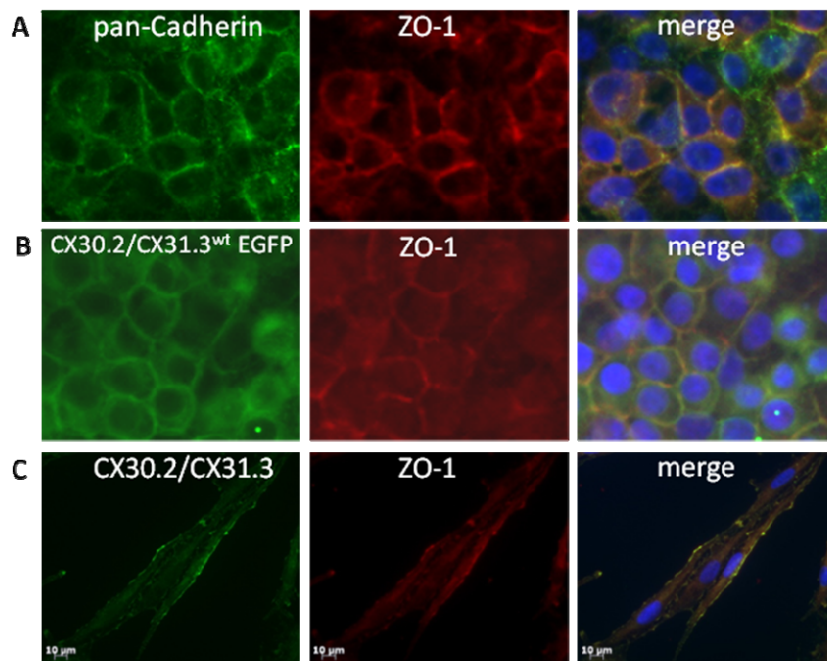


Fig. 11. Interaction of CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP with ZO-1 proteins in stably transfected HeLa cells and in transfected glioma cells and immunocytochemistry using ZO-1 antibody. (A) Fluorescence microscopy of ZO-1 in HeLa cells revealed fluorescence along cell membrane. (B) Fluorescence microscopy of CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in stably transfected HeLa cells revealed continuous fluorescence along cell membrane and interaction with ZO-1 proteins. (C) Fluorescence microscopy of CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in transfected glioma cells revealed interaction with ZO-1 proteins. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

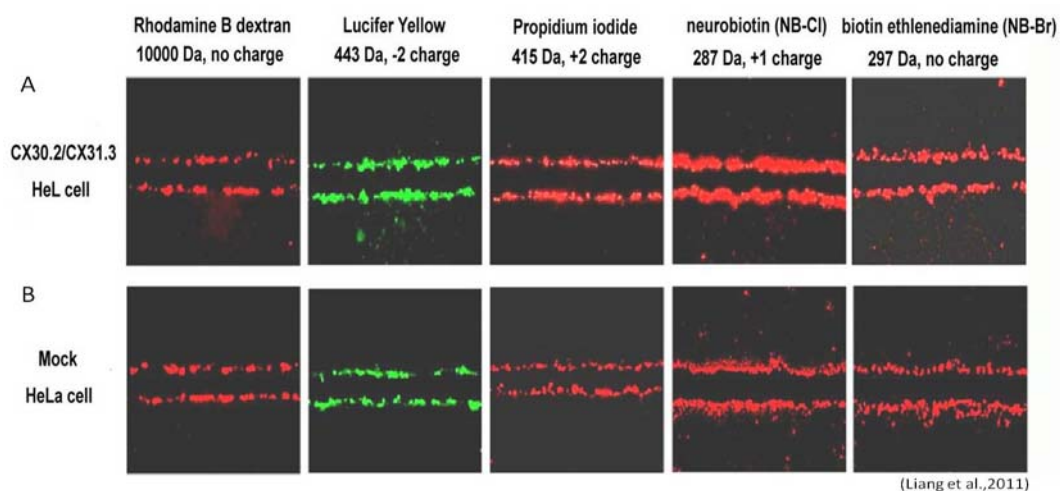


Fig. 12. Dye transfer after scrape loading stably express CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in HeLa cells. (A) Fluorescence images of stably expressed CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in HeLa cells (B) and mock HeLa cell. Cells were incubated in Lucifer Yellow (LY; 443 Da, -2 charge), propidium iodide (PI; 415 Da, +2 charge), neurobiotin (NB-Cl; 287 Da, +1 charge) or biotin ethylenediamine (NB-Br; 297 Da, uncharge). Rhodamine-dextran (10,000 Da) was the negative control. There are no dye transfer to neighboring cells.

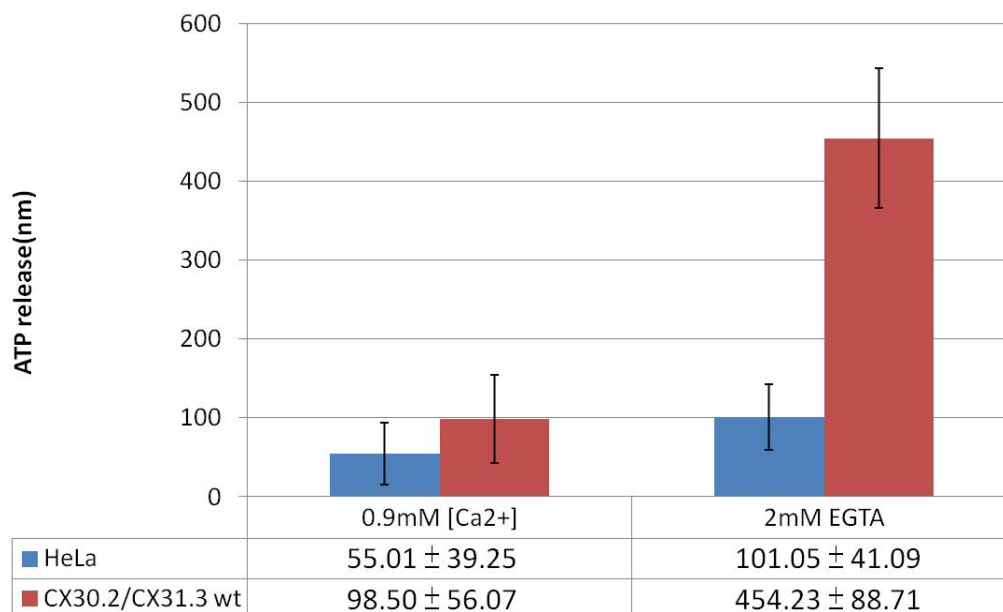


Fig. 13. Analysis of activity of CX30.2/CX31.3 hemichannels by bioluminescence assay for quantitative determination of ATP released from CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in stably transfected HeLa cells.

Bar chart showing ATP release from stably expressing CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP HeLa cells and the mock HeLa cells, cultured in 0.9mM [Ca²⁺] with PBS or 2mM EGTA with PBS (n=3).

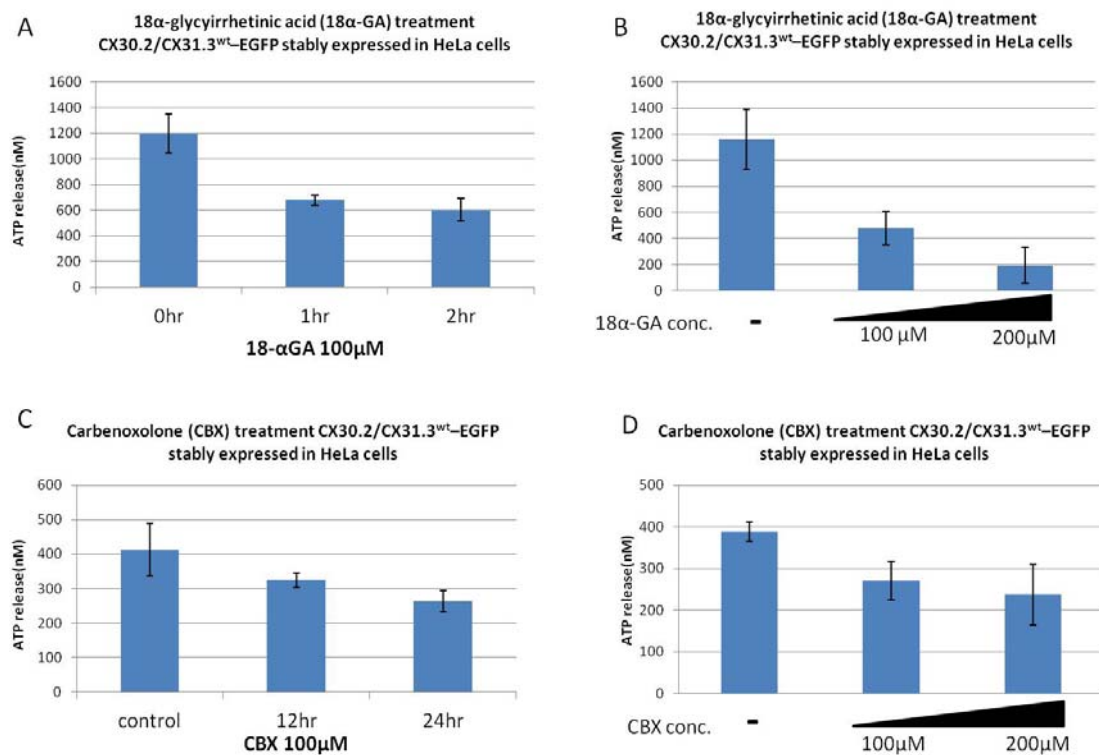


Fig. 14. Analysis of effect of CX30.2/CX31.3 hemichannels by gap junction hemichannel inhibitor 18 α -glycyrrhethinic acid (18 α -GA) and Carbenoxolone (CBX) for quantitative determination of ATP released from CX30.2/CX31.3^{WT}-EGFP in stably transfected HeLa cells. (A) Cultured 18 α -GA 100 μ M medium and DMSO (control) in time course. (B) Cultured 18 α -GA 100 μ M and 200 μ M with 1hr. (C) Cultured CBX 100 μ M medium and ddH₂O (control) in time course. (D) Cultured CBX 100 μ M and 200 μ M with 1hr. (n=3)

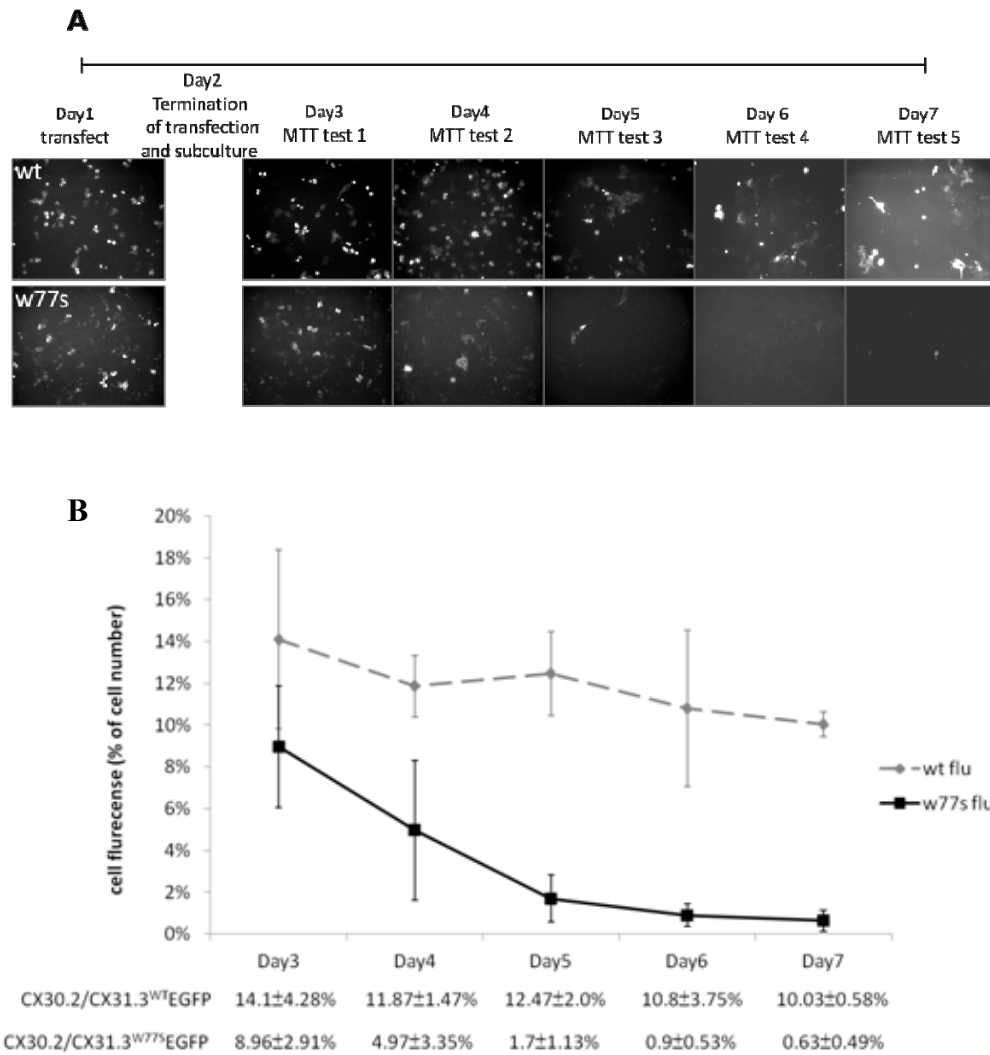


Fig. 15. Analysis of wild-type and p.W77S mutant CX30.2/CX31.3 expression in transiently transfected HeLa cells. (A) Fluorescence microscopy of the p.W77S mutant CX30.2/CX31.3 transfected HeLa cells show progressive decrease in time course. Mock HeLa cell is a positive control. The statistical analysis of cells expressing fluorescent fusion protein presents in panel B (n=1000).

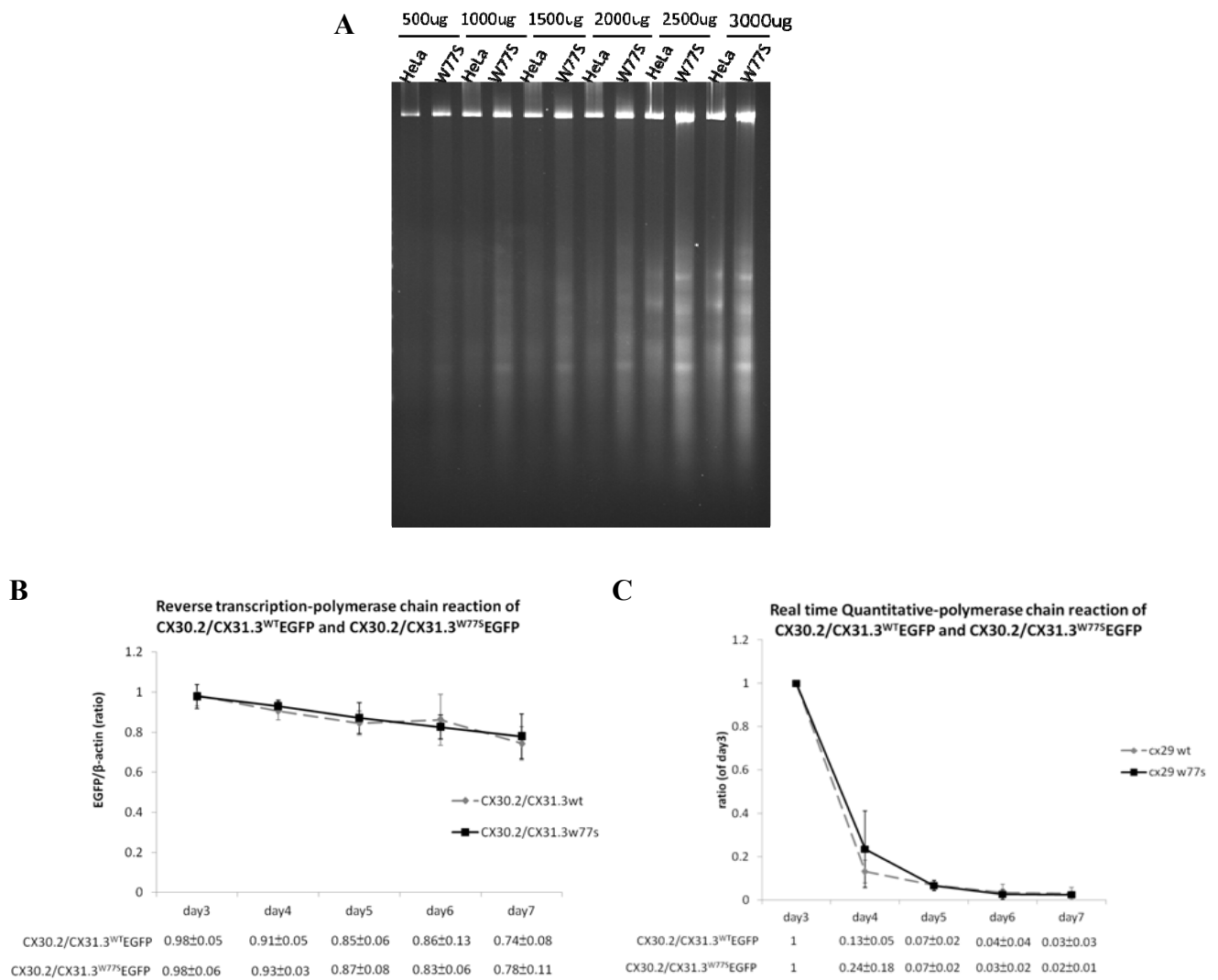


Fig. 16. Analysis of genomic DNA and mRNA expression in p.W77S transiently transfected HeLa cells. (A) DNA fragments were not significantly detected in CX30.2/CX31.3^{W77S} expression and mock HeLa cells. Then, mRNA expression of CX30.2/CX31.3^{WT} and CX30.2/CX31.3^{W77S} were detected from 3 day to 7 day using RT-PCR (B) and Q-PCR (C) The statistical analysis of mRNA in panel B and C.

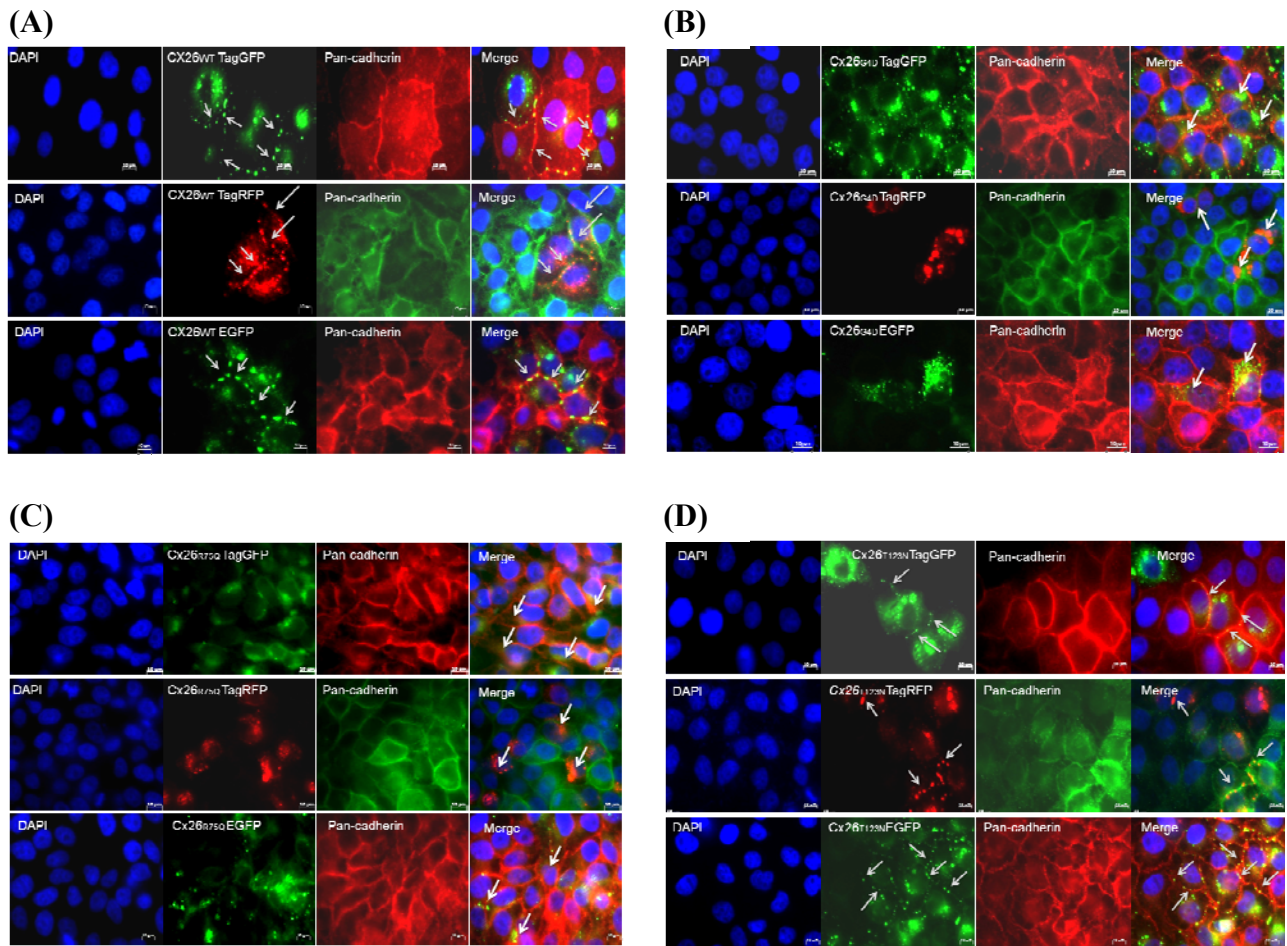


Fig. 17. Analysis of wild-type and mutant CX26 expression in stably transfected HeLa cells by immunocytochemistry using pan-cadherin antibody.

Fluorescence microscopy of (A) CX26^{WT} and (D) CX26^{T123N} HeLa cells showing expression of CX26 fusion protein at the plasma membranes. In contrast, the (B) CX26^{G4D} and (C) CX26^{R75Q} stably transfected HeLa cells show impaired trafficking and concentration in the cytoplasm. Arrows indicate the localization of CX26 protein. Scale bars: 10 μ m.

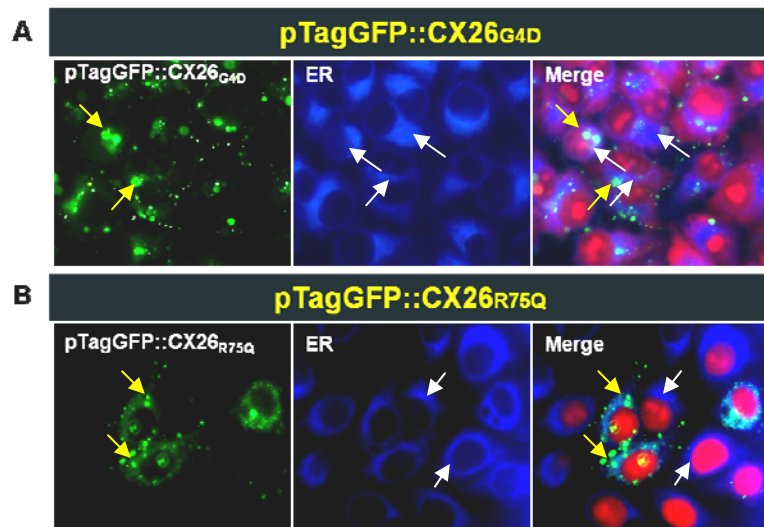


Fig. 18. Intercellular localization of the mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP proteins. Photomicrograph of HeLa cells stably transfected with CX26^{G4D}-TagGFP (A) or CX26^{R75Q}-TagGFP (B) cDNA and immunostained for use as markers of ER. The staining results for mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP showed the different localization from ER (blue). Yellow arrows indicate the localization of CX26 mutant protein. White arrows indicate the localization of ER. The cells were counterstained with PI (red) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

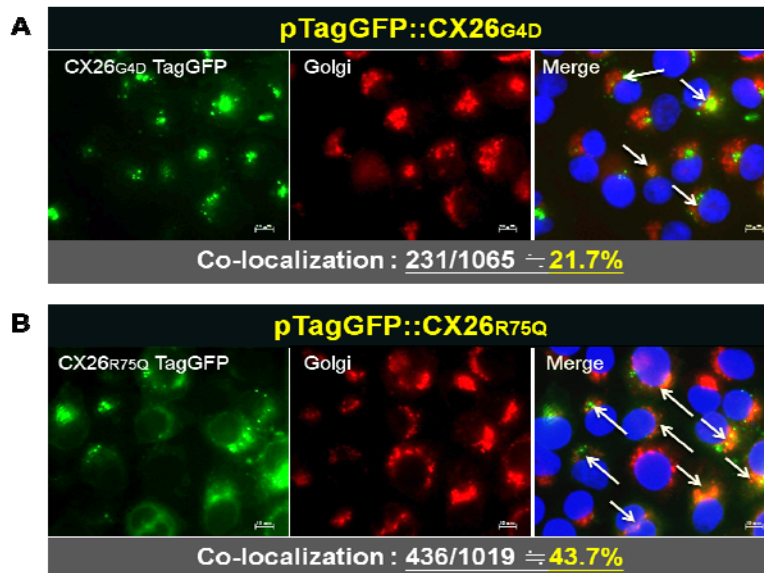


Fig. 19. Association of missense mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP proteins with Golgi apparatus. Photomicrograph of HeLa cells stably transfected with CX26^{G4D}-TagGFP (A) or CX26^{R75Q}-TagGFP (B) cDNA and immunostained for use as markers of Golgi apparatus. The staining results for mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP showed the substantial co-localization in the Golgi apparatus. Arrows indicate the localization of CX26 protein. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

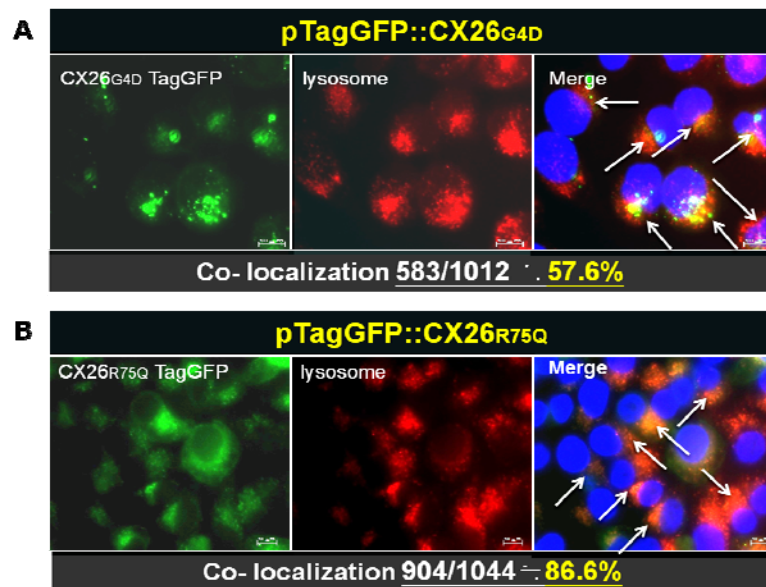


Fig. 20. Association of missense mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP proteins with lysosome. Photomicrograph of HeLa cells stably transfected with CX26^{G4D}-TagGFP (A) or CX26^{R75Q}-TagGFP (B) cDNA and immunostained for use as markers of Golgi apparatus. The staining results for mutant CX26^{G4D}-TagGFP and CX26^{R75Q}-TagGFP showed the substantial co-localization in the lysosome. Arrows indicate the localization of CX26 protein. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μ m.

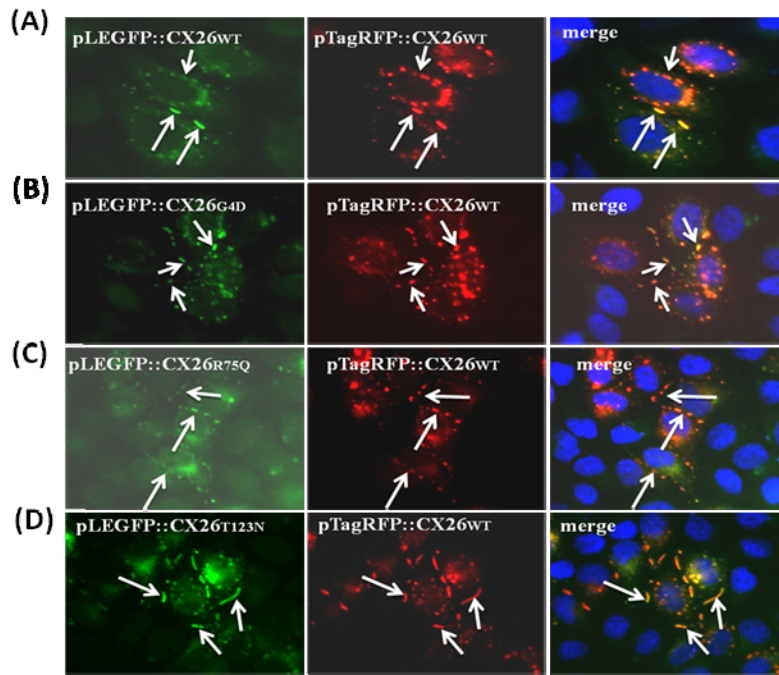


Fig. 21 Co-expression of mutant proteins with CX26^{WT} in transiently transfected HeLa cells. HeLa cells co-expressing CX26^{WT}-EGFP (A) or CX26^{T123N}-EGFP (D) with CX26^{WT}-TagRFP revealed co-localization of both proteins at the plasma membrane. CX26^{G4D}-EGFP (B) or CX26^{R75Q}-EGFP (C) co-expressing with CX26^{WT}-TagRFP exhibited the same pattern as homozygous WT. Both of them were displayed at the plasma membrane. Arrows indicate co-expression protein. The cells were counterstained with DAPI (blue) to highlight the nuclei. Scale bars: 10 μm.

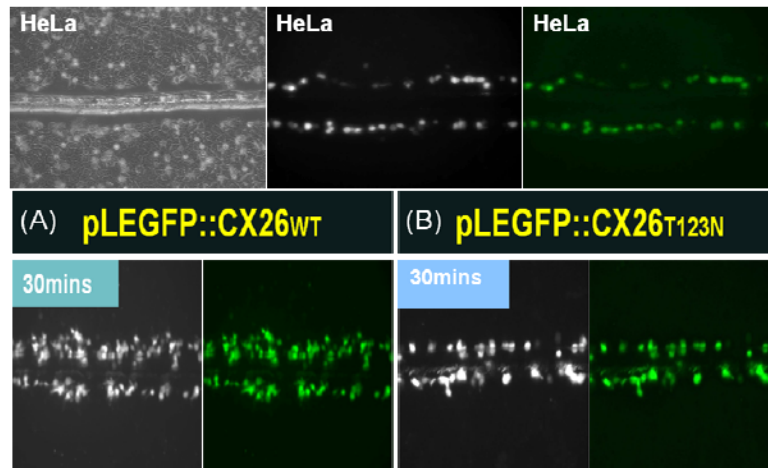


Fig. 22. Scrape loading dye transfer in HeLa cells stably expressing CX26^{WT}-EGFP or CX26^{T123N}-EGFP. Fluorescence images of stably expressed CX26^{WT}-EGFP (A) or CX26^{T123N}-EGFP (B) in HeLa cells and mock HeLa cell. This Cells were incubated in Lucifer Yellow (LY;443 Da, -2 charge) for 30 minutes. The wounded cells took up the dye in all cases, but no dye was transferred from wounded parental cells to neighboring cells in CX26^{T123N}-EGFP expressing cells.

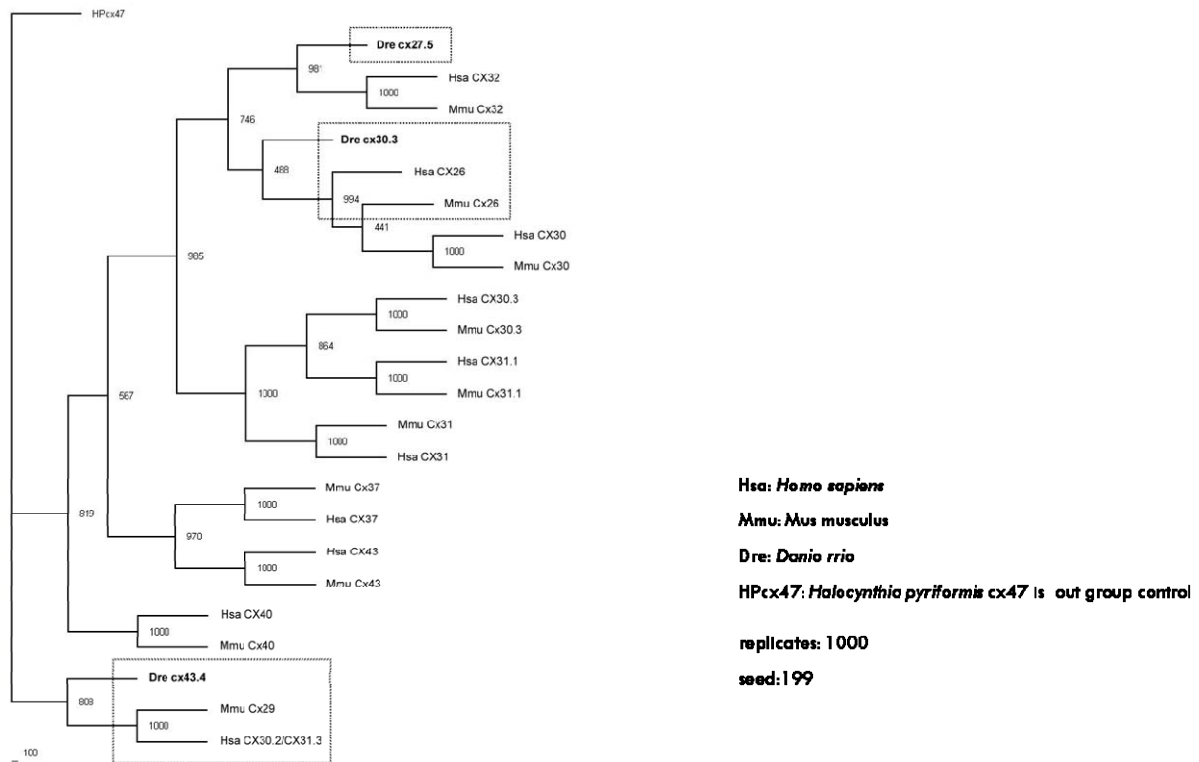


Fig. 23. Neighbor-joining tree. A neighbor-joining tree show that the zebrafish Cx30.3 and Cx27.5 amino acid sequence is closely to human CX26 as well as zebrafish Cx43.4 is also closely to human CX30.2/CX31.3. Bootstrap values are base on 1000 neighboring replicates and indicated as node labeling. Hsa: *Homo sapiens*, Mmu: *Mus musculus*, Dre: *Danio rerio*, HPcx47: *Halocynthia pyriformis cx47* is out group control.

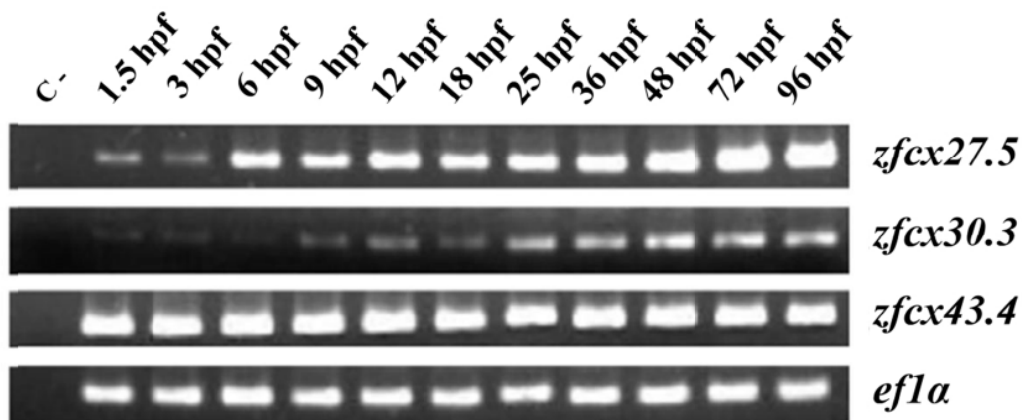


Fig. 24. Analysis of zebrafish *cx27.5* and *cx30.3* gene expression in embryo development stage by RT-PCR. Zebrafish *cx27.5* (*zfcx27.5*) is small expressed in the 1.5 to 3 hpf and large expressed after 6 to 96 hpf. Contrarily, *zfcx30.3* transcripts are hardly detected until 9 hpf. *zfcx34.4* transcripts are consistent expressed from 1.5 hpf to 96 hpf. *Efla* (elongation factor 1-Alpha) is an internal control. hpf: hour post fertilization.

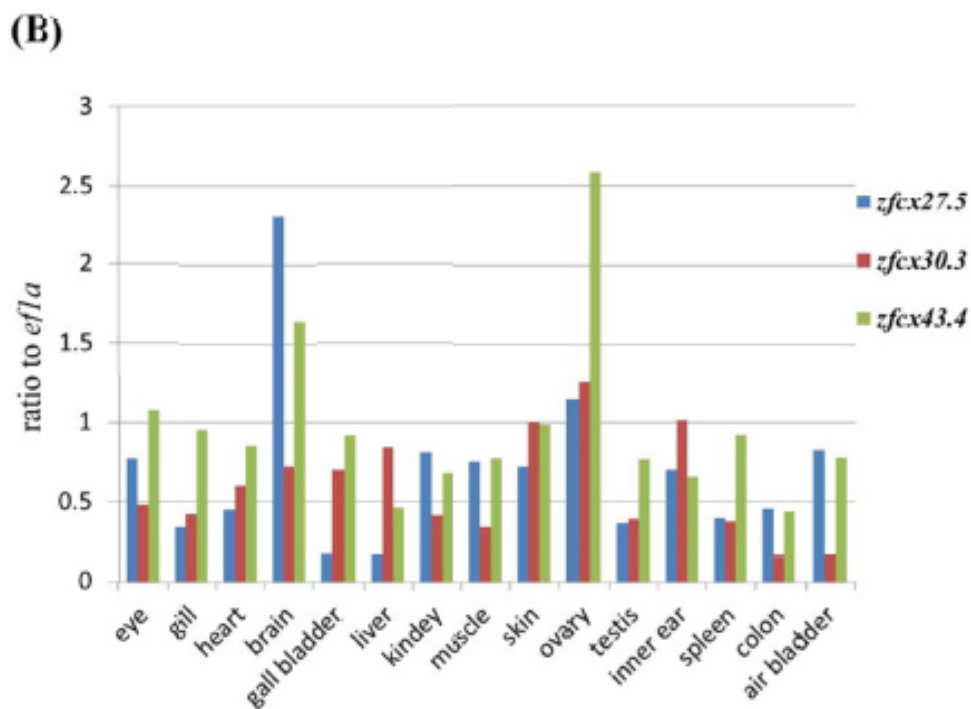
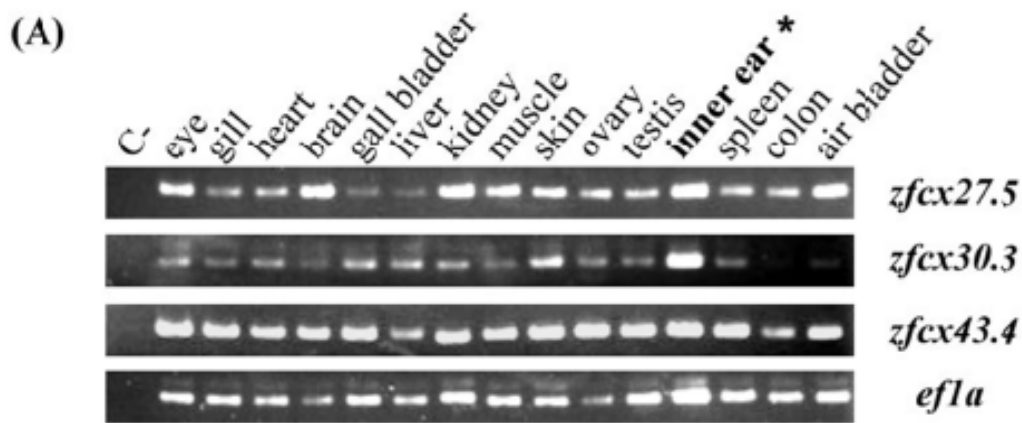


Fig. 25. Analysis of zebrafish *cx27.5* and *cx30.3* gene expression in adult tissues by RT-PCR. *Zfcx27.5* and *zfcx43.4* are large expressed in most adult tissues, except liver tissue. *Zfcx30.3* is only large expressed in the ovary of zebrafish including two isoform. Notably, *zfcx27.5*, *zfcx30.3* and *zfcx43.4* are expressed in the inner ear of zebrafish, which is similar to human *GJB2* (*CX26*) and *GJC3* (*CX30.2/CX31.3*) expression in the inner ear. *Efla* (elongation factor 1-Alpha) is an internal control.

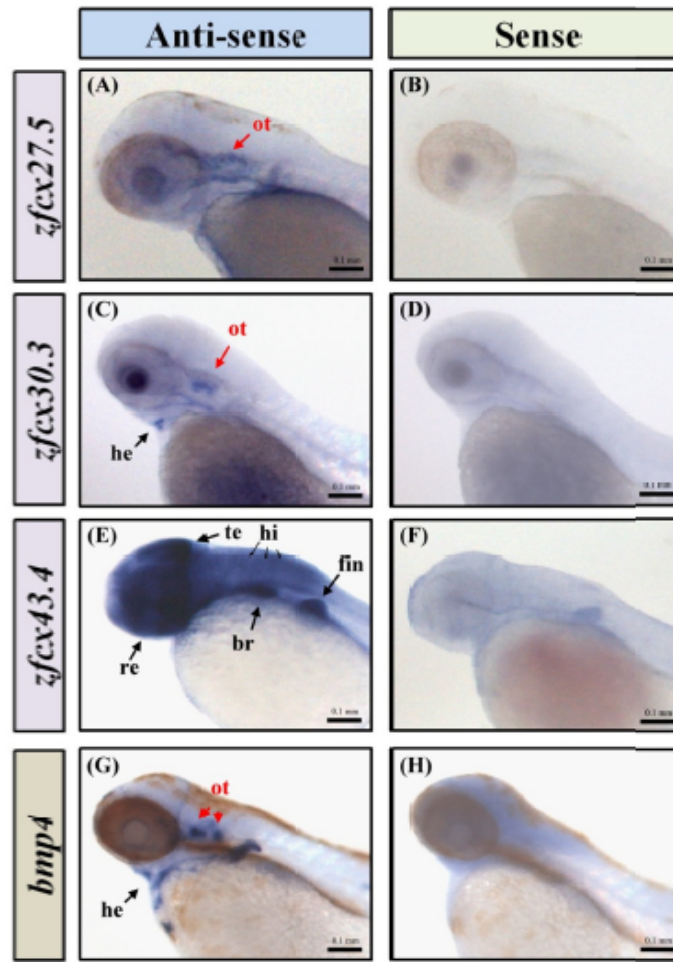


Fig. 26. Whole-mount in situ hybridization (WISH) in 72 hpf embryos. All images are lateral views, anterior is to the left and dorsal is up. (A, B) *zfcx27.5* mRNA is detectable in otic vesicle (ot). (C, D) *zfcx30.3* mRNA is also detectable in otic vesicle (ot) and heart (he). (E, F) *zfcx43.4* is expressed in branchial arches (ba), retina (re), pectoral fin (pf), and hindbrain (hd) of 72 dpf embryos. (G, H) *bmp4* mRNA probe is a otic vesicle marker. Scale bars: 1 mm.

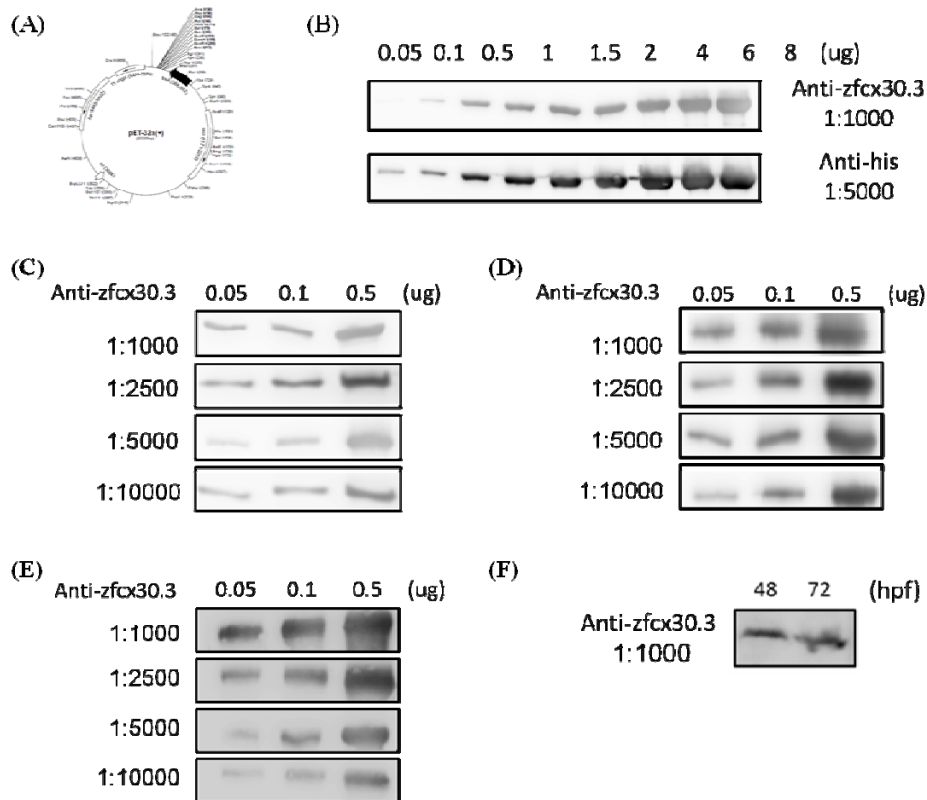


Fig. 27. Zfcx30.3 antibody production. (A) We clone zfcx30.3 c-tail sequence in the pET32b plasmid and express recombinant protein by BL21 strain of *E.coli*. Then, we purify the recombinant protein using nickel-column and immune rabbit to obtain the antibody. After immune 2 weeks (B), 4 weeks (C), 6 weeks (D) and 18 weeks (E), we test the rabbit serum and found that the serum can detected to the lower from 0.5 μg to 0.05 μg recombinant protein using western-blot analysis. Anti-his antibody is positive control. (F) We also detected zfcx30.3 protein in 48 and 72 hpf embryo of zebrafish using immune 6 week serum.

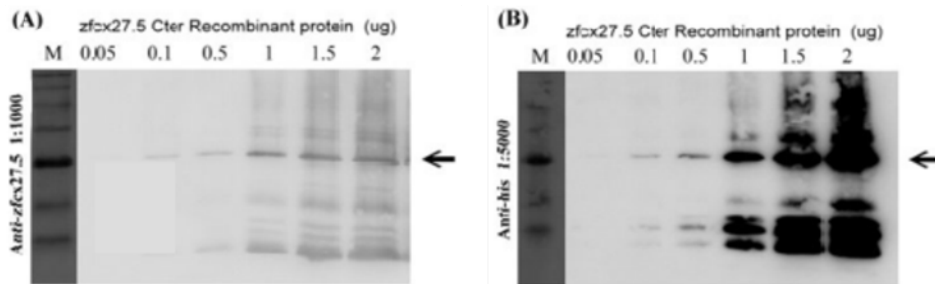


Fig. 28. Zfcx27.5 antibody production. (A) We clone zfcx27.5 c-tail sequence in the pET32b plasmid and express recombinant protein by BL21 strain of *E.coli*. Then, we purify the recombinant protein using nickel-column and immune rabbit to obtain the antibody. (A) After immune 5 weeks, we test the rabbit serum and found that the serum can detected to the lower from 2 μg to 0.05 μg recombinant protein using western-blot analysis. (B) Anti-his antibody is positive control. Arrow indicate the protein molecular size.

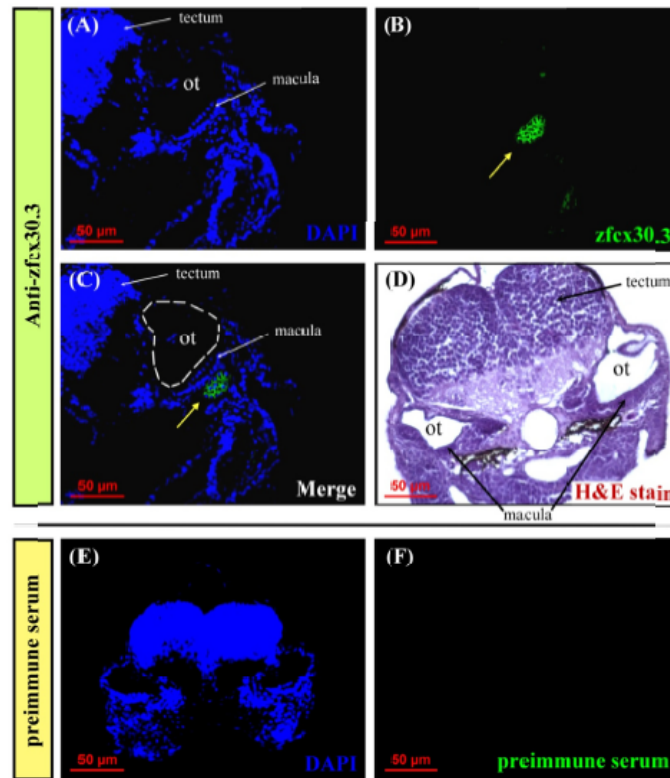


Fig. 29. Immunolabeling patterns of zfcx30.3 in the inner ear of 72 hpf embryo. (A-D) Expression of zfcx30.3, indicated by yellow arrows, is shown in the supporting cell using anti-zfcx30.3 antibody. (E-F) Zfcx30.3 expression is not shown in the 72 hpf embryo using preimmune serum. (A, E) Sections of the 72 hpf embryo were counterstained with DAPI to highlight the nuclei. (B, F) zfcx30.3 expression (C) (A) merge (B) (D) HE staining. Scale bars: 50 μ m.

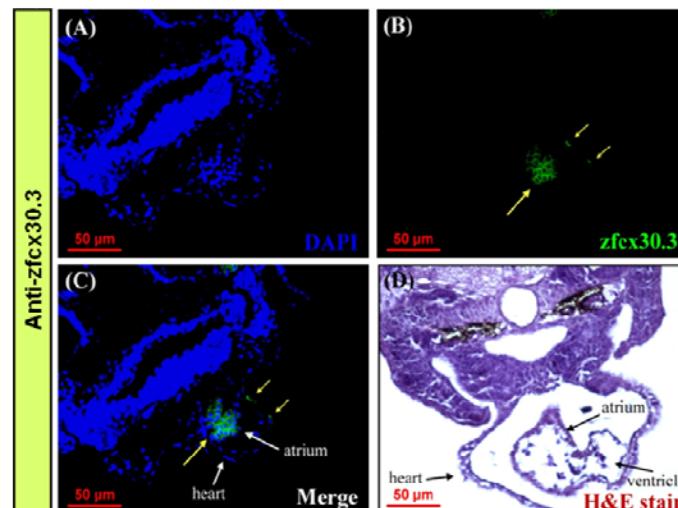


Fig. 30. Immunolabeling patterns of zfcx30.3 in the inner ear of 72 hpf embryo. (A-D) Expression of zfcx30.3, indicated by yellow arrows, is shown in the heart using anti-zfcx30.3 antibody. (A) Sections of the 72 hpf embryo were counterstained with DAPI to highlight the nuclei. (B) zfcx30.3 expression (C) (A) merge (B) (D) HE staining. Scale bars: 50 μ m.

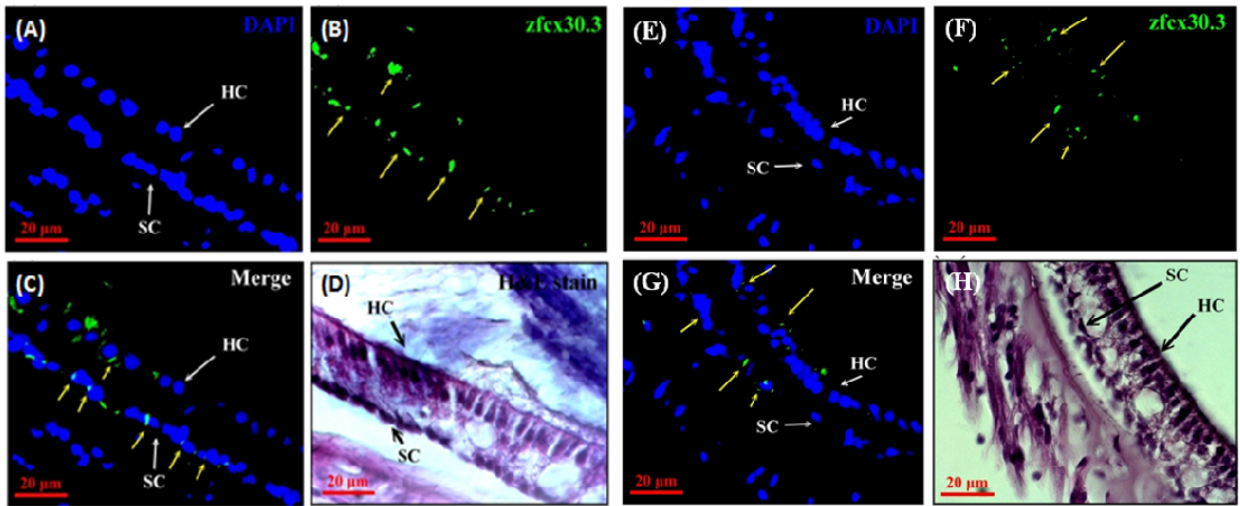


Fig. 31. Immunolabeling patterns of zfcx30.3 in the inner ear of adult zebrafish. Expression of zfcx30.3, indicated by yellow arrows, is shown in the saccule (A-D) and utricle (E-H), especially in the supporting cell (SC) and hair cell (HC) using anti-zfcx30.3 antibody. (A, E) Sections of the adult tissues were counterstained with DAPI to highlight the nuclei. (B, F) zfcx30.3 expression (C, G) (A) or (E) merge separately with (B) or (F). (D, H) HE staining.

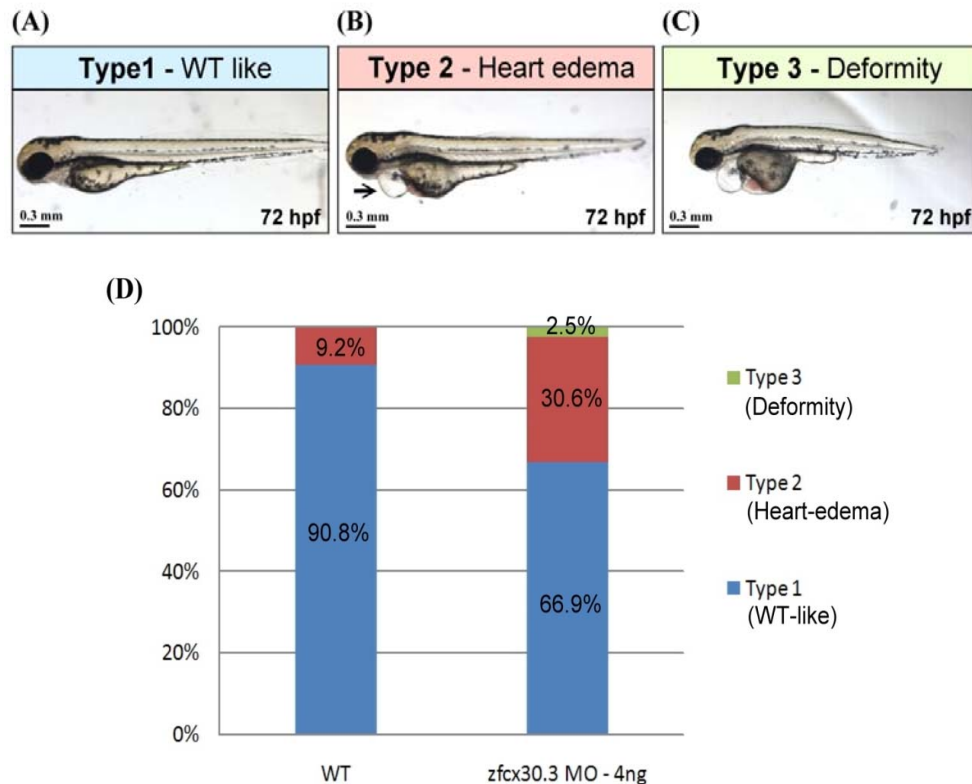


Fig. 32. Morpholinos to *zfcx30.3* phenocopy otic defects in wild-type zebrafish. We microinjected 4 ng morpholino oligonucleotide (MO) to knock down *zfcx30.3* translation. All DIC images of 72 hpf embryos are lateral views, anterior is to the left and dorsal is up. *zfcx30.3* morphants show the wild-type like (A), heart edema (B) and abnormal somite (C) phenotype. The statistical analysis of morphants presents in panel D. Scale bars: 0.3 mm.

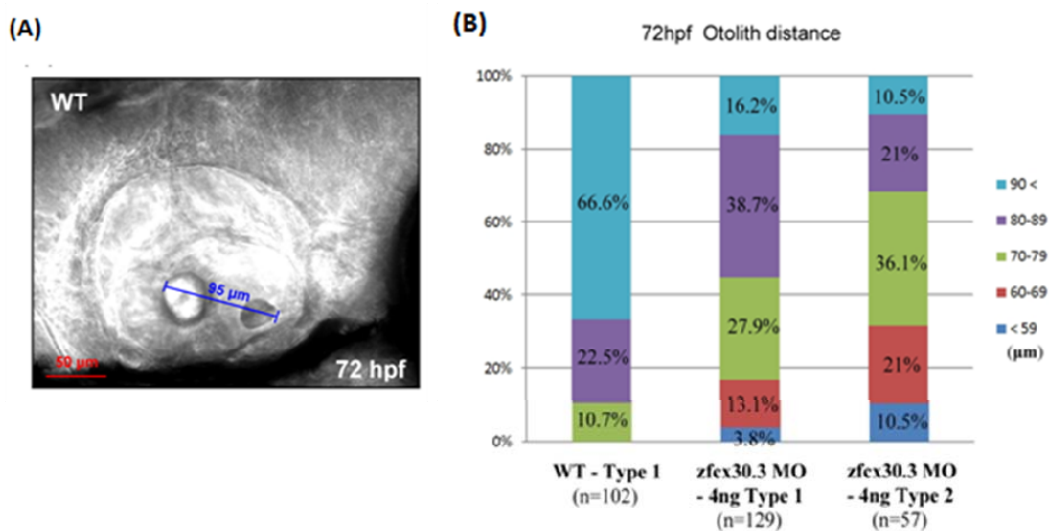


Fig. 33. Knockdown of *zfcx30.3* expression causes shorter otolith distance in the 72 hpf embryos. *zfcx30.3* morphants show the wild-type like, heart edema and abnormal somite phenotype. (A) We detected the distance between two otoliths and (B) divided the distance into five groups. The reduced otolith distance in both *zfcx30.3* morphants phenotype. Scale bars: 50 μm.

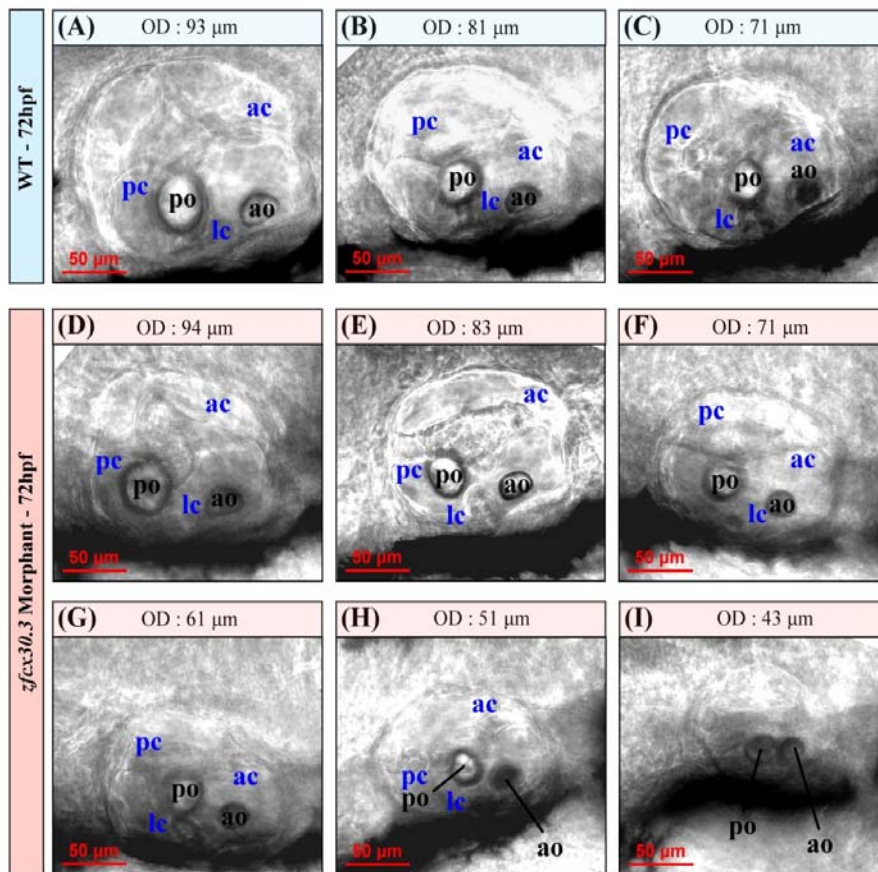


Fig. 34. DIG images showing the inner ear phenotypes of *zfcx30.3* morphants in the 72 hpf embryos. (A-C) Lateral views of wild-type (WT) inner ear for comparison with *zfcx30.3* morphants. (D-I) *zfcx30.3* morphants reveal the reduced otolith distance and size of cochlea. OD: otolith distance, ao: anterior otolith, po: posterior otolith, ac: anterior semicircular canal, lc: lateral semicircular canal, pc: posterior semicircular canal. Scale bars: 50 μm .

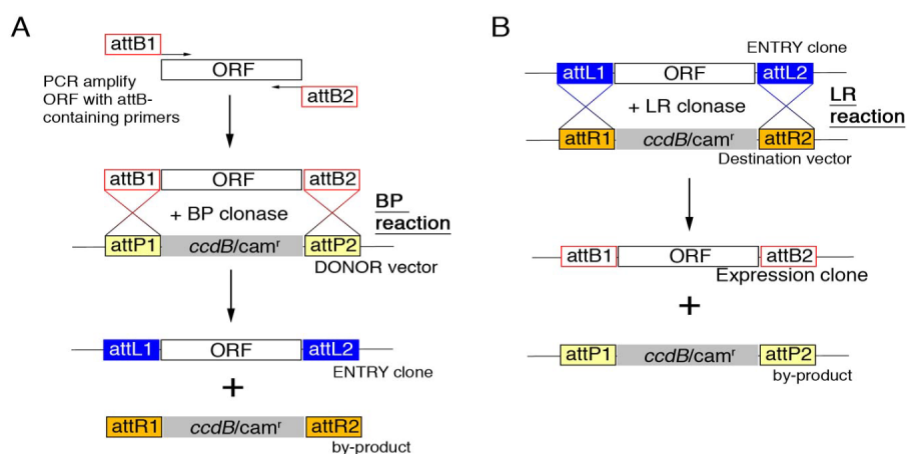


Fig. 35. MultiSite Gateway cloning system (Invitrogen). (A) Description of the BP reaction for a polymerase chain reaction amplified open reading frame to get an ENTRY clone and by-product. (B) LR reaction between an ENTRY clone and a Destination vector to get an Expression clone. Note that att sites are not to scale.

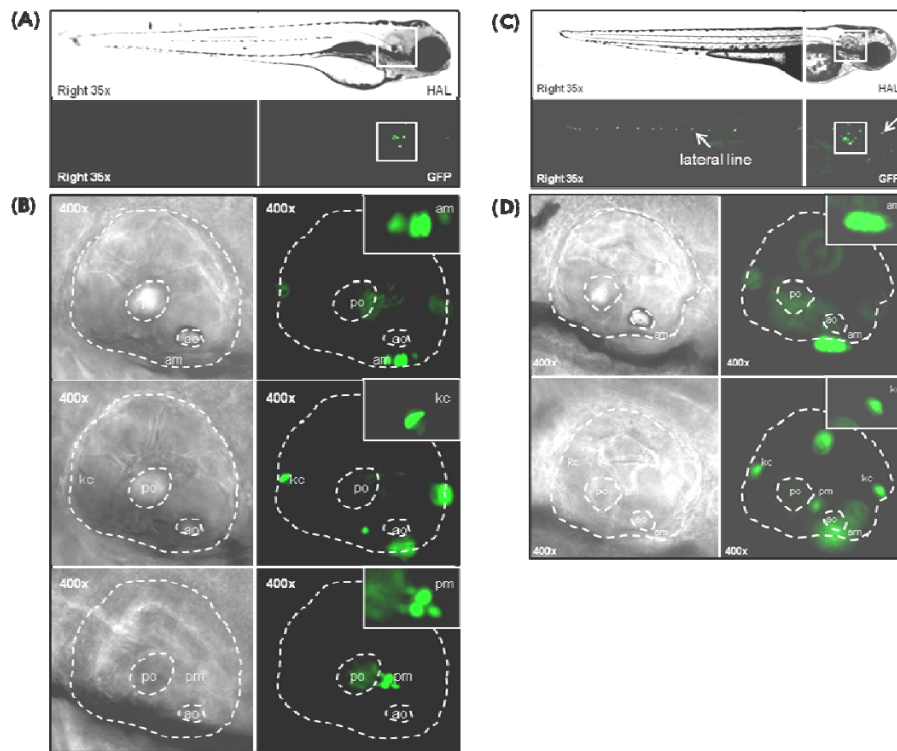


Fig. 36. Cellular distribution of TagGFP in the pvalb3b transgenic line. All DIC images of 96 hpf embryos are lateral views, anterior is to the right and dorsal is up. Fluorescent images of 96 hpf embryos demonstrate TagGFP labeling in the otic vesicle (A) or/and lateral line (C). (B, D) In ventral view of embryo in 96 hpf, sensory epithelia containing TagGFP-positive cells are located beneath the two otoliths or crista. ao: anterior otolith, po: posterior otolith, am: anterior macula, pm: posterior macula, kc: Kinocilia of the crista hair cells.

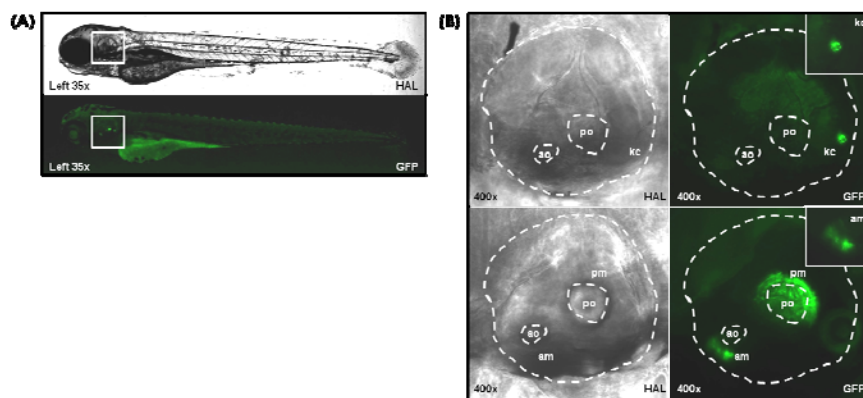


Fig. 37. Cellular distribution of hCX26-TagGFP in the pvalb3b transgenic line. All DIC images of 96 hpf embryos are lateral views, anterior is to the left and dorsal is up. (A) Fluorescent images of 96 hpf embryos demonstrate hCX26-TagGFP labeling in the otic vesicle. (B) In ventral view of embryo in 96 hpf, sensory epithelia containing hCX26-TagGFP-positive cells are located beneath the two otoliths or crista. ao: anterior otolith, po: posterior otolith, am: anterior macula, pm: posterior macula, kc: Kinocilia of the crista hair cells.

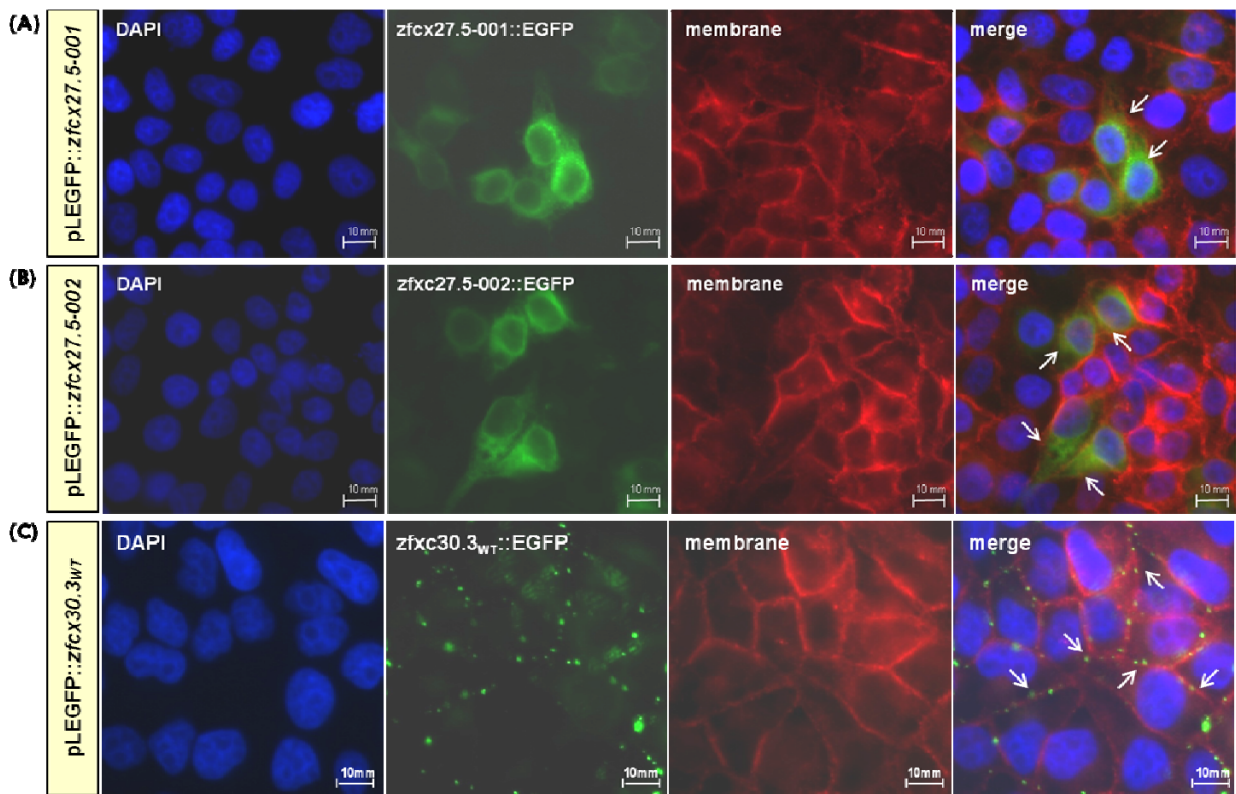


Fig. 38. Analysis of zebrafish connexin 27.5 (*zfcx27.5*) and *zfcx30.3* expression in transiently transfected HeLa cells by immunocytochemistry using pan-cadherin antibody. Fluorescence microscopy of the *zfcx27.5*-001 (A) and *zfcx27.5*-002 (B) transfected HeLa cells show concentration of *zfcx27.5* fusion protein in the cytoplasm. In contrast, the (C) *zfcx30.3* transfected HeLa cells show expression of *zfcx30.3* fusion protein at the plasma membrane. The results demonstrate *zfcx30.3* is more similar to human *GJB2* (*CX26*) than *zfcx27.5*. Arrows indicate the localization of *zfcx27.5* or *zfcx30.3* proteins. Scale bars: 10 μm.

行政院國家科學委員會補助團隊參與國際學術組織會議報告

101 年 06 月 22 日

報告人姓名	楊建洲	服務機構	中山醫學大學 生物醫學科學學系	職稱	副教授
會議正式名稱	中文：2012 第 45 屆發育生物學與第 64 屆細胞生物學聯合研討會 英文：2012 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology				
會議時間	自 101 年 05 月 28 日至 101 年 05 月 31 日	地點（國、州、城市）		日本神戶	

報告內容包括下列各項：

一、參加會議經過

2012 年在日本神戶舉辦的第 45 屆發育生物學與第 64 屆細胞生物學聯合研討會，是個非常大型的國際會議，分為六個不同的主題，分別如下：1.Cellular dynamics and Morphogenesis；2.Frontiers in intracellular transport and organelle biology；3. Intrinsic and extrinsic control of stem cell system；4.Epigenomic regulation of gene expression；5.Regulating embryonic development and organogenesis variations and underlying common principles；6.Superresolution fluorescence imaging of cellular functions。另外有三個壁報發表時段來進行，詳細議程如下列網址所示：<http://www.aeplan.co.jp/jsdb-jscb2012/program.html>。本人此次參與會議除聆聽一些演講和參觀別人的壁報發表外，本人也將在國科會計畫支持下所做的部分結果以壁報的方式呈現，我此次發表了兩張壁報 1.Functional study of *CLAUDIN14* mutants in nonsyndromic hearing loss using cell model(圖一；P2-110)與 Connexin gene is required for inner ear development in the zebrafish (圖二 A 和 B; P3-139)分

別被歸類在 cell-cell interaction/cell adhesion /extracellular matrix 與 Evolution/diversity/early development/morphogn。

二、與會心得

在研討會第一天下午京都大學教授 Yoshiko Takahashi 的演講中他提到:JSCB 與 JSDB 這兩個不同大型研討會的聯合舉辦，能夠促使細胞生物學與發育生物學之間激盪出正向的火花，幫助生命科學推向更高的境界。發育生物學是一個觀察多個細胞的系統，能夠追溯細胞之間發育的起源與發育的走向；然而細胞生物學則是趨向於研究個別細胞與細胞之間的研究，分析細胞內的分子機制，細胞的結構，與細胞的功能。發育生物學與細胞生物學這兩門科學之間有著密不可分的關係，若是能夠將這兩門科學知識加以統整歸納，必定是一件好事，藉由這次的聯合研討會提供一個便利的環境，讓發育生物學與細胞生物學的學者之間能夠便利的交流。

這次帶著我的研究生參加研討會，總共張貼了兩張壁報(圖一，圖二)，在 Functional study of CLAUDIN14 mutants in nonsyndromic hearing loss using cell model 這張壁報張貼之後，總共有十位學生及在場學者提出問題，這張壁報的內容主要是利用細胞模式來探討台灣學齡前聽障患者 *CLAUDIN14* 基因突變之後所造成的致病機轉，最後也發現了咖哩主成分之一的薑黃素能夠挽救突變 *CLAUDIN14* 在 MDCK 細胞株的功能，且可能是藉由抑制蛋白酶體 (proteasome) 來達成效果，當然這部分是比較創新的發現，大部分的提問者都是對於這個現象比較有興趣，比較值得一提的是由一位神戶大學教授所提出來的建議，他提到：為何 *CLAUDIN14* 大量表現的 MDCK 細胞株，細胞的 tight junction 功能會有這麼大的轉變，這是個很有趣的現象，是否 *CLAUDIN14* 大量表現後會影響到 MDCK 的內生性 *CLAUDIN* 家族蛋白質，進而影響細胞的 tight junction 功能？是否考慮再做深入的探討？當然這是很好的研究題材，也確實這部分目前還留有個未知的問

號，但在現階段我們的研究主要方向為發現並探討台灣地區聽障基因的致病機轉，至於更深入的部分，會納入往後設計實驗的方向。也有許多教授建議我們，既然知道了突變 *CLAUDIN14* 挽救 tight junction 功能可能是藉由抑制蛋白酶體 proteasome 來達成，應該在更深入的觀察突變 *CLAUDIN14* 在 MDCK 細胞中泛素化(ubiquitilation)的情形，可以利用 E3 泛素連接酶的抗體做標定再行觀察，這是個很好的建議，日後實驗會想辦法進一步做這項觀察。至於另一篇壁報 Connexin gene is required for inner ear development in the zebrafish 是利用斑馬魚系統研究 Connexin 基因與斑馬魚聽力之間的關聯性，斑馬魚的聽力研究是個比較新的題目，提問者大多是學生，他們通常是對於壁報提出疑問並要求詳細講解。

這次的研討會總共有 566 張壁報張貼，在講解自己的壁報之餘，我也撥空走訪了許多學生或是研究員的壁報，其中有幾篇還不錯，看完之後讓我有許多對於自己研究方向的新想法，例如在 Role and mode of nectins in the mouse cellular patterning in sensory organ 這篇壁報中，作者提到了 nectin 這個蛋白質能表現於細胞與細胞之間形成鍵結，鍵結的形式可能為同型合子或異型合子，以小鼠做為模式動物觀察後發現 nectin-1 與 nectin-3 存在於小鼠的耳蝸毛細胞與支持細胞，然而若是把小鼠的 nectin-1 與 nectin-3 基因剔除，則會造成毛細胞之間的接觸產生異常，進而造成感覺缺失，或許在未來我也可以從聽障病人的基因中找尋有無 nectin-1 與 nectin-3 突變的現象，有助於進一步了解聽障病人的致病原因。在 Regulation of tight junctions and actin cytoskeletons by the osmotic gradient in two different renal cell lines 這邊壁報中，作者指出在動物中，上皮組織的功能性主要是一種防禦的功能，藉由 tight junction 來防禦物質的進出，而達到保護與維持的效果，然而作者利用腎臟遠曲小管上皮的 MDCK I 細胞株與腎臟近曲小管上皮 MDCK II 細胞株做研究，他發現了在不同濃度的鈉離子刺激之下，會破壞 tight junction 的結構，使得 tight

junction 蛋白質與細胞內的 actin 蛋白質產生結構上的改變，進一步打開 tight junction 的結構，形成一個個囊泡狀類似開啟狀態的 tight junction 結構，作者也猜測這是在動物腎臟中一種調節的機制，藉由不同的鈉離子濃度來 tight junction 的開啟與關閉。這是個很新奇的研究報告，在過去鮮少看到類似的研究成果，也許 tight junction 的開啟與關閉也是一個正常 tight junction 應該要具備的功能，或許在 *CLAUDIN14* 的突變研究中能夠利用不同濃度的鈉離子來測試 tight junction 是否能正常的開啟與關閉，以此來推測 tight junction 的功能性是否完善。另外有一篇壁報 ILDR1 and ILDR2 recruit tricellulin to tricellular tight junctions，作者指出 tricellular tight junctions 是一個很特別的窄型結構，由三個細胞間的互相接觸形成，而 ILDR1 與 ILDR2 能夠聚集細胞內的 tricellulin 形成 tricellular tight junctions，其中 ILDR1 相較於 ILDR2 是一個比較重要的因子，且表現於內耳，在最近的研究中指出 ILDR1 與 tricellulin 若發生基因異常，會導致 DFNB42 與 DFNB49 的聽障產生，所以在這邊作者認為他們所發現的 ILDR1 與 ILDR2 聚集 tricellulin 進一步形成 tricellular tight junctions 的這種現象對於聽力的形成是非常重要的。tricellular tight junctions 這個觀點是個很值得探討的議題，或許在病人檢體中找尋 ILDR1 與 ILDR2 基因的缺失或突變，送入細胞或模式動物中，觀察在細胞或模式動物內耳中的 tricellular tight junctions 結構也能進一步的了解聽障患者的致病機轉。

此次到日本參加的第45屆發育生物學與第64屆細胞生物學聯合研討會真可謂不虛此行，總共500多篇的壁報以及場數眾多的演講讓我萌生許多想法，在未來的實驗設計又多了許多方向，幫助相當大。這次到日本除了感受當地文化之外，也感受到了日本當地的研究員與學者對於一個研究主題的態度，他們對於一個假設能夠用非常多且非常精細的實驗去加以驗證，這種打破砂鍋問到底的精神很值得學習，期望未來能夠學習他們的精神，讓自己更精進。

三、考察參觀活動（無是項活動者省略）

無

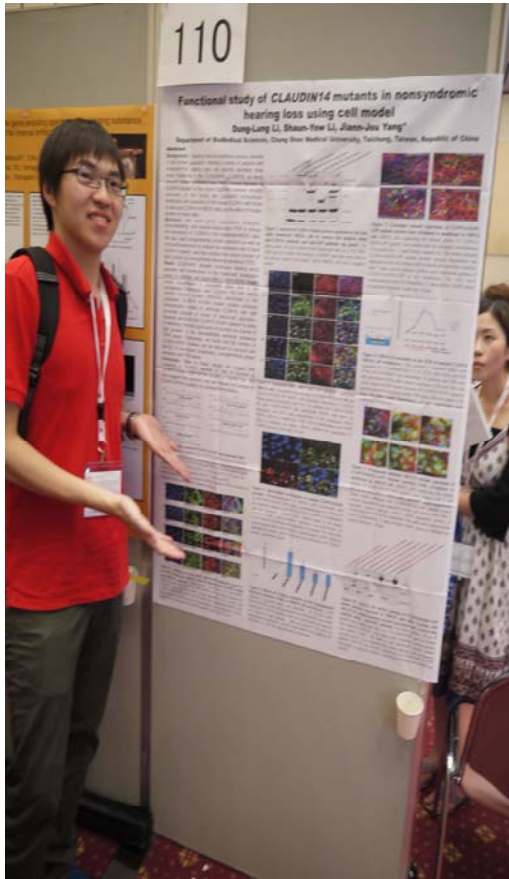
四、建議事項

無

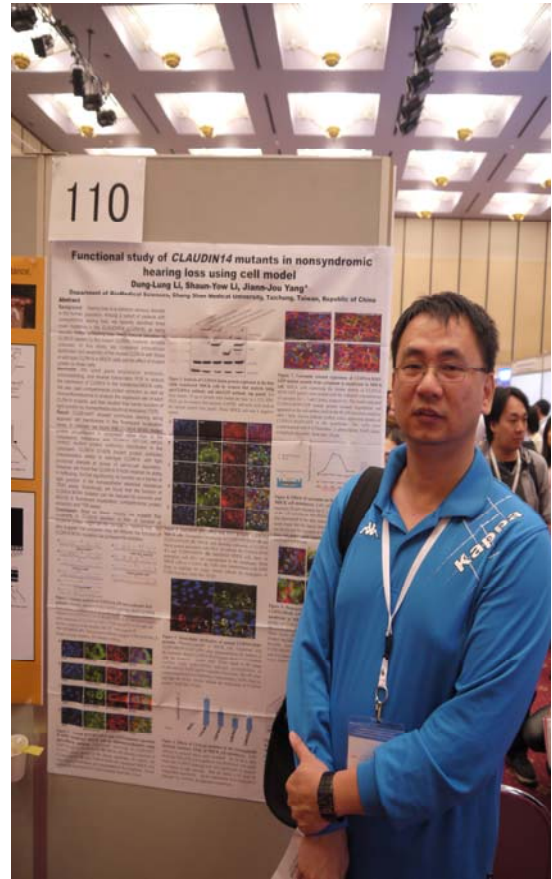
五、其他

感謝國科會提供經費讓研究學者參與國外國際會議，讓研究學者可獲得最新的資訊，也增加國際觀，有助於我們研究的進展。

A

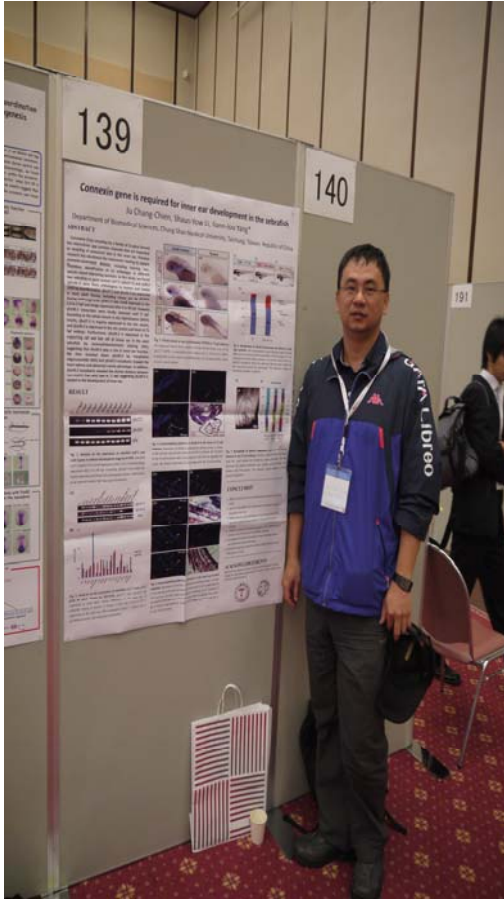


B

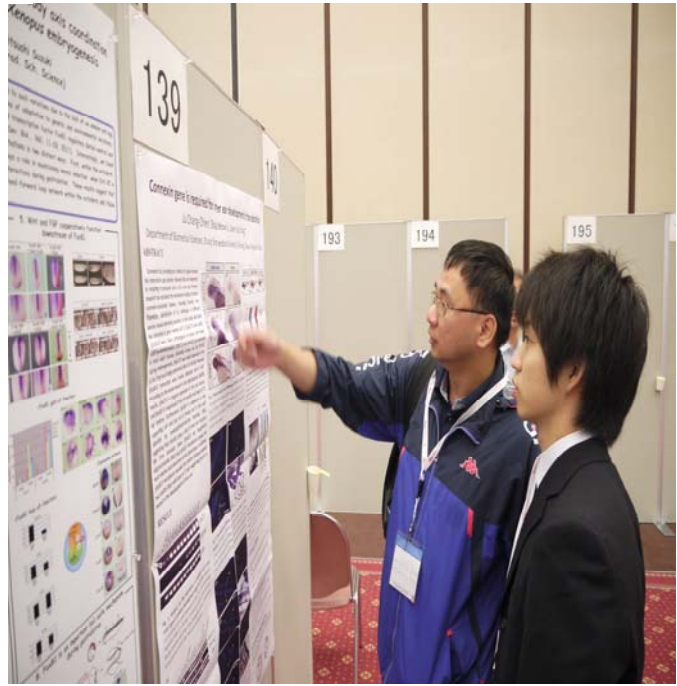


圖一、Functional study of *CLAUDIN14* mutants in nonsyndromic hearing loss using cell model 壁報呈現(P2-110)，(A)圖中人員為本人之研究生。

A



B



圖二、Connexin gene is required for inner ear development in the zebrafish 壁報呈現(P3-139)。

圖中人員為本人(A)。和一個日本研究生討論研究內容。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/07/02

國科會補助計畫	計畫名稱: 利用細胞和動物模式探討connexin26和connexin29基因突變造成聽障之機制
	計畫主持人: 楊建洲
	計畫編號: 98-2320-B-040-016-MY3 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：楊建洲		計畫編號：98-2320-B-040-016-MY3				計畫名稱：利用細胞和動物模式探討 connexin26 和 connexin29 基因突變造成聽障之機制	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	9	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	3	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	4	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	獲得國科會 101 年度大專校院獎勵特殊優秀人才(第一級)(2012/08)
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

我們已將本計畫的研究成果已發表三篇文章於國際期刊，且另有兩篇相關的文章正在投稿中，兩篇正在撰寫中。同時連續在第 25 屆(2010)生物醫學聯合學術年會、第 26 屆(2011)生物醫學聯合學術年會、第 7 屆(2011)歐洲斑馬魚國際會議、(2011)台灣斑馬魚研討會以及第 27 屆(2012)生物醫學聯合學術年會…等會議以壁報方式發表與計畫相關之研究共計 13 篇壁報(包含 4 篇國外，9 篇在國內)。在本研究計畫中我們已證實正常及突變 GJC3 (CX30.2/CX31.3)和 GJB2 (CX26)基因在細胞內的表現情形及功能。另外在斑馬魚系統的建立上，我們完成選殖與人類及小鼠 GJC3 和 GJB2 基因相似的斑馬魚 connexin 基因 (zfcx27.5、zfcx30.3、zfcx43.4)，且自備 zfcx27.5 和 zfcx30.3 多株抗體以偵測兩者在斑馬魚組織中的表現情形，更藉由 morpholino (MO)瞭解 zfcx30.3 基因在斑馬魚耳囊發育上所扮演的角色，同時我們也完成建立 Tol2 基因轉殖魚系統，目前我們已經篩選到 pvalb3b:TagGFP 和 pvalb3b:hCX26-TagGFP 兩種品系的基因轉殖斑馬魚，綜合上述的研究成果為符合我們當初對於計畫內容所追求的目標，也提供相關的資訊可作為後續研究 GJB2 和 GJC3 基因造成非症候群聽障致病機轉的參考。