KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2001;44:239-45

# 유전성 난청과 동반된 GJB2 유전자 변이의 세포간극에 대한 기능적 연구

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
정연훈 · 유상준 · 이준호 · 박홍준

## Functional Study of Gap Junction in GJB2 Mutations Associated with Hereditary Hearing Loss

**Yun Hoon Choung, MD, DDS, Sang Jun Ryu, MD, Joon Ho Lee, MD and Hong-Joon Park, MD**
*Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

**ABSTRACT**

**Background and Objectives** : GJB2 (Connexin 26), the gene of the gap-junction proteins, was found to be the main causative gene of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (DFNB1). Whereas 35delG was known as the major type mutation in the western countries, 235delC was reported as the specific form of mutation in Asian population. The objective of this study is to identify how two mutations (235delC, E114G) found in the Korean population affect the function of GJB2 using the molecular biology techniques. **Materials and Methods** : 235delC and E114G types of mutations were cloned in the pcDNA3 vector. HeLa cells were transfected with these cloned vectors by the liposome complex method. 1) The expression and subcellular localization of Cx26 were determined using antibodies against amino acid sequences in the intracellular loop (IL) and N-terminal (NT) portions of Cx26. 2) To analyze functions of the GJB2, we examined the lucifer yellow dye transfer between cells with scrape-loaded technique. We used the wild-type (WT) Cx26 of normal hearing as a positive control, and mock cells as a negative control. **Results** : The immunocytochemical analysis showed that cells transfected with E114G and WT gave characteristic punctuated patterns of reaction in the cell membrane with both antibodies. However, 235delC cells were not stained with the anti-IL antibody but only with the anti-NT antibody slightly around the nucleus regions. In the functional study of GJB2, transfer of lucifer yellow dye into contiguous cells was detected in E114G but not in 235delC. **Conclusion** : The 235delC type of mutation showed loss of their targeting activity on the cell membrane. As a result, the function of gap junction channels were severely deteriorated. With the E114G type mutation, we didn't find any difference when compared with the WT transfected cells. Above data indicate that types of GJB2 mutation are closely related to the status of hearing loss due to altered function of gap junction protein. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:239-55)**

**KEY WORDS** : Hereditary hearing loss · Gap junction protein · Connexin 26 · Functional study.

## 서 론

청각 장애는 전 인구의 4 10%의 유병률을 보이는 흔한 질환이며, 신생아 1000명당 1 3명이 선천성 난청으로 출생하는 것으로 알려져 있고, 국내에서도 매년 약 2,000명에 달하는 난청 신생아가 출생하는 것으로 추정된다.[1] 이러한 소아 난청의 약 60%가 선천적인 유전적 원인에 의한 것이며, 그 유전적 원인의 약 80%는 비증후군성 상염색체 열성유전(nonsyndromic, autosomal recessive etiology) 형태를 보이고 있다.[2] 또한 비증후군적, 상염색체 열성유전의 원인 중 약 50%가 connexin 26(Cx26) 유전자(GJB2/DFNB1)의 변이에 의한 것으로 보고되고 있다.[3] 따라서 GJB2 (Cx26 유전자) 변이는 유전성 소아난청의 약 40%의 원인에 관여하는 가장 중요한 요인이다.[3-5]

Connexin은 세포간 신호전달체계인 간극결합(gap-junction)을 구성하는 단백질로, 지금까지 포유동물에서 14개의 isoform이 발견되었는데, 간극결합의 성질은 이를 구성하는 connexin의 종류 및 결합 형태에 따라 달라지게 된다.[6] Connexin은 포유동물의 대부분의 장기에 분포하지만, 심장, 간, 피부 등 장기에 따라 그 분포의 정도가 다르게 되며, 이 중 Cx26은 26.5 kDa의 분자량을 갖는 isoform으로 내이에 많이 분포하고 있다.[7][8] 특히 이들이 형성하는 간극결합은 내이의 기능 유지를 위한 칼륨이온 국소순환에 관여

논문접수일 : 2000년 11월 7일 / 심사완료일 : 2001년 1월 19일
교신저자 : 박홍준, 442-721 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (031) 219-5267 · 전송(031) 219-5264
E-mail : hjpark@madang.ajou.ac.kr

함으로써 와우의 청각기능에 필수적인 세포외(내림프) 고전위를 유지하는데 중요한 역할을 담당한다.[8] 따라서 Cx26 유전자 변이에 따른 간극결합을 구성하는 단백질의 이상은 곧 와우의 청각 기능에 심각한 영향을 미치게 된다.

최근 선천성 난청과 관련된 Cx26 유전자(GJB2)의 변이 중 가장 많은 것으로 알려진 것은 35delG(30delG) 형태이다.[3)9)] 이 형태는 영국, 프랑스, 레바논 등의 지중해 연안 유럽지역과 호주 등에서 많이 발견되었고, 유태인에서는 167delT가 가장 흔하며,[10)] 그 외 M34T, W77R, W44C 등[11)] GJB2의 여러 변이가 보고되었다. 국내에서는 선천성 난청환자에서 외국과는 달리 35delG 변이형태는 드물고 235delC, E114G 등이 발견되어 유럽과는 다르지만 일본과 유사한 인종간의 특이성이 관찰되었다.[12)13)] 235delC는 명확하게 열성유전의 형태로 난청환자에서 발견되며, E114G는 난청환자뿐만 아니라 정상인에서도 발견됨으로서 난청과의 관련이 의심되지만, 이 두가지 변이형태에 대한 기능적 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 한국인 선천성 난청 환자에서 발견된 Cx26 유전자 변이 형태(235delC, E114G)가 간극결합 단백질 기능에 어떠한 변화를 유발하는지 밝히는데 그 목적이 있다.

## 대상 및 방법

### 대 상

한국인 열성 선천성 난청 환자의 Cx26 변이 유전자를 이용하였다. 즉 난청을 유발한 돌연변이 형태인 235delC와, 정상군과 난청환자군 모두에서 발견된 E114G를 대상으로 하였다. 동형접합체의 혈액을 이용하였으며, 양성 대조군으로 정상 청력의 신생아의 혈액을 이용하여 wild-type(WT)으로 사용하였고, 음성 대조군으로 mock cell(vector만 transfection 시킨 실험군)을 이용하였다.

### 방 법

본 연구는 크게 3 단계로 시행하였다(Fig. 1). 첫째 단계는 선천성 난청 환자에서 발견된 Cx26 변이 유전자의 genomic DNA를 추출하여 효소중합반응(PCR) 및 pcDNA3 vector를 이용하여 클로닝(cloning)했다. 둘째 단계는 클론(clone)된 genomic DNA를 Cx26이 발현되지 않는 HeLa cell에 transfection시켰으며, 마지막으로 이 transfection된 HeLa cell을 이용하여 Cx26의 발현 및 세포내 위치에 대한 분석과 간극결합의 정보물질 교환에 관한 기능적 연구를 시행하였다.

#### Connexin 26 cloning

**효소중합반응**

Cx26 유전자를 클로닝하기 위하여 전체 coding 염기 서열을 포함하여 양쪽 끝에 특정 제한(restriction) 효소의 작용부위(밑줄부위)를 포함할 수 있도록 고안된 다음의 primer를 사용했다.

Cx-BamH1 : 5 '- CAA GGATCC ATGGATTGGGGC - 3 '

Cx-EcoR1 : 5 '- CGC GAATTC TTAAACTGGCTT - 3 '

반응의 조건은 95℃에서 30초, 54℃에서 30초, 72℃에서 1분을 1 cycle로 30 cycle을 시행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 유지시켰다.

효소중합반응산물은 염기서열 분석(sequencing)을 시행하여 처음의 genomic DNA와 일치하는지를 확인하였다.[12)13)]

#### Transformation

제한효소로는 BamH1과 EcoR1(NEB)을 사용하였으며, 효소중합반응 산물 15 μl와 BamH1 1 μl, EcoR1 1 μl를 universal buffer(10×) 2.5 μl, 증류수 5.5 μl에 섞어 37℃에서 1  3시간 반응시킨다. 마찬가지로 pcDNA3 vector (33.65 μg/ml) 3 μl를 동일한 방법으로 반응시킨다. 효소

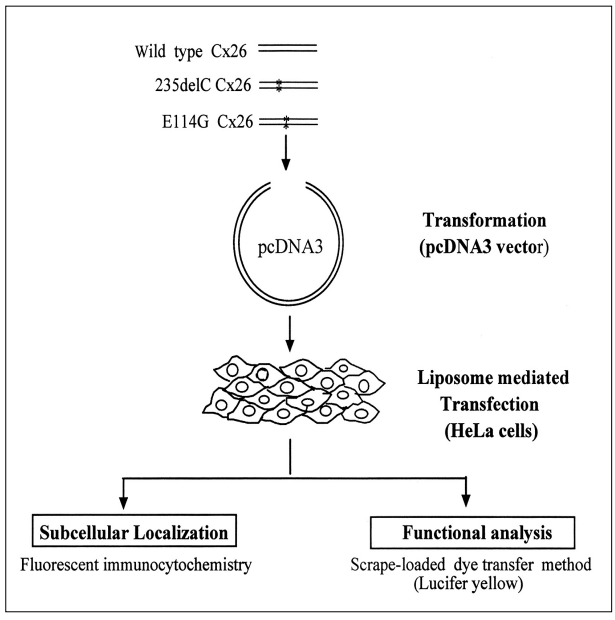


**Fig. 1.** Schema of this experiment. This study was carried out by 3 steps of transformation, transfection, subcellular localization of Cx26, and functional study of gap junction using 235delC, E114G, wild-type Cx26, and mock cells. The expression and subcellular localization of Cx26 was determined using antibodies against amino acid sequences in the intracellular loop and N-terminal of Cx26. To analyze functions of the gap junction, we examined Lucifer yellow dye transfer between cells with scrape-loaded technique.

로 처리한 각 효소중합반응 산물을 pcDNA3 vector, T4 DNA ligase(Promega), ligase buffer(Promega, 10×), 증류수와 섞어 20 μl를 만들어 16℃에서 8시간 동안 결합반응시킨다. Plasmid transformation을 위해서 -70℃에 보관된 competent cell(DH5α[*sup*E44Δ*lac*U169(FΦ80*lacZ*ΔM15)*hsd*R17*rec*A*end*1*gyr*A96*thi*-1*rel*A1]) 4℃에 위치시킨다. Competent cell 50 μl에 결합혼합물(ligation mixture) 5 μl를 넣고 1.4 kV 전기 pulse로 electrophoration한다. 여기에 배지 LB 1 μl를 첨가하고, 37℃ 배양기에서 30분간 배양시킨다. Ampicillin(50 μg/ml)을 포함한 LB 고체 배지(1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, 10% bacto agar)에 도말하여, 37℃에서 16시간 동안 배양시킨다. 이후 집락(colony)을 취하여 ampicillin(50 μg/ml)을 포함한 LB 액체 배지에서 16시간동안 37℃에서 흔들면서 배양한다.

Plasmid DNA preparation

Plasmid DNA는 Wizard™ Genomic DNA Purification Kit(Promega)을 이용하여 추출하였다. 배양한 세포를 10 k rpm으로 5분간 회전침전 시키고, 상층액 제거 후 250 μl cell resuspension 용액을 넣고 vortexing해서 완전하게 섞이도록 한다. 250 μl cell lysis 용액을 넣고 거꾸로 해서 용액이 맑아지는 것을 확인한다. 10 μl alkaline protease 용액을 넣고 거꾸로 세워서 상온에 5분간 방치하고, 350 μl neutralization 용액을 넣고 거꾸로 세운다. 이를 14 k rpm으로 10분간 회전침전 시키고, 깨끗한 lysate를 collection tube에 끼워 있는 spin column으로 옮긴다. 14 k rpm으로 1분간 회전침전 시킨 후 collection tube를 비우고 750 μl column 세척 용액을 column에 넣고 14 k rpm으로 1분간 회전침전 시킨 뒤 collection tube를 비운다. 250 μl column 세척 용액을 column에 다시 넣고 14 k rpm으로 2분간 회전침전 시킨 후 collection tube를 비운다. column을 깨끗한 1.5 ml tube로 옮기고 100 μl의 증류수를 column에 넣고 14 k rpm에서 1분간 회전침전 시켜서 DNA를 얻는다. 이 plasmid DNA를 염기서열 분석하여 처음의 DNA sample과 일치하는지 확인하였다. 이때 사용된 primer는 다음과 같다.

T7 : 5'-AATACGACTCACTATAGGGA-3'
Sp6 : 5'-TAGTGTCACCTAAATG-3'

Transfection

혈청이 포함된 성장배지(DMEM-20%FBS) 4 ml가 담겨진 조직배양 용기(6 well plate)에 70,000 100,000 HeLa cell을 분배하고 $CO_2$ 배양기에서 24시간 동안 37℃에서 배양한다. 이때 cell은 30 50% confluent를 이루도록 했다. 12×75 mm 무균관(tube)에 1 μg vector DNA를 100 μl Opti-MEM I 배지에 희석시킨 용액과 Lipofectin reagent 6 μl를 100 μl Opti-MEM I 배지에 희석시킨 용액을 준비하여 두 용액을 잘 섞고 실온에서 5 10분간 배양한다. 이를 항생제, 혈청이 들어있지 않은 배지로 잘 씻어낸다. DNA/liposome complex 1 ml를 첨가하고 5시간 동안 배양한다. 1 ml DMEM-40% FBS를 첨가하고 24시간 동안 배양한다. 모든 성장배지를 씻어내고 DMEM-20% FBS를 다시 첨가하고 24시간 동안 배양시킨다. 다시 성장배지를 씻어내고 5 ng/ml G418/DMEM-20% FBS를 첨가시킨 후 24 격자판에 분할한다. 성장배지는 3일에 한번씩 갈아주고 혈청은 떨어지지 않게 보충한다. Genticin® antibiotic(G418 sulfate)으로 처리하여 성공적으로 transformation된 세포들을 선택하였다.

GJB2 유전자의 발현 및 기능적 연구

**Cx26 발현 및 세포내 위치 확인**

Cx26 발현 여부 및 세포내 위치를 확인하기 위하여 형광면역세포화학(fluorescent immunocytochemistry) 염색방법을 이용하였다. Cover glass를 1×1 cm 크기로 잘라 70% ethanol로 세척하고 말린 뒤에, 60 mm dish에 DMEM media(10% FBS, Ab1%)를 넣고 cover glass를 담근다. cover glass 한 장씩을 6-well plate에 놓고, 각 HeLa cell suspension을 부어 세포가 confluent해질 때까지 약 24시간을 배양시킨다. PBS로 세척 후 4% neutral formalin으로 10분간 고정한다. 이를 PBS로 다시 세척 후 0.15% triton X-100(in PBS)으로 5분간 처리하여 항체가 세포막의 구멍을 통해 일시적으로 투과되도록 한다. PBS로 3회 세척 후 1% BSA(bovine serum albumin)로 상온에서 1시간동안 처리하여 blocking을 실시한다. 사각형 case에 휴지를 놓고 증류수로 적신 후 parafilm을 깐다. 구획을 구분한 뒤 Mouse Cx26의 세포내고리(intracellular loop)에 결합하는 primary rabbit antibody(Zymed, South San Francisco, USA)를 blocking 용액으로 10 μg/ml 농도로 만들어 20 μl 씩을 떨어뜨리고, 세포배양이 된 cover glass를 뒤집어 덮어 상온에서 1시간 성숙시킨다. 이를 다시 꺼내어 PBS가 들어있는 6-well plate에 넣고 10분간씩 3회를 세척한 뒤에 1.5 mg/ml 농도의 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody(Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA)를 1 : 200으로 희석하여 50 μl씩을 섞

는다. 어두운 곳에서 1시간 성숙시키고 PBS로 10분간씩 3회를 세척한 뒤 slide glass 위에 glycerol 한방울(10 μl)을 떨어뜨리고 cover glass를 덮어 mounting한다. 이를 형광 현미경(high performance cooled CCD imaging systems, Apogee instruments Inc)을 이용하여 관찰하였다. 아울러 같은 방법으로 Cx26의 N-terminal에 결합하는 primary goat polyclonal IgG(Santa cruz biotechnology, California, USA)를 30 μg/ml 농도로 만든 20 μl와 1.5 mg/ml 농도의 FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG secondary antibody(Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA)를 1 : 500으로 희석한 50 μl를 이용하여서도 반응을 시켰다.

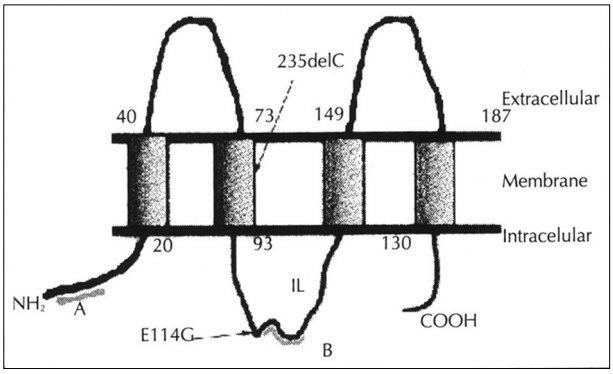


**Fig. 2**. The molecular structure of connexin 26.
235 delC and E114G are located in M2 and IL, respectively. Epitopes which are used in the immunocytochemistry A) N-terminal, B) int-racellular loop. M 1-4 : transmembrane domains, IL : intra-cellular loop.

**간극결합 단백질의 기능적 연구**

간극결합 단백질을 통한 세포간 정보교환(cell communication)의 분석을 위해서 1987년 El-Fouly 등[14]이 제시한 scrapeloaded dye transfer 방법을 사용하였다. 235 delC, E114G 그리고 wild type의 Cx26 DNA를 함유한 HeLa cell을 24시간 40 mm dish에 배양한 후 PBS로 2회 세척한다. 여기에 0.5% Lucifer yellow를 넣고 #10 수술용 칼(surgical scalpel)로 칼자국을 낸다. 이후 10분간 배양기에 넣어둔 후 Lucifer yellow 용액을 제거하고 PBS로 1회 세척한다. 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정한 후 형광 현미경(high performance cooled CCD imaging systems)으로 Lucifer yellow의 세포간 이동을 관찰하였다.

## 결 과

235 delC 변이형태는 두 번째 세포막(transmembrane domain)내에 위치하고 있고, frame shift를 초래하여 Cx26 단백질의 81번째 codon에서 stop codon을 형성하게 한다. E114G 변이형태는 세포내고리(intracellular loop)에 위치하고, 114번째 codon인 gluamate를 glycine으로 변환시킨다(Fig. 2).

Cx26 단백질 발현 및 세포내 위치 확인

Cx26 단백질의 발현 및 세포막에서의 간극결합 형성 여부를 파악하기 위하여 Cx26의 Nterminal과 세포내고리에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 형광세포염색을 시행하였다. Cx26의 세포내고리에 결합하는 항체를 사용한 경우, wild-type과 E114G 발현 세포에서는 간극결합이 위치하는 세포막에 특징적인 반점형태의 형광염색을 관찰할 수 있었다. 반면에 235delC 발현 세포에서는 세포막 및 세포내 염색이 관찰되지 않아 Cx26이 발현되지 않은 mock cell의 경우와 일치한 모습이었다(Fig. 3). Cx26의 N-terminal에 결합하는 항체를 사용한 경우, wild-type과 E114G 경우에서는 세포내고리에 결합하는 항체를 사용한 경우와 마찬가지로 세포막에 특징적인 반점형태의 염색을 보였다. 반면에 235 delC 경우에서는 일부 세포내 핵주변에만 약하게 형광염색되었고 세포막에는 염색되지 않았다. Mock cell은 전혀 형광염색되지 않았다(Fig. 4).

간극결합 단백질의 기능적 연구

변이 Cx26 단백질의 세포간극을 통한 물질 전달의 기능을 파악하기 위하여 형광물질인 Lucifer yellow의 세포간 전달을 분석하였다. E114G의 경우에서는 wild-type의 HeLa cell과 유사하게 형광물질 주입세포에서 인접세포로 형광염색물질이 전달되는 것이 관찰되었다. 반면 235delC 경우에서는 형광물질 주입세포부터 인접 세포로의 형광염색물질 전달이 전혀 관찰되지 않았다. mock cell의 경우에서도 형광 염색이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 5).

## 고 찰

간극결합은 인접세포간의 직접적인 정보교환의 통로로써 일반적으로 비특이적, 수동적 확산에 의해 물질의 이동이 이루어지는 곳이다. 이는 통로를 통하여 물질의 크기에 따라 비교적 선택적으로 물질 이동이 이루어지는데, cAMP, inositol 1,4,5-triphosphate(IP3)와 같은 1000Da 이하의 작은 물질이나 $Na^+$, $K^+$, $Ca^+$ 등의 비유기 이온을 통과시키고, 반면에 단백질이나 핵산의 이동은 못하게 한다. 이러한 작은 정보 물질의 이동에 의해 세포는 상호 정보교환을 하

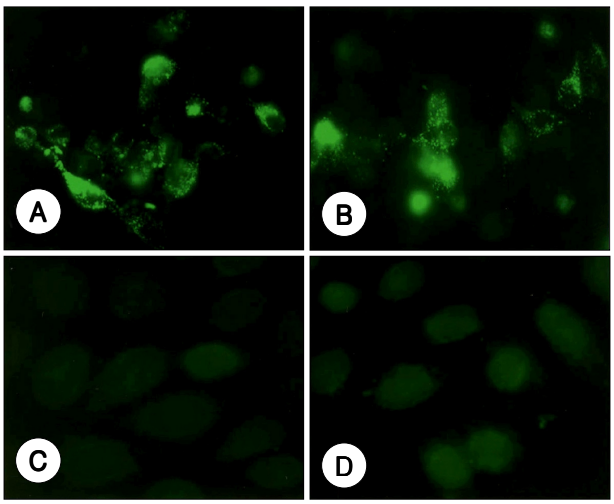


**Fig. 3.** Immunocytochemistry of HeLa cells using primary antibody against intracellular loop portion of Cx26. A : wild-type (WT) B : E114G C : 235delC D : mock transfected cells, respectively. Both WT and E114G transfected HeLa cells showed positive immunofl-uorescent reactions in the cell membranes. However, 235delC transfected cells showed no reaction like as mock transfected cells.

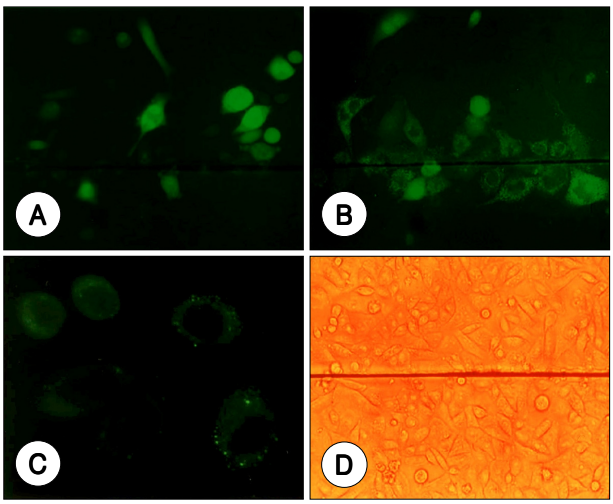


**Fig. 5.** Functional study of GJB2 using scrape-loaded dye (Lucifer yellow) technique. A : wild-type (WT) B : E114G C : 235delC trans-fected cells, respectively (Fluorescent microscopic view). Transfer of Lucifer yellow dye into contiguous cells were detected in WT and E114G but not in 235delC transfected HeLa cells. D : Light microscopic view of HeLa cells with scrape-loaded dye technique.

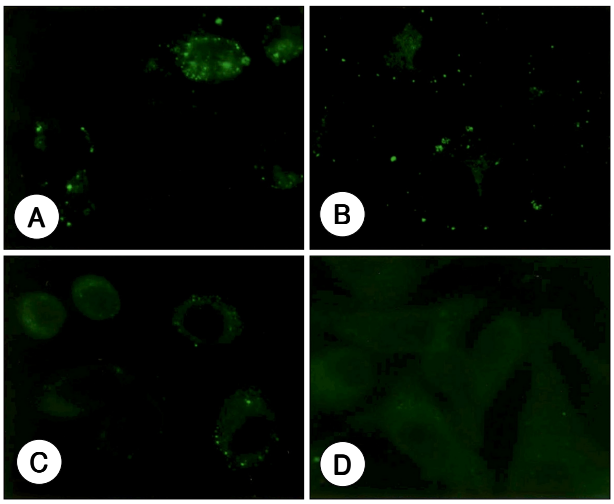


**Fig. 4.** Immunocytochemistry of HeLa cells using primary antibody against N-terminal portion of Cx26. A : wild-type (WT) B : E114G C : 235delC D : mock transfected cells, respectively. Both WT and E114G transfected HeLa cells showed positive immunofluorescent reactions in the cell membranes. However, 235delC transfected cells showed weak reactions only around the nucleus regions. Mock transfected cells showed no reaction.

게되고, 이를 통해 각 기관의 발생 및 발육을 조절하고, 그 정상 기능을 발휘하게 된다.[15]

특히 내이에서는 간극결합이 $K^+$의 국소 순환에 관여함으로써 청각기능 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[8] 이러한 $K^+$의 국소순환에 장애가 오면 난청을 유발하게 되는데, 유전적 원인으로 $K^+$ 통로에 관련된 유전자인 KCNQ1, KCNQ4, KCNE1과 GJB2(connexin 26), GJB3 (connexin 31), GJB5(connexin 30) 등이 소개되고 있다.[16] 특히 Cx26은 청각모세포(sensory hair cell) 주변의 상피세포층과 혈관조의 변연세포 주변의 연조직층에 많이 분포하여 중요한 역할을 함으로써, Cx26 유전자 변이는 심각한 난청을 초래하게 된다.[17]

Connexin은 간극결합을 구성하는 단백질의 기본단위로서 6개가 모여 connexon이라는 hemichannel을 만들고, 이는 인접 세포의 connexon과 결합하여 완전한 통로를 만들게 된다.[6] 그 중 Cx26은 connexin의 지금까지 발견된 14종류의 isoform의 하나로써 26.5 kDa의 분자량을 갖고 있다. 13번째 염색체 장완의 12번째 locus에 위치한 유전자에 의해 형성되고 주로 간, 내이 등에 많이 분포하고 있다.[7][8]

Connexin은 종류에 관계없이 1개의 세포내 고리, 두 개의 세포외 고리를 갖고 N-과 C-terminal이 세포내에 존재하는 유사한 세포내 배열(topological distribution)을 하고 있다(Fig. 2).[18] 이 중 세포막내 domain인 M1은 전압감지통로 역할을 함으로써 일부 세포막통로를 구성하게되고, M2는 connexon hemichannel을 형성하는 oligomerization에 중요한 것으로 알려져 있다. M3는 양가성의 성질로 통로의 표면을 구성하는데 관여하고, 2개의 세포외고리는 각각 고리 내에 3개의 cystine기를 가져 disulphide 결합을 형성함으로써 세포간 connexon 결합에 필요한 견고한 3차원 구조를 유지하게 한다. 이 구조에서 세포막내 domain인 M2, M3 그리고 세포내 존재하는 C-terminal의 배열이 co-

nnexin의 종류에 따라 변화가 다양한 것으로 알려져 그 기능조절에 중요한 것으로 되어 있다.[6] 한편 connexin 유전자 변이에 따른 connexin 단백질의 변형은 그 변형에 따라 간극결합 구조의 변화 및 기능에 심각한 변화를 초래하기도 하고, 정상기능의 다형성(polymorphism)으로 표현되기도 한다.

본 연구에서 사용된 235delC 형태의 변이는 세포막내 domain인 M2에서 79번째 codon의 cystine이 결손됨으로써 frame shift를 일으켜 81번째 codon에서 stop codon (TGA)을 초래하게 된다. 즉 전체 226개 중 80개로 아미노산의 길이가 짧아지는 미성숙 Cx26 단백질을 형성하게 된다. 한편 E114G는 세포내 고리에서 missense 변이를 일으켜 114번째 glutamate(E)가 glycine(G)으로 치환됨으로써 음전하 R군에서 비극성 지방족 R군으로 바뀌게 되고, Cx26 단백질의 3차원적 구조 및 극성의 변화를 예측할 수 있다. 특히 235delC가 난청환자에서 열성유전의 형태로 나타났고, E114G는 정상인과 난청환자 모두에서 발견되는 것으로 보아 235delC Cx26 단백질의 기능손상이 더 클 것으로 예상되었다.

본 연구에서는 변이 유전자에 의해 형성된 Cx26 단백질이 정상적으로 형성되어 세포막으로 이동하였는지를 알아보기 위해 면역세포화학염색을 시도하였다. 235delC의 경우에서는 세포내고리에 결합하는 항체 염색에서 전혀 반응하지 않았고, N-terminal에 결합하는 항체 염색에서는 핵 주변의 세포질 내에만 일부분 분포하였다. 이는 아미노산 길이가 짧아짐으로써 세포내 고리를 포함한 이후의 구조가 형성되지 못하며, N-terminal 부위의 일부만이 형성된 결과라고 해석된다. 또한, Cx26 단백질이 소포체 또는 골기체에서 oligomerization 되어 세포막으로 이동하고, 세포막에서 hemichannel이 형성되는데 그 과정의 어느 부분에 결손이 생김으로써 실질적으로 세포막으로의 이동이 정상적으로 이루어지지 않았음을 나타내며, 염색의 강도가 wild-type이나 E114G와 비교하여 현저히 작은 것으로 보아 oligomerization 자체와 안정성에 결손을 초래한 것으로 사료된다. E114G의 경우에서는 N-terminal 과 세포내고리에 결합하는 항체 염색 모두에서 wild-type과 유사하게 세포막과 세포막내에 염색되었다. Martin 등[11]은 Cx26의 세포막으로의 이동효율이 wild-type에서는 53.3%이나 missense mutation인 M34T에서는 26.9%, W77R에서는 9.8%로 정상에서 보다 감소됨을 보고하였다. 본 연구에서도 wild type에 비하여 E114G가 세포막에서 약하게 관찰되는 경향이 관찰되었으나 정확한 분석을 위해서는 정량적이 측정이 추가되어야 할 것으로 사료된다.

간극결합과 관련한 세포간 물질전달에 대한 기능적 연구는 일반적으로 3가지 방법이 이용되고 있다. 대사협조분석(metabolic cooperative assay), 형광염색전달(fluorescent dye transfer), 그리고 전기생리방법(electrophysiological methods) 등이 그것이다. 대사협조분석은 주로 독성학 등의 화학물질을 이용하는 경우에 사용하고, 세포배양에 시간이 많이 걸리는 단점이 있다.[19] 빠른 결과 분석과 정량화가 가능한 방법으로 현미경하에서 세포에 직접 염색물질을 주입하는 방법(microinjection)이 있는데, 이 기술은 매우 어렵고, 정밀함을 요한다.[11][19] 본 연구에서는 1987년 El-Fouly 등[14]이 소개한 scrapeloaded dye transfer 방법을 이용하였는데 이 방법은 특별한 기구 없이 매우 간단히 시행할 수 있고, 역시 형광염색된 세포의 수를 측정함으로써 정량화도 가능하다. 칼날에 상처가 난 세포의 생존률은 자극 직후에는 약 50  60%에 달하고, 이들 생존 세포의 약 90%가 형광염색을 전달할 수 있다고 한다. 칼 자극으로 인하여 세포막 일부에 일시적인 결손이 생겨 염색물질이 세포내로 주입되고 이것이 간극결합을 통하여 인접세포로 전달되게 된다. 본 연구에서 E114G 발현 세포는 wild-type과 유사하게 인접세포로 Lucifer yellow의 염색전달이 관찰되었다. Martin 등[11]에 의하면 형광염색 미세 주입방법을 이용하여 wild-type Cx26은 20.4%에서 염색이 전달되었고, M34T에서는 5.7%, W77R에서는 4.1%였다고 보고하였다. 본 실험에서 E114G는 wild-type과 유사한 전달형태를 보인 반면, 235delC 발현 세포는 mock cell과 같이 전혀 염색전달이 관찰되지 않았다. 따라서 E114G는 정상적인 간극결합 기능을 갖고 있는 것으로 보이고, 235delC는 간극결합 기능에 결손이 있음을 알 수 있었다.

## 결 론

한국인 선천성 난청환자에서 GJB2 유전자 변이형태로 보고된 235delC, E114G를 대상으로 세포간극 기능 분석을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 235delC 변이는 Cx26 단백질의 81번째 codon에서 stop codon을 이루어 비정상적인 Cx26 단백질을 형성하고 세포막으로 이동하지 못함으로써 간극결합 단백질 형성에 결정적인 결손을 초래한 변이로 사료된다. 또한 E114G는 114번째 codon인 glutamate가 glycine으로 변환되어 구조적 변화가 예측되지만, 단백질의 형성이나 세포막으로의 이동, 그리고 인접세포간의 간극결합을 통한 염색전달 기능에 손상을 보이지 않음으로써 유전성 난청의 원인을 유발하는 변이보다는 polymorphism의 한 형태로 여겨진다.

본 연구를 통하여 GJB2 유전자 변이가 선천성 난청과 밀접히 관련되어 있으며, 변이 위치 및 형태에 따라 간극결합 단백질의 기능을 변화시키고, 아울러 난청의 발현 정도에도 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

중심 단어 : 선천성 난청 · Connexin 26 · Gap junction · 기능적 연구.

본 논문은 보건복지부 보건의료 기술개발사업(중점공동연구개발사업 관리번호 HMP - 00 - CH - 05 - 0005)의 연구비 지원에 의함.

## REFERENCES


1) Park HJ, Park KH, Oho JH, Lee JS. *TEOAE as a newborn hearing screening. Korean J tolaryngol 1999;42:565-9.*
2) Morton NE. *Genetic epidermiology of hearing impairment. Ann NY Acd Sci 1991;630:16-31.*
3) Zelante L, Gasparini P, Estivill X. *Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in mediterraneans. Hum Mol Genet 1997;6:1605-9.*
4) Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L. *Connexin-26 mutation in sporadic and inherited sensorineural deafness. Lancet 1998;35:394-8.*
5) Cohn ES, Kelly PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz DM, Kuehn HJ, *et al. Clinical Studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). Pediatrics 1999;103:546-50.*
6) Kumar NM, Gilula NB. *The gap junction communication channel. Cell 1996;84:381-8.*
7) Forge A, Becker D, Evans WH. *Gap junction connexin isoforms in the inner ear of gerbil and guinea pigs. Br J Audio 1997;31:76-7.*
8) Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Evans WH, Lench N, Souter M. *Gap junctions and connexin expression in the inner ear. In: Cardew G, editor. Gap Junction-Mediated Intercellular Signaling in Health and Disease. Novartis Foundation Symposium; Wiley Chichester UK.;1999. p.134-56.*
9) Denoyelle F, Weil D, Maw MA. *Prelingual deafness: High prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. Hum Mol Gen 1997;6:2173-7.*
10) Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ. *Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. N Engl J Med 1998;339:1500-5.*
11) Martin PEM, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH. *Properties of connexin 26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. Hum Mol Genet 1999;8:2369-76.*
12) Park HJ, Park KH, Song JW, Choung YH, Choi HS. *Molecular genetic analysis of Connexin 26 in Korean congenital hearing loss. Korean J Otolaryngol 2000;43:357-62.*
13) Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park KH, Kim HN. *Connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. Laryngoscope 2000;110:1535-8.*
14) El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. *Scrapeloading and dye transfer: A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. Exp Cell Res 1987;168:422-30.*
15) Lowenstein WR. *Junctional intecellular communication and the control of growth. Biochem Biophys Acta 1979;560:1-65.*
16) Holt JR, Corey DP. *Ion channel defects in hereditary hearing loss. Neuron 1999;22:217-9.*
17) Kikuchi T, Kimura RS, Paul D, Adams JC. *Gap junctions in the rat cochlea: Immunohistochemical and ultrastructural analysis. Anat Embryol 1995;191:101-18.*
18) Bruzzone R, White TW, Paul DL. *Connections with connexins-the molecular-basis of direct intercellular signalling. Eur J Biochem 1996;238:1-27.*
19) George CH, Martin PEM, Evans WH. *Rapid determination of gap junction formation using HeLa cells microinjected with cDNAs encoding wild-type and chimeric connexins. Biochem Biophys Res Commun 1998;284:785-9.*