

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**SENDROMİK OLMAYAN TÜRK İŞİTME KAYIPLI OLGULARDA
OTOFERLİN (OTOF) GEN MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağlar DOĞUER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adnan MENEVŞE

ANKARA

Ekim 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**SENDROMİK OLMAYAN TÜRK İŞİTME KAYIPLI OLGULARDA
OTOFERLİN (OTOF) GEN MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağlar DOĞUER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adnan MENEVŞE

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-96 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Ekim 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 13/10/2008


İmza
Prof.Dr. Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


İmza
Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi


İmza
Prof.Dr. Yıldırım BAYAZIT
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler	V
Tablolar	VII
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kulağın Anatomik Yapısı	3
2.2. İşitme Mekanizması	6
2.3. Otoferlinin İşitmedeki Önemi	9
2.4. İşitme Bozukluklarının Sınıflandırılması	10
2.4.1 Genetik İşitme Kayıplarının Genel Özellikleri	11
2.4.2. Sendromik Olmayan İşitme Kayıplarının Genel Özellikleri	12
2.4.3. Sendromik Olmayan İşitme Kayıplarının İsimlendirilmesi	13
2.5. OTOF Geninin Kromozom Üzerindeki Yeri	13
2.6.OTOF Geninin Özellikleri	14
2.7. Otoferlin Proteininin Genel Özellikleri	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Araç ve Gereçler	18
3.1.1 Kullanılan Laboratuvar cihazları ve gereçleri	18
3.1.2. Kimyasal Maddeler	18
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	19
3.2.1. 5XTBE Çözeltilisinin Hazırlanışı	19

3.2.2. 1X TBE Çözeltisinin Hazırlanışı	19
3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı	20
3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı	20
3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı	20
3.3.1. Primerler	21
3.4 Yöntemler	21
3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikleri	21
3.4.2. Genomik DNA Saflaştırılması	22
3.4.3. PZT ve Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	23
3.4.3.1 Araştırılan Gen Bölgelerinin PZT ile Çoğaltılması	23
3.4.3.2 OTOF Geninde Araştırılan 6 Mutasyon Bölgesinin PZT Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi	25
3.4.4. Leu1011Pro PZT Ürünlerinin <i>MspI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	25
3.4.4.1 Deneyin Yapılışı	26
3.4.5. Arg1939Gln PZT Ürünlerinin <i>AspS9I</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	26
3.4.5.1 Deneyin Yapılışı	27
3.4.6. Pro1987Arg PZT Ürünlerinin <i>BstDSI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	27
3.4.6.1 Deneyin Yapılışı	28
3.4.7. c.1651delG PZT Ürünlerinin <i>Bse8I</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	29
3.4.7.1 Deneyin Yapılışı	29

3.4.8. Gln829Ter PZT Ürünlerinin <i>Fsp</i> BI Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	30
3.4.8.1 Deneyin Yapılışı	30
3.4.9. c.4799+1G>C PZT Ürünlerinin <i>Afi</i> I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	31
3.4.9.1 Deneyin Yapılışı	31
4.BULGULAR	32
4.1. Moleküler Genetik Analizleri	32
4.1.1. Leu1011Pro Mutasyonuna ait bulgular	32
4.1.2. Arg1939Gln Mutasyonuna ait bulgular	33
4.1.3. Pro1987Arg Mutasyonuna Ait Bulgular	34
4.1.4. c.1651delG Mutasyonuna Ait Bulgular	35
4.1.5. Gln829Ter Mutasyonuna Ait Bulgular	36
4.1.6. c.4799+1G>C Mutasyonuna Ait Bulgular	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	44
7. ÖZET	45
8. SUMMARY	46
9. KAYNAKLAR	47
10. EKLER	56
11. ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER, RESİMLER

	Sayfa No
Şekil 1: Kulağın anatomik yapısı.	4
Şekil 2: Korti organının çalışma mekanizması	7
Şekil 3: Saç hücrelerindeki iyon kanalları	7
Şekil 4: Dış saç hücresi ve iyon kanalları	8
Şekil 5: Otoferlinin SNARE proteinleri Syntaxin-1 ve SNAP25 proteinleriyle etkileşimi	10
Şekil 6: OTOF geninin kromozom üzerindeki yeri.	14
Şekil 7: İnsan ferlin geni ailesi proteinleri. C2 kalsiyum bağlanma bölgesi.	16
Şekil 8: Otoferlin proteinin uzun ve kısa izoformu.	17
Şekil 9: Leu1011Pro mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.	32
Şekil 10: Leu1011Pro mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	33
Şekil 11: Arn1939Gln mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.	33
Şekil 12: Arg1939Gln mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	34
Şekil 13: Pro1987Arg mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT	34

ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.

Şekil 14: Pro1987Arg mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 35

Şekil 15: c.1651delG mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. 35

Şekil 16: c.1651delG mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 36

Şekil 17: Gln829Ter mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. 37

Şekil 18: Gln829Ter mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 37

Şekil 19: c.4799+1G>C mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. 38

Şekil 20: c.4799+1G>C mutasyonu içeren bölgeye ait Restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 38

Resim 1: Tek sıra halinde görünen iç saç hücreleri ile üç sıra halinde görünen dış saç hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü. 5

TABLolar

Tablo 1: Hedef bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.	21
Tablo 2: Otof Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Tepkime Karışımı	23
Tablo 3: Otof Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Tepkime Sıcaklıkları	24
Tablo 4: Otof Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Ürünlerinin Büyüklükleri	25

SEMBOLLER, KISALTMALAR

A	: Adenin
β	: Beta
BB	: Kan Lizis Tamponu
Bç	: Baz Çifti
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad Derece
Ca^{2+}	: Kalsiyum
C	: Sitozin
dH_2O	: Distile Su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit Disodyum Dihidrat
g	: Gram
G	: Guanin
K^{+}	: Potasyum
kDa	: Kilo Dalton
kb	: Kilo baz
MgCl_2	: Magnezyum Klorür
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
mM	: Mikromolar
M	: Molar

mRNA	: Elçi RNA
N	: Pürin Veya Pirimidin Bazı(Adenin, Guanin, Sitozin, Timin)
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
pMol	: Pikomol
R	: Pürinler (Adenin, Guanin)
Rpm	: Dakika başına dönme sayısı
sn	: Saniye
Taq	: Thermus aquaticus
T	:Timin
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
Tris Bazı	: Tris (hidroksimetil) metilamin
U	:Ünite
V	: Volt
UV	: Ultraviyole
Y	:Pirimidinler (Sitozin, Timin)

1. GİRİŞ

İşitme kaybı, en sık görülen duysal bozukluk olup, 1000 doğumda yaklaşık 1-3 oranında görülmektedir ¹⁻³. Etiyolojilerine göre işitme kayıpları, genetik ve çevresel nedenli işitme kayıpları olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır. İşitme kaybı nedenlerinin yaklaşık %50'si genetikdir ³⁻⁶.

Genetik nedenli işitme kayıplarının %30'unu sendromik işitme kayıpları oluşturur ⁷. Hastaların çoğunda işitme kaybı hafif veya değişken özelliktedir ⁸. İşitme kaybına klinik olarak başka hiçbir bulgunun eşlik etmediği bu olgular, sendromik olmayan işitme kayıplarıdır ¹⁰. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini ise, sendromik olmayan işitme kayıpları oluşturur ^{1,11}.

Prelingual başlangıçlı sendromik olmayan işitme kaybında otozomal resesif kalıtım %80 gibi yüksek bir oranda görülmekte iken otozomal dominant kalıtım %20, X'e bağlı kalıtım %1 ve mitokondriyal kalıtım da <%1 oranında gözlenmektedir ^{11,12}. Genetik heterojenitenin yüksek seviyede görüldüğü sendromik olmayan işitme kaybı ile ilgili 120 lokus haritalanmış ve 41 gen tanımlanmıştır ¹³.

Otoferlin (OTOF) geni sendromik olmayan işitme kaybı ile ilgili olarak tanımlanmış olan genlerden birisidir. Otoferlin hücre zarına tutunmuş olan sitozolik bir proteindir ¹⁴. Bu proteinin C2 olarak adlandırılan kalsiyum bağlayan yapısal bölgesi 6 tekrar içerir. C2 bölgesini içeren diğer proteinlerin de fosfolipidlerle ve proteinlerle etkileşime girdiği bilinmektedir. Otoferlin molekülünde bulunan C2 bölgelerinin Ca^{2+} ile tetiklenen vesikül-membran füzyonunda görev yaptığı önerilmektedir ^{12,14}.

OTOF geni kohlea, vestibül ve beyinde ifadenmektedir ^{5,14}. 48 ekzon içeren OTOF geni, çeşitli translasyon başlangıç bölgelerinin alternatif intron çıkartılması ile birlikte kullanarak, proteinin çoklu uzun ve kısa izoformlarını kodlamaktadır. Uzun izoformunda 6 tane C2 bölgesi bulunurken, kısa izoformunda ise 3 tane C2 bölgesi bulunmaktadır ¹⁴.

İşitme kaybının erken dönemde fark edilmesi sosyal hayatın sürdürülmesi için çok önemlidir. Doğuştan işitme kaybı nedeni mutasyonların saptanması, işitme bozukluğunun erken tanısında yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada, sendromik olmayan işitme kayıplı olgularda OTOF geninde belirlenen 6 mutasyon araştırılmıştır. Bu araştırma ile genetik işitme kayıplı olguların erken dönemde belirlenmesi ve Türk toplumunda genetik işitme kaybı nedeni olarak OTOF mutasyonlarının sıklığının araştırılması hedeflenmektedir. Sonuçlar, bireyin kendisi için olası bir tedavi sağlamayacaktır. Ancak bireyin evlenmesi veya ebeveynlerin tekrar çocuk sahibi olmak istemesi halinde, sonuçlar ailenin bilgilendirilmesi amacıyla kullanılabilecektir.

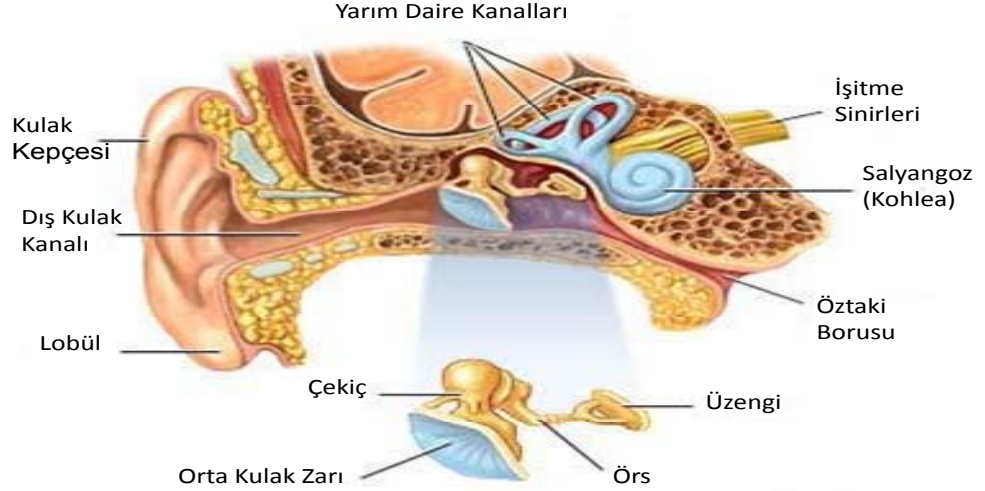
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kulağın Anatomik Yapısı

Sesleri algılayan duyu organımız kulak, dış, orta ve iç kulak olmak üzere 3 farklı kısımdan oluşmuştur (Şekil 1). Dış kulak ses dalgalarını toplayıp orta kulağa iletmekten; orta kulak aldığı ses dalgalarının enerjisini değiştirerek, sıkıştırılmış dalgalar şeklinde iç kulağa iletmekten sorumludur. İç kulak ise aldığı bu ses dalgalarını sinir sinyallerine dönüştürerek beyne gönderir ve beyinde sesin algılanıp yorumlanması gerçekleşir ¹⁵⁻¹⁸.

Dış kulak, kulak kepçesi ve kulak kanalı olmak üzere 2 kısımdan oluşmuştur. Kulak kepçesi özgül şekli sayesinde ses dalgalarını toplamaktan sorumludur. Bu yapı ayrıca, sesin gelme yönünü ayırt etmemizi de sağlar ^{17,19}.

Orta kulak; kulak zarı ve dıştan içe doğru sırasıyla çekiç (malleus), örs (incus) ve üzengi (stapes) kemiklerinden ve içi hava dolu boşluktan oluşmuştur. Çekiç, orta kulak zarı ile bağlantılıdır. Üzengi, orta kulağın en iç kısmında yer alır ve vestibülün oval penceresiyle temas halindedir. Örs ise çekiç ve üzengi kemikleri arasında yerleşmiştir ^{15,16,18} (Şekil 1).



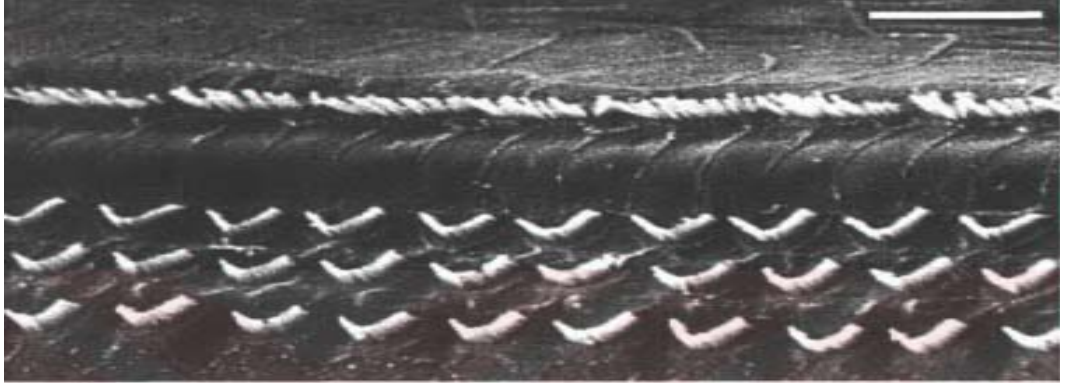
Şekil 1: Kulağın anatomik yapısı ²⁰.

İç kulak, işitme ve denge sistemi olmak üzere iki duyuşal sisteme sahiptir. İç kulak, kemiksi ve zarsı labirentlerden (iç kulak boşluğu) oluşmuştur. Kemiksi labirent, perilenf adı verilen bir sıvı ile doludur ve 3 büyük kanal içerir. Bu kanallar, vestibül, kohlea (salyangoz), sakkuluslu ve utrikuluslu yarım daire kanallarıdır ^{15,16}.

Kohlea işitme sinyallerini yönlendiren merkezdir ^{16,19,21}. Kohlear kanalın endolenf sıvısı içerisinde ses dalgaları, elektriksel impulslara çevrilirler. Bu impulslar sinir flamentleri (fiber) tarafından merkezi işitme sistemindeki akustik sinir olan 8. sinire ve son olarak da beyin duyu korteksine taşınır ^{16,22}.

İnsan kohleasının algılayıcı kısmı “korti organı” olarak isimlendirilmektedir. Korti organı tek sıra halinde iç saç hücresi ve üç sıra halinde dış saç hücresi olmak üzere iki tip duyu hücresi içerir ^{16,22} (Resim 1). İç saç hücresi, sinyalleri akustik sinir ve duyu korteksine gönderen reseptör hücreleridir. Dış saç hücresi, duyma hassasiyetine ve frekans seçimine katkıda bulunan, hem duyu hem de motor elementleri içeren hücrelerdir ^{16,23}. Dış saç hücreleri akustik olarak uyarıldıkları zaman anında uzayıp kısalırlar. Dış saç hücrelerindeki bu değişimler, aktin gibi filamentler içeren hücre iskeleti ve plazma zarı boyunca birçok moleküler motorun ortak hareketi sonucunda meydana gelmektedir ¹⁶.

Her saç hücresi apikal kutbunda kademeli uzunlukta dikey olarak uzanan V şeklinde dizilmiş yaklaşık 100 adet silindir şeklinde sterosil içeren saç yığınıyla kaplanmıştır ^{16,21,24,25} (Resim 1).



Resim 1: Tek sıra halinde görünen iç saç hücreleri ile üç sıra halinde görünen dış saç hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü. Korti organının üst kısmından görünen dış saç hücreleri ve saç örgülerinin V şeklindeki düzgün sıralanışı görünmektedir ²⁵.

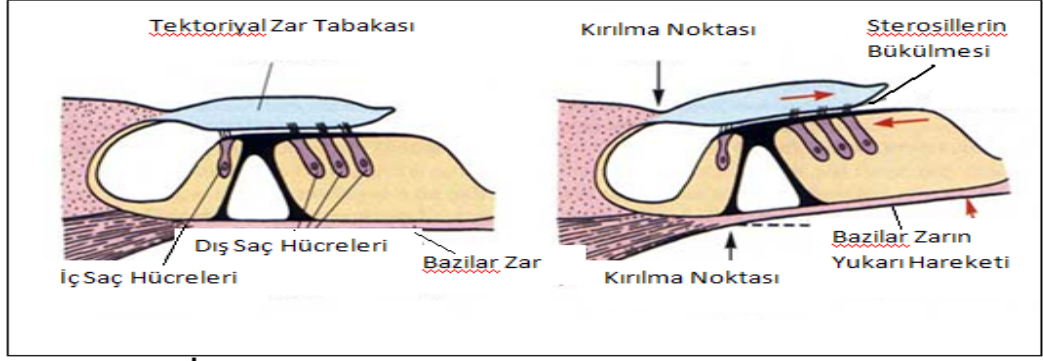
Her bir sterosil hücrenin plazma zarıyla çevrelenmiş bir aktin iskeletinden oluşmaktadır ^{16,21,26,27}. Sterosiller çapraz bağlı aktin filamentlerin yığılmasından dolayı hareket edemezler. Sterosiller komşularına uç bağlantılarla bağlıdır ^{16,28,29}. Uç bağlantıların hareketi miyozin VI ve miyozin VII tarafından kontrol edilir ^{16,30}.

2.2. İşitme Mekanizması

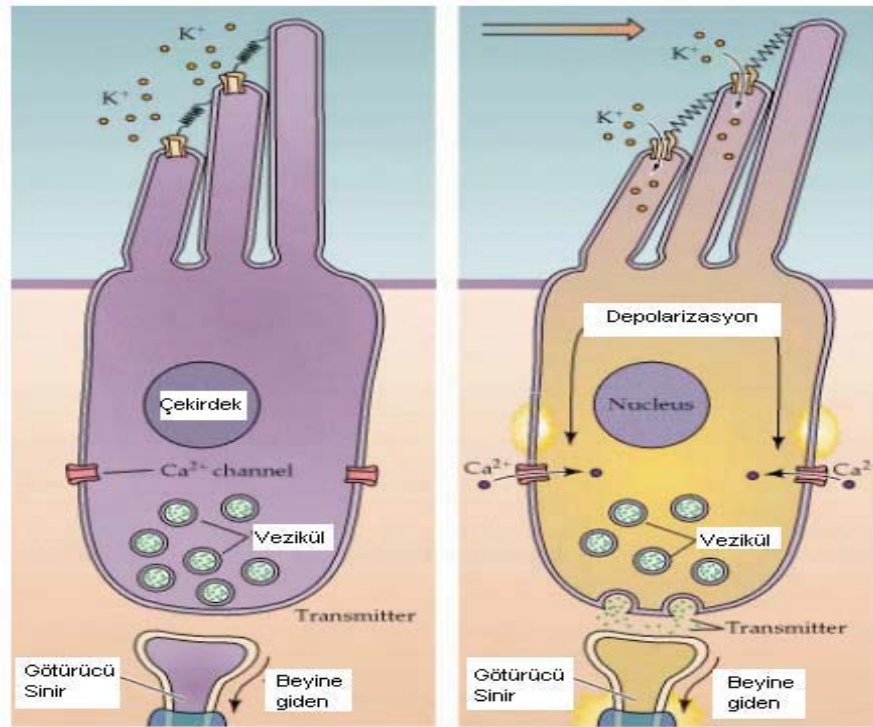
Başımıza çarpan ses dalgaları ilk olarak dış kulak tarafından tutulur ve dış kulak kanalı boyunca taşınarak orta kulak zarı olan timpanik membrana iletilir. Kulak zarında ses dalgalarının oluşturduğu basınç titreşimlere sebep olur. Bu titreşimler orta kulaktaki işitme kemiklerinde piston benzeri mekanik hareketler meydana getirerek titreşimleri ilk olarak üzengi kemiğinin tabanına daha sonra da oval pencere yoluyla kohleaya aktarır. Ses dalgalarının yaratmış olduğu titreşimler kohleanın perilemf sıvısı içerisinde bir dalgalanmaya neden olur. Perilemf sıvısı içerisinde meydana gelen bu dalgalanma saç hücreleri ile bu hücreler üzerinde yer alan tectorial zar tabakası arasında bir harekete neden olur. Meydana gelen bu hareket tüy demetinin uzantısı olan sterosillerin en büyük sterosil yönüne doğru bükülmesine neden olmaktadır ^{24,31-33} (Şekil 2).

Miyozinler tarafından kontrol edilen sterosiller arasındaki uç bağlantılarının hareketleri sonucunda endolenf içindeki yüksek konsantrasyondaki potasyum iyonları, sterosillerin uç bağlantılarındaki transdüksiyon kanallarından saç hücrelerin içerisine girerek aksiyon potansiyelini başlatırlar. Bu pozitif yük, hücrenin depolarizasyonuna neden olur. Potasyum iyonlarının sterosil hücrelerinin içerisine girmesi

bazolateral bölgedeki kalsiyum kanallarının açılmasına ve kalsiyumun hücre içerisine girmesine neden olmaktadır ^{15,16,24} (Şekil 3).

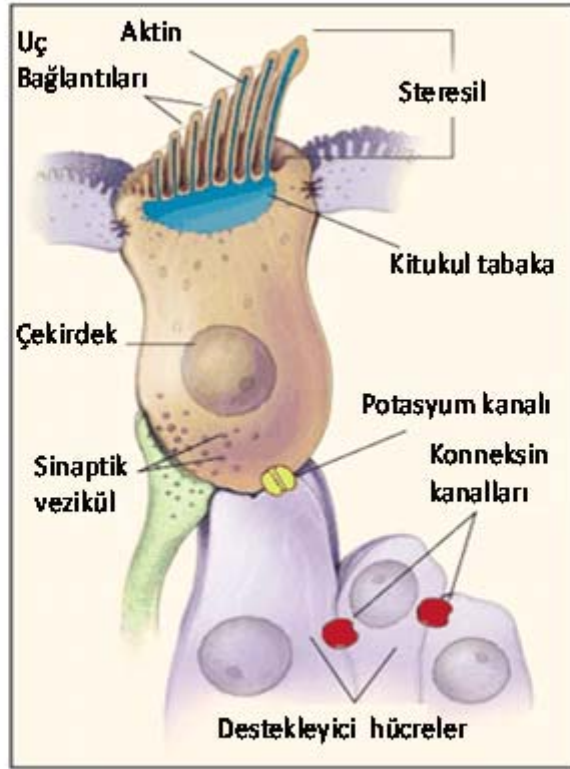


Şekil 2: Korti organının çalışma mekanizması. Bazilar zarın titreşimi, tectorial zar içine gömülü durumdaki stereosil uzantılarının bükülmesine neden olur. Bu mekanik etki, hücrelerin elektriksel potansiyellerini değiştirerek, ses titreşimlerini elektriksel sinir sinyallerine dönüştürür ¹⁸.



Şekil 3: Saç hücrelerindeki iyon kanalları ³⁴.

Normal işitmenin devamı için tüy hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşturan K^+ iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Potasyum iyonları potasyum kanallarına gitmek üzere saç hücrelerini terk ettiklerinde hücreler repolarize olurlar. Potasyum iyonları daha sonra ince çizgi halindeki damarların içinden konneksinlerden oluşan gap-junctionlara doğru difüzyona uğrarlar ve potasyum kanallarının içinden endolenfe geri salınarak mekanik elektriksel iletim sistemini yeniden başlatır ¹⁶ (Şekil 4).

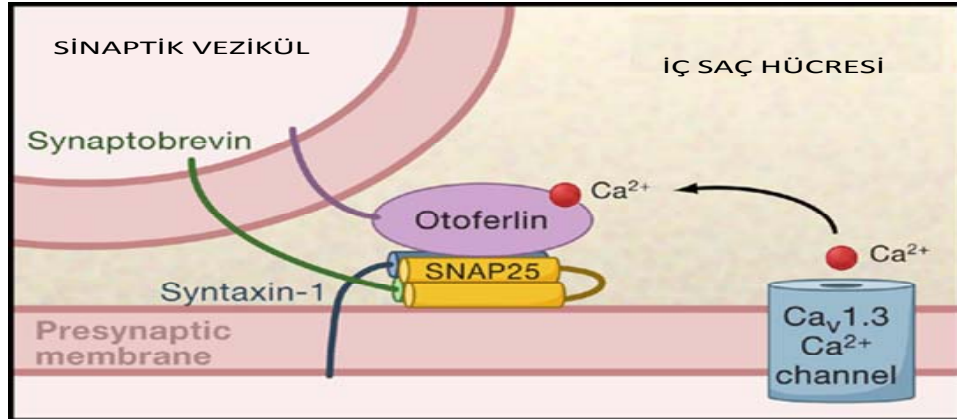


Şekil 4: Dış saç hücresi ve iyon kanalları. Potasyum iyonları önce potasyum kanalından sonrasında da konneksin kanallarından geçerek hücreyi terk eder ve potasyum iyonlarının çıkmasıyla hücre eski haline geri döner ¹⁶.

2.3. Otoferlinin İşitmedeki Önemi

Potasyum iyonlarının sterosil hücrelerinin içerisine girmesiyle birlikte bazolateral bölgedeki kalsiyum kanalları açılarak kalsiyum iyonları hücre içerisine girmektedir (Şekil 4). Hücre içerisine giren kalsiyum iyonları otoferlin molekülüne bağlanır. Otoferlin, saç hücrelerinde bulunan sinaptik veziküllerin taşınmasında görev alan bir proteindir ^{35,36}. Sinaptik veziküller ilk olarak plazma zarına protein-protein etkileşimleri yolu ile hedeflenirler. Bu etkileşimlerde SNARE proteinleri iş görmektedir ^{37,38}. Vezikülle ilişkili zar proteini (VAMP/synaptobrevin), presinaptik plazma zarında bulunan Sintaksin 1 ve SNAP25' proteinlerine bağlanır ³⁹. Böylece SNARE kompleksi oluşur ve sinaptik vezikül ile plazma zarı füzyon bölgesinde yakın temasa geçer ^{37,40}. Aynı SNARE proteinleri iç saç hücrelerinde de bulunur ve bu nedenle nörotransmitter salınımında iş görmektedir.

Otoferlin, Sintaksin1 ve Snap25 adı verilen SNARE kompleks proteinleriyle etkileşim halindedir (Şekil 5). Bu proteinler sinaps bölgesinde nörotransmitterlerin salınımı ve ekzositoz sırasında sinaptik vezikül membranı ile pre-sinaptik membran füzyonunda oldukça kritik öneme sahiptirler. Hücre içerisine giren kalsiyum iyonlarının otoferline bağlanması otoferlin proteinin SNARE kompleks proteinleriyle olan etkileşimini değiştirmektedir. Bu değişim sonucunda da presinaptik membran ile sinaptik vezikülün füzyonu gerçekleşmekte ve ekzositozla nörotransmitterler serbest hale geçmektedir. Serbest hale geçen nörotransmitterler akustik siniri aktive etmektedir. Bu şekilde mekanik enerji kohlear sinire aktarılan elektrik enerjisine dönüşmüş olur ^{35,36,39}.



Şekil 5: Otoferlinin SNARE proteinleri Syntaxin-1 ve SNAP25 proteinleriyle etkileşimi ³⁹.

2.4. İşitme Bozukluklarının Sınıflandırılması

İşitme bozukluğu kişilerin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın algılama bozukluklarından biridir ^{15,42-44}.

İşitme bozukluklarını nedenlerine göre; genetik nedenli ve çevresel nedenli işitme kayıpları, başlama yaşına göre; prelingual (2 yaşından önceki dönem) ve postlingual (2 yaşından sonraki dönem) işitme kayıpları, fenotipik özelliklerine göre; sendromik veya sendromik olmayan işitme kayıpları, işitme yolu üzerinde etkili oldukları bölgeye göre; iletim tipi, sensorinöral ve miks tip işitme kayıpları şiddetine göre; hafif, orta, orta derece şiddetli, şiddetli ve derin işitme kayıpları şeklinde sınıflandırılmaktadır ^{16,45,46}.

2.4.1. Genetik İşitme Kayıplarının Genel Özellikleri

Yeni doğan her 1000 çocuktan birinde ya da prelingual dönemde işitme kaybı görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde prelingual sağırılığın %50'sinden fazlasında genetik faktörler etkili olmaktadır ^{3,5,46}. Genetik kökenli işitme bozuklukları, tek bir gendeki mutasyonun (monogenik) veya farklı genlerdeki mutasyonların kombinasyonları ile birlikte çevresel faktörlerin ortak sonucu (multifaktoriyel) olarak da gerçekleşebilmektedir ^{16,45}. Gelişmiş ülkelerde prelingual işitme bozukluklarının %50'sinden fazlasını tek gen hasarları oluşturmaktadır ^{12,47}. İşitme kaybı ile birlikte seyreden birçok sendrom tanımlanmasına rağmen, işitme kaybı çoğu durumda tek bir semptom olarak görülmekte ve otozomal resesif bir karakter göstermektedir ⁵.

Genetik işitme kayıplarında dominant, resesif, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım görülmektedir. Genetik nedenli işitme kayıplarının %30'unu sendromik işitme kayıpları %70'ini ise, sendromik olmayan işitme kayıpları oluşturmaktadır ^{1,11,48}.

Otozomal resesif kalıtım gösteren genetik nedenli işitme kayıpları sıklıkla ciddi işitme kayıplarına neden olurlar ve konuşma yeteneğinin kazanılmasını engeller. Otozomal resesif kalıtım gösteren işitme kayıplarının tek gene bağlı hastalıklar olduğu tahmin edilmektedir ve bu genler yüksek derecede genetik heterojenite göstermektedir ⁵.

2.4.2 Sendromik Olmayan İşitme Kayıplarının Genel Özellikleri

Sendromik olmayan işitme kayıplarının %75'i otozomal resesif, % 20'si otozomal dominant, %5'i X'e bağlı ve %1'inden azı mitokondrial kalıtım göstermektedir ^{7,43,48}.

Sendromik olmayan işitme kaybında sadece işitme kaybı görülür. Sendromik işitme kaybında ise işitme kaybının yanında farklı doku ve organlarda diğer patolojik etkiler de görülür. Bir gendeki mutasyonların biri sendromik, diğeri sendromik olmayan işitme bozukluğuna neden olabilmektedir ^{49,50}.

Sendromik veya otozomal dominant işitme kayıpları; iletim tipi, sensörinöral ya da birleşik tip olabilir. Bunun aksine otozomal resesif sendromik olmayan pre-lingual işitme kayıpları her zaman sensorinöral nedenlidir ⁵¹.

Bugüne kadar otozomal resesif işitme kaybıyla ilişkili olan yaklaşık 53 lokus ve 29 gen tanımlanmıştır ^{12, 13, 57 66}. Sendromik olmayan işitme kaybının moleküler tanısı, gözlenen aşırı heterojenite nedeni ile karmaşık bir durum sergilemektedir. Konneksin-26 (GJB2) ve konneksin-30 (GJB6) olarak isimlendirilen iki gendeki mutasyonlar, otozomal resesif kalıtılan sendromik olmayan işitme kayıplarının yaklaşık %50'sinde gözlenmektedir ^{1,11,52, 53}. Ancak diğer genlerdeki mutasyonların katkısı hala araştırılma aşamasındadır. Bundan başka, sendromik olmayan işitme

kaybının genetik epidemiyolojisinin toplumlar arasında oldukça değişken olması nedeniyle bu araştırmalar oldukça karmaşık ve zordur ^{7,12,19}.

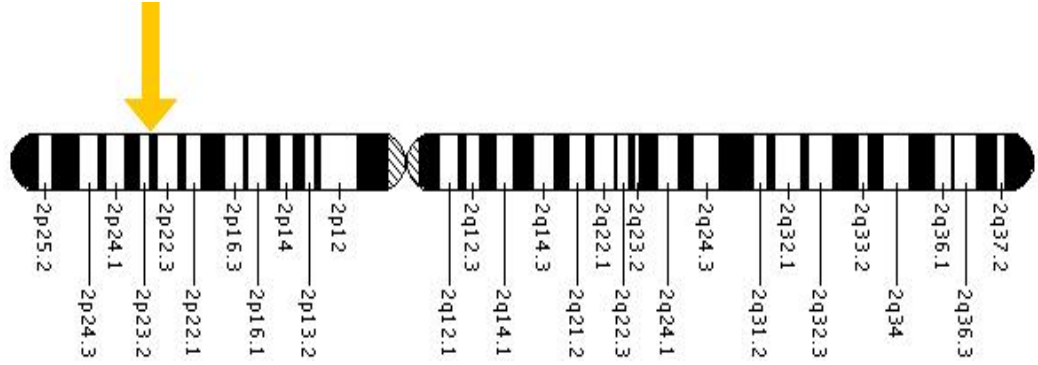
Yüksek derecede gözlenen heterojenite nedeniyle, klinik incelemelerle sendromik olmayan işitme bozukluklarını, çevresel faktörlere bağlı olarak gelişen işitme bozukluklarından ayırmak oldukça zor olmaktadır. Ancak ailedeki ikinci bir işitme engelli bireyin varlığı, işitme bozukluğunun kalıtsal olduğu yönde bir bilgi vermektedir ^{5,54}.

2.4.3. Sendromik Olmayan İşitme Bozukluklarının İsimlendirilmesi

Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak isimlendirilmekte ve keşfedilişlerinin kronolojik sırasına göre her lokusa numara verilmektedir. Bu isimlendirmeye göre otozomal dominant lokuslar DFNA, otozomal resesif lokuslar DFNB ve X'e bağlı lokuslar DFN olarak gösterilmektedir ^{11,16,55}.

2.5. OTOF Geninin Kromozom Üzerindeki Yeri

OTOF geni 2. kromozomun kısa kolunun 23.1 pozisyonunda yer almaktadır ^{5, 56} (Şekil 6).



Şekil 6: OTOF geninin 2. kromozom üzerindeki yeri ⁵⁶.

2.6. OTOF Geninin Özellikleri

Otoferlin proteinini kodlayan OTOF geni, otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğu bilinen 29 genden biridir^{5,57}. OTOF geni 90 kb uzunluğundadır. 48 ekzonu bulunan genin ilk ve son ekzonu sırasıyla 5' ve 3' translasyonu yapılmayan bölgeleri kodlamaktadır. OTOF geni, çeşitli translasyon başlangıç bölgelerinin alternatif intron çıkartılması ile birlikte kullanılmasıyla proteinin uzun ve kısa izoformlarını kodlamaktadır ^{14,58}. OTOF geni kohlea, vestibul ve beyinde yüksek seviyede ifadelirken kalp, plesanta, akciğer, pankreas, iskelet kası ve böbrek de daha düşük düzeyde ifadelendiği belirlenmiştir^{5,14}. Fare dokularında sadece uzun izoformu ifadelirken, insanda beyin haricindeki diğer dokularda sadece kısa formu ifadelenmektedir. İnsan beyinde ise hem uzun hem de kısa izoformların ifadelendiği saptanmıştır ¹⁴.

Genin beyinde ifadelenen uzun formu 7156 bp uzunluğunda bir mRNA oluşturmaktadır. mRNA'da 128. nükleotitde translasyon

başlangıç kodonu yer almaktadır. Başlangıç kodonundan sonra 5991 bazlık bir açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. mRNA'nın 3' kısmında da translasyonu yapılmayan 1038 bazlık bir kısım yer almaktadır. Tüm intronlarda GT/AG kuralı gözlenmektedir ¹⁴.

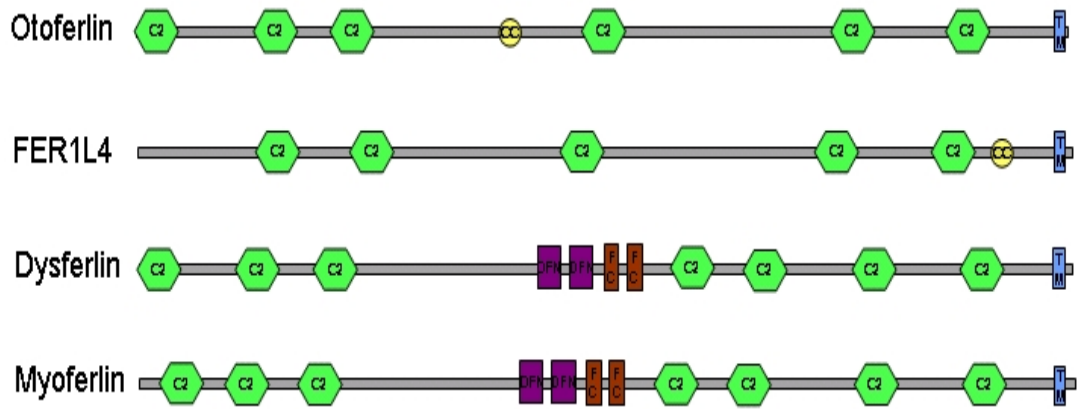
OTOF geninin C-terminal bölümü ile hücre membranına bağlanan sitozolik bir protein kodladığı ve membran yapısında veziküllerin, plazma membranına taşınmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir ⁵.

2.7. Otoferlin Proteininin Genel Özellikleri

Otoferlin *Caenorhabditis elegans* Fer-1 geni ile ilişkilendirilen ferlin adı verilen memeli gen ailesi proteinidir. Otoferlin proteini diğer ferlin ailesi geni proteinleri olan disferlin, myoferlin ve FER1L4 proteinleriyle homoloji göstermektedir ^{14,59}. Bu proteinler, membrana tutunmuş sitozolik proteinlerdir ^{14,60}. Bu sitozolik proteinler C2 bölgesi olarak adlandırılan kalsiyum bağlayan yapısal bölgelerin tekrarlarını içermektedir. Tüm ferlinlerde korunmuş C2 tekrar bölgeleri ve bir C-terminal transmembran bölgesi bulunmaktadır ⁶¹(Şekil 7).

C2 bölgeleri 2 tane 4 zincirli β tabakadan oluşmuştur ve yüksek derecede benzerlik gösterirler ^{14,62}. C2 bölgelerinin yapısında negatif yüklü aspartil birimleri yer almaktadır. Kalsiyum iyonlarının bu negatif yüklü aspartil birimlerine bağlandığı düşünülmektedir. Kusursuz bir C2 bölgesinde 5 aspartil birimi bulunmaktadır. Otoferlin C2A bölgesi β 1 zinciri eksik olan bir bölgedir ve bu nedenle tam olarak işlev

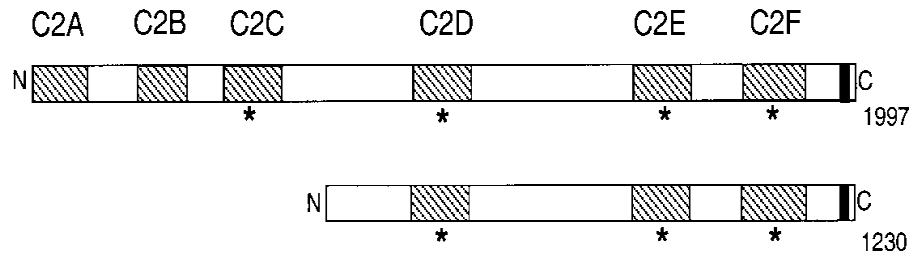
görememektedir. C2A ve C2B bölgelerinde kalsiyum iyonlarının bağlanması için gerekli olduğu düşünülen 5 aspartil biriminden bir kaçı eksiktir. C2C-C2F bölgeleri ise 5 aspartil biriminin eksiksiz olduğu bölgelerdir. Bu yüzden kalsiyum iyonlarının otoferlinin sadece son 4 C2 bölgesine(C2C-F) bağlandığı düşünülmektedir ¹⁴.



Şekil 7: İnsan ferlin geni ailesi proteinleri. C2 (yeşil) kalsiyum bağlanma bölgesi. CC (sarı); Sarılmış sarmal bölgesi. TM (Mavi); transmembran bölgesi. DysFN (mor); dysferlin N ucu DysFC (kahverengi) dysferlin bölgesi C ucu ⁶³.

C2 bölgelerine sahip olan proteinler fosfolipit ve proteinlerle etkileşir ⁶². Bu etkileşimler kalsiyum iyonlarına bağlıdır. Kalsiyum iyonlarının C2 bölgelerinde yer alan negatif yüklü aspartil birimlerine bağlanması, proteinin yüzey elektrostatik potansiyelini değişmesine neden olmakta ve bunun sonucunda da proteinin negatif yüklü fosfolipitler ve proteinlerle etkileşmesini sağlamaktadır ^{5,64}.

Otoferlin proteininin uzun izoformu 6 C2 bölgesini ve bir transmembran bölgeyi içerirken kısa izoformu ise sadece son 3 C2 bölgesini ve bir transmembran bölgeyi içermektedir ^{14,57} (Şekil 8).



Şekil 8: Otoferlin proteininin uzun ve kısa izoformu. * işareti kalsiyum iyonlarının bağlandığı C2 bölgelerini göstermektedir ¹⁴.

Otoferlin proteininin uzun izoformunda 48 ekzonun tümü mRNA oluşumu için kullanılırken, kısa izoformunun mRNA'sının oluşturulması için uzun formda bulunan ilk 19 ekzon kullanılmaz ^{14,57}.

Bu bilgiler ışığı altında sendromik olmayan Türk işitme kayıplı olgularda OTOF geni 6 mutasyon itibariyle incelenecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Gereçler

- Masaüstü mini santrifüj (Hettich Mikro 22, Almanya)
- Spin santrifüj (Biosan, Rusya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, ABD)
- Vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler (CLP, ABD)
- Otomatik ısı döngü cihazı (Thermal cycler) (Eppendorf, Almanya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (Sanyo, Japonya)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo, ABD)
- Elektroforez tankı (Thermo, ABD)
- UV transluminator (Fotodyne, ABD)
- Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- GF-1 Kandan DNA saflaştırma kiti (Vivantis Technologies, Malezya)
- Primer sentezleri (Integrated DNA Technologies, Belçika)
- PZT tamponu (Vivantis Technologies, Malezya)
- Agaroz (ONBIO Inc., Kanada)
- Borik asit (Merck, Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)

- dNTP karışımı (Fermantas, ABD)
- Taq DNA polimeraz (Vivantis Technologies, Malezya)
- $MgCl_2$ (Vivantis Technologies, Malezya)
- Trizma baz (Sigma, ABD)
- Gliserol (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci (Fermantas, ABD)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, ABD)
- *MspI* restriksiyon enzimi (Fermantas, ABD)
- *AspS9I*, *BstDSI*, *Bse8I*, *FspBI*, *AfiI* restriksiyon enzimleri ve tamponları (Vivantis Technologies, Malezya)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

Trizma Baz	54 g
Borik Asit	27.5 g
0,5 M EDTA (pH: 8)	20 ml

Kimyasallar çözündükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

200 ml 5X TBE, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı

Gliserol	55 ml
Orange G	100 mg
1X TBE çözeltisi	45 ml

Son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz, hassas terazide tartıldı. 1X TBE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden sonra 3 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE çözeltisinden eklendi. PZT ürününden 10 µl alınarak, 3 µl orange G jel yükleme boyası ile karıştırıldı. Örnekler ve moleküler ağırlık belirteci yükleme sonrasında 20 dakika 150 volt sabit akımda yürütüldü. Ultraviyole (UV) transluminator altında moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak DNA bantları değerlendirildi. Jel görüntüleri Kodak Gel Logic 100 görüntü analiz sistemi kullanılarak görüntülenip kayıt altına alındı.

3.3.1. Primerler

Otoferlin geninde araştırılan mutasyonları içeren bölgelerin çoğaltılması amacıyla kullanılan primer dizileri Tablo 1’de gösterilmektedir.

Tablo 1: Hedef bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.

Hedef Bölge	Primer çifti	Kaynak
Leu1011Pro	F: 5'- AGGGACGACAAGGAGGACA -3' R: 5'- CAGGTGGAGTGCAGGGAAC -3'	Dizayn edildi.
Arg1939Gln Pro1987Arg	F: 5'- TTGGGGGTCCAGAAGGACAGA - 3' R: 5'- TCGGCCCAAGGCATGAAGA - 3'	Varga 2003 ¹⁰ .
c.1651delG	F: 5'- TCAGCACCCAGGAGCTGG - 3' R: 5'- CCTGGGACCCAGGTGACT - 3'	Yasunaga 2000 ¹⁴
Gln829Ter	5'-GCCTGGTTGTGAGAAGGTG-3' 5'-GGGTCTAGCCTCCTGATTG-3'	Yasunaga 1999 ⁵
c.4799+1G>C	F: 5' - ACTTCTCCAACCCAGAACAC - 3' R: 5' - AATCACCAGGATCTGAATCTC - 3'	Yasunaga 1999 ⁵

3.4. Yöntemler

3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Ocak 2006 – Mart 2008 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalında sendromik olmayan işitme kaybı tanısı konmuş 95 birey çalışmaya dahil edildi. Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-96 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.4.2. Kandan Genomik DNA Saflaştırılması

Kan örneklerinden genomik DNA saflaştırma işlemi GF-1 kandan DNA saflaştırma kiti kullanılarak aşağıda yazılı protokole göre yapıldı.

- 1- 1,5 ml'lik ependorf tüpüne; 200 l BB zltisi ve 200 l kan rneği eklendikten sonra 20 l Proteinaz K zltisi (20 mg/ml) eklenip karışım 65 C' de 10 dk bekletildi.
- 2- Karışım zerine 200 l %96' lık etanol eklenerek hemen karıştırıldı.
- 3- Karışım filtre içeren toplama tüpüne aktarılıp 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi filtre altında toplanan kısım atıldı.
- 4- Filtre zerine 500 l yıkama zltisi 1 eklendi ve 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi filtre altında toplanan kısım atıldı.
- 5- Filtre zerine 500 l yıkama zltisi 2 eklendi ve 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi filtre altında toplanan kısım atıldı.
- 6- Filtre zerine 500 l yıkama zltisi 2 eklendi ve 13000 rpm' de 3 dk santrifüj edildi ve filtre altında toplanan kısım atıldı.
- 7- Filtre yeni bir ependorf tüpüne yerleştirildi ve 65 C'de ısıtılmış olan seyreltme zltisi eklenip 2 dakikada bekletildi.
- 8- 8000 rpm'de 1 dk. Santrifuj edildi.

3.4.3. PZT ve Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

3.4.3.1 Araştırılan Gen Bölgelerinin PZT İle Çoğaltılması

Otoferlin geninde araştırılan 6 mutasyonu içeren gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan PZT karışımı Tablo 2’de verilmiştir. Her bir bölge için Tablo 2’ de verilen miktarların kullanılmasıyla elde edilen tepkime karışımı 0.2 ml’lik tüplere dağıtıldıktan sonra üzerine hastalara ait saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Bu şekilde elde edilen tepkime karışımı 3000-4000 rpm’ de 10-12 saniye santrifüj edildi ve ardından otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tüm PZT’ lerde negatif kontrol olarak DNA içermeyen steril su kullanıldı.

Tablo 2: OTOF Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Tepkime Karışımı

Mutasyon	DNA	10X PCR tamponu	Primerler 100 pmol/μl	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Taq DNA polimeraz 5 U/μl	DMSO	dH ₂ O	Toplam Hacim
Leu1011Pro	3 μl	5 μl	0,3 μl	1.5 μl	0,5 μl	0,2 μl	---	39,5 μl	50 μl
Arg1939Gln Pro1987Arg	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	0,2 μl	0,2 μl	---	38,1 μl	50 μl
c.1651delG	3 μl	5 μl	0,5 μl	5 μl	0,2 μl	0,2 μl	3 μl	33.1 μl	50 μl
Gln829Ter	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	0,2 μl	0,2 μl	3μl	35.1 μl	50 μl
c.4799+1G>C	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	0,2 μl	0,2 μl	3 μl	35.1	50 μl

OTOF geninde araştırılan 6 mutasyonunu içeren bölgelerin PZT işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı Tablo 3’de belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı.

Tablo 3: Otof Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Tepkime Sıcaklıkları

MUTASYON	Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon aşaması	Hibridizasyon aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
Leu1011Pro	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 15 sn	68 °C’de 15 sn	72 °C’de 30 sn	72 °C’de 5 dk
Arg1939Gln Pro1987Arg	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 15 sn	66 °C’de 15 sn	72 °C’de 30 sn	72 °C’de 5 dk
c.1651delG	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 15 sn	66 °C’de 15 sn	72 °C’de 30 sn	72 °C’de 5 dk
Gln829Ter	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 15 sn	63 °C’de 15 sn	72 °C’de 30 sn	72 °C’de 5 dk
c.4799+1G>C	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 15 sn	60 °C’de 15 sn	72 °C’de 30 sn	72 °C’de 5 dk

3.4.3.2 OTOF Geninde Araştırılan 6 Mutasyon Bölgesinin PZT Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi

PZT sonucunda çoğalan DNA parçalarının incelenmesi amacıyla %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl PZT ürünü 3 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 150 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Mor ötesi (Ultraviyole, UV) ışık kaynağı altında, moleküler ağırlık belirteci ile diğer bantlar karşılaştırıldı. Tablo 4'te belirtilen her bir mutasyon bölgesi için belirlenen DNA baz uzunluğuna denk gelen bantlar aranarak sonuçlar değerlendirildi. Her bir mutasyon bölgesine özgün olan DNA bantlarını gözlemlemek için restriksiyon enzim kesimi aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

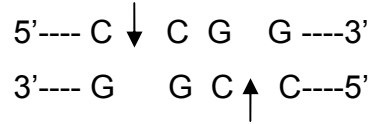
Tablo 4: OTOF Geninde Araştırılan 6 Mutasyonu İçeren Bölgelerin PZT Ürünlerinin Büyüklükleri

Mutasyon	PZT Ürününün Büyüklüğü (bp)
Leu1011Pro (c.3032T>C)	407
Arg1939Gln (c.5816G>A)	393
Pro1987Arg (c.5960C>G)	393
c.1651delG	405
Gln829Ter (c.2485C>T)	298
c.4799+1G>C	323

3.4.4. Leu1011Pro PZT Ürünlerinin *MspI* Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Leu1011Pro değişimine OTOF geninin cDNA'sında 3032. nükleotitte gerçekleşen T>C mutasyonu (c.3032T>C) neden olmaktadır. Normalde bu pozisyonadaki T varlığında proteinde 1011. amino asit lösin

iken mutasyon olduğunda (C aleli) l3sin amino asiti proline d3nüşmektedir. Bu mutasyonunu tanımlamak için 3zgöl primerler kullanılarak PZT ile çoğaltılan 407 bç'lik gen b3lgesi *MspI* enzimi ile kesildi. *MspI* enziminin tanıma b3lgesi şu şekildedir.



Enzim, mutasyon olduğunda (C aleli, Pro1011) PZT 3r3n3nde kesim yaparak 241 ve 166 bç'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır. Mutasyon taşımayan yabanıl tip genotipe sahip bireylerde (T aleli, Leu1011) ise enzim tanıma b3lgesi olmadığından dolayı PZT 3r3n3 kesilmemekte ve agaroz jelde 407 bç'lik tek bir bant g3r3lmektedir.

3.4.4.1 Deneyin Yapılışı

0.2 ml'lik ependorf t3p3n3n içine 10 l PCR 3r3n3, 1.2 l tampon, 10 3nite *MspI* restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lık kuru ısıtıcı blokta bir gece ink3be edildi. Ink3basyon sonrası t3plerden alınan 10 l kesim 3r3n3, 3 l Orange G ile karıştırılarak %2 'lik agaroz jele y3klendi. %2'lik agaroz jelde 100 bç'lik molek3ler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda y3r3t3l3p Gel Logic 100 jel g3r3nt3leme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

3.4.5. Arg1939Gln PZT 3r3nlerinin *AspS9I* Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Arg1939Gln değişimine OTOF geninin cDNA'sında 5816. n3kleotitte gerçekleşen G>A mutasyonu (c.5816G>A) neden olmaktadır. Normalde bu pozisyonadaki guanin varlığında (G aleli) proteinde 1939.

amino asit arjinin iken mutasyon olduğunda (A aleli) arjinin amino asiti glutamine dönüşmektedir. Arg1939Gln mutasyonunu tanımlamak için özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 393 bç'lik gen bölgesi *AspS9I* enzimi ile kesildi. *AspS9I* enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir.



Mutasyon olduğunda (A aleli, Gln1939) PZT ürününde *AspS9I* enziminin tanıma bölgesi olmadığından dolayı PZT ürünü kesilmemekte ve agaroz jelde 393 bç'lik tek bir bant görülmektedir. Mutasyon taşımayan yabancı tip genotipe (G aleli, Arg1939) sahip bireylerde ise enzim PZT ürününde kesim yaparak 303 ve 90 bç'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır.

3.4.5.1 Deneyin Yapılışı

0,2 ml'lik ependorf tüpünün içine 10 µl PCR ürünü, 1,2 µl tampon, 10 ünite *AspS9I* restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lık kuru ısıtıcı blokta bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası tüplerden alınan 10 µl kesim ürünü, 3 µl Orange G ile karıştırılarak %2 'lik agaroz jele yüklendi. %2'lik agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda yürütülüp Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

3.4.6. Pro1987Arg PZT Ürünlerinin *BstDSI* Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Pro1987Arg değişiminde OTOF geninin cDNA'sında 5960. nükleotitte gerçekleşen C>G mutasyonu (c.5960C>G) neden olmaktadır.

Normalde sitozin varlığında (C aleli) proteinde 5960 amino asit prolin iken mutasyon olduğunda (G aleli) arjinin amino asiti şifrelenmektedir. Pro1987Arg mutasyonunu tanımlamak için özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 393 bp'lik gen bölgesi *Bst*DSI enzimi ile kesildi. *Bst*DSI enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir.



Enzim, mutasyon olduğunda (G aleli, Arg1987) PZT ürününde kesim yaparak 232 ve 161 bp'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır. Mutasyon taşımayan yabanıl tip genotipe (C aleli, Pro1987) sahip bireylerde ise enzim tanıma bölgesi olmadığından PZT ürünü kesilmemekte ve agaroz jelde 393 bp'lik tek bir bant görülmektedir.

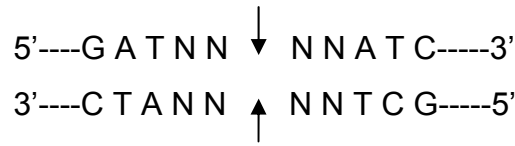
3.4.6.1 Deneyin Yapılışı

0,2 ml'lik ependorf tüpünün içine 10 µl PCR ürünü, 1,2 µl tampon, 10 ünite *Bst*DSI restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 65°C'lık kuru ısıtıcı blok'ta bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 10 µl kesim ürünü, 3 µl Orange G ile karıştırılarak %2 'lik agaroz jele yüklendi. %2'lik agaroz jelde 100 bp'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda yürütülüp Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

3.4.7. c.1651delG PZT Ürünlerinin Bse8I Restriksiyon Enzimi

İle Kesimi

c.1651delG mutasyonunu tanımlamak için özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 405 bç'lik gen bölgesi Bse8I enzimi ile kesildi. Bse8I enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir.



Enzim c.1651delG mutasyonu olduğunda PZT ürünüde enzim tanıma bölgesi olmadığından PZT ürünü kesilmemekte ve agaroz jelde 405 bç'lik tek bir bant görülmektedir. Mutasyon taşımayan yabancı tip genotipe sahip bireylerde ise enzim PZT ürünüde kesim yaparak 177 ve 228 bç'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır.

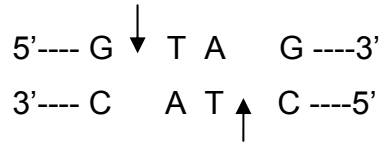
3.4.7.1 Deneyin Yapılışı

0,2 ml'lik ependorf tüpünün içine 10 µl PCR ürünü, 1.2 µl tampon, 10 ünite Bse8I restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 60°C'lık kuru ısıtıcı blokta bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası tüplerden alınan 10 µl kesim ürünü, 3 µl Orange G ile karıştırılarak %3 'lük agaroz jele yüklendi. %3 'lük agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda yürütülüp Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

3.4.8. Gln829Ter PZT Ürünlerinin *Fsp*BI Restriksiyon Enzimi

İle Kesimi

Mutasyon sonucunda 'Dur' kodonu oluşarak 829. amino asitte erken sonlanma gerçekleşmektedir. Gln829Ter mutasyonunu tanımlamak için özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 298 bç'lik gen bölgesi *Fsp*BI enzimi ile kesildi. *Fsp*BI enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir.



Enzim Gln829Ter mutasyonu olduğunda PZT ürününde kesim yaparak 168, 123 ve 7 bç'lik üç DNA parçası oluşturmaktadır. Mutasyon taşımayan yabanıl tip genotipe sahip bireylerde ise enzim 291 ve 7 bç'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır.

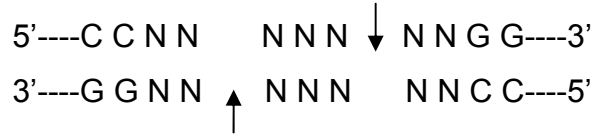
3.4.8.1 Deneyin Yapılışı

0,2 ml'lik ependorf tüpünün içine 10 µl PCR ürünü, 1.2 µl tampon, 10 ünite *Fsp*BI restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lık kuru ısıtıcı blok'ta bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 10 µl kesim ürünü, 3 µl Orange G ile karıştırılarak %3 'lük agaroz jele yüklendi. %3 'lük agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda yürütülüp Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

3.4.9. c.4799+1G>C PZT Ürünlerinin *Afi*I Restriksiyon Enzimi

İle Kesimi

Mutasyon etkisi ile intronun çıkartılması için gerekli sinyal olan guanin nükleotidi sitozine dönüşmektedir. Bu durum intronun çıkartılamamasına neden olarak normal protein yapımını etkilemektedir. c.4799+1G>C mutasyonunu tanımlamak için özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 323 bç'lik gen bölgesi *Afi*I enzimi ile kesildi. *Afi*I enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir.



Enzim c.4799+1G>C mutasyonu olduğunda PZT ürününde kesim yaparak 247 ve 76 bç'lik iki DNA parçası oluşturmaktadır. Mutasyon taşımayan yabanıl tip genotipe sahip bireylerde ise enzim 162 ve 161 bç uzunluğunda iki DNA parçası oluşturmaktadır.

3.4.9.1 Deneyin Yapılışı

0,2 ml'lik ependorf tüpünün içine 10 µl PCR ürünü, 1,2 µl tampon, 10 ünite *Afi*I restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 50°C'lık kuru ısıtıcı blok'ta bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 10 µl kesim ürünü, 3 µl Orange G ile karıştırılarak %2 'lik agaroz jele yüklendi. %2'lik agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 150 V sabit akımda yürütülüp Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi ile incelenip fotoğrafı çekildi.

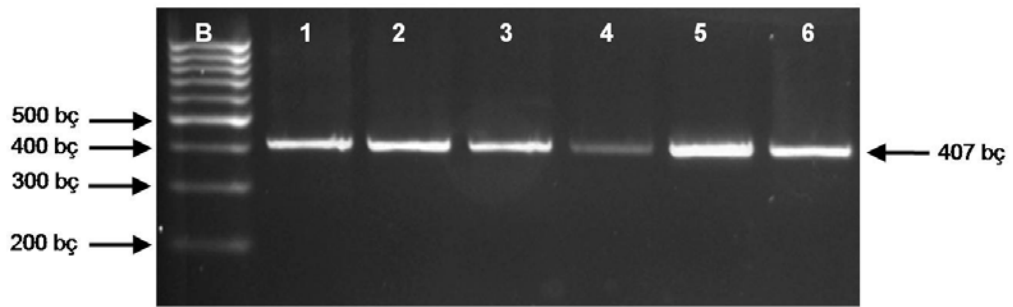
4.BULGULAR

4.1. Moleküler Genetik Analizleri

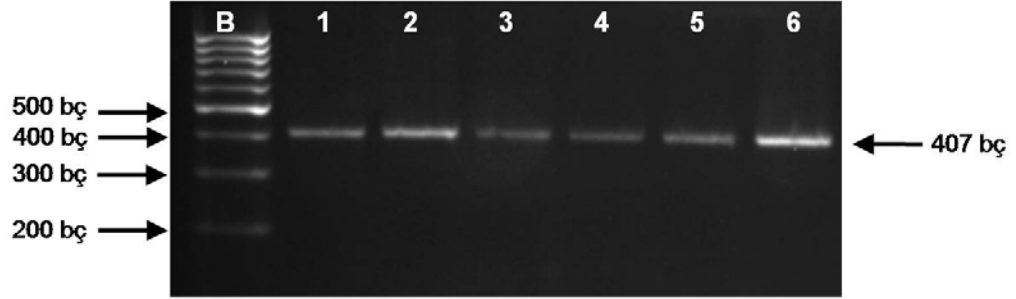
Bu çalışmada bulgularımızı ortaya koyan moleküler genetik laboratuvar uygulamaları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Leu1011Pro Mutasyonuna ait bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 407 bç uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil 9). PZT ürünü *MspI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Sadece mutasyonu taşıyan bireyler enzim için tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabancı tip genotipi gösteren 407 bç büyüklüğünde tek bant izlendi (Şekil10).



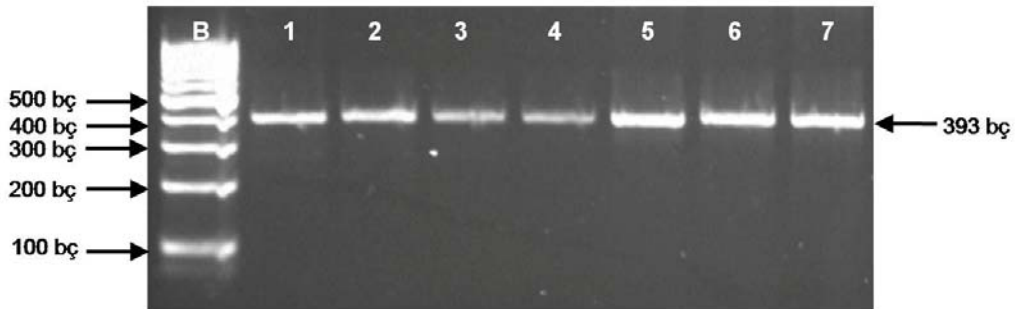
Şekil 9: Leu1011Pro mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. Kuyularda 407 bç'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir.



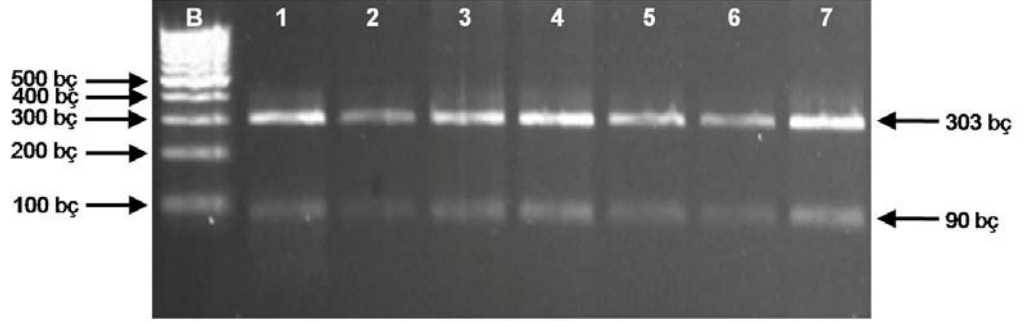
Şekil 10 : Leu1011Pro mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. 1-6: Yabanıl genotipe (Leu/Leu) sahip bireyler.

4.1.2. Arg1939Gln Mutasyonuna ait bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 393 bp uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil11). PZT ürünü *AspS9I* restriksiyon enzimi ile kesildi. Sadece yabanıl bireyler enzim için tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabanıl tip genotipi gösteren 303 bp ve 90 bp büyüklüğünde iki bant izlendi (Şekil12).



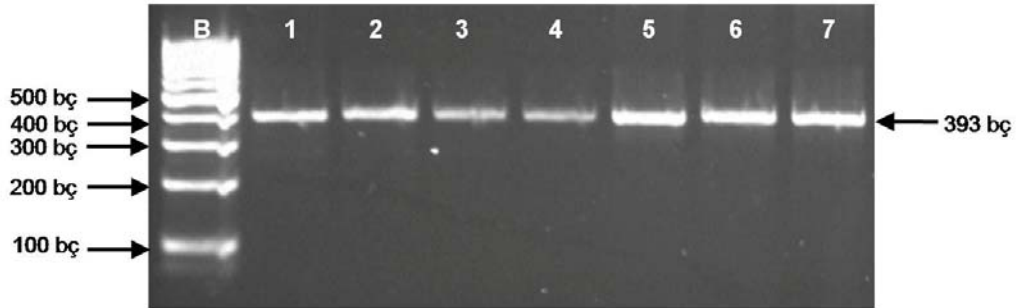
Şekil 11: Arg1939Gln mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. Kuyularda 393 bp'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir.



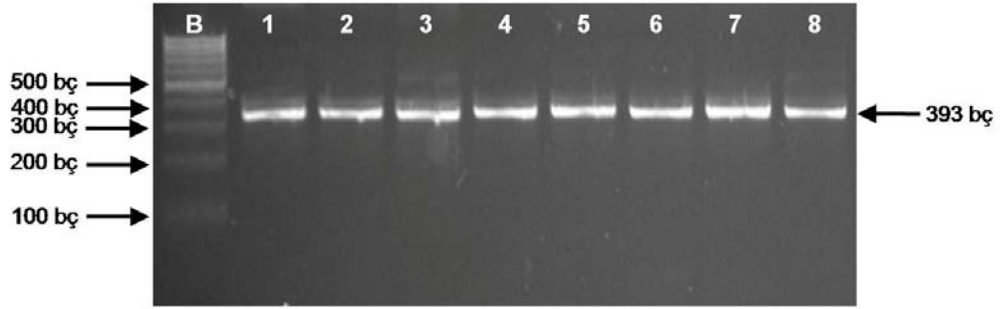
Şekil 12: Arg1939Gln mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. 1-7: Yabanıl genotipe (Arg/Arg) sahip bireyler.

4.1.3. Pro1987Arg Mutasyonuna Ait Bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 393 bp uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil 13). PZT ürünü *Bst*DSI restriksiyon enzimi ile kesildi. Sadece mutasyon taşıyan bireyler enzim için tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabanıl tip genotipi gösteren 393 bp büyüklüğünde tek bant izlendi (Şekil14).



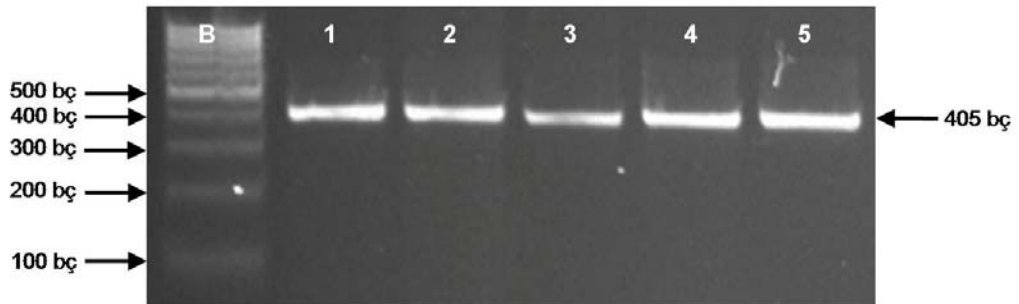
Şekil 13: Pro1987Arg mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. Kuyularda 393 bp'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir



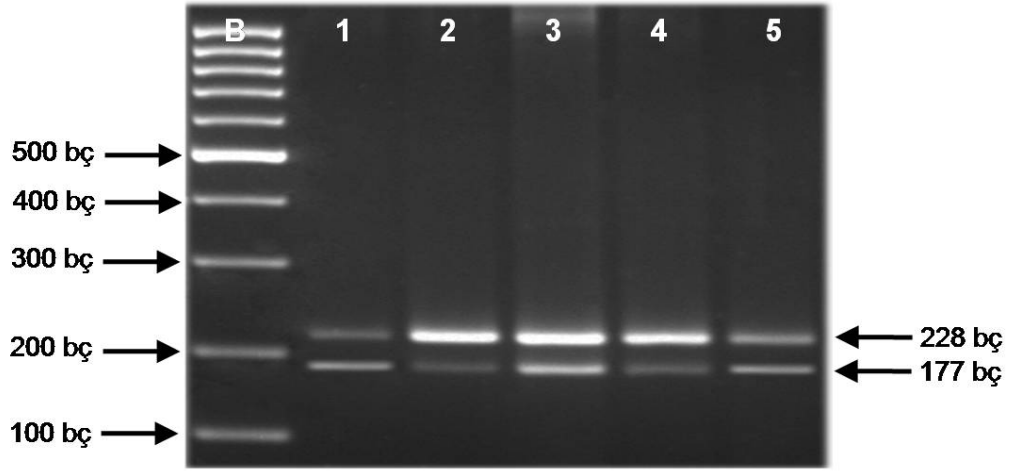
Şekil 14: Pro1987Arg mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. 1-8: Yabanıl genotipe (Pro/Pro) sahip bireyler

4.1.4. c.1651delG Mutasyonuna Ait Bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 405 bp uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil 15). PZT ürünü *Bse8I* restriksiyon enzimi ile kesildi. Sadece yabanıl bireyler enzim için tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabanıl tip genotipi gösteren 228 bp ve 177 bp büyüklüğünde iki bant izlendi. (Şekil 16).



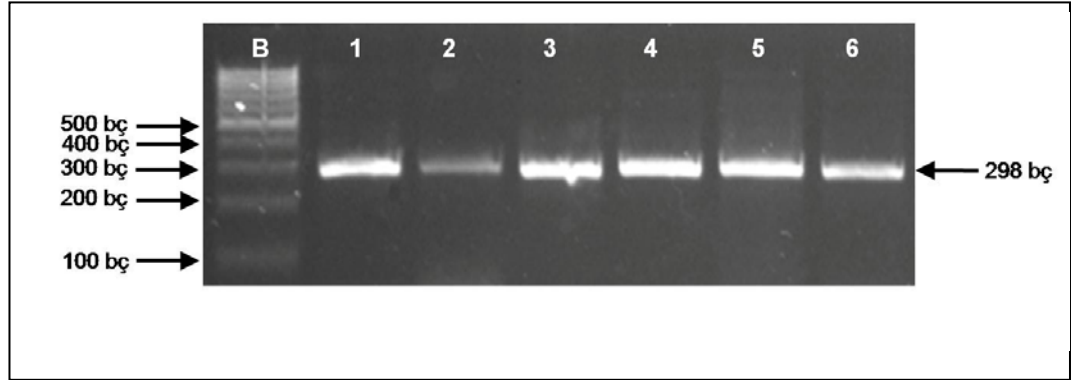
Şekil 15: c.1651delG mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. Kuyularda 405 bp'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir.



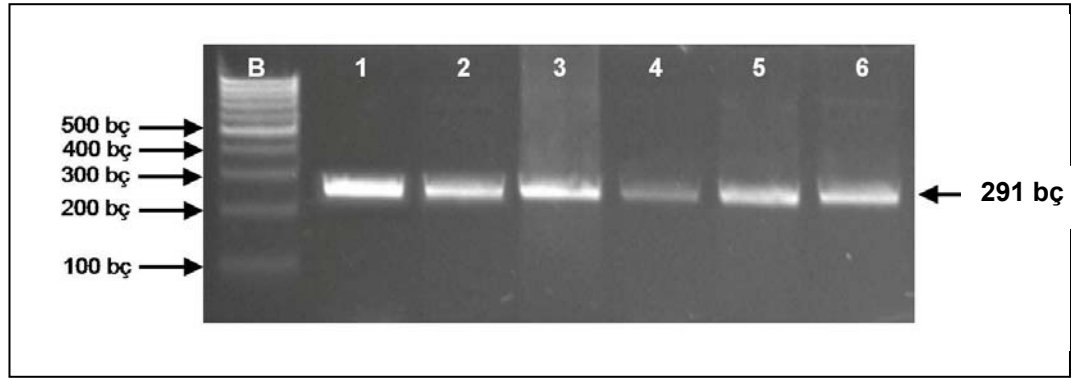
Şekil 16: c.1651delG mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci. 1-5: Yabanıl genotipe sahip bireyler

4.1.5. Gln829Ter Mutasyonuna Ait Bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 298 bp uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil 17). PZT ürünü *FspBI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabanıl tip genotipi gösteren 291 bp büyüklüğünde tek bir bant gözlemlendi. 7 bp'lik bant jelde görünmediği için değerlendirme tek bir 291 bp'lik bandın varlığına göre yapıldı. (Şekil 18).



Şekil 17: Gln829Ter mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. Kuyularda 298 bç'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir.

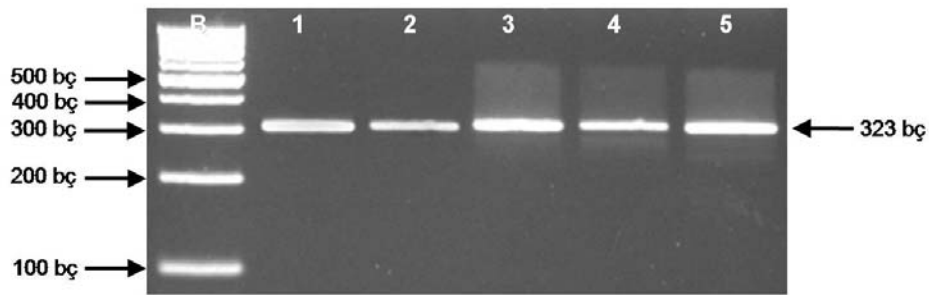


Şekil 18: Gln829Ter mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. 1-6: Yabanıl genotipe (Gln/Gln) sahip bireyler.

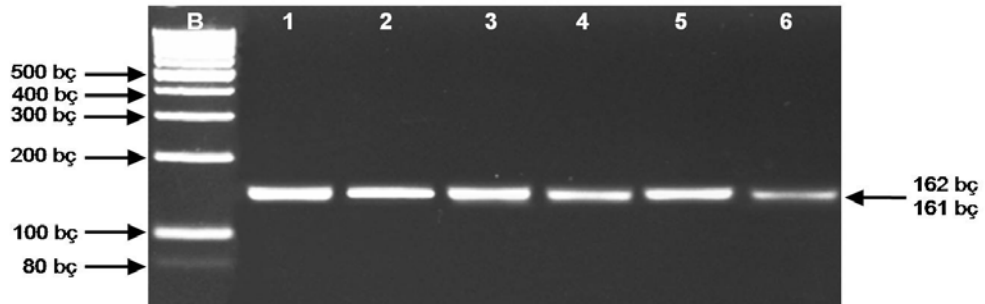
4.1.6. c.4799+1G>C Mutasyonuna Ait Bulgular

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZT sonrasında 323 bç uzunluğunda PZT ürünü elde edildi. (Şekil 19). PZT ürünü *AfiI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Mutasyon taşıyan bireyler enzim için iki tanıma bölgesine yabanıl bireyler ise enzim için tek tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek

elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünlerini jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde tüm hastalarda yabancı tip genotipi gösteren 162 ve 161 bç'lik DNA parçalarından oluşan tek bir bant gözlemlendi. DNA büyüklüklerinin birbirine yakın olması sebebiyle enzim kesimi sonrasında oluşan bu iki bant tek bir DNA bandı olarak görüldü. (Şekil 20).



Şekil 19: c.4799+1G>C mutasyonunu içeren bölgeye ait PZT ürününün % 2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. Kuyularda 323 bç'lik PZT ürününün oluşturduğu bantlar görülmektedir.



Şekil 20: c.4799+1G>C mutasyonu içeren bölgeye ait restriksiyon enzim kesim sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 baz çiftlik molekül ağırlık belirteci. 1-6: Yabancı genotipe sahip bireyler

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, çeşitli toplumlarda sendromik olmayan işitme kayıplı hastalarda OTOF geninde bulunduğu belirlenen mutasyonlardan 6 tanesi, sendromik olmayan işitme kayıplı 95 Türk hastada araştırılmıştır. Bu mutasyonlardan üç tanesi yanlış anlamlı mutasyon (Leu1011Pro, Arg1939Gln ve Pro1987Arg), bir tanesi anlamsız mutasyon (Gln829Ter), bir tanesi nükleotid delesyonu (c.1651delG) ve son olarak bir tanesi de intronun çıkartılmasını engelleyen (c.4799+1G>C) mutasyondur.

Bu mutasyonlardan ilki OTOF geninin Leu1011Pro yanlış anlamlı mutasyonudur. Bu mutasyon genin 26. ekzonunda yer alan Timinin Sitozine değişmesi (c.3032T>C) sonucunda oluşmaktadır. DNA seviyesinde gerçekleşen bu mutasyon OTOF proteininde 1011. amino asit olan Lösinin Proline değişmesine neden olmaktadır. Proteinin 1011. pozisyonundaki yer alan Lösin amino asitinin otoferlinin çoklu izoformlarından hem kısa izoformunda hem de uzun izoformunda bulunduğu gösterilmiştir. Leu1011Pro mutasyonu 6 C2 bölgesine sahip otoferlinin 4. bölgesinde (C2D) meydana gelir. C2 bölgeleri 2 tane 4 zincirli β tabakadan oluşur ve yüksek derecede benzer yapıdadır¹⁴. Korunmuş bir bölgede gerçekleşen bu mutasyon sonucunda OTOF molekülünün normal fonksiyonunu yapmasına engel olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde OTOF gen mutasyonlarını belirlemeye yönelik tek çalışma 2005 yılında Tekin ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, bir ailede Leu1011Pro mutasyonunu ailenin üç çocuğunda da homozigot formda bulunduğu gösterilmiştir⁶⁵. Buna karşın bu tez çalışmasında, sendromik olmayan işitme kaybı olan 95 hasta Leu1011Pro mutasyonu bakımından taranmış ancak bu mutasyonu taşıyan birey bulunamamıştır.(Şekil 10)

Araştırılan mutasyonlardan ikincisi 48. ekzonda yer alan Arg1939Gln (c.5816G>A) yanlış anlamlı mutasyonudur. Bu mutasyon sonucunda proteindeki 1939. amino asiti kodlayan Arjinin amino asiti Glisin amino asitine dönüşmektedir. Bu yanlış anlamlı mutasyon sonucunda insan ve fare otoferlin genleri ile insan disferlin ve miyoferlin moleküllerinde korunmuş olan bir amino asit değişikliği olmaktadır¹⁰. Varga ve ark yaptıkları bir çalışmada bu mutasyonu, çalışmada araştırdığımız dördüncü mutasyon olan c.1651delG ile birlikte bileşik heterozigot formda bulmuşlardır. Bir ailede tanımlanmış olan her iki mutasyonda bizim çalışmamızda bulunamamıştır (Şekil 12).

Araştırılan mutasyonlardan üçüncüsü 48. ekzonda yer alan Pro1987Arg, c.5960C>G (6285C>G) yanlış anlamlı mutasyonudur. Bu mutasyon sonucunda proteindeki 1987. amino asiti kodlayan prolin, glisin amino asitine dönüşmektedir. Bu değişimde yine Arg1939Gln mutasyonunda meydana gelen değişim gibi proteinin ligantlarla etkileşimini etkilemektedir¹⁴. Bu mutasyonda Varga ve ark tarafından bir ailede belirlenmiştir. Buna karşın yaptığımız tez çalışmasında, araştırmaya dahil olan Türk işitme kayıplı hastalar arasında bu mutasyonun varlığını gösteremedik (Şekil 14).

Araştırılan mutasyonlardan dördüncüsü 16. ekzonda meydana gelen c1651delG nükleotid delesyonudur. Bu delesyon erken sonlanma kodonu oluşturarak daha kısa bir protein sentezlenmesine, bunun sonucu olarak da işlevsiz bir protein oluşumuna neden olmaktadır¹⁰. Varga ve ark yaptığı bir araştırmada bu mutasyonu bir ailede heterozigot formda bulmuşlardır. Buna karşın araştırmamıza dahil ettiğimiz 95 türk işitme kayıplı hastanın hiç birinde bu mutasyonun varlığını gösteremedik (Şekil 16).

Araştırılan mutasyonlardan beşincisi 22 ekzonda yer alan Gln829Ter anlamsız mutasyonudur. Bu mutasyonda 2485. nükleotitte meydana gelen C>T baz değişikliği, glutamin kodonunun erken dur kodonuna (Gln829Ter) dönüşmesine neden olmaktadır. Miglioisi ve ark yaptığı çalışmada, Gln829Ter mutasyonunu sendromik olmayan prelingual işitme kaybıyla ilişkilendirilmiş 364 kişiden 12'sinde (%3) bulmuşlardır. İspanya toplumunda bu mutasyonun işitme kaybına neden olan en yaygın üçüncü mutasyon olduğunu vurgulamışlardır ⁵⁸. Yine Varga ve ark. yaptığı başka bir çalışmada da bu mutasyonun bir İspanyol bir de Küba kökenli olan işitsel nöropatili ailede tanımlamıştır ⁶⁰. Montserrat Rodriguez - Ballesteros ve ark sendromik olmayan işitme kayıplı hastalarda Gln829X mutasyon taramaları sonucunda şu sonuçları bulmuşlardır: İspanya kökenli 708 hastanın; 15'i homozigot, 11'i heterozigot, Kolombiya kökenli 83 hastanın 1'i homozigot 2'si heterozigot ve 30 Arjantin kökenli hastanın 2'si heterozigot olarak saptanmıştır ⁵⁷. Türk toplumundaki sendromik olmayan işitme kayıplı hastalara yönelik yaptığımız bu çalışmada ise Gln829Ter mutasyonu bakımından taranan 95 hastada mutasyonu taşıyan birey bulunamamıştır (Şekil 18).

Araştırılan mutasyonlardan altıncısı 39. İntronda yer alan c.4799+1G>C (IVS39+1 G>C) intronların çıkartılması ve ekzonların birleştirilmesini etkileyen bir mutasyondur. Bu mutasyon sonucunda 39. intron mRNA' dan uzaklaştırılamadığı için erken 'Dur' kodonu açığa çıkmakta ve kısa protein oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Varga ve ark. yaptığı çalışmada bu mutasyonu bir ailenin heterozigot olarak taşıdığını belirlemişlerdir¹⁰. Bizim çalışmamızda ise, araştırmaya dahil edilen bireyler arasında mutasyonun varlığı gözlenmemiştir (Şekil 20).

Bu güne kadar otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybıyla ilgili 53 genetik lokus ve 29 gen tanımlanmıştır ^{12,57,66}. Günümüze

kadar OTOF geni üzerinde yapılan araştırmalarda bizim incelemiş olduğumuz mutasyonlar da dahil olmak üzere toplam 42 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mutasyonlardan 11'i proteinin sadece uzun izoformunu etkileyen mutasyonlar kalan 31 mutasyon ise proteinin hem uzun hem de kısa izoformunu etkileyen mutasyonlardır ⁵⁷.

Bu tez çalışmasında araştırdığımız 6 mutasyon diğer toplumlarda gözlenmiş olmasına rağmen, çalışmaya dahil edilen sendromik olmayan işitme kayıplı Türk hastalarda bulunmadığı belirlenmiştir. Mutasyon sıklıklarındaki bu farklılığın nedeni toplumlar arasındaki etnik köken farkları olabilir. Araştırılan hasta sayısının arttırılması ile çalışmada araştırılan mutasyonlar belirlenebileceği düşünülmektedir. Ancak diğer toplumlarda gözlenen mutasyonların bu çalışmada belirlenememesi ve Türk toplumuna ait sadece tek bir çalışmanın bulunması ⁶⁵, Türk toplumuna özgü olan ancak, henüz tanımlanmamış mutasyonların olabileceğini de düşündürmektedir. Bu olası mutasyonları saptamak amacıyla Türk hastalarda OTOF geninin dizi analizinin yapılması gerekmektedir.

OTOF geni, 2. kromozomun kısa kolunun 23.1 bölgesinde yer almaktadır. 48 ekzondan oluşan bu genin uzunluğu intronları ile birlikte 90 kb' dır. mRNA uzunluğu ise yaklaşık 7 kb'dır ¹⁴. Böylesi büyük bir genin dizisinin belirlenmesinde öncelikle ekzonların dizi analizi yapılmalıdır. Ekzonlarda mutasyon bulunmaması durumunda da intronların ve promotör bölgenin dizisi çıkartılarak olası mutasyonların varlığı araştırılabilir. Ancak bu kadar büyük bir genin dizilenmesi maliyet-yarar açısından incelendiğinde rutin olarak çalışılması mümkün görülmemektedir. Yine de araştırma amaçlı olarak gen dizisinin belirlenmesinden sonra Türk toplumuna özgü olan mutasyon veya mutasyonlar ortaya çıkartılabilir. Bundan sonra da belirlenen mutasyonlara özgü restriksiyon enzimleri

belirlenerek rutin tarama amaçlı maliyet açısından daha uygun olan PZT-RFLP yöntemi uygulanabilir.

Sendromik olmayan işitme kayıplı bireylerde OTOF gen mutasyonlarının belirlenmesi rutin bir yöntemden daha ziyade araştırma aşamasındadır. Bu tez çalışmasında da görüldüğü gibi gende günümüze kadar belirlenmiş olan mutasyonlar aileye veya topluma özgü konumdadır ve kısıtlı sayıda mutasyonun incelenmesi her zaman moleküler tanının konmasına yardımcı olmamaktadır. Bu nedenle Türk işitme kayıplı hastalardaki olası OTOF mutasyonlarının belirlenmesi toplumumuza özgü mutant allellerin sıklıklarının ortaya çıkartılması bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca bu mutasyonların belirlenmesiyle genotip-fenotip ilişkisinin kurulması mümkün olabilecektir.

6.SONUÇ

Bu tez çalışmasında, çeşitli toplumlarda sendromik olmayan işitme kayıplı hastalarda OTOF geninde bulunduğu belirlenen mutasyonlardan 6 tanesi, (Leu1011Pro, Arg1939Gln, Pro1987Arg, Gln829Ter, c.1651delG, (c.4799+1G>C) sendromik olmayan işitme kaybı olan 95 Türk hastada araştırıldı.

Bu araştırma ile genetik nedenli işitme kayıplı olguların erken dönemde belirlenmesi ve Türk toplumunda genetik işitme kaybı nedeni olarak OTOF mutasyonlarının sıklığının araştırılması hedeflenmiştir.

Sendromik olmayan Türk işitme kayıplı 95 hastanın hiç biri , farklı toplumlarda varlığı gösterilen OTOF gen mutasyonlarını (Leu1011Pro, Arg1939Gln, Pro1987Arg, Gln829Ter, c.1651delG, c.4799+1G>C) taşımadığı belirlendi.

Sonuç olarak, gende tespit edilen mutasyonlar aileye ve/veya topluma özgü mutasyonlar oldukları için, hasta sayısının artırılarak incelenmesi ve tüm gen dizisinin taranması ile Türk toplumuna özgü olası mutasyonların belirlenebilmesi açısından oldukça önem kazanmaktadır.

7. ÖZET

Sendromik Olmayan Türk İşitme Kayıplı Olgularda Otoferlin (OTOF) Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi

İşitme kaybı, en sık görülen duyuşal bozukluk olup 1000 doğumda yaklaşık 1-3 oranında görülmektedir. Etiyolojilerine göre işitme kayıpları, genetik ve çevresel kökenli işitme kayıpları olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir. İşitme kayıplarının yaklaşık %50'si genetik nedenlidir. Genetik işitme kayıpları, işitme kaybına eşlik eden başka semptomların bulunup bulunmamasına göre sendromik veya sendromik olmayan işitme kayıpları olarak sınıflandırılırlar.

Sendromik olmayan işitme kayıpları genetik nedenli işitme kayıplarının %70'ini oluşturur. Prelingual başlangıçlı sendromik olmayan işitme kaybında otozomal resesif kalıtım %80 gibi yüksek oranında görülmekte iken otozomal dominant %20, X'e bağlı kalıtım %1 ve mitokondriyal kalıtımda <%1 oranında gözlenmektedir. Otoferlin (OTOF) geni sendromik olmayan işitme kaybı ile ilgili tanımlanan genlerden birisidir.

Bu çalışmanın amacı, OTOF geninde belirlenen ve işitme kaybı ile ilişkili olduğu bilinen 6 OTOF gen mutasyonunun sendromik olmayan Türk işitme kayıplı olgularda araştırılmasıdır.

Bu çalışmada, sendromik olmayan Türk işitme kayıplı 95 hastanın, araştırılan 6 OTOF gen mutasyonundan (Leu1011Pro, Arg1939Gln, Pro1987Arg, Gln829Ter, c.1651delG ve c.4799+1G>C) hiçbirini taşımadığı belirlendi. Diğer toplumlarda gözlenen mutasyonların bu çalışmada belirlenememesi Türk toplumuna özgü olan henüz tanımlanmamış mutasyonların olabileceğini de düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: OTOF, Otoferlin, Sendromik olmayan işitme kayıpları, PZT, RFLP

8. SUMMARY

Detection Of Otof Gene Mutations In Turkish Patients With Nonsyndromic Hearing Loss

Hearing loss is the most frequent auditory disorder and occurs in approximately 1 to 3 of 1,000 children. According to their etiology, hearing loss can be classified into genetic and environment origin. 50% of hearing losses are attributed to genetic causes. Genetic hearing loss can be subdivided into syndromic and non-syndromic hearing loss whether being associated with additional symptoms or isolated, respectively.

Non-syndromic hearing loss accounts for 70% of hearing loss. In nonsyndromic genetic deafness of prelingual onset, autosomal recessive inheritance predominates (80%), but autosomal dominant (20%), X-linked (1%) and mitochondrial inheritance (<1%) have observed. Otoferlin (OTOF) is one of the identified gene related to nonsyndromic hearing loss.

The aim of this study was to investigate 6 OTOF gene mutations, which were previously identified in OTOF gene and known to be associated with hearing loss, in nonsyndromic Turkish hearing loss patients.

In this study, none of the 95 Turkish patients with nonsyndromic hearing loss were found to have 6 OTOF gene mutations (Leu1011Pro, Arg1939Gln, Pro1987Arg, Gln829Ter, c.1651delG and c.4799+1G>C). Mutations found in different populations were not encountered in our study therefore it is suggested that there may be some spesific unknown mutations in Turkish population.

Key Words: OTOF, Otoferlin, Nonsyndromic hearing loss, PCR, RFLP

9.KAYNAKLAR

- 1- Kenneson A, Braun KVN, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A huge review. *Genet Med* 2002; 4:258–274.
- 2- Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 1989;18: 911–917.
- 3- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46: 486–491
- 4- Hauseman MJ, Jackson AP, Al-Gazali LI, Bahid RA, Roberts E, Mueller RF. A novel mutation in a family with non-syndromic sensorineural hearing loss that disturbs the newly characterised OTOF long isoforms. *J Med Genet* 2001 Aug;38(8):E25;
- 5- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness, *Nat Genet* 1999;21(4):363-9
- 6- Lalwani AK, Castelein CM. Cracking the auditory genetic code: nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Am J Otol* 1999; 20:115-132

- 7- Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;(4):341–402.
- 8- Nance, WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003 ; 9(2):109-19
- 9- Bitner-Glindzicz, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 2002; 63:73-94.
- 10-Varga R, Kelley P M, Keats B J, Starr A, Leal S M, Cohn E, Kimberling W J. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutation in the otoferlin (OTOF) gene. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 45-50.
- 11-Bayazit YA, Yilmaz M. An overview of hereditary hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68(2):57-63.
- 12-Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006; 69: 371-392.
- 13-G.Van Camp, RJH Smith, Hereditary hearing loss homepage [Internette], 2008 [8 Haziran 2008 okundu] elektronik adresi: <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>
- 14-Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, Smith TN, Friedman TB, Lalwani AK, Wilcox ER, Petit C. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):591-600

- 15-Kalatzis, V, Petit, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. Hum Mol Genet 1998;7:1589–1597
- 16-Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. N Engl J Med. 2000 Apr 13;342(15):1101-9.
- 17-Noyan A. Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. 13. Baskı. Meteksan yayın evi. Ankara. 2003
- 18-Çokgezer S, Fathalizadeh A, Gedik G, Işık O, Sinan C. Ses dalgalarının özellikleri ve sesin algılanması. [İnternette], 2005 [13 Ağustos 2008 okundu] elektronik adresi: <http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/kulak.htm>
- 19-Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. Annu Rev Genet 2001;35:589-646
- 20-Molmenti H. Ear anatomy [İnternette], 2007 [5 Haziran 2008 alındı] elektronik adresi: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1092.htm>
- 21- Hudspeth AJ. How the ear's Works work. Nature 1989;341(6241):397-404
- 22-Nobili R, Mammano F, Ashmore J. How well do we understand the cochlea. Trends Neurosci 1998;21:159-67.
- 23-Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. Lancet. 2001 Sep 29;358(9287):1082-90.

- 24-Markin VS, Hudspeth AJ. Gating-spring models of mechanoelectrical transduction by hair cells of the internal ear. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995;24:59-83.
- 25-Gregory IF, Inna AB, Thomas BF, Andrew JG. Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells, *Nature Reviews Genetics* 2004;5:489-498
- 26-Flock A, Cheung HC. Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. *J Cell Biol* 1977 Nov;75(2 Pt 1):339-43
- 27-Tilney LG, Derosier DJ, Mulroy MJ. The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. *J Cell Biol* 1980 Jul;86(1):244-59.
- 28-Assad JA, Shepherd GM, Corey DP. Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron*. 1991 Dec;7(6):985-94
- 29-Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Re*. 1984 Aug;15(2):103-12.
- 30-Steel KP, Kros CJ. A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 2001 Feb;27(2):143-9.
- 31-Howard J, Hudspeth AJ. Compliance of the hair bundle associated with gating of mechanoelectrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1988 May;1(3):189-99.

- 32-Howard J, Roberts WM, Hudspeth AJ. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1988;17:99-124
- 33-Hudspeth AJ. Hair-bundle mechanics and a model for mechanoelectrical transduction by hair cells. *Soc Gen Physiol Ser.* 1992;47:357-70
- 34- Bıyıklı TA. Türkiye’de sendromik olmayan işitme kaybının moleküler patolojisi. Doktora. Ankara:Hacettepe Üniversitesi, 2006
- 35-Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell.* 2006 Oct 20;127(2):277-89
- 36-Roberts WM. Snaring otoferlin's role in deafness. *Cell.* 2006 Oct 20;127(2):258-60.
- 37- Jahn R, Lang T, Sudhof TC. Membrane fusion. *Cell* 2003;112: 519–533.
- 38- Robinson LJ, Martin TF. Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:483–492
- 39- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNAREproteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15781–15786.

- 40- Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:509–547.
- 41-Roberts WM. Snaring otoferlin's role in deafness. *Cell*. 2006 Oct 20;127(2):258-60
- 42-Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 2002;63:73-94
- 43-Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996 Dec;14(4):385-91.
- 44-Ballesteros MR, Castillo FJD, Martin Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Teran J, Morales-Angulo C, Navas C, Trinidad G, Tapia M C, Felipe M, Castillo del I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Human Mutations* 2003; 22: 451-456.
- 45-Calapoğlu NŞ. Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği. *S.D.Ü Tıp Fak Derg* 2006; 13 (2): 37-46
- 46-Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
- 47-Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory

neuropathy allele. J Med Genet 2006 Jul;43(7):576-81. Epub 2005 Dec 21

48-Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. J Mol Diagn 2004;6(4):275-84

49-Bronya J. B. Keats,¹ and Charles I. Berlin Genomics and Hearing Impairment. Genome Res.1999;9(1):7-16

50-Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJ, Kanlikama M, Ozer E, Cakmak EA, Mumbuc S, Arslan A. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2003 Dec;67(12):1331-5.

51-Piatto VB, Nascimento EC, Alexandrino F, Oliveira CA, Lopes AC, Sartorato EL, Maniglia JV. Molecular genetics of non-syndromic deafness. Rev Bras Otorrinolaringol 2005 Mar/Apr;71(2):216-23

52-Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HH, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJ, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. Am J Hum Genet 2003 Dec;73(6):1452-8. Epub 2003 Oct 21.

- 53-Baysal E, Bayazit YA, Ceylaner S, Alatas N, Donmez B, Ceylaner G, San I, Korkmaz B, Yilmaz A, Menevse A, Altunyay S, Gunduz B, Goksu N, Arslan A, Ekmekci A. GJB2 and mitochondrial A1555G gene mutations in nonsyndromic profound hearing loss and carrier frequencies in healthy individuals. J Genet 2008 Apr;87(1):53-7.
- 54-Kalay E, Caylan R, Karag zel A. Non-sendromik işitme kayıpları genetiğindeki gelişmeler. Otoloscope 2004; 4: 130-138.
- 55-Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. Ear Hear 2003; 24: 275-88.
- 56-Where is the OTOF gene located [İnternette], 2006 [25 Temmuz 2008 okundu], elektronik adresi: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=otof>
- 57-Rodr guez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, Arslan E, Med  C, Curet C, V lter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Ted n S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavall  L, Gelvez N, Primignani P, G mez-Rosas E, Mart n M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I.. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. Hum Mutat 2008 Jun;29(6):823-31
- 58-Migliosi V, Modamio-H ybj r S, Moreno-Pelayo MA, Rodr guez-Ballesteros M, Villamar M, Teller a D, Men ndez I, Moreno F, Del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. J Med Genet 2002 Jul;39(7):502-6

- 59-Britton S, Freeman T, Vafiadaki E, Keers S, Harrison R, Bushby K, Bashir R. The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics*. 2000 Sep 15;68(3):313-21
- 60-Varga, R.; Avenarius, M. R.; Kelley, P. M.; Keats, B. J.; Berlin, C. I.; Hood, L. J.; Morlet, T. G.; Brashears, S. M.; Starr, A.; Cohn, E. S.; Smith, R. J. H.; Kimberling, W. J. : OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J. Med. Genet.* 2006;43: 576-581.
- 61-Jiménez JL, Bashir R. In silico functional and structural characterisation of ferlin proteins by mapping disease-causing mutations and evolutionary information onto three-dimensional models of their C2 domains. *J Neurol Sci* 2007 Sep 15;260(1-2):114-23. Epub 2007 May 21.
- 62-Rizo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1998 Jun 26;273(26):15879-82
- 63-Smith RJ, Gurrola JG, Kelley PM. OTOF-Related Deafness [Internet]. 2008 [19 Haziran 2008 okundu], elektronik adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=dfnb9>

- 64-Mirghomizadeh F, Pfister M, Apaydin F, Petit C, Kupka S, Pusch C M, Zenner HP, Blin N. Substitutions in the conserved C2C domain of otoferlin cause DFNB9, a form of nonsyndromic autosomal recessive deafness. *Neurobiology of Disease* 2002; 10: 157-164
- 65-Tekin M, Akcayoz D, Incesulu A. A novel missense mutation in a C2 domain of OTOF results in autosomal recessive auditory neuropathy. *Am J Med Genet A*. 2005 Sep 15;138(1):6-10.
- 66- Van Camp G, Smith R. The Hereditary Hearing loss Homepage [İnternette] 2008 [12 Temmuz 2008 okundu], elektronik adresi: <http://webh01.ua.ac.be/hhh>

10.EKLER

Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince yakın ilgisini ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimi ile bana her zaman yol gösteren, danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, deneyim ve iyi niyetlerini esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE, Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında ilgisiyle ve bilgisiyle bana daima destek olan, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, Sayın Araş. Gör. Akın YILMAZ'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli bölüm arkadaşlarıma, yardımları ve paylaşımları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki hasta kan örneklerinin temininde yardımlarını ve yakın ilgilerini esirgemeyen başta Sayın Prof. Dr. Yıldırım Ahmet BAYAZİT, Sayın Prof. Dr. Nebil GÖKSU, Sayın. Dr. Elif BAYSAL olmak üzere tüm Kulak Burun Boğaz bölümü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteklerini ve sonsuz sevgilerini arkamda hissettiğim, bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan annem Nurten DOĞUER,'e babam Erdoğan DOĞUER'e ve çok sevdiğim kardeşim Sezer DOĞUER'e en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : ÇAĞLAR
Soyadı : DOĞUER
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA, 08.05.1983

Eğitimi :

2005- Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Eğitimi
2000-2005 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi
1997-2000 Ankara Lisesi, Lise Eğitimi
1994-1997 Cebeci İlköğretim Okulu Lisesi, Ortaokul Eğitimi
1989-1994 Açıkalın İlköğretim Okulu, İlkokul Eğitimi

Yabancı Dili : İngilizce