

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

學習語言前非症候群感音神經性聽障基因功能分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-062-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：楊建洲、廖珮如、黃士炘、周奎秀

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

學習語言前非症候群感音神經性聽障基因功能分析

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B-040-062-

執行期間：93年 08月 01日至 94年 07月 31日

計畫主持人：李宣佑

計畫參與人員：楊建洲、廖珮如、黃士炘、周奎秀

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 94 年 10 月 31 日

一、中文摘要

到目前為止已知有 59 個基因發生突變而造成遺傳性聽障。針對 K^+ 再循環 (recycling) 和維持耳蝸內 K^+ 濃度相關基因如 *Connexin (Cx)* 基因族 (*Cx26*、*Cx29*、*Cx30*、*Cx30.3*、*Cx31* 及 *Cx43*) 我們已經分析 120 位聽力正常人及 260 位語言學習前聽障患者，在這篩檢中我們已經找到這些基因的一些突變點。然而目前對於這些基因發生突變後所產生的突變蛋白對功能的影響和是否會影響到其他基因蛋白質的功能尚未清楚，且同一基因在不同位置的突變常會產生功能上的差異。因此我們將進行這些突變點的對聽障影響的功能探討。

本次研究我們主要針對 *Cx31* 和 *Cx30.3* 基因功能進行研究，我們利用細胞免疫螢光染色法分析發現正常和 357C>T 突變的 *Cx31* 蛋白均可以在 HeLa 細胞株形成 gap junction，但是突變的 *Cx31* 520G>A 蛋白並無法形成 gap junction 而堆積在高基氏體上。另外共同轉染實驗 (co-transfection) 我們發現 520G>A 並不會干擾正常的 *Cx31* 蛋白的合成及運輸。在染劑通透實驗中顯示 520G>A 的表現位置確實會影響 gap junction 的功能；而 357C>T-*Cx31* 的染劑通透表現則與野生型 *Cx31* 的狀況類似。在 *Cx30.3* 的功能研究上，在免疫螢光的實驗結果證明，正常的 *Cx30.3* 蛋白和突變的 507C>G C169W 蛋白都是散佈在細胞質，然而在有 *Cx31* 蛋白的存在下此正常和突變的 507C>G C169W *Cx30.3* 的蛋白都可以運輸至細胞膜表面，並且產生 gap junction。這些資料庫的建立和功能分析系統的建立將有助我們對聽障的致病成因和機轉有更進一步的瞭解。

關鍵詞：語言學習前聽障、*Cx31*、*Cx30.3*、

基因、功能研究

Abstract

To date, 59 auditory genes have been identified, among which are those involved in K^+ recycling and maintenance. This coincides with the notion that sensory transduction in the cochlea and the vestibular labyrinth depend on the recycling and maintenance of K^+ . The importance of K^+ recycling and maintenance is underscored by the fact that mutations in each of *Connexin 26 (Cx26)*, *Connexin 29 (Cx29)*, *Connexin 30 (Cx30)*, *Connexin 30.3 (Cx30.3)*, *Connexin 31 (Cx31)*, *Connexin 43 (Cx43)* leads to deafness in human.

Previously, we have found many mutations in the above mentioned genes from screening of 260 children with prelingual nonsyndromic deafness. However, functional alteration in these mutant genes remain unknown. In the proposed project, we will focused on study of the effect on function in *Cx31* and *Cx30.3* genes when mutations occur. In immunostaining, we have found that both normal *Cx31* and 357C>T-*Cx31* proteins were localized to the cellular membrane, whereas 520G>A-*Cx31* protein accumulates in the cytoplasm. Co-transfection study showed that the protein were present in cytoplasm and plaques on cell surface, indicating that 520G>A did not interfere with wild-type protein synthesis and transport to the cell membrane. Nevertheless, dye transfer experiments revealed that 520G>A-*Cx31* did not form functional gap junction channels, probably due to incorrect

assembly or altered properties of Cx31 channels. In contrast, intercellular coupling between cells expressing 357 C>T-Cx31 was comparable to that of wt-Cx31, suggesting that 357 C>T is a functionally inconsequential polymorphism of Cx31. In addition, the result of protein localization by immunofluorescence showed that WT-Cx30.3 and mutant Cx30.3(C169W) was diffused in the cytoplasm were expressed individually in HeLa cell. However, WT-Cx30.3 formed gap junction plaque between contiguous cells with WT-Cx31 when they were co-expressed in HeLa cells. Formation of gap junction between mutant Cx30.3(C169W) and WT-Cx31 were unaffected and were comparable with that between WT-Cx30.3 and WT-Cx31 proteins.

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

Keywords: prelingual hereditary hearing loss, *Cx31*, *Cx30.3*, functional study

二、緣由與目的

耳蝸是一種非常精緻的器官，包含數十種細胞及正常聽力所需的特化區域。在涉及聽覺的基因中，有許多基因所編碼的蛋白質 (encoded protein) 會在耳蝸中表現。因此在聽覺中耳蝸的功能扮演十分重要的角色，而在耳蝸內的許多聽障基因主要會影響離子的恒定性 (ionic homeostasis)。毛細胞之上半部表面浸在內淋巴液 (endolymph) 具有高濃度 K^+ 和低濃度 Na^+ ，在老鼠是維持正靜止電位的 +100mv，此種高靜止電位是正常毛細胞功

能所需，因為當此靜止電位減少至零，會造成耳聾 (Steel et al., 1987)。柯蒂氏器 (organ of Corti) 包括感音毛細胞和支持細胞 (supporting cells) 座落於較有通透性的基膜 (basilar membrane) 上，在此基膜下面為內含perilymph之管道，具有高 Na^+ 及低 K^+ 濃度，很像正常的細胞外液 (extracellular fluid)。在柯蒂氏器內，內毛細胞 (inner hair cells) 的基側膜 (basolateral membrane) 為支持細胞所包圍，但外毛細胞 (outer hair cell) 則暴露於Cortilymph， K^+ 離子濃度，略高於perilymph內之 K^+ 離子濃度，當大的聲音 (loud sound) 傳到毛細胞，Cortilymph內之 K^+ 濃度會累積，其他圍繞在內毛細胞之外細胞液也有較高之 K^+ 濃度。毛細胞的特殊離子環境對其功能是非常重要的，因為影響內淋巴液 (endolymph) 之離子濃度的基因突變會導致聽障。

我們已知 K^+ 泵進入 (pumped into) 內淋巴液並不是來自stria vascularis之血液供應 (Konish, et al., 1978, Wada et al., 1979)。有學者認為 K^+ 離子可能是在耳蝸管 (Cochlear duct) 之再循環 (recycling) (Kikuch et al., 1995, Spicer & Schulte 1998)。 K^+ 離開毛細胞會被柯蒂氏器之支持細胞攝取，運回stria vascularis，再泵回 (pump back) 內淋巴液。 K^+ 再循環 (recycling) 有幾條路徑。(1) 側面途徑 (lateral route)：經由支持細胞間的網狀 gap junction 流到 spiral ligament 的 fibrocyte，再回到stria vascularis (Kikuch et al., 1995)，(2) 在內淋巴液部位的上下經由perilymph到達spiral ligament，然後再到stria vascularis (Schulte & Steel 1994)，(3) 利用中間支持細胞 (medial supporting cell)，spiral limbus fibrocyte 及 interdental cell間的gap junction而在interdental cell膜上 $Na^+-K^+-ATPase$ pumps 泵出，進入

endolymph (Kikuch et al., 1995, Spicer & Schulte 1998, Schulte & Steel 1994)。

在整個 K^+ recycling 牽涉的基因很多，其中 *connexin(Cx)* 基因族--- *connexin 26 (Cx26)*、*connexin 30 (Cx30)*、*connexin 31 (Cx31)*、*connexin 29 (Cx29)* 及 *connexin 43(Cx43)* 等佔有很重要的角色。各種Cx基因表現出來的蛋白稱為Cx蛋白是形成Gap junction的最小組成單位。目前在哺乳類動物中已知有 20 種Cx蛋白(Bruzzone 等 1996)，在人類的Cx蛋白可依據其核苷酸和胺基酸序列的相似性區分為 α (如Cx43)、 β (如Cx 26、Cx30 和Cx31)和 γ (如Cx29)三種次群體(sub groups)。

Gap junction 是細胞與鄰近細胞間的通道，其功能在於運送細胞間的離子(ions)、代謝物(metabolite)及第二訊息物(second messengers)例如 cyclic AMP、inositol (Dermietzel and Spray, 1993；White and Bruzzone, 1996；Kumar 等 1996)。Gap junction 是由 Cx 蛋白經一連串的組合過程(assembly processes)而形成(Bruzzone 等 1996)，connexin 在內質網(endoplasmic reticulum)被製造並被完成正確折疊(folding)並經由聚合過程(oligomerizing)將六個 connexin 次單位(subunits)聚合成半通道(half channel)，稱之 connexon，將完成組合的 connexon 插入內質網膜上，再與鈣離子結合蛋白(calcium-binding protein)結合運送至高基氏體(Golgi body)後繼續被運送至細胞膜上(plasma membrane)排列，且與鄰近細胞的 connexons 直線排列成一完整細胞間之通道(intercellular channel)。在形成 gap junction 的大部分細胞中常表現出不只一種 Cx 蛋白，因此在細胞內可能會形成具有不同生理功能的 gap junction (Kumar, et al., 1996)，另外在形成 connexon 時有可能是由相同的(homomeric)或不同的

(heteromeric) Cx 蛋白所組成，且在相鄰兩細胞的 connexon 的結合形成 gap junction 也有可能是同質性(homotypic junction)或異質性(heterotypic junction)的 connexon 所組成(Falk, M.M. 2000a,b)。到目前為止大部分的研究發現正常只有單一次群的 Cx 會彼此互相結合形成 gap junction，不同的次群並不會互相結合，就是說 α 次群只會和 α 次群結合， β 次群只會和 β 次群結合。在最近幾年在老鼠或人類內耳的研究也證明了 Cx26 通常和 Cx30 都會共同表現在相同區域且會形成 heteromeric connexon 並造成彼此的影響 (Lautermann, et al., 1998；Forge, et al., 2002；Marziano, et al., 2003)。

針對 K^+ recycling相關基因，在四年多前我們開始針對這些基因—Cx families (Cx26、Cx29、Cx30、Cx30.3、Cx31、Cx32、 ρ Cx43 and Cx43)分析 120 為聽力正常人的基因多型性(polymorphism)(Table 1)及 260 位語言學習前聽障患者(Table 2)及部分家屬，目前已獲得結果，此部分的資料已撰寫成論文中且 submission 到 Journal of Biomedical Science。然而目前對於這些牽涉 K^+ recycling 基因的功能和彼此之間的影響機制並不是很清楚，且同一基因在不同位置的突變常會產生功能上的差異，以 Cx26 基因發生的突變為例，Marziano, et al., (2003)證實當 Cx26 發生 G66H 和 G59A 的突變主要造成 Cx26 的突變蛋白在運送到細胞膜的過程中就受到阻礙而使這些突變的蛋白堆積在細胞質中，而 Wang 等人 (2003)發現當 Cx26 發生 R127H 突變時，此突變的蛋白還是可以正常的運送到細胞膜形成通道，但此通道利用 dye transfer 實驗證明是缺乏功能的。由此可知同一基因不同位置突變後所產生的影響可能不同，另外在相同的基因族內的不同基因彼此也會有影響如在老鼠或人類內耳的研究證明了

Cx26 和 Cx30 會共同表現在相同區域且會形成 heteromeric connexon 並造成彼此的影響 (Lautermann, et al., 1998 ; Forge, et al., 2002 ; Marziano, et al., 2003)。另外的研究也發現 Cx30.3 需要在 Cx31 的存在下才會形成 gap junction (Plantard, et al., 2003)。

我們將探討我們實驗室在語言學習前聽障患者中所發現 Cx 基因族突變後 (Table 2) 對功能和彼此之間的影響，以瞭解 Cx 基因族在聽障中的致病機制。

三、結果與討論

在過去幾年的研究中我們已建立了台灣地區非症候群聽障患者 K⁺ recycling 有關的基因如 Cx 基因族 (Cx26、Cx30、Cx31、Cx30.3、Cx29 及 Cx43) 的資料庫，也發現了一些突變點但這些突變點對於聽障基因所致病基轉是如何？我們還不是很清楚，因此為了進一步了解這些基因突變所造成的影響在我們將進行這些基因的功能分析。在 92 年度的報告中，我們已經利用 HeLa 細胞株來進行 Cx26 和 Cx30 功能研究並獲得初步結果。我們也建立了兩種染色系統：1. 利用特異性抗體；2. 利用 FlAsH-EDT₂ Fluorescent Labeling 系統來探討正常和異常 Cx 基因表現蛋白在細胞內的表現位置。且我們也已經製造出 3 種特異性兔子抗體分別用來偵測 Cx30、Cx30.3 及 Cx31 三種蛋白。

本年度 (93) 我們主要延續去年所建立的模式來探討 Cx31 和 Cx30.3 在聽障中所扮演的角色。

(1) Cx31 的功能研究

在我們的針對 Cx31 的研究中我們發現了一個 520G>A (V174M) 異型結合子的錯意突變 (missense mutation)，這個錯意突變位在 Connexin 31 的 2nd extracellular loop 上；及一個位於 Connexin 31 的 cytoplasmic loop 位置，和一個 357C>T (N119N) 同型結合子隱性

突變 (silent mutation)。因此我們想要瞭解這些突變點會不會對 gap junction 形成的功能上造成影響，我們建構了正常的 Cx31 和 520G>A (V174M) 及 357C>T (N119N) 兩個突變點的 Cx31 的表現質體，並轉殖到 HeLa 細胞中經過長時間的選殖，經過免疫螢光，及染劑通透等實驗，來分析這些 Cx31 蛋白的表現量、位置及其功能。

在免疫螢光染色實驗中，正常的 Cx31 可以被運送到細胞膜上形成 gap junction，另外我們發現 357C>T-Cx31 也可以被運送到細胞膜上形成間隙連結，但是 520G>A-Cx31 卻會堆積在細胞質中 (Fig 1)。為進一步瞭解 520G>A/wt (heterozygote) 的功能影響，我們利用共轉染實驗 (co-transfection) 來探討此異型節合子的功能，結果可以發現 Cx31 蛋白在細胞質和細胞膜上皆發現 Cx31 蛋白的存在 (Fig 1 D)。這代表著 520G>A 並不會干擾正常的 Cx31 蛋白的合成及運輸。在染劑通透實驗中顯示 520G>A 的表現位置確實會影響 gap junction 的功能；而 357C>T-Cx31 的染劑通透表現則與野生型 Cx31 的狀況類似 (Fig 2 and 3)。綜合以上的結果，對於我們發現的突變 (357C>T 和 520G>A/wt) 在功能上的影響有進一步的瞭解。未來我們需要進一步針對 520G>A/wt 在功能上的影響加以探討，以更清楚的確認 520G>A/wt 在聽障中的角色

(2) Cx30.3 的功能研究

在我們針對的 Cx30.3 基因之前的研究中，我們發現有 7 個錯意突變 (missense mutation)，分別是：64C>T/wt (R22C)、109G>A/wt (V37I)、220G>A/wt (V74M)、292C>T/wt (R98C)、302G>A/wt (R101H)、370C>G/wt (R124W) 和 507C>G (C169W)，因此我們為了進一步了解 Cx30.3 這些突變點的影響，我們建構正常的 Cx30.3 和突變的 Cx30.3 507C>G (C169W) 質體表現於 HeLa 細胞。在過去研究中發現 Cx30.3 和

Cx31 基因在結構或在分子層次上有相互的作用(Plantard et al., 2003)，因此我們對於 Cx30.3 和 Cx31 之間的關係也將加以探討。

在免疫螢光的實驗結果證明，正常的 Cx30.3 蛋白是散佈在細胞質(Fig 4)，而正常的 Cx31 蛋白則表現在細胞膜且與鄰近細胞的 Cx31 蛋白形成 gap junction。另外當正常的 Cx30.3 蛋白與正常的 Cx31 蛋白共同表現時，會使原本散佈在細胞質的 Cx30.3 蛋白運輸至細胞膜表面，並且產生 gap junction，這結果和先前的報告(Plantard et al., 2003)是一致的。然而突變的 Cx30.3 507C>G(C169W)蛋白與正常的 Cx31 蛋白一起表現時，此突變的 Cx30.3 507C>G(C169W)蛋白亦可運輸至細胞膜表面，並且產生 gap junction (Fig 5 and 6)，雖然結果如此，但並不一定代表此 gap junction 蛋白就有功能，所以在未來我們必須進一步作功能的分析來探討此突變的 Cx30.3 507C>G(C169W)所形成的 gap junction 是否仍有正常間隙連結的功能。

在這研究中我們已經建立了研究 Cx31 和 Cx30.3 的模式，且初步的了解 Cx30.3 和 Cx31 之間的關係，因此未來我們將進一步的分析 Cx30.3 另外幾個突變點的影響和 Cx30.3 及 Cx31 這些突變點之間的影響。相信這些研究的完成將可對於造成聽障的成因更加清楚。

四.計劃成果自評:

之前我們已建立台灣地區語言學習前期非症候群聽障孩童與K⁺ recycling有關的基因如Cx基因族(Cx26、Cx30、Cx31、Cx30.3、Cx29及Cx43)的基因多型性的資料庫，對於這些基因突變的研究有重大意義。加上本篇研究結果對於我們研究Cx基因族在聽障的致病機轉有進一步的了解，也符合我們當初對於計畫內容所要追求的目標。另外針對Cx基因族功能分析模式的建立將可讓我們更進一步的瞭解到這些基因在聽障中的角色

在我們先前的一些研究中可得知語

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

五、參考文獻

- Bruzzone R, White TW, and Paul DL, (1996) Connections with connexins the molecular-basis of direct intercellular signalling. *Eur. J. Biochem.* 238:1-27.
- Dermietzel R, Spary DC, (1993) Gap junction in the brain: where, what type, how many, and why? *Trends. Neurosci.* 16:186-192.
- Falk MM. (2000a) Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. cell Biol.* 79, 564-574
- Falk MM.(2000b) connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J.cell.sci.* 113, 4109-4120
- Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, and Nickel R. (2002) Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol. Neurootol.* 7, 141-145
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL and Adams JC (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 191, 101-118
- Konishi T, Harick DE and Walsh PJ (1978) Ion transport in guinea pig cochlea. I. Potassium and sodium transport. *Acta Otolaryngol* 86, 22-34
- Kumar NM, Gilula NB, (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-8.
- Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, and winterhager E.(1998) Expression of the gap-junction *connexins* 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 294,415-420

- Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. (2003) Mutations in the gene for *connexin 26* (*GJB2*) that cause hearing loss have a dominant negative effect on *connexin 30*. *Hum Mol Genet.* 12(8):805-812
- Plantard L, Huber M, Macari F, Meda P and Hohl D (2003) Molecular interaction of connexin 30.3 and connexin 31 suggests a dominant-negative mechanism associated with erythrokeratoderma variabilis. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3287-94
- Schulte BA and Steel KP (1994) Expression of α and β subunit isoforms of Na, K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the W^v or Si^d loci. *Hear. Res.* 78, 65-76
- Spicer SS and Schulte BA (1998) Evidence for a medial K^+ recycling pathway from inner hair cell. *Hear Res.* 118, 1-12
- Steel KP, Barkway C and Bock GR (1987) Strial dysfunction in mice with cochleo-saccular abnormalities. *Hear. Res.* 27, 11-26
- Wada J, Kambayashi J, Marais DC and Thaimann R, (1979) Vascular perfusion of the cochlea: effect of potassium-free and rubidium-substituted media. *Arch Otorhinolaryngol* 225, 79-81
- Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH, Wu CY, Chen MS, Huang PC. (2003) Functional analysis of *connexin-26* mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem.* 84(4):735-42
- White TW, Bruzzone R, (1996) Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and function consequences. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28:339-350.

Table 1. Polymorphisms of Cx gene family in Study

| Gene | Polymorphism Genotype | Allele Frequency (%) | | | Genotype Frequency & | | |
|---------------|--------------------------|----------------------|---------------------|----------|----------------------|---------------------|----------|
| | | Deafness (n =520) | Control (n =240) | P Value* | Deafness (n =260) | Control (n =120) | P Value* |
| Cx26 | 79G>A | G: 0.763 A: 0.237 | G:0.804 A:0.196 | 0.211 | 20/83/157 | 1/45/74 | 0.021 |
| | 109G>A | G:0.838 A:0.162 | G:0.858 A: 0.142 | 0.482 | 32/20/208 | 17/0/103 | 0.007 |
| | 341A>G | A:0.867 G:0.133 | A:0.933 G:0.067 | 0.007 | 7/55/198 | 8/0/112 | <0.001 |
| | 608T>C | T:0.948 C:0.052 | T:0.958 C:0.042 | 0.541 | 5/17/238 | 5/0/115 | 0.008 |
| <i>ρ</i> Cx43 | 112A>C | A:0.987 C:0.013 | A:0.987 C:0.013 | 0.914 | 0/7/253 | 0/3/117 | 0.913 |
| | 1122A>G | A:0.654 G:0.346 | A:0.783 G:0.217 | <0.001 | 90/0/170 | 26/0/94 | 0.011 |
| | 1127G>A | G:0.654 A:0.346 | G:0.783 A:0.217 | <0.001 | 90/0/170 | 26/0/94 | 0.011 |
| Cx31 | 357C>T | C:0.902 T:0.098 | C:0.896 T:0.104 | 0.795 | 1/49/210 | 0/25/95 | 0.721 |
| Cx30.3 | 174C>T | C:0.993 T:0.007 | C:0.983 T:0.017 | 0.260 | 0/4/256 | 0/4/116 | 0.257 |
| | 451C>A | C:0.996 A:0.004 | C:0.992 A:0.008 | 0.427 | 0/2/258 | 0/2/118 | 0.426 |
| | 507C>G | C:0.950 G:0.050 | C:0.983 G:0.017 | 0.028 | 1/24/236 | 0/4/116 | 0.096 |
| | 611A>C | A:0.890 C:0.110 | A:0.900 C:0.100 | 0.690 | 2/53/205 | 1/22/97 | 0.896 |
| Cx29 | IVS1+63C>T | C:0.985 T:0.015 | C:0.996 T:0.004 | 0.184 | 0/8/252 | 0/1/119 | 0.181 |
| | 840+2T>G | T:0.992 G:0.008 | T:0.992 G:0.008 | 0.926 | 0/4/256 | 0/2/118 | 0.926 |

*Chi-square test was used.

& The numbers indicated homozygote/heterozygote/wild type

Table 2. Prevalence of Cx gene family mutations in 260 deaf individuals

| Gene | Genotype | Individual found | Percentage (%) |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Cx26 | 235delC/235delC | 12 | 4.62 % |
| | 235delC/Wt | 7 | 2.69 % |
| | 235delC/299-300delAT | 6 | 2.31 % |
| | 299-300delAT/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 368C>A/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 551G>A/Wt | 1 | 0.38 % |
| subtotal | | 28 | 10.77 % |
| ρ Cx43 | 205T>C/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 873C>T/Wt | 2 | 0.77 % |
| | 932delC/Wt | 16 | 6.15 % |
| subtotal | | 19 | 7.31 % |
| Cx43 | 624C>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 717G>A/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 976C>T/Wt | 2 | 0.77 % |
| subtotal | | 4 | 1.54 % |
| Cx31 | 520G>A/Wt | 3 | 1.15 % |
| | 357C>T/357C>T | 1 | 0.38% |
| subtotal | | 4 | 1.54% |
| Cx30.3 | 370C>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 302G>A/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 64C>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 109G>A/Wt | 2 | 0.77 % |
| | 220G>A/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 292C>T/Wt | 2 | 0.77 % |
| | 507C>G/507C>G | 1 | 0.38 % |
| subtotal | | 9 | 3.46 % |
| Cx29 | 807A>T/Wt | 2 | 0.77 % |
| | IVS1+15C>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | IVS1+10C>G/Wt | 1 | 0.38 % |
| subtotal | | 4 | 1.54 % |
| Cx30 | 119C>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 261A>T/Wt | 1 | 0.38 % |
| | 396G>A/Wt | 3 | 1.15 % |
| subtotal | | 5 | 1.92 % |
| total | | 73 | 28.08% |

Wt: wild type

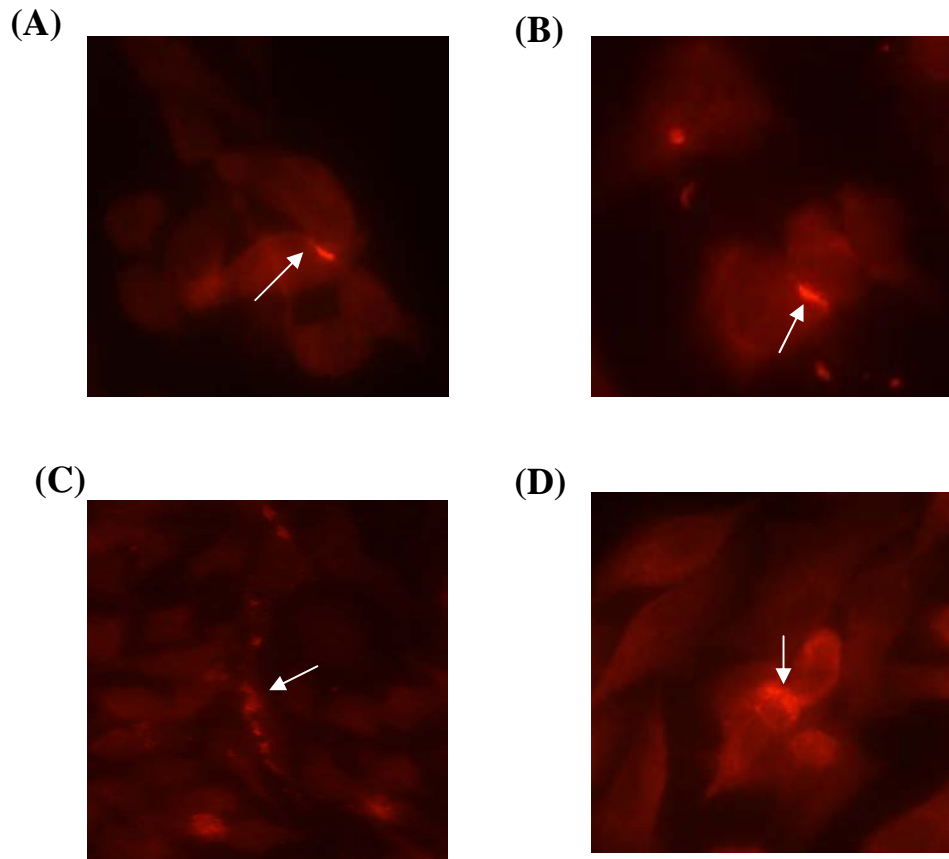


Fig. 1 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內正常和突變 Cx31 蛋白表現

- (A). 利用抗體的偵測發現正常 Cx31 蛋白位於細胞膜(箭頭所指之處)
- (B). 利用抗體的偵測發現 Cx31 357C>T 突變蛋白位於細胞膜(箭頭所指之處)
- (C). 利用抗體的偵測發現 Cx31 520G>A 突變蛋白堆積在細胞質(箭頭所指之處)
- (D). Cx31 520G>A 和 Cx31 正常蛋白共同轉染實驗(co-transfection)發現可在細胞膜間形成 gap junction (箭頭所指之處)。

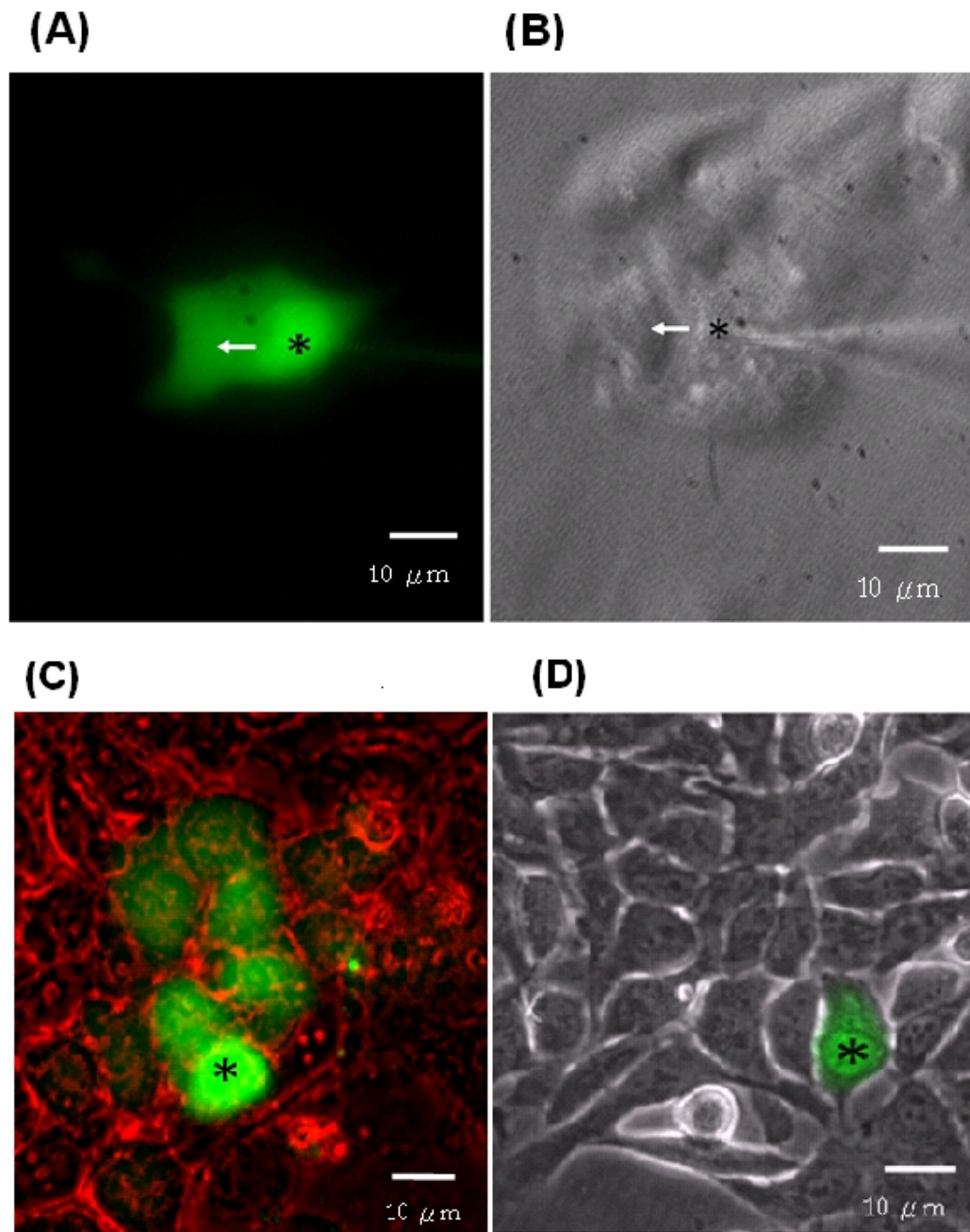


Fig 2. 含正常 Cx31 蛋白的 HeLa 細胞株染劑通透實驗

- (A) 注入染劑後，持續表現 wt-Cx31 的 HeLa 細胞仍具有通透能力。
- (B) 圖為(A)同範圍明視野的影像。
- (C) 圖為其他視野的 wt-Cx31 通透結果，紅色為明視野。
- (D) 未轉染 Cx31 的 HeLa 細胞經染劑通透實驗後與明視野影像合併的負對照。“*”號代表注射的細胞。

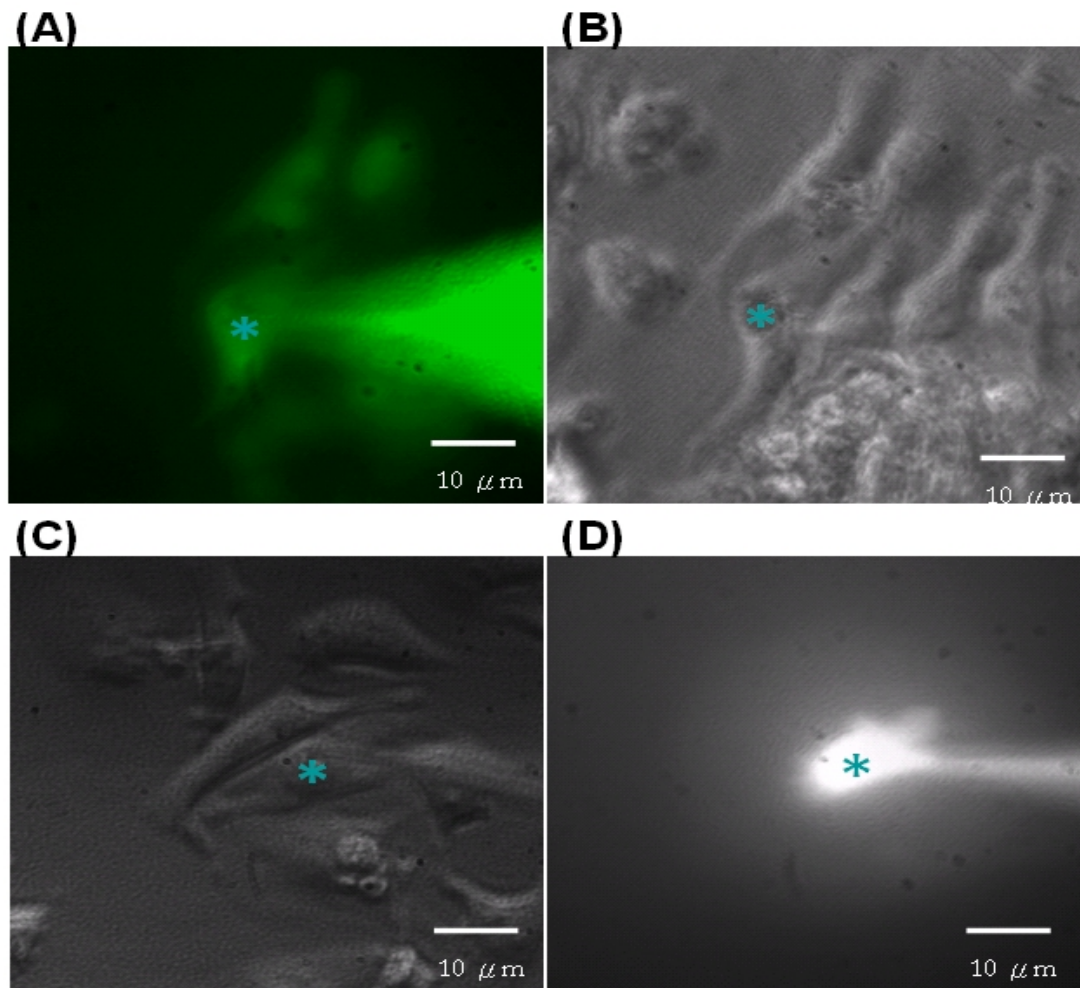


Fig 3. 含 357C>T-Cx31 與 520G>A-Cx31 突變蛋白的 HeLa 細胞株染劑通透實驗。

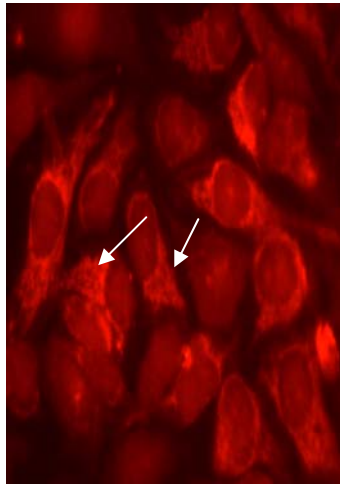
(A) 注入染劑後，持續表現 C357T-Cx31 的 HeLa 細胞仍具有通透能力。

(B) 圖為(A)相同範圍於 400 倍明視野下的影像。

(C) 為(D)相同範圍明視野下的影像。

(D) 持續表現 G520A-Cx31 的 HeLa 細胞沒有通透染劑的能力。所有染劑通透實驗的螢光觀察均使用 FITC 濾片，在 400 倍螢光顯微鏡下呈現。染劑為 4 % Lucifer Yellow 溶於 10mM LiCl HEPES 溶液中。“*”號代表注射的細胞。

(A)



(B)

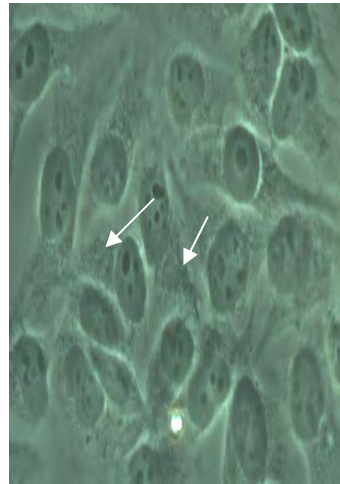


Fig 4. 利用免疫螢光染色偵測 HeLa 細胞內正常 Cx30.3 蛋白表現

(A) 正常 Cx30.3 蛋白散佈在細胞質上。

(B) 為(A)圖在明視野下的細胞型態。

(箭頭為蛋白表現位置)

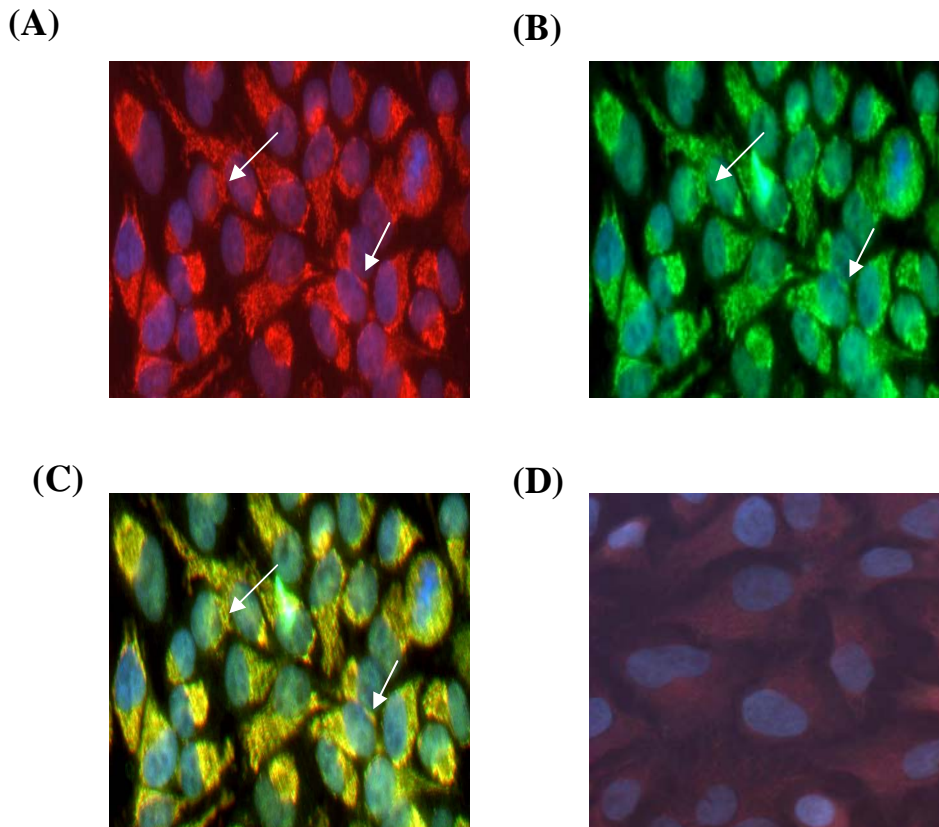


Fig 5. 利用免疫螢光染色偵測在 Cx30.3 stable cell line co-transfected 正常的 Cx31 於 HeLa 細胞內蛋白的表現(箭頭為蛋白表現位置)

- (A) 正常 Cx30.3 蛋白表現在細胞膜且與鄰近細胞的 Cx30.3 蛋白形成 gap junction。
- (B) 正常 Cx31 蛋白表現在細胞膜且與鄰近細胞的 Cx31 蛋白形成 gap junction。
- (C) A、B 兩圖結合在一起，黃色表示 Cx30.3 蛋白和 Cx31 蛋白有共同表現在相同位置。
- (D) 未被基因轉殖感染的 HeLa 細胞。

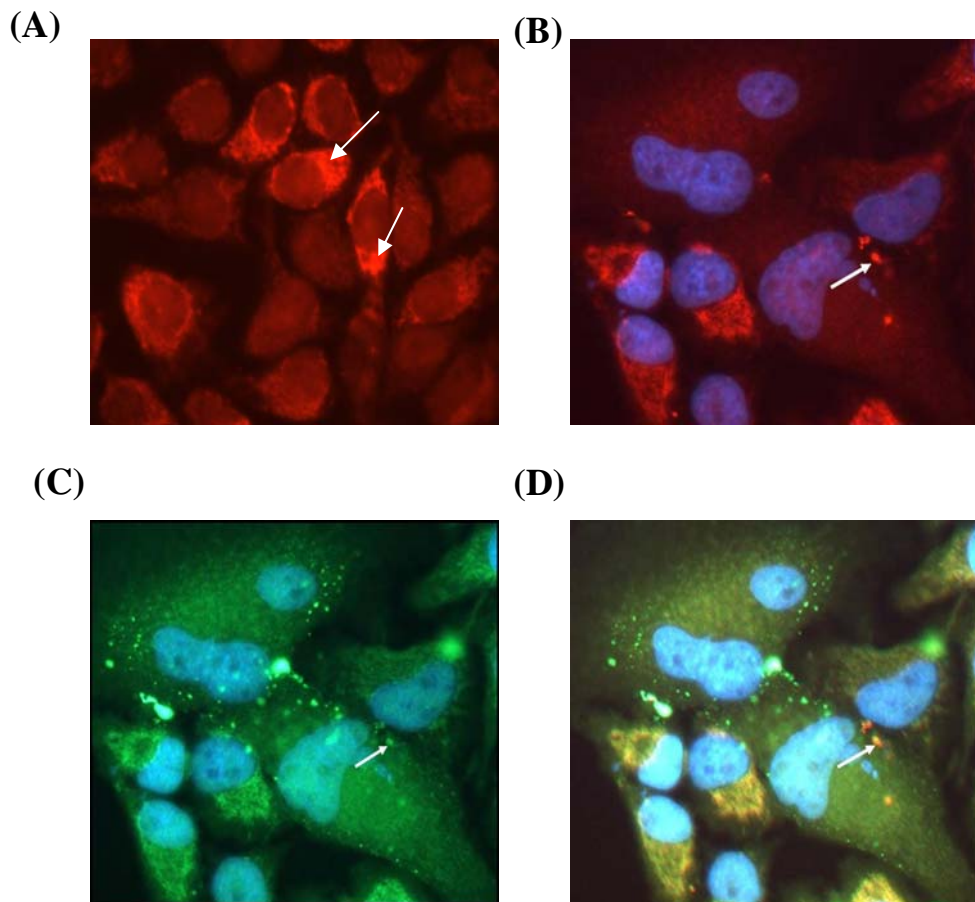


Fig 6. 利用免疫螢光染色偵測突變的 Cx30.3 C169W(homozygous) 和正常的 Cx31 於 HeLa 細胞的表現位置

(A) 單一 Cx30.3 C169W 基因轉殖感染的 HeLa 細胞發現突變蛋白散佈在細胞質。

(B) Co-transfect 突變的 Cx30.3 C169W(homozygous) 和正常的 Cx31 於 HeLa 細胞，發現突變的 Cx30.3 C169W (homozygous) 蛋白形成 gapjunction 表現在相鄰的兩細胞膜間。

(C) Co-transfect 突變的 Cx30.3 C169W(homozygous) 和正常的 Cx31 於 HeLa 細胞，發現正常 Cx31 蛋白表現在細胞膜且與鄰近細胞的 Cx31 蛋白形成 gap junction。

(D) B、C 兩圖結合在一起，黃色表示突變的 Cx30.3 C169W 蛋白和正常的 Cx31 蛋白有共同表現在相同位置。藍色為 DAPI 染細胞核。(箭頭為蛋白表現位置)