

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İŞİTME KAYBINDAN SORUMLU
CONNEXİN 26 (Cx26/GJB2) GENİ 35delG MUTASYONUNUN
POPULASYONUMUZ İÇİN
ATASAL HAPLOTİPİNİN BELİRLENMESİ**

118 855

Burcu BALCI

118855

Hacettepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Pervin DİNÇER

ANKARA

2002

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

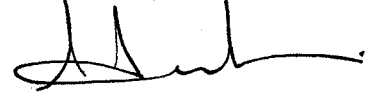
Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji programına Bilim Uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:


Doç. Dr. Pervin DİNÇER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

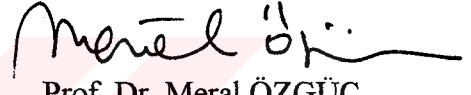
Üye:



Prof. Dr. Şükriye AYTER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye:



Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye:



Prof. Dr. Erol BELGİN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye:




Doç. Dr. Engin YILMAZ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. N. Sezgin İLGI

Enstitü Müdürü

ÖZET

Balcı, B., İşitme kaybından sorumlu *Connexin 26* (Cx26/GJB2) geni 35delG mutasyonunun popülasyonumuz için atasal haplotipinin belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 2002. Cx26 geninde görülen mutasyonlar, birçok farklı popülasyonda otozomal resesif kalıtılan prelingual nonsendromik işitme kayıplarının temel nedeni olarak gösterilmiştir. Beyaz ırkta, Cx26 geninde en sık görülen mutasyon, 35delG'dir. Atasal mutasyon olduğu düşünülen 35delG mutasyonun, popülasyonlardaki taşıyıcı frekanslarının dağılımı onun popülasyonlara yayılışını ortaya çıkarmıştır. Buna göre, 35delG mutasyonu Orta Doğu'dan köken almakta ve iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayılmaktadır. Türkiye coğrafi konumu ile bu iki rotanın arasında yer almaktadır. Yapmış olduğumuz ön çalışmamızda, iki geniş Doğu Karadeniz kökenli ailemizdeki bireylerde (37 sağlıklı, 33 hasta) mutasyon bölgesine en yakın D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak haplotip analizi yapılmış ve 2-6-4 haplotipi, ortak haplotip olarak tespit edilmiştir. Tarih öncesi zamanlarda yerleşimi nedeniyle, ırksal ve kültürel açıdan farklı popülasyonların göçlerine maruz kalan Doğu Karadeniz Bölgesi, ikinci göç rotası üzerinde yer almaktadır. Çalışmamızda, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan 2-6-4 haplotipinin, Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olma özelliği araştırılmıştır. İki geniş Doğu Karadeniz kökenli ailemize ek olarak, yine aynı bölgeden sekiz ve Türkiye genelinden 13 hastada haplotip analizi yapılmıştır. 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda, 2-6-4 haplotipinin Türkiye genelindeki görülme sıklığı (%9.52) ile Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki görülme sıklığı (%39.13) karşılaştırılmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=5.13/ df.=1/ p=0.023$). Mutant kromozomlarda saptanan 2-6-4 dışındaki diğer haplotiplerin görülme sıklıkları, Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Bununla beraber 2-6-4 haplotipinin, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki sağlıklı ve mutant kromozomlardaki görülme sıklıkları karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=7.46 /df.=1/ p\leq 0,01$). İstatistiksel olarak bulunan bu anlamlı farklılıklar, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonunun taşındığı atasal kromozomların haplotipinin 2-6-4 olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: prelingual nonsendromik işitme kaybı, Cx26, 35delG, atasal haplotip

ABSTRACT

Balci, B., Identification of the ancestral haplotype of 35delG mutation in the Connexin 26 (Cx26/GJB2) gene responsible for hearing loss in Turkish population, Hacettepe University Health Sciences Institute, MSc Thesis in Medical Biology, Ankara, 2002. Mutations in the Cx26 gene, have been shown to be the major cause of autosomal recessively inherited, prelingual non-syndromic hearing loss. 35delG was found to be the most frequent mutation among Caucasoids. The distribution of the population specific carrier frequencies of the 35delG mutation explains its widespread occurrence. The mutation originated somewhere in the Middle East and was spread throughout Europe along two routes. The geographical position of Turkey is located between these two routes. In a preliminary study, we performed haplotype analysis of two large families from Trabzon (33 having hearing loss, 37 healthy) by using D13S141, D13S175 and D13S143 tightly linked polymorphic markers near 35delG mutation and identified 2-6-4 common haplotype. Position of the East Black Sea, which has allowed immigrations of racially and culturally distinct groups since prehistoric times, is on the second mutation route. In this study, we analyzed the 2-6-4 haplotype of the chromosomes associated with 35delG mutation, as an ancestral haplotype for the East Black Sea Region. In addition to our two families from the East Black Sea Region, we performed haplotype analysis on eight patients from the same region and 13 patients from Turkey. The frequency of the mutant chromosomes bearing the 2-6-4 haplotype was compared between the East Black Sea Region (%39.13) and general population (%9.52). The difference was found significant between these two groups ($\chi^2=5.13/df.=1/ p=0.023$). The other haplotypes of the mutant chromosomes except 2-6-4, was not found statistically different when compared with the East Black Sea Region and general population. In addition, when the frequency of mutant and healthy chromosomes bearing 2-6-4 haplotype was compared, statistically significant difference was observed in the East Black Sea Region ($\chi^2=7.46 /df.=1/ p\leq 0,01$). The results of this study demonstrates that 35delG mutation originated the East Black Sea Region with ancestral 2-6-4 haplotype.

Key words: prelingual non-syndromic hearing loss, Cx26, 35delG, ancestral haplotype

TEŞEKKÜR

Her konuda olduğu gibi bu çalışmada da gösterdiği anlayış ve zen ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pervin Dinçer'e, tez çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda, Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Bilim Dalı'nda, Tübitak DNA Doku Bankası ve Gen Araştırma Laboratuvarı'nda ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, eğitimimin her aşamasında göstermiş oldukları sonsuz anlayış ve destek için sevgili aileme en içten duygularla teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
1.1) Amaç ve Hipotez	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1) İşitme Sistemi	4
2.2) İşitme Kaybının Genetik Özellikleri	5
2.3) “ <i>Gap Junction</i> ” Kanalları	6
2.4) “ <i>Connexin</i> ” Proteinleri (Cx)	8
2.5) “ <i>Connexin 26</i> ” (Cx26) Proteini ve İşitme Kayıplarındaki Rolü	10
2.6) “ <i>Connexin 26 - Gap Junction Beta 2</i> ” (Cx26 / GJB2) Geni	12
2.7) 35delG Mutasyonu ve Önemi	13
BİREYLER VE YÖNTEM	17
3.1) Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	18
3.1.A) DNA İzolasyonu	18
3.1.B) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu	18
3.1.C) Agaroz Jel Elektroforezi	19
3.1.D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi	20
3.1.D.I) Nondenatüre Poliakrilamid Jelde “ <i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> ” (SSCP) Bantlarının Gözlenmesi	21
3.1.D.II) Denatüre Poliakrilamid Jelde Haplotip Analizi	21
3.1.E) Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi	21

3.1.F) Gümüş Boyama Sonrası Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Fotoğraflarının Eldesi	21
3.2) Yöntemler	22
3.2.A) DNA İzolasyonu	22
3.2.B) Mutasyon Analizi	22
3.2.B.I) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	23
3.2.B.II) “ <i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> ” (SSCP) Analizi	25
3.2.C) Haplotip Analizi	26
3.2.D) İstatistiksel Analizler (χ^2 Testi)	27
BULGULAR	28
4.1) Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizdeki Hasta Bireylerde DNA Dizi Analizi ile 35delG Mutasyonunun Saptanması	28
4.2) Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizdeki 69 Bireyde SSCP Yöntemi İle 35delG Mutasyon Analizi	29
4.3) Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizde Haplotip Analizi ve Mutant Kromozomlarda 2-6-4 Ortak Haplotipinin Tespiti	30
4.4) Türkiye Genelinde, Doğu Karadeniz Bölgesi Dışında Farklı Kökenlerden Gelmiş Olan 13 Hastanın 35delG Mutasyonu Taşıyan Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi	37
4.5) Doğu Karadeniz Kökenli 8 Hastanın 35delG Mutasyonu Taşıyan Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi	41
4.6) Mutant Kromozomlarda 2-6-4 Haplotipinin Görülme Sıklığının, Türkiye Geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi Arasında Karşılaştırılması	43
4.7) Mutant Kromozomlarda Saptanan Tüm Haplotiplerin Görülme Sıklıklarının, Türkiye Geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi Arasında Karşılaştırılması	43
4.8) Doğu Karadeniz Bölgesi Kontrol Populasyonundaki Taşıyıcı Bireylerin Mutant Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi	44
4.9) 2-6-4 Haplotipinin Görülme Sıklığının, Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki Sağlıklı ve Mutant Kromozomlar Arasında Karşılaştırılması	44

TARTIŞMA	46
SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR	56
EKLER	
EK 1: Doğu Karadeniz Kökenli Birinci Ailemize Ait Geniş Aile Ağacı	



SİMGELER VE KISALTMALAR

DFNB	“Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss”
GJB2	“Gap Junction Beta 2”
Cx26	“Connexin 26”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
SSCP	“Single Strand Conformational Polymorphism”
kDa	“Kilodalton”
bç	“baz çifti”
EDTA	“Ethylenediamine tetra acetic acid”
dNTP	“Deoxynucleotide triphosphate”
SDS	“Sodium dodecyl sulphate”



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. “ <i>Gap Junction</i> ” kanal yapısının üç boyutlu modeli	7
2.2. “ <i>Connexin</i> ” proteinlerinin ortak yapısı	9
2.3. Koklear “ <i>gap junction</i> ” kanallarıyla gerçekleşen potasyum döngüsü	11
2.4. Avrupa ve Akdeniz popülasyonlarında 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları	16
3.1. Haplotip analizi için kullandığımız D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicilerinin 35delG mutasyon bölgesine uzaklıkları	26
4.1. 35delG mutasyonunun DNA dizi analizi	28
4.2. 35delG mutasyonunu kapsayan 102bç.’lik bölgenin SSCP metodu ile analizi	29
4.3. D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak yapılan haplotip analizleri	31
4.4. Doğu Karadeniz kökenli iki ailemize ait haplotip analizi sonuçları	32-35
4.5. 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastanın haplotip analizi sonuçları	39-40

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. “ <i>Connexin</i> ” proteinlerinin sınıflandırılması	8
2.2. Farklı populasyonlar için 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı değerleri	14
3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu protokolü	23
4.1. Doğu Karadeniz kökenli iki ailedeki bireylerin 35delG mutasyon analizi sonuçları	30
4.2. Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizde 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipleri	36
4.3. Nonsendromik prelingual işitme kaybı tanısı alan 72 hastaya ait 35delG mutasyon analizi sonuçları	37
4.4. 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastaya ait bilgiler ve hasta numaraları	38
4.5. Türkiye genelinde incelenen 13 hastada 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipleri	41
4.6. 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan 8 Doğu Karadeniz kökenli hastanın haplotip analizi sonuçları	42
4.7. Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi’nde, 2-6-4 haplotipinin 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki dağılımı	43
4.8. Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi’nde, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan haplotiplerin görülme sıklıkları	44

GİRİŞ

1.1. Amaç ve Hipotez

İşitme kaybı, iç kulakta (sensör organ / koklea) görülen hataların en sık rastlanana olup, insidansı yaklaşık 1/1000 olarak saptanmakla beraber prevalansı yaşa bağlı olarak artmaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde işitme kayıplarının yaklaşık olarak %60'ı genetik bir nedene, geriye kalan %40'lık kısmı ise çevresel etmenlere bağlı olarak meydana gelmektedir (2).

Kalıtsal işitme kayıpları, sendromik ve nonsendromik olmak üzere ikiye ayrılır (3). Prelingual nonsendromik (izole form) işitme kayıpları; sık karşılaşılan kalıtsal sensör hatalardan olup, yaklaşık olarak %80'i otozomal resesif kalıtım (DFNB) göstermektedir (4). Populasyonumuz için yapılan bir çalışmada, ileri derecede sensorinöral işitme kayıplı çocukların etyolojik incelemeleri sonucunda, en önemli etkenin otozomal resesif geçiş olduğu (%42.3) ortaya konmuştur (5).

Bugüne kadar 33 farklı DFNB lokusu tanımlanmış olup, bunlardan 14'ünün geni bilinmektedir (6).

Nonsendromik işitme kaybına neden olan genler içinde en önemli yeri, DFNB1 lokusunda sorumlu gen olan "*Connexin 26*" (GJB2 / Cx26) tutmaktadır. "*Gap junction*" kanallarının oluşumundan sorumlu olan "*Connexin 26*" proteinini kodlayan bu gendeki mutasyonların, resesif kalıtılan prelingual nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %50'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (7,8).

Cx26 genindeki mutasyonlar arasında, arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşan 35delG (30delG) mutasyonu, en sık rastlanan mutasyondur. Bu mutasyon sonucunda, 13. pozisyonda dur kodonu oluşumu ile 12 aminoasitlik erken sonlanmış kısa bir polipeptid meydana gelir (9).

35delG mutasyonu Cx26 mutant allellerinin %82'sinde bulunmakla beraber, otozomal resesif kalıtım gösteren ailelerde ve sporadik vakalarda genetik nedene bağlı işitme kaybının temel etkeni olarak gösterilmektedir (10). Otozomal resesif kalıtılan işitme kaybı olgularının yaklaşık %50'sinin, Akdeniz çevresi, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli populasyonlarda, 35delG mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı saptanmıştır (11).

35delG mutasyonu için ilk yapılan araştırmalarda bazı populasyonlarda görülen yüksek taşıyıcı frekansı değerleri, 35delG'nin, Cx26 geninin sıcak mutasyon bölgesinde olduğu düşüncesini doğurmuş ve bu mutasyon populasyonlar arasında sık tekrarlayan ("*recurrent*") bir mutasyon olarak kabul edilmiştir (4,12).

Daha sonra yapılan araştırmalarda; 35delG mutant allelinin beyaz ırkta yüksek frekansta bulunmasına karşın, beyaz olmayan ırkta düşük taşıyıcı frekansı değerleriyle karşılaşılmıştır. Bazı populasyonlarda, Cx26 geninde görülen diğer mutasyonlar, 35delG'nin taşıyıcı frekansından daha yüksek değerlere ulaşırken, bazı populasyonlarda ise 35delG mutasyonu saptanamamıştır. Coğrafi, etnik ve kültürel açıdan farklı populasyonlar arasında, 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansında görülen değişiklikler, bu mutasyonun çok eski dönemlerde oluşan, ortak bir atadan türeyen atasal ("*founder*") bir mutasyon olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır (10). Yapılan hesaplamalarla 35delG'nin, yaklaşık olarak 500 kuşak önce oluşmuş ve 10.000 yaşında olan bir mutasyon olduğu saptanmıştır (13). Belçika, İngiltere ve Amerika'daki beyaz ırkta, 35delG mutasyonunun aynı haplotipe sahip kromozomlarda taşındığının gözlenmesiyle, bu mutasyonun atasal bir mutasyon olduğu yönündeki kanıtlar artmıştır (14).

35delG mutasyonunun, Orta Doğu'dan köken aldığı ve populasyonların göçleriyle iki farklı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmektedir. Birinci mutasyon göç rotası Akdeniz kıyılarını takip ederken, ikinci rota Tuna ve Ren vadilerini takiben Kuzey Avrupa'ya ulaşmaktadır (13).

Yüzyıllar boyunca etnik, ırksal ve kültürel açıdan birçok farklı populasyonu bünyesinde barındırmış olan Türkiye coğrafi konumu nedeniyle iki mutasyon göç rotasında üzerinde yer almaktadır. Atasal mutasyon olduğu düşünülen 35delG'nin çok eski bir mutasyon olduğu düşünülecek olursa, populasyonumuz gen havuzuna katıldığı bölge/bölgeler ve Türkiye populasyonu için atasal haplotipi/haplotipleri olması gerekmektedir.

Yapmış olduğumuz ön çalışmamızda; önemli bir liman kenti ve ticaret merkezi olma niteliğini koruyan Doğu Karadeniz Bölgesi'nin Trabzon ilinde yaşamakta olan iki geniş ailemizde; 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan 2-6-4 haplotipi, ortak haplotip olarak tespit edilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nin Trabzon ili ve çevresi, ikinci mutasyon göç rotası üzerinde yer aldığından 35delG mutasyonunun Türkiye populasyonuna katıldığı bir bölge olma ihtimali yüksektir.

35delG mutasyonunun populasyonumuz için atasal haplotipini belirlemek üzere planladığımız bu çalışmamızda; mutasyonun taşındığı kromozomların haplotiplerinden biri olan 2-6-4 haplotipinin, Doğu Karadeniz Bölgesi'ne özgül atasal bir haplotip olma özelliği araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Sistemi

Kulak; dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç ana kısımda incelenir. Kulak kepçesi ve onu takiben kısa ve dar bir tüp şeklinde olan dış kulak kanalı, dış kulağı oluşturmaktadır. Kulak zarı ile iç kulak arasında bir köprü görevini üstlenen orta kulak, elastik bir yapıya sahip olan kulak zarı, orta kulak kavitesi, kemikcik zinciri ve orta kulak kavitesini örten mukoz zardan meydana gelir. Temporal kemiğin içinde yer alan iç kulak ise, yuvarlak ve oval pencereler ile orta kulakla bağlantılıdır. İşitme ve denge organlarını içeren iç kulak, kemik labirent ve zar labirentten oluşmaktadır.

İşitme sistemi; iletim mekanizması, sensörinöral mekanizma ve santral mekanizma olarak üç ana bölümde incelenir.

İletim mekanizması, kulak kepçesinden ya da dış kulaktan başlar. Bu mekanizmanın en önemli fonksiyonu dışardan gelen titreşimli (vibrasyon halinde olan) ses enerjisini, sensörinöral mekanizma tarafından kullanılacak olan kulağın iç kısmına iletmektir.

Sensörinöral mekanizma, koklea'dan başlar. Koklea işitmenin sensör organı olup iletim mekanizması tarafından taşınan ses enerjisini, elektrik enerjisine çevirir. İşitsel uyarıyı temsil eden bu uyarı, 8. Kranial sinir tarafından taşınır ve daha sonra santral işitme mekanizması tarafından yorumlanır. Bu nedenle koklea ve 8. Sinir işitme fonksiyonunun sensörinöral kısmından sorumludurlar.

Santral mekanizma, işitsel bilginin tanımlanmasından, yorumlanmasından ve entegrasyonundan sorumludur. Beyin sapı ve korteks'de bulunan alanlar santral işitsel sistemi oluşturur (15,16).

2.2. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri

Çoğu işitme kaybı; iletim mekanizmasında veya sensörinöral mekanizmada meydana gelen hatalar sonucunda, dış ve/veya orta kulağın veya koklea'nın, ya da üçünün birden etkilenmesiyle meydana gelir (17).

Doğumdan ileri yaşlara kadar, insan hayatının her döneminde karşılaşılabilen işitme kaybının insidansı yaklaşık olarak 1/1000 olmakla beraber prevelansı yaşa bağlı olarak artmaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde işitme kayıplarının yaklaşık olarak %60'ı genetik bir nedene, geriye kalan %40'lık kısmı ise çevresel etmenlere (erken doğum, farmakolojik ototoksite, doğum öncesi geçirilmiş kızamıkçık, sitomegalovirus enfeksiyonu vb.) bağlı olarak meydana gelmektedir (2,18).

Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgular, sendromik ve nonsendromik olmak üzere ikiye ayrılır. Sendromik formlar çocuklardaki işitme kaybının %30'unu kapsar ve sendromların çoğunluğu kulağın embriyolojik gelişimi sırasındaki genetik hatalar sonucu oluşur (19). Bunların büyük bir kısmı Mendel kalıtımına uymakta, bir kısmı ise mitokondriyal kalıtım göstermektedir. İşitme kaybına, başka hiçbir patolojik organ veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği durumlarda nonsendromik işitme kaybı sözkonusudur. Genetik işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir (15).

Prelingual nonsendromik (izole form) işitme kayıpları; özellikle gelişmekte olan ülkelerde sık karşılaşılan kalıtsal sensör hatalardandır (10). %70-80'i otozomal resesif kalıtım (DFNB) gösterirken, otozomal dominant formları (DFNA) %23-30, X'e bağlı kalıtım gösteren formları (DFN) %2-3 oranında görülür (17).

Bugüne kadar 33 DFNB lokusu tanımlanmış olup bunlardan 14'ünün geni bilinmektedir. (DFNB1-Cx26/“*Connexin 26 gene*”, DFNB2-MYOVIIA/“*Myosin7A gene*”, DFNB3-MYOXV/“*Myosin15 gene*”, DFNB4-PDS/“*Putative sulphate transporter gene*”, DFNB7/DFNB11-TMC1/ “*Transmembrane cochlear expressed gene 1*”, DFNB8/DFNB10-TMPRSS3/“*Transmembrane serine protease gene*”,

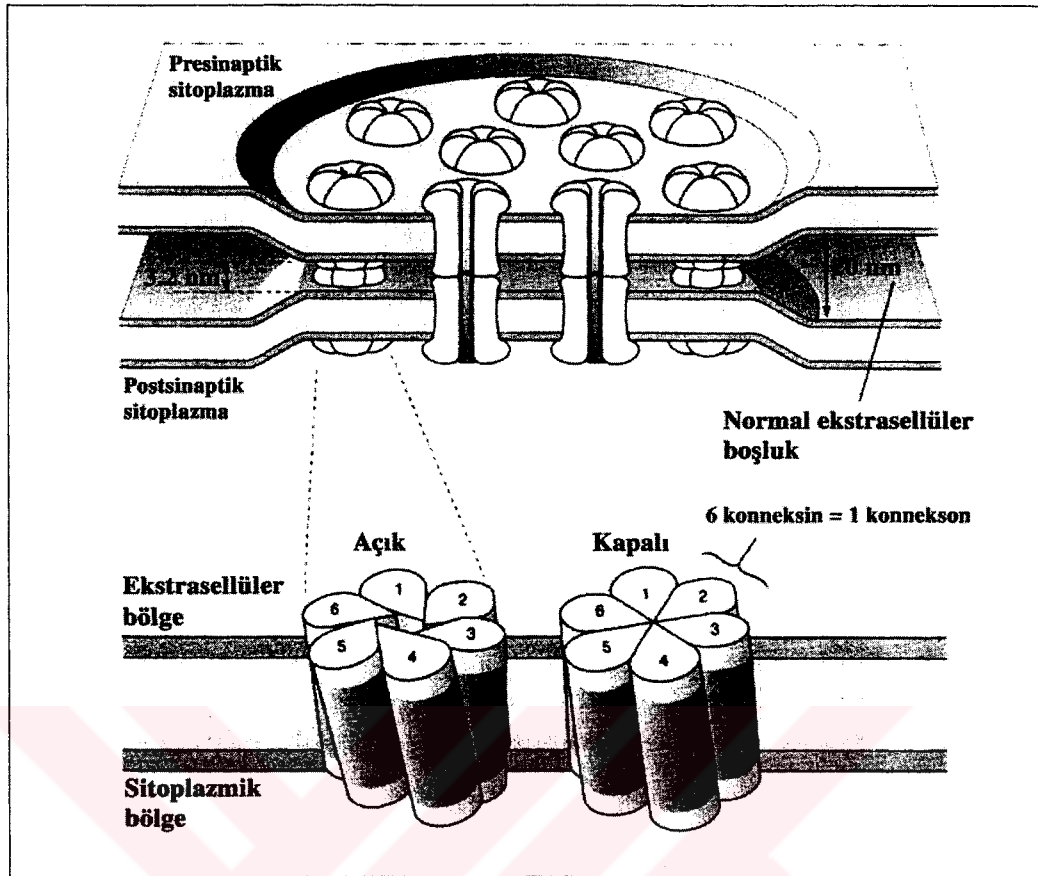
DFNB9-OTOF/“*Otoferlin gene*”, DFNB12-CDH23/“*Cadherin-like gene*”, DFNB16-STRC/“*Sterocilin gene*”, DFNB18-USH1C/“*Usher syndrome type 1C gene*”, DFNB29-CLDN14/“*Claudin 14 gene*”, DFNB21-TECTA/“*Alpha tectorin gene*”) (6).

Yapılan çalışmalar, DFNB1 lokusunda sorumlu gen olan “*Connexin 26*” (Cx26 / GJB2)’nin genetik işitme kayıplarında en önemli yeri aldığını göstermektedir (20). Bu gen küçük moleküllerin ve iyonların hücreler arasındaki difüzyonunu sağlayan “*gap junction*” (bağlantı aralıkları) kanallarının oluşumunda görevli protein ailesinin bir üyesi olan “*Connexin 26*” (Cx26) proteinini kodlamaktadır (9).

2.3. “*Gap Junction*” Kanalları

İşitmenin sensör organı olarak bilinen koklea; iletim mekanizması tarafından iç kulağa iletilen ses enerjisini elektrik enerjisine çevirirken yapısında bulundurduğu “*gap junction*” kanallarından yararlanır (21). İyon ve metabolitlerin difüzyonunu sağlayarak hücreler arasında iletişimi sağlayan “*gap junction*” kanalları, çok hücreli organizmalarda hücrel aktivitelerin koordineli bir biçimde devamı için gereklidirler (22).

İyon kanallarına göre daha kompleks bir yapıya sahip olan “*gap junction*” kanalları, duyu hücreleri hariç kokleadaki bütün destek hücreleri arasında iletişimi sağlar (21). Bu hücreler arası kanallar “*connexin*” proteinleri adı verilen 12 alt üniteden oluşur (23). “*Gap junction*” kanal yapısının üç boyutlu modeli Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. "Gap junction" kanal yapısının üç boyutlu modeli (24)

"Connexin" proteinleri endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra 6 tanesinin oligomerizasyonu sonucunda "connexon" adı verilen yarı kanallar oluşur. Bunlar aynı "connexin" alt ünitelerinden oluşmuşsa homomerik, farklı "connexin" alt ünitelerinden oluşmuşlarsa heteromerik olarak adlandırılırlar. Bu yarı kanallar, ilk önce cis daha sonra trans golgi'ye geçer ve buradan koparak plazma membranına katılırlar. Plazma membranında birden çok "connexon"un birleşmesiyle plak yapısı oluşur. Daha sonra, komşu hücrelerdeki "connexon"lar birleşir ve "gap junction" dediğimiz bir bütün kanal yapısını oluştururlar (22).

Bu kanallar diğer hücre membran kanallarından, seçicilik özellikleriyle ayrılırlar. "Gap junction" kanallarından ~1kD ağırlığa kadar olan moleküllerin, metabolitlerin ve Ca^{+2} , IP_3 , cAMP ve ATP gibi ikincil mesajcıların geçişi sağlanır (23).

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda ilginç olarak, “*gap junction*” kanalları bulunduran hücrelerin sitoplazmasında birden çok konnekson’dan oluşan yoğun olarak paketlenmiş veziküler yapılar görülmüş (“*annular gap junctions*”) fakat bu yapıların nasıl oluştuğu konusunda kesin bir bilgi elde edilememiştir (25).

2.4. “*Connexin*” Proteinleri (Cx)

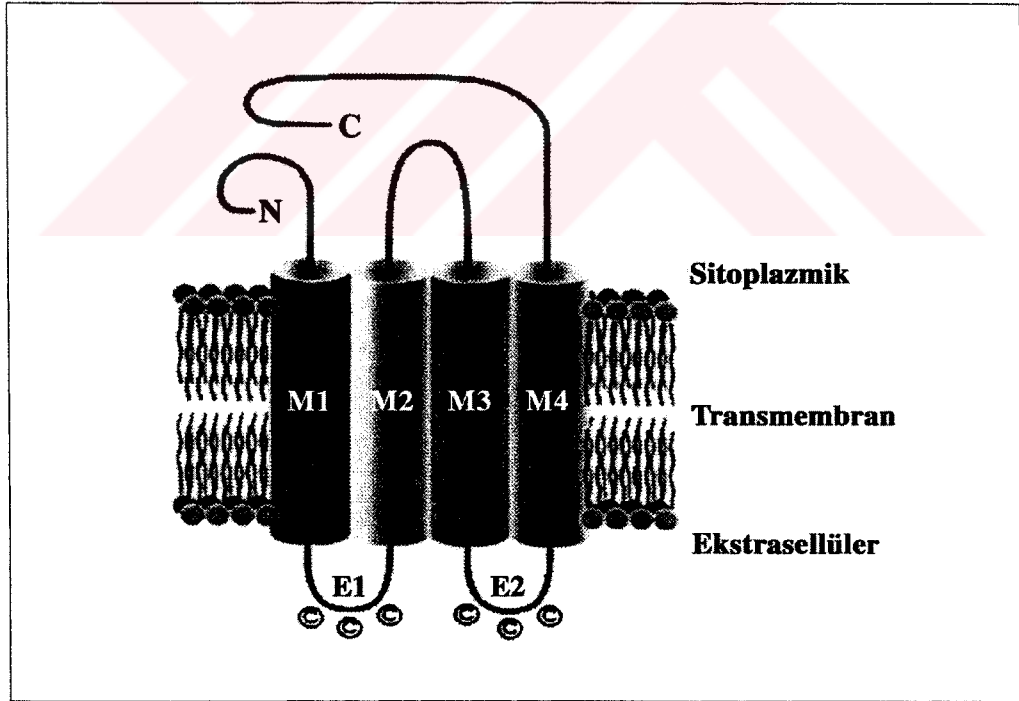
“*Gap junction*” kanallarının yapısını oluşturan “*connexin*” proteinlerinden günümüze kadar 15’i tanımlanabilmiştir. Farklı tiplerdeki “*connexin*” proteinleri, farklı hücre tipi ve organlardaki “*gap junction*” kanallarının yapısına katılırlar. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilir ve α , β , γ olarak üç ana gruba ayrılır. İçlerinde en son olarak tanımlananı, memeli beyinde eksprese olduğu bulunan ve 3.grup olarak kabul edilen γ grubuna dahil edilen “*Connexin 36*” proteindir. Bu protein hariç bütün “*connexin*” proteinleri, aminoasit seviyesinde %50 dizi homolojisi gösteren gen ailesi tarafından kodlanırlar (22,23). Tablo 2.1’de “*connexin*” proteinlerinin sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 2.1. “*Connexin*” proteinlerinin sınıflandırılması (23)

“CONNEXIN” TİPİ	LOKALİZASYONU
1.GRUP (β “CONNEXIN”LER)	
Cx26	13q11-12
Cx30	-
Cx30.3	-
Cx31	1p35.1
Cx31.1	-
Cx32	Xq13.1
2.GRUP (α “CONNEXIN”LER)	
Cx33	-
Cx37	1p35.1
Cx40	1q21.1
Cx43	6q21-23.2
Cx45	-
Cx46	13q11-12
Cx50	1q21.1
Cx57	-
3.GRUP (γ “CONNEXIN”LER)	
Cx36	15q14

İnsan “*connexin*” proteinleri arasında yapısal olarak korunmuş benzer motifler vardır. Bunun yanısıra insanda ve farede bulunanlar arasında da hem yapısal hem de moleküler ağırlık bakımından benzerlikler saptanması, bize bu proteinlerin evrim sürecinde büyük oranda korunduğunu göstermektedir (24).

Herbir “*connexin*” proteini; dört transmembran domain (M1, M2, M3, M4), iki ekstrasellüler (E1, E2) ve bir sitoplazmik ilmek yapılarının yanında sitoplazmik amino (NT domain) ve karboksil (CT domain) uçları içerirler. Ekstrasellüler ilmek yapısı bu proteinler arasında yapısal olarak büyük oranda korunmuş olup, her ilmek yapısında bulunan üç sistein aminoasitinin yeri 12 “*connexin*” proteininde aynı pozisyonadadır. Bu aminoasitler her bir “*connexon*”un diğerine bağlanıp “*gap junction*” kanal yapısı oluşturması için gerekli olan üç boyutlu yapıyı sağlamaya yardımcı olurlar (26). Şekil 2.2’de “*connexin*” proteinlerinin ortak yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.2. “*Connexin*” proteinlerinin ortak yapısı (24)

Ortak yapılar gösteren “*connexin*” proteinleri arasından Cx26, Cx31 ve Cx32 proteinlerini kodlayan genlerde oluşan mutasyonların işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir. Cx30 proteininin de memeli kokleasında bazı hücre tiplerinde bulunduğu gözlenmiş fakat işitme kaybı ile bağlantısı açıklanamamıştır (26).

2.5. “*Connexin26*” (Cx26) Proteini ve İşitme Kayıplarındaki Rolü

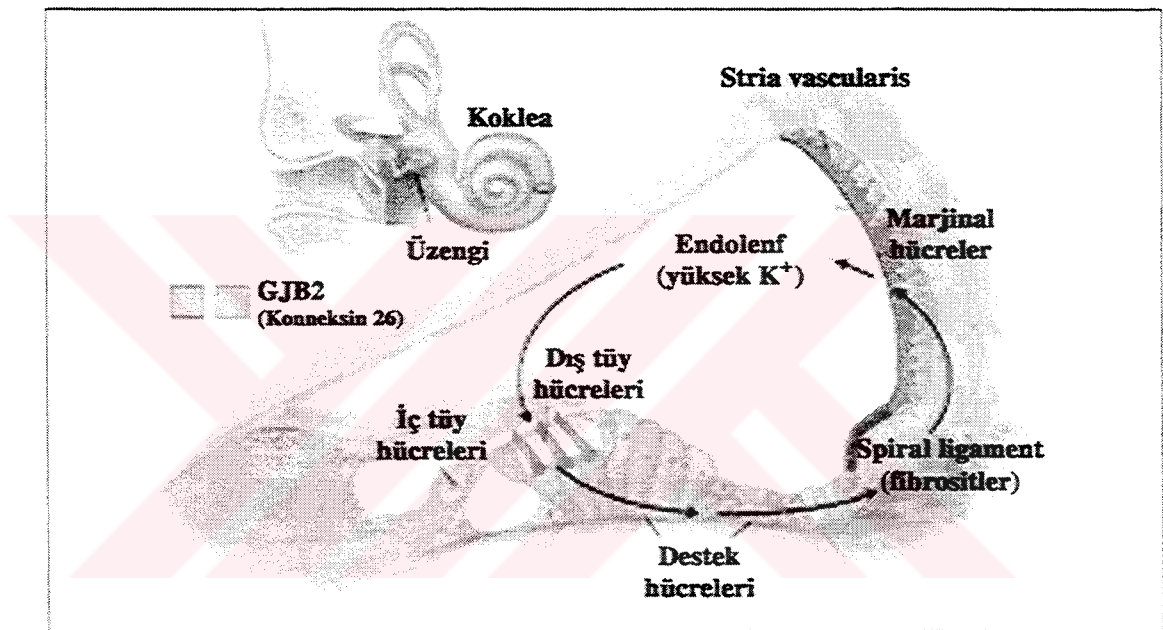
“*Connexin 26*” (Cx26), “*gap junction*” kanalları yapısının oluşmasından sorumlu, 26kD ağırlığında bir protein olup “*Connexin 26*” geni tarafından kodlanmaktadır (9). Küçük moleküllerin ve iyonların bir hücreden diğerine geçmesini sağlayarak komşu hücrelerin iletişimde görev alan Cx26 proteini, aynı zamanda geniş “*connexin*” proteinleri ailesinin bir üyesidir (24). İç kulakta yer alan kokleadaki potasyum (K^+) homeostazında görev alan başlıca proteinlerden biri olması nedeniyle kokleanın sensörinöral fonksiyonları için gerekli bir proteindir (27).

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla “*Connexin*” 26 proteininin kokleada; “*stria vascularis*”deki bazal hücreler arasında, “*spiral ligament*”de tipI ve tipII fibrositlerin bulunduğu bölgelerde, “*suptrastrial zone*”da ve korti organındaki destekleyici hücreler arasında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.3) (28).

Kokleanın normal fonksiyonunu devam ettirebilmesi için Cx26 proteinine gereksinimi vardır. Cx26 geninde görülen mutasyonlar sonucunda, Cx26 proteininde oluşan bozukluklar, otozomal resesif nonsendromik işitme kayıplarının temelini oluşturur (4,12).

Kokleada bulunan endolenfte tüy hücrelerinin apikal yüzeyinde yüksek K^+ konsantrasyonu (~100mV) mevcuttur. Tüy hücreleri, iletim mekanizması tarafından iç kulağa ulaşan ses ile uyarıldıkları zaman, reseptör hücrelerde elektriksel bir değişim olur ve endolenften başlayan K^+ döngüsü gerçekleşir. Voltaj değişikliğine duyarlı Ca^{++} yollarının açılmasıyla, hücreye Ca^{++} iyonları girer. Hücre membranının

iç kısmında Ca^{++} miktarının artmasıyla, Ca^{++} a duyarlı olan K^+ geçiş yolları açılır. K^+ , tüy hücrelerinin artı yöne hareketiyle içeriye alınır, buradan destek hücrelerine geçer ve “*stria vascularis*”deki bazal hücreler yardımıyla endolenfe geri dönmesi sonucunda hücre istirahat potansiyeline dönüşür. Lateral duvardaki “*stria vascularis*” K^+ ’un pompalanmasında çok kritik rol oynar. Destek hücreleri ve fibrositler arasındaki “*gap junction*” kanalları da K^+ döngüsünde rotayı tespit eder (28,29). Koklear “*gap junction*” kanallarıyla gerçekleşen potasyum döngüsü Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Koklear “*gap junction*” kanallarıyla gerçekleşen potasyum döngüsü (27)

Cx26 proteinini kodlayan gende herhangi bir mutasyon mevcut ise “*gap junction*” kanal yapısı etkilenir, kokleadaki K^+ iyon akışında bozukluk oluşur ve K^+ döngüsü durur. Endolenfte, korti organında ve tüy hücrelerinde yüksek derecede K^+ birikerek lokal bir toksik etki yaratır. Tüy hücrelerinin normal fonksiyon görememesi ve kokleadaki potansiyelin düşmesi nedeniyle bireylerde işitme kaybı meydana gelir (26,30).

2.6. “*Connexin26 - Gap Junction Beta 2*” (Cx26 / GJB2) Geni

Küçük moleküllerin ve iyonların hücreler arasındaki difüzyonunu sağlayan “*gap junction*” kanallarının oluşumunda görevli, 226 aminoasitlik Cx26 proteinini kodlayan “*Connexin 26 - Gap Junction Beta 2*” (Cx26 / GJB2) geni, nonsendromik işitme kaybından sorumlu olduğu kanıtlanan ilk genidir. 1997 yılında Kelsell ve arkadaşları tarafından 13q11-q12’de lokalize olduğu tespit edilen bu gen, 5456 nükleotid içermekte ve tek bir ekzondan oluşmaktadır (9). İnsan vücudunda; iç kulak, beyin, kas dokusu, prostat, plasenta, deri, böbrek ve akciğer dahil olmak üzere birçok farklı dokuda bol miktarda eksprese olduğu bilinmektedir (31).

DFNB1 lokusunda sorumlu gen olan Cx26, nonsendromik işitme kaybına neden olan genler arasında en önemli yeri almıştır (4,12). Küçük bir gen olup tek bir ekzon içermesi, araştırmacılara mutasyon taraması açısından avantajlar sağlamıştır. Şu ana kadar Cx26 proteinini kodlayan bu gende 93 mutasyon tanımlanmıştır (6).

Bu gende görülen mutasyonların büyük bir çoğunluğu otozomal resesif kalıtılan nonsendromik işitme kaybından sorumlu olup, genellikle proteinin erken terminasyonu sonucunda düşük molekül ağırlıklı protein oluşumu gözlenir. Allelik heterojenite nedeniyle otozomal dominant kalıtım gösteren formlarına da rastlanmıştır. Bunlar resesif kalıtılanların aksine, genelde aminoasit sayısının sabit kaldığı “*missense*” mutasyonlar olup hastalığın seyri daha hafiftir (9,32).

Cx26 genindeki mutasyonların resesif kalıtılan prelingual işitme kayıplarının yaklaşık olarak yarısından sorumlu olduğu gösterilmesine rağmen bu gendeki mutasyonlar arasında, arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşan 35delG (30delG) mutasyonu, en sık rastlanan mutasyondur (9). Cx26 mutant allellerinin %82’sinde bulunan 35delG mutasyonu, otozomal resesif kalıtım gösteren ailelerde ve sporadik vakalarda genetik nedene bağlı işitme kaybının temel etkeni olarak gösterilmiştir (10).

2.7. 35delG Mutasyonu ve Önemi

Cx26 geninde, 30-35. nükleotidleri oluşturan, arka arkaya sıralanmış 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda mRNA çerçevesinin kaymasına neden olan mutasyona 35delG (30delG) adı verilir. Bu mutasyon sonucunda dur kodonu oluşumu ile 12 aminoasitlik kısa bir polipeptid meydana gelir (9).

Ailesel ve sporadik vakalarda genetik nedene bağlı işitme kaybının temel etkeni olarak gösterilen 35delG mutasyonu, Cx26 geninde en sık rastlanan mutasyondur (9). Akdeniz çevresi, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli, otozomal resesif kalıtılan işitme kaybı olgularının yaklaşık yarısı bu mutasyona bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (11).

Farklı populasyonlarda yapılan çalışmalarla 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları hesaplanmış, bazı populasyonlarda $\Delta F508$ kistik fibrozis mutasyonundan daha yüksek taşıyıcı frekansı değerlerine ulaşılmıştır (Estonya'da %4.4, Yunanistan'da %3.5, İtalya'da %3.4 vb.) (11). 35delG mutasyonunun meydana geldiği T(G)₆T dizisi, DNA polimerazın replikasyon sırasında kaymasına ("*replication slippage*") ve yanlış eşleşme yapmasına neden olabilecek, mutasyon açısından sıcak bir bölgedir (9,33). Bu nedenle, bazı populasyonlarda görülen bu yüksek değerler ilk olarak 35delG'nin populasyonlar arasında sık tekrarlayan ("*recurrent*") bir mutasyon olarak kabul edilmesine neden olmuştur (4,12). 35delG mutasyon bölgesini çevreleyen 2cM'lık geniş bir bölgede yapılan haplotip analizi çalışmaları sonucunda da heterojen bir haplotipin gözlenmesiyle ortaya atılan bu fikir doğrulanmış, 35delG mutasyonunun birçok farklı kökenden ortaya çıktığı kabul edilmiştir (34).

Daha sonra yapılan araştırmalarda ise; 35delG mutant allelinin beyaz ırkta yüksek frekansta bulunmasına karşın, beyaz olmayan ırkta düşük taşıyıcı frekansı değerleriyle karşılaşılmıştır (10). Yahudi populasyonunda 167delT, Afrika populasyonunda R143W, Japonya ve Kore'de 235delC vb. Cx26 geninde görülen diğer mutasyonlar, 35delG'nin taşıyıcı frekansından daha yüksek değerlere

ulaşmıştır. Afrika ve Asya kökenli Amerikalılar, Mısırlılar gibi bazı populasyonlarda ise 35delG mutasyonu saptanamamıştır (34,35,36). Tablo 2.2’de farklı populasyonlar için 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı değerleri verilmiştir.

Tablo 2.2. Farklı populasyonlar için 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı değerleri
(13)

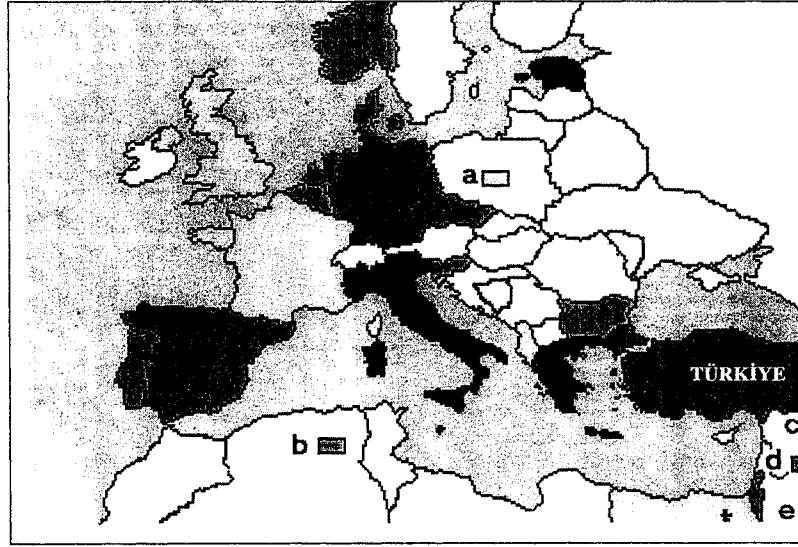
POPULASYON	TEST EDİLEN BİREY SAYISI	35delG TAŞIYICI SAYISI	TAŞIYICI FREKANSI (%)
AVRUPA			
NORVEÇ	190	1	0,5
DANİMARKA	95	2	2,1
ESTONYA	113	5	4,4
ALMANYA	200	4	2,0
HOLLANDA	89	2	2,2
BELÇİKA	190	1	0,5
BELÇİKA	360	9	2,5
FRANSA	96	1	1,0
FRANSA	200	1	0,5
FRANSA	68	0	0,0
FRANSA	512	14	2,7
BULGARİSTAN	157	1	0,6
ÇEK CUMHURİYETİ	195	4	2,1
SLOVENYA	182	1	0,5
İTALYA	116	4	3,4
İTALYA	255	8	3,1
İTALYA	150	6	4,0
İSPANYA	200	5	2,5
İSPANYA	130	3	2,3
PORTEKİZ	179	4	2,2
MALTA	144	4	2,8
YUNANİSTAN	400	12	3,0
YUNANİSTAN	395	14	3,5
AMERİKA			
AMERİKA	119	0	0,0
BEYAZ İRK	173	1	0,6
BEYAZ İRK	100	1	1,0
BEYAZ İRK	96	2	2,0
BEYAZ İRK	560	14	2,5
AFRİKA KÖKENLİ	173	0	0,0
AFRİKA KÖKENLİ	190	0	0,0
ASYA KÖKENLİ	53	0	0,0
YAHUDİ KÖKENLİ	551	4	0,7
DİĞER POPULASYONLAR			
MISIRLILAR	95	0	0,0
ARAPLAR	58	1	1,7
KORELİLER	100	1	1

35delG mutasyonu taşıyıcı frekansının belirli populasyonlarda yüksek olmasının nedeni, mutasyon açısından taşıyıcı olan bireylerin belirli bir hastalığa karşı direnç kazandığı heterozigot avantajı ile açıklanabilir mi sorusu ortaya çıkmıştır. Cx26 geni birçok farklı dokuda eksprese olmaktadır. Farklı coğrafik ve kültürel

koşullar altında, koklea dışındaki dokulardan birindeki “*gap junction*” kanallarının; iklim, besin, enfekte edici ajanlar vb. birtakım faktörlere karşı taşıyıcı bireylerde özgül fonksiyon görmesiyle heterozigot avantajı sağlayabileceği düşünülmüş, fakat bu görüş kanıtlanamamıştır (11).

Bunun yanısıra, 2001 yılında Belçika, İngiltere ve Amerika’daki beyaz ırkta, 35delG mutasyonunu çevreleyen dar bir bölgede aynı haplotipin gözlenmesi; bu mutasyonun çok eski dönemlerde ortaya çıktığı, ortak bir atadan türediği dolayısı ile atasal (“*founder*”) bir mutasyon olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Araştırma sırasında 6 farklı SNP (“*single nucleotide polymorphism*”) kullanılarak genotiplendirme yapılmış, mutasyon bölgesine 731bç. uzaklıkta olan bir SNP ile 35delG mutasyonunun birlikteliği arasında χ^2 analizleri sonucunda, anlamlı bir ilişki bulunmuştur (13).

Avrupa ve Akdeniz ülkelerini kapsayan bir başka çalışmada ülkeler için 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları hesaplanmıştır. Musevi populasyonlardaki 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları, Musevi olmayan komşu populasyonun değerleriyle karşılaştırıldığında, belirgin bir fark göze çarpmamaktadır. Bu da bize, mutasyonun oluştuktan sonra, gen akışı sayesinde komşu populasyonların gen havuzuna katıldığını ve coğrafi olarak birbirine yakın ülkeler arasında benzer taşıyıcı frekansı değerleri oluştuğunu göstermektedir (11). Şekil 2.4’de Avrupa ve Akdeniz populasyonları arasındaki taşıyıcı frekansı değerleri harita üzerinde karşılaştırılmıştır.



*koyu renkten açık renge doğru gidildikçe 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları düşmektedir.

*beyaz renkle gösterilen bölgelerde taşıyıcı frekansları hesaplanmamıştır.

* = Musevi populasyonlar (a:Ashkenazi, b:Kuzey Afrika, c:Persiyen, d:Irak, e:Yemen)

Şekil 2.4. Avrupa ve Akdeniz populasyonlarında 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları (11)

Yapılan hesaplamalarla 35delG'nin, yaklaşık olarak 500 kuşak önce oluşmuş ve 10.000 yaşında olan bir mutasyon olduğu saptanmıştır. Atasal bir mutasyon olduğu düşüncesinin doğrultusunda; 35delG mutasyonunun Orta Doğu'dan köken aldığı ve Neolitik populasyonların göçleriyle, Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmektedir (13).

Asya ve Avrupa arasında köprü görevi gören Türkiye, iki mutasyon göç rotasının da üzerinde yer almaktadır. 35delG mutasyonu atasal bir mutasyon da olsa, populasyonlar arasında sık tekrarlayan bir mutasyon da olsa, populasyonumuz gen havuzuna katıldığı bir bölge/bölgeler ve atasal bir haplotip/haplotipler olması gerekmektedir.

Mutasyonun atasal mutasyon olduğu yönündeki düşünceler kuvvetlenmiş de olsa, populasyonlara ve etnik kökenlere özgül çalışmalar yeterli olmadığından, bu görüş halen kesin olarak kanıtlanamamıştır. 35delG mutasyonunun atasal mutasyon olduğunun kanıtlanması ancak, populasyonlara özgül haplotiplerin çıkartılması ve bu haplotiplerin göç yolları üzerinde yer alan diğer populasyonlarda da gözlenmesiyle mümkün olacaktır.

BİREYLER VE YÖNTEM

- Bu çalışma kapsamında, 114 hasta ve 106 sağlıklı birey olmak üzere, toplam 220 birey, Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiş olup, 94 bireyde haplotip analizi yapılmıştır.
- İncelediğimiz hastalardan 107'sinin; klinik, odyolojik ve impedansmetrik incelemeleri H.Ü. Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı ve Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Bilim Dalı'nda yapılmıştır. İnceleme sonucunda işitme kaybı dışında başka şikayetlerin görülmediği hastalar, prelingual nonsendromik işitme kaybı tanısı almışlardır.
- K.T.Ü. Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda nonsendromik prelingual işitme kaybı tanısı almış olan 8 Doğu Karadeniz kökenli hastanın mutasyon analizleri K.T.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.1) Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.A) DNA İzolasyonu

- Lizis Tampon (pH 8.2) : Tris-HCl (Sigma) 10 mM
NaCl (Merck) 400 mM
Na₂EDTA (Merck) 2mM
- %10 SDS (Merck) : Sodyum dodesil sülfat
10 gr/100 ml distile su
- Proteinaz K (Sigma) : 10 mg/ml 1mM Tris HCl
- Satüre amonyum asetat (Carlo-Erba) : Amonyum asetat
74 gr/100 ml distile su
- Tris-EDTA tampon (pH 7.5) : Tris-HCl (Sigma) 10 mM
Na₂EDTA (Merck) 1mM

3.1.B) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

- Taq DNA polimeraz tampon (10X) (Fermentas) : 750mM Tris-HCl (pH 8.3, 25°C)
200mM(NH₄)₂SO₄
%0.1 Tween 20
- Taq DNA polimeraz (Fermentas) : 5U/μl
- MgCl₂ (Fermentas) : 25mM
- dNTP karışımı (Epicentre) : 2.5 mM dATP, 2.5 mM dCTP
2.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP

Cx26 geni ekzon bölgesi primer dizileri (35delG mutasyonu DNA dizi analizi)

F: 5' CCT ATG ACA AAC TAA GTT GGT TC 3'

R: 5' GAC AGC TGA GCA CGG GTT GCC TC 3'

SSCP analizi için kullanılan primer dizileri (35delG mutasyon analizi)

F: 5' CAT TCG TCT TTT CCA GAG CA 3'

R: 5' TTC CAA TGC TGG TGG AGT G 3'

Haplotip analizi için kullanılan primer dizileri

D13S141 F: 5' GTC CTC CCG GCC TAG TCT TA 3'

R: 5' ACC ACG GAG CAA AGA ACA GA 3'

D13S175 F: 5' TAT TGG ATA CTT GAA TCT GCT G 3'

R: 5' TGC ATC ACC TCA CAT AGG TTA 3'

D13S143 F: 5' CTC ATG GGC AGT AAC AAC AAA A 3'

R: 5' CTT ATT TCT CTA GGG GCC AGC T 3'

3.1.C) Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz (Sigma) : Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
- Tris-asetat tamponu (TAE) (pH 8.0) : Tris baz (Merck) 2 M
Glasiyal asetik asit (Merck) 1.14 ml
Na₂EDTA (Merck) 0.5 M
- Yükleme tamponu : Gliserol (Merck) 5.5 ml
1XTAE tamponu (Merck) 4.5 ml
Orange G boya (Merck) 0.01 gr
- Etidyum bromür : 10 mg/ml distile su
- Moleküler ağırlık belirleyicisi : ΦX174/HaeIII (Sigma) ile kesilmiş
(1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234,
194, 118, 72 baz çifti)
Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder
(1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400,
300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti)

3.1.D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- %40 Akrlamid/bisakrlamid solüsyonu : Akrlamid (Sigma) 41.5 gr
Bisakrlamid (Sigma) 1 gr
Distile su ile 115 ml'ye tamamlanır.
- Tris-borat tampon (TBE) (pH 8.3) (10X) : Tris baz (Merck) 0.9 M
Borik asit (Merck) 0.9 M
Na₂EDTA (Merck) 25 mM
- Amonyum persülfat (Sigma) (APS)(%10) : 0.1 gr/1 ml distile su
- TEMED (Sigma) : 35 µl/100 ml jel solüsyonu
- Yapıştırıcı solüsyon : Bind silane (Sigma) 50 µl
Glasiyal asetik asit (Merck) 50 µl
Etil alkol (%95) (Sigma) 10 ml
- Silikon solüsyon (Stratagene) : 2 ml/ cam üzerine
- Yükleme tamponu (6X) : %40 Sükroz (Sigma)
%0.25 brom fenol mavisi (Sigma)
%0.25 ksilen siyanol (Sigma)
- Moleküler ağırlık belirleyicisi : ΦX174/HaeIII (Sigma) ile kesilmiş
(1353, 1078, 872, 603, 310, 281,
234, 194, 118, 72 baz çifti)
Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder
(1031, 900, 800, 700, 600, 500,
400, 300, 250, 200, 150, 100, 50
baz çifti)

3.1.D.I) Nondenatüre Poliakrilamid Jelde “Single Strand Conformational Polymorphism,, (SSCP) Bantlarının Gözlenmesi

- Nondenatüre jel solüsyonu (%8) :Akrilamid/bisakrilamid (%40) 20 ml
TBE (10X) 10 ml
%10 APS 350 µl
TEMED 35 µl
Distile su ile 70 ml’ye tamamlanır.

3.1.D.II) Denatüre Poliakrilamid Jelde Haplotip Analizi

- Denatüre jel solüsyonu (%7) : Üre 42 gr
Akrilamid/bisakrilamid (%40) 17.5 ml
TBE (10X) 10 ml
%10 APS 350 µl
TEMED 35 µl
Distile su ile 100 ml’ye tamamlanır.

3.1.E) Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi

- Fiksasyon solüsyonu : Glasiyal asetik asit (Merck) 100 ml
Distile su 900 ml
- Gümüş nitrat solüsyonu (%1) (Sigma) : 1 gr/L
- Formaldehit (%1) (Sigma) : 1 ml/L
- Sodyum tiyosülfat (Sigma) : 10 mg/ml
- Sodyum karbonat solüsyonu (Merck) : 30 gr/L

3.1.F.) Gümüş Boyama Sonrası Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Fotoğraflarının Eldesi

- APC (Automatic Processor Compatible) film (Promega)

3.2.) Yöntemler

3.2.A) DNA İzolasyonu

Prelingual nonsendromik işitme kaybı görülen hasta ve ailelerinden, EDTA'lı tüplere alınan 10 ml periferik kandan DNA izolasyonu yapıldı. Total DNA izolasyonu sırasında, yüksek tuz konsantrasyonunda çöktürme yöntemi kullanıldı. 10 ml kan 50 ml'lik tüplere alındı ve eritrositlerin parçalanması amacıyla 40ml soğuk distile su ilave edilerek 2-3 dk. hızlı olarak çalkalandı. Tüpler 15 dk. 2500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj (IEC International Santrifuge Model K) edilerek lokositlerin dipte toplanması sağlandı. Üst faz atılarak pellet üzerine 30 ml soğuk distile su eklendi ve çalkalanarak pellet yıkandı. 2500 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatant yavaş ve dikkatli bir şekilde döküldü. Pellet üzerine 3 ml liziz tamponu eklendi ve hücreler vorteksle karıştırıldıktan sonra üzerine 200 µl %10 SDS, 150 µl Proteinaz K eklendi. Tüpler dikkatli bir şekilde alt üst edilerek 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda karışım üzerine 1 ml sature amonyum asetat eklenerek 30 sn. hızlıca çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dk. bekletildikten sonra 4500 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınarak üzerine 15 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması sağlandı. Toplanan DNA %70 etanolle yıkandı ve alkol uçuruldu. DNA, TE tamponu içeren tüpe alındı ve erimesi için bir gece oda ısısında veya 37°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra analizine kadar +4°C'de saklandı (37).

3.2.B) Mutasyon Analizi

Bu çalışmada, 35delG mutasyon analizi için iki farklı yol uygulanmıştır.

- I. İki büyük Doğu Karadeniz kökenli ailemizden seçilen bireylerde, 942bp.'lik Cx26 geni ekzon bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Bu bireyler, Cx26 genindeki mutasyonun belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizine alındı.

- II. Seçilen bireyler dışındaki, tüm prelingual nonsendromik işitme kaybı görülen hastalar ve ailelerinde, 35delG mutasyonunu içeren gen bölgesini kapsayan 102bç.'lik bölge PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan örneklerin 35delG mutasyon analizleri, SSCP metodu ile yapıldı.

3.2.B.1) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin, o bölgeye özgül oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem; sıcaklık ile DNA molekülünün çift zincirinin birbirinden ayrılması, primerlerin ayrılmış olan DNA zincirine bağlanması ve DNA polimeraz enzimi tarafından hedef bölgenin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur. Bu aşamaların 35-40 döngü halinde tekrarlanması sonucunda, incelenmek istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (38).

Çalışmamızda kullandığımız polimeraz zincir reaksiyonu için uygulanan protokol Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu protokolü

STOK	25 µl İÇİN KULLANILAN	SON KONSANTRASYON
10X tampon	2.5 µl	1X
25 mM MgCl ₂	1.5 µl	1.5 mM
2.5 mM dNTP	1 µl	0.01 mM
primer "forward" 20ng/µl	1 µl	20 ng
primer "reverse" 20ng/µl	1 µl	20 ng
Taq DNA polimeraz 5U/µl	0,1 µl	0.5 U
Genomik DNA	1 µl	50-100 ng
dH ₂ O	16.9 µl	
TOPLAM	25 µl	

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları:

Cx26 geni ekzon bölgesi'nde DNA dizi analizi için kullanılan primerlerin amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

94°C	5 dk.	}	34 döngü
94°C	1 dk.		
60°C	1 dk.		
72°C	1.5 dk.		
72°C	8 dk.		

35delG mutasyon bölgesinin SSCP analizi için kullanılan primerlerin amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

94°C	5 dk.	}	35 döngü
94°C	30 sn.		
58°C	1 dk.		
72°C	1 dk.		
72°C	5 dk.		

Haplotip analizi için kullanılan primerlerin (D13S141, D13S175, D13S143) amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

95°C	5 dk.	}	35 döngü
95°C	30 sn.		
55°C	30 sn.		
72°C	30 sn.		
72°C	5 dk.		

Amplifiye edilen örnekler %2'lik agaroz-TAE jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

3.2.B.II) Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analizi

SSCP analizi; günümüzde pek çok kalıtsal hastalığa neden olan mutasyonların ve bilinmeyen mutasyonların bulunması için bir ön tarama metodu olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, ilgilenilen hedef dizi PCR ile çoğaltılır ve nondenatüre koşullar altında tek zincirli moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanır. Mutasyonun tersiyer yapıda meydana getirdiği farklılık nedeni ile, mutant zincirlerin jeldeki mobiliteleri sağlıklı kontrolden farklı olur (39).

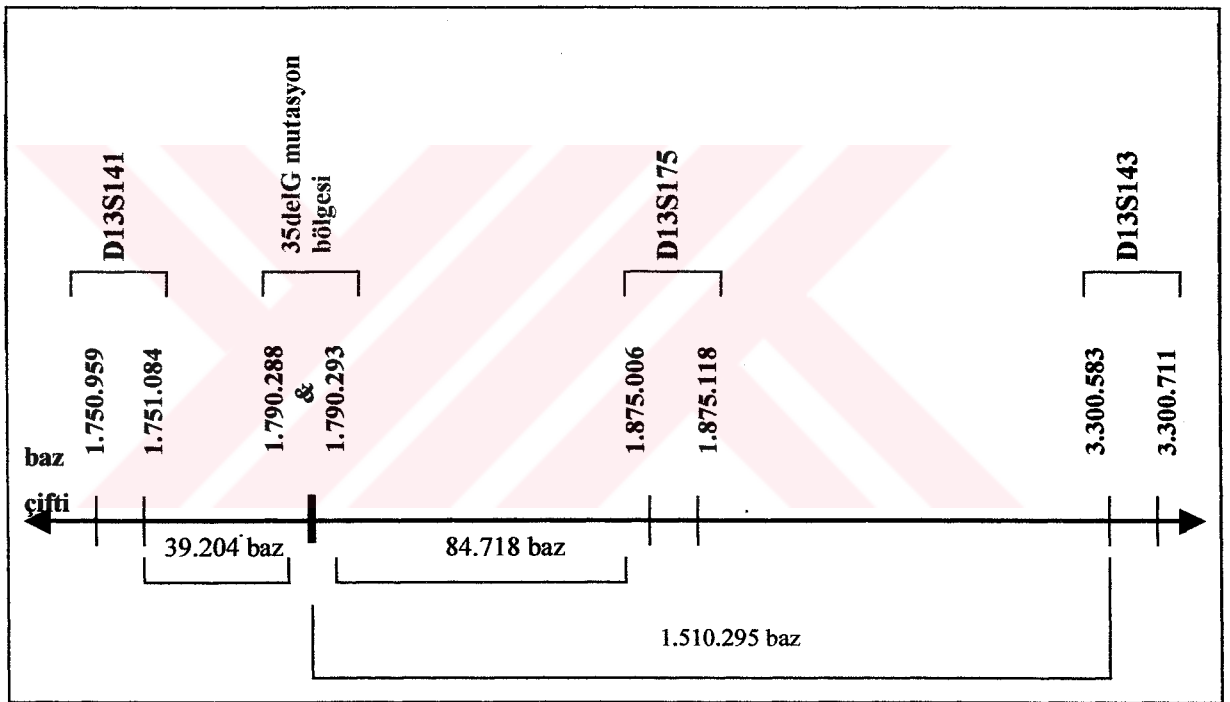
Çalışmamızda, 35delG mutasyonunun incelenmesi amacıyla SSCP yöntemi kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda çoğaltılan DNA örnekleri (7 µl), yükleme tamponu (3 µl) ile karıştırılıp, 94°C’de 10 dk. denatüre edildi. Buz üzerine alınan örnekler ve önceden 30 dk. yürütülüp, homojen duruma getirilen %8’lik nondenatüre poliakrilamid jelde SSCP analizi (250V, 10mA, 17 saat) ile incelendiler.

Elektroforez işleminden sonra jel, DNA bantlarının görüntülenmesi için gümüş nitrat ile boyandı. Bu işlem için, jel önce %10’luk asetik asit solüsyonunda fiksasyon amacıyla 30 dk. çalkalandı. Daha sonra distile su ile iki kez 5 dk. olacak şekilde yıkandı ve içine formaldehit eklediğimiz gümüş nitrat solüsyonunda 30 dk. boyandı. En son olarak, sodyum karbonat ile hazırlanan “developer” solüsyonunda (%30 sodyum karbonat, 2 ml formaldehit, 0.4 ml sodyum tiyosülfat) bir süre çalkalanarak bantlar görünür hale getirildi.

DNA dizi analizleri sonucunda, 35delG mutasyonunu homozigot/heterozigot olarak taşıyan ve her iki allelinde de taşımayan kontrol DNA’ları, inceleyeceğimiz bireylerin DNA bantları ile karşılaştırarak; mutasyonu taşıyan, taşımayan veya bir allelinde taşıyan bireyleri SSCP analizi ile saptamak mümkün olmuştur.

3.2.C) Haplotip Analizi

SSCP analizi ile 35delG mutant allelini taşıdığı tespit edilen bireylere, DFNB1 lokusunda, gen bölgesine en yakın polimorfik belirleyiciler kullanılarak haplotip analizi yapıldı (40). Atasal haplotip analizi çalışmalarımızda; *Genome Database*'den (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/map_search) elde ettiğimiz D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanıldı. Şekil 3.1'de üç polimorfik belirleyicinin 35delG mutasyon bölgesine uzaklıkları, 13. kromozoma ait taslak baz dizisi (gI: 200548892) üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Haplotip analizi için kullandığımız D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicilerinin 35delG mutasyon bölgesine uzaklıkları

Her üç belirleyici için; polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda çoğaltılan hedef DNA bölgesi (7 µl), yükleme tamponu (5 µl) ile karıştırılıp, 94°C'de 10 dk. denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı ve %7'lik denatüre poliakrilamid jelde yürütüldü (1600V, 34mA, 2.5 saat).

Elektroforez işleminden sonra jel, DNA bantlarını görüntülemek için gümüş nitrat ile boyandı. Hasta bireylerin allelleri, CEPH kontrol bireyi (1347-02) ile karşılaştırılarak numaralandırıldı ve her belirleyiciye ait alleller birarada değerlendirilerek hastalara ait haplotipler oluşturuldu. Bazı hastaların ebeveynleri, allellerin kromozom üzerindeki dizilişlerinde hata olmaması için haplotip analizine dahil edildi.

3.2.D) İstatistiksel Analizler (χ^2 Testi)

Ki-kare testi; gözlenen frekansla beklenen frekanslar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığının analiz edilmesi temeline dayanır (41). Yapmış olduğumuz çalışmamızda, Doğu Karadeniz Bölgesi ve Türkiye genelindeki haplotip frekansları, χ^2 Testi (2x2) kullanılarak karşılaştırıldı ve *Hardy-Weinberg* dengesinde olup olmadıkları incelendi. (STATS İstatistik Programı, 1.1 versiyonu, 1998, Decision Analyst, Inc.)

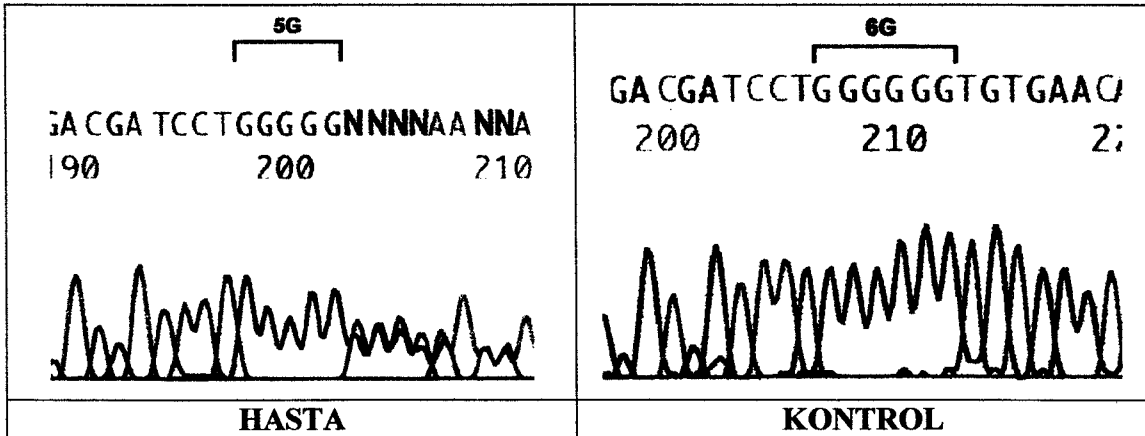
BULGULAR

4.1. Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizdeki Hasta Bireylerde DNA Dizi Analizi ile 35delG Mutasyonunun Saptanması

En az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesinin Trabzon ilinde yaşamakta olan iki ailemizdeki hasta bireylerde klinik, odyolojik ve impedansmetrik incelemeler yapılmış; inceleme sonucunda hastalar, işitme kaybı dışında başka şikayetlerin görülmediği nonsendromik prelingual işitme kaybı tanısı almıştır.

Ailelere ait detaylı aile ağacı çizilmesi ile hastalığın otozomal resesif kalıtıldığı tespit edilmiştir. Ailelerimizden birincisi çok geniş olduğu için çalışma kolaylığı açısından beş dala ayrılmıştır (Şekil 4.4). Aileye ait geniş aile ağacı EK 1’de verilmiştir.

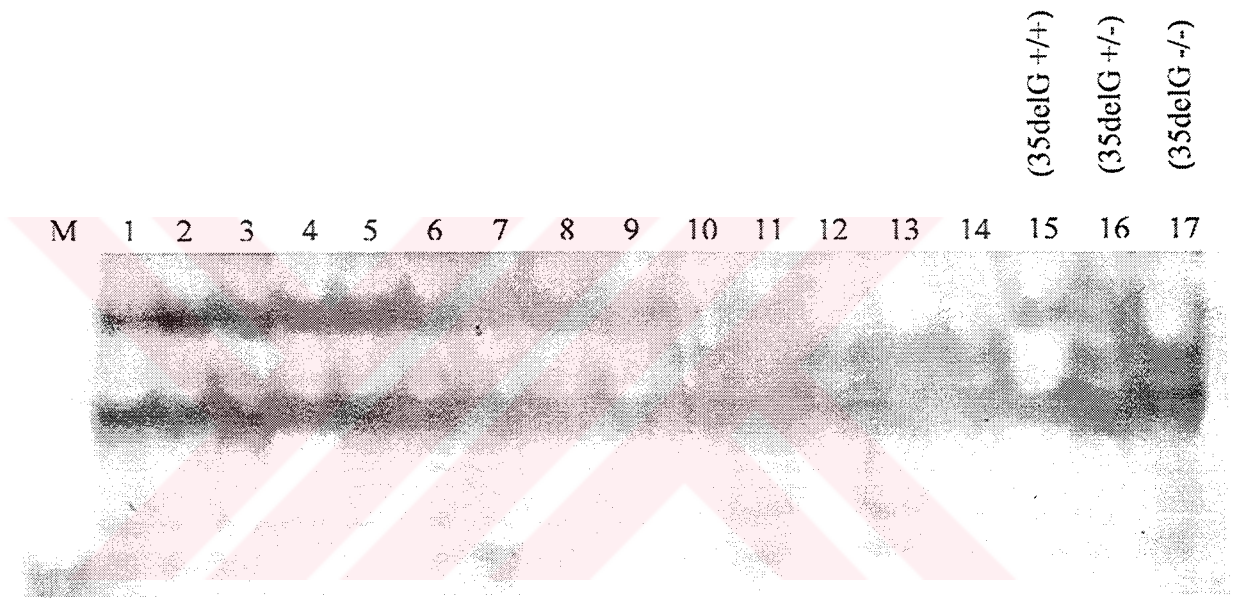
Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizdeki sağlıklı ve hasta bireyler, Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir. İlk olarak, iki ailemizden seçilen bireylerde, Cx26 geninin 942bc.’lik ekzon bölgesi DNA dizi analizine alınmış ve hastaların 35delG mutasyonunu homozigot (mutasyonun her iki allelde taşınması) olarak taşıdıkları tespit edilmiştir. 35delG mutasyonunun DNA dizi analizi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. 35delG mutasyonunun DNA dizi analizi

4.2. Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizdeki 69 Bireyde SSCP Yöntemi ile 35delG Mutasyon Analizi

İkinci adım olarak, Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizdeki tüm hasta ve sağlıklı bireylerde, 35delG mutasyonunu kapsayan 102bç.'lik bölge PCR ile çoğaltılarak, SSCP analizine alınmıştır. 35delG mutasyonunun SSCP metodu ile analizine ait örnek fotoğraf, Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 35delG mutasyonunu kapsayan 102bç.'lik bölgenin SSCP metodu ile analizi

- M → Moleküler ağırlık belirleyicisi (Φ x174/Hae III)
 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 → 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bireyler (35delG+/+)
 10, 11 → 35delG mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan bireyler (35delG+/-)
 12, 13, 14 → 35delG mutasyonunu her iki allelinde de taşımayan bireyler (35delG-/-)
 15, 16, 17 → Kontrol bireyler

(%8'lik nondenatüre poliakrilamid jel, 250V, 10mA, 17 saat)

Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizdeki 69 bireyin 35delG mutasyon analizi sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Sonuçların aile ağaçları üzerindeki yerleşimi Şekil 4.4’de gösterilmektedir.

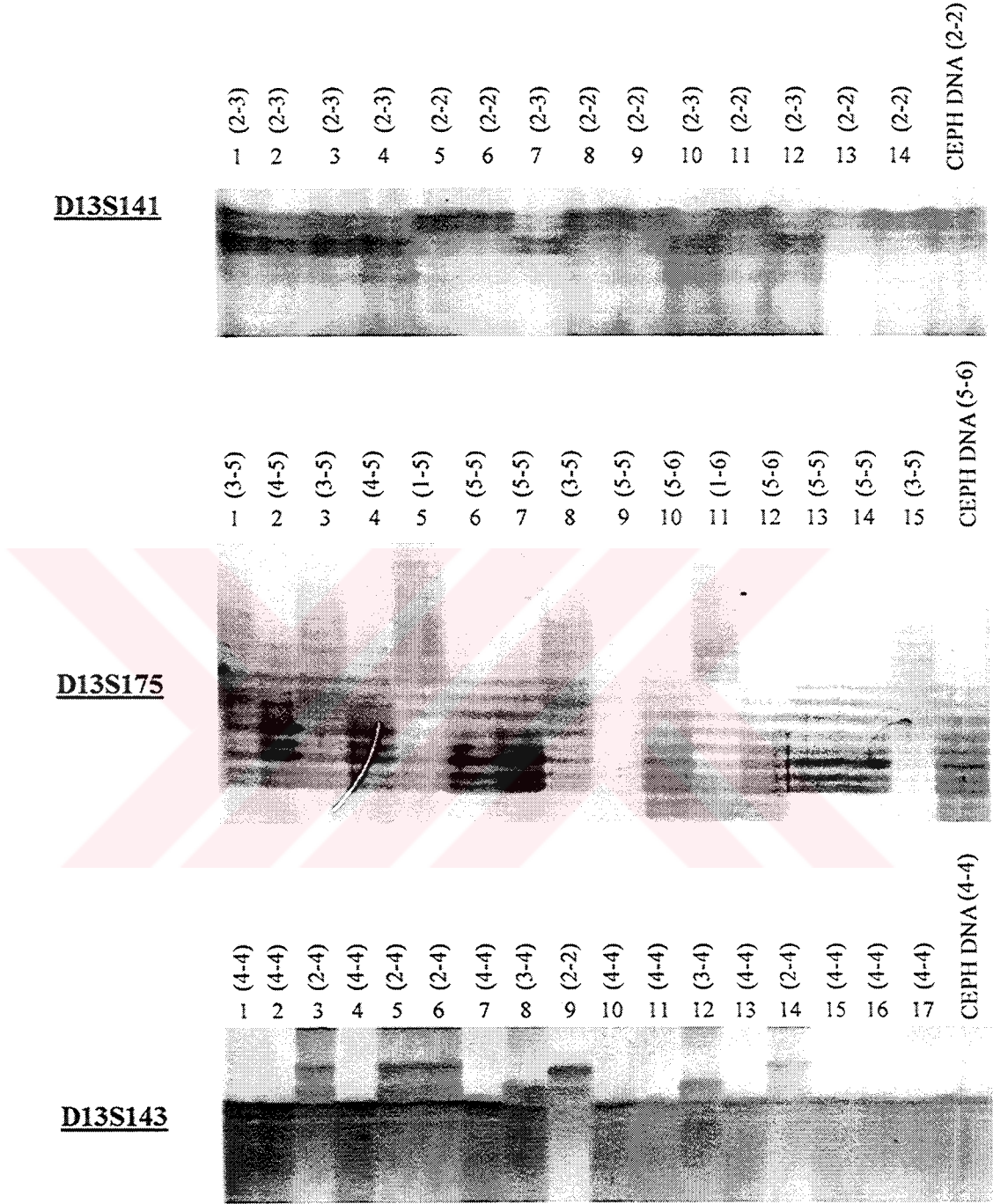
Tablo 4.1. Doğu Karadeniz kökenli iki ailedeki bireylerin 35delG mutasyon analizi sonuçları

		<u>35delG +/+</u>	<u>35delG +/-</u>	<u>35delG -/-</u>
<u>1. AİLE</u>	21 hasta birey	21	-	-
	34 sağlıklı birey	-	31	3
<u>2. AİLE</u>	11 hasta birey	10	1	-
	3 sağlıklı birey	-	3	-

35delG mutasyonunu, birinci ailemizdeki tüm hastaların homozigot olarak taşıdığı bulunmuştur. İkinci ailemizde, 35delG mutasyonunun 10 hastada homozigot, bir hastada ise heterozigot olarak (mutasyonun tek bir allelde taşınması) taşıdığı tespit edilmiştir.

4.3. Doğu Karadeniz Kökenli İki Ailemizde Haplotip Analizi ve Mutant Kromozomlarda 2-6-4 Ortak Haplotipinin Tespiti

Her iki Doğu Karadeniz kökenli ailemizde, 35delG mutasyon analizleri yapılmış olan sağlıklı ve hasta bireylerde, Cx26 gen bölgesine en yakın D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak haplotip analizi yapılmıştır. Polimorfik belirleyicilerin 35delG mutasyon bölgesine uzaklıkları sırasıyla 39.204bç., 84.718bç., ve 1.510.295bç.’dir. Birinci ailemizden 47 birey ve ikinci ailemizdeki tüm bireyler haplotip analizine alınmıştır. Haplotip analizlerine ait örnek fotoğraflar Şekil 4.3’de verilmiştir.

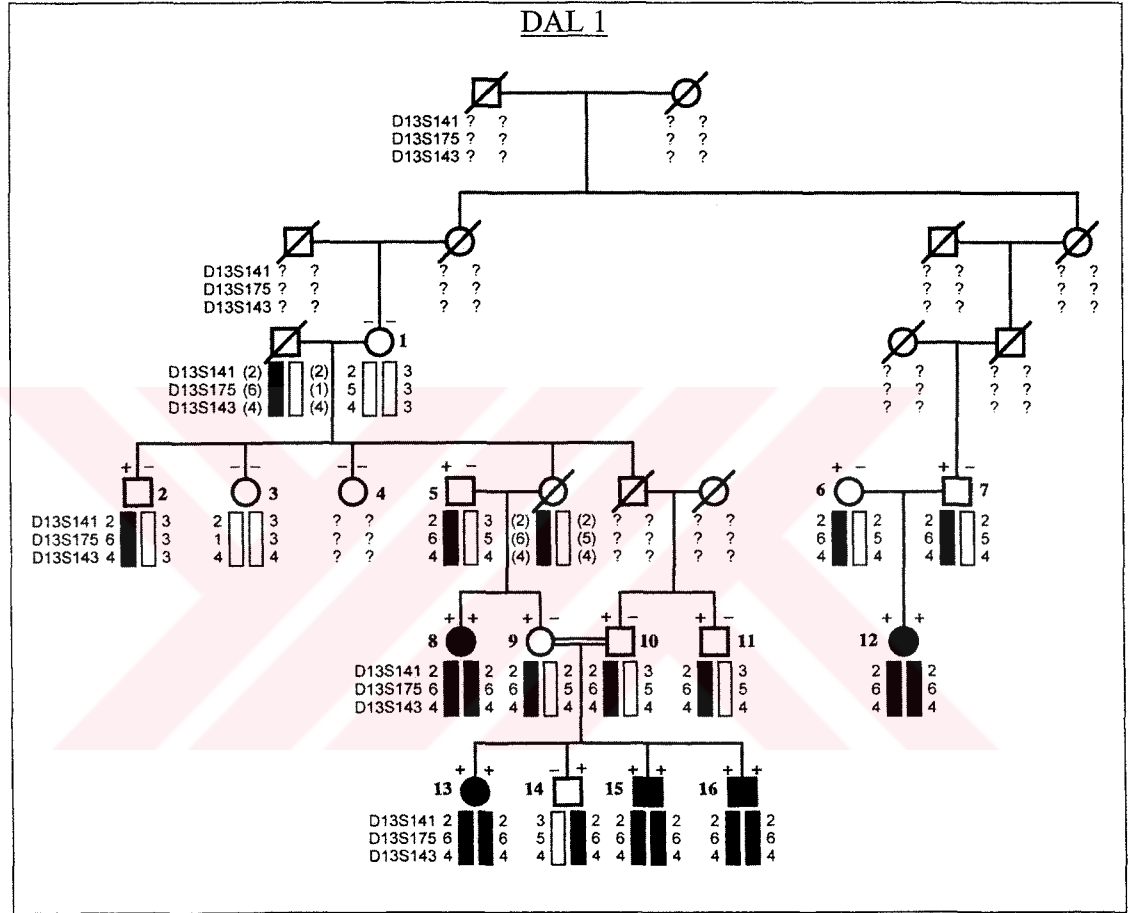


Şekil 4.3. D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak yapılan haplotip analizleri

(%7'lik denatüre poliakrilamid jel, 1600V, 34mA, 2.5 saat)

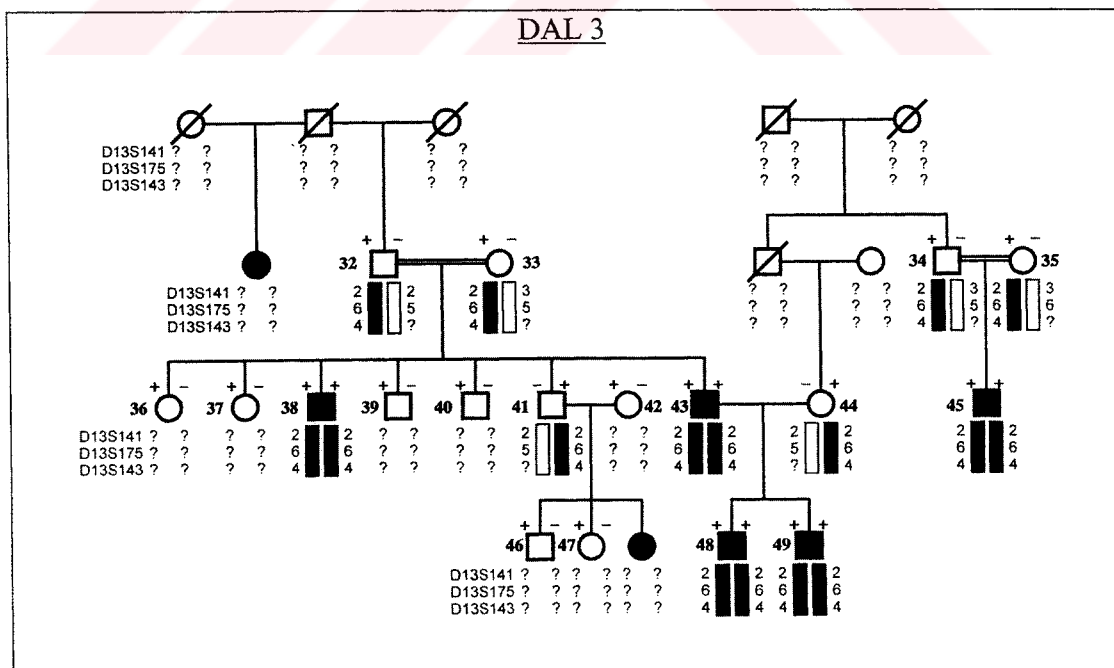
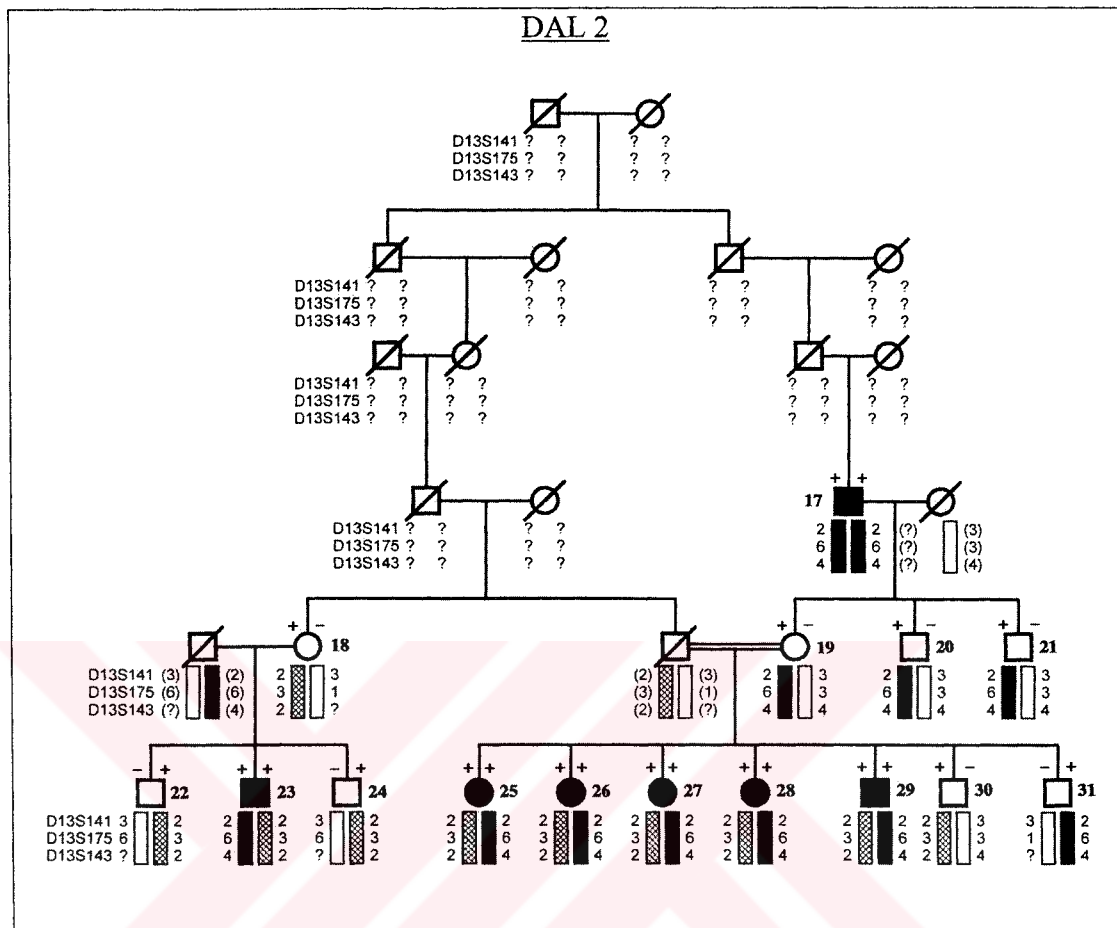
İki ailemize ait haplotip analizi sonuçları Şekil 4.4'de aile ağaçları üzerinde gösterilmiştir.

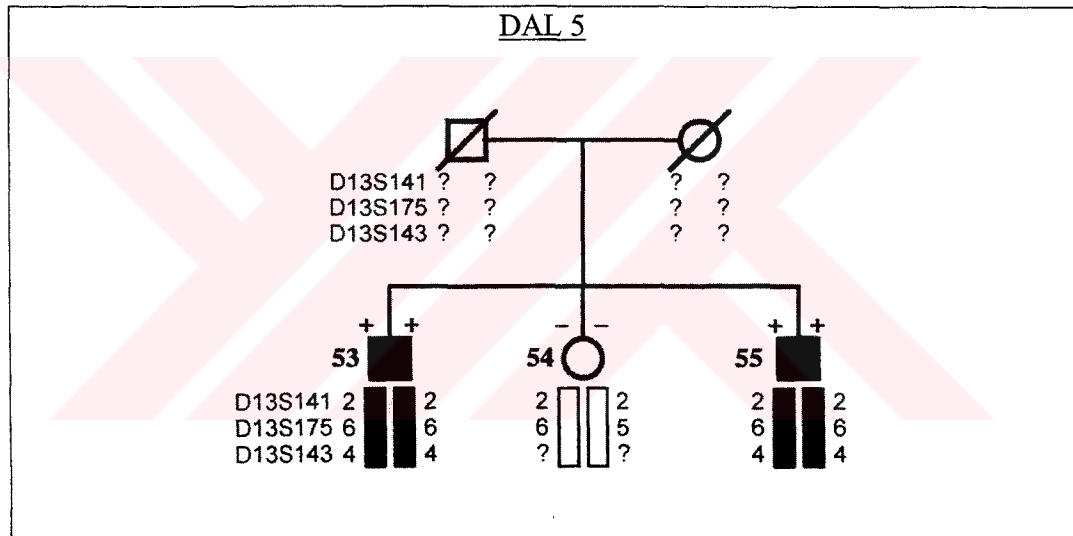
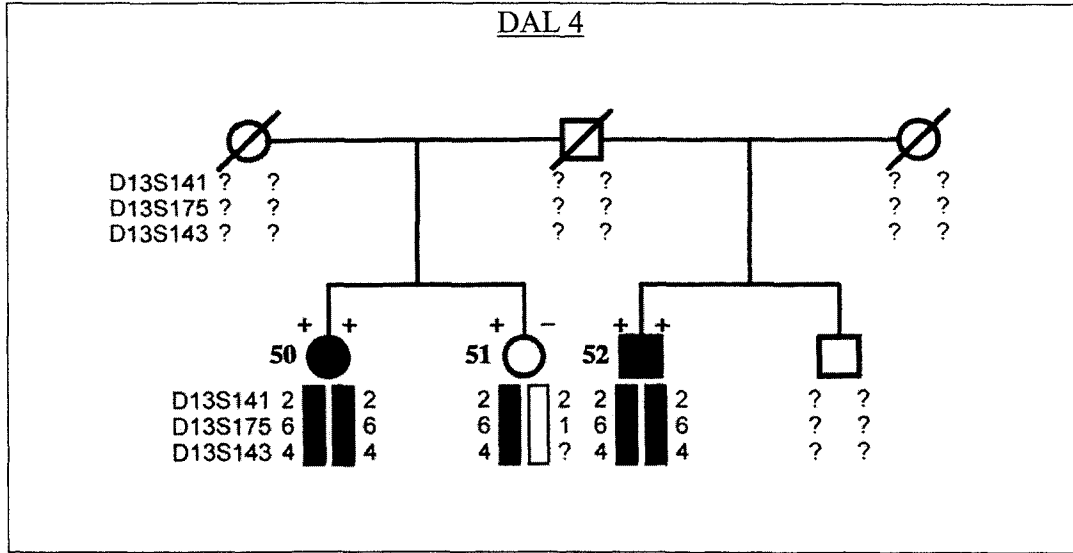
(a) Doğu Karadeniz kökenli birinci ailemize ait haplotip analizi sonuçları



+/+ = 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bireyler
 +/- = 35delG mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan bireyler
 -/- = 35delG mutasyonunu her iki alelinde de taşımayan bireyler

- * Haplotiplerin aile ağacı üzerinde daha kolay izlenebilmesi açısından taşıyıcı bireyler +/- sembolü ile gösterilmiştir.
- * Sonuçların detaylı aile ağacı (EK 1) ile karşılaştırılabilmesi için sadece incelenen bireylere numara verilmiştir.





→ 35delG mutasyonunu taşıyan 2-6-4 haplotipli kromozomlar

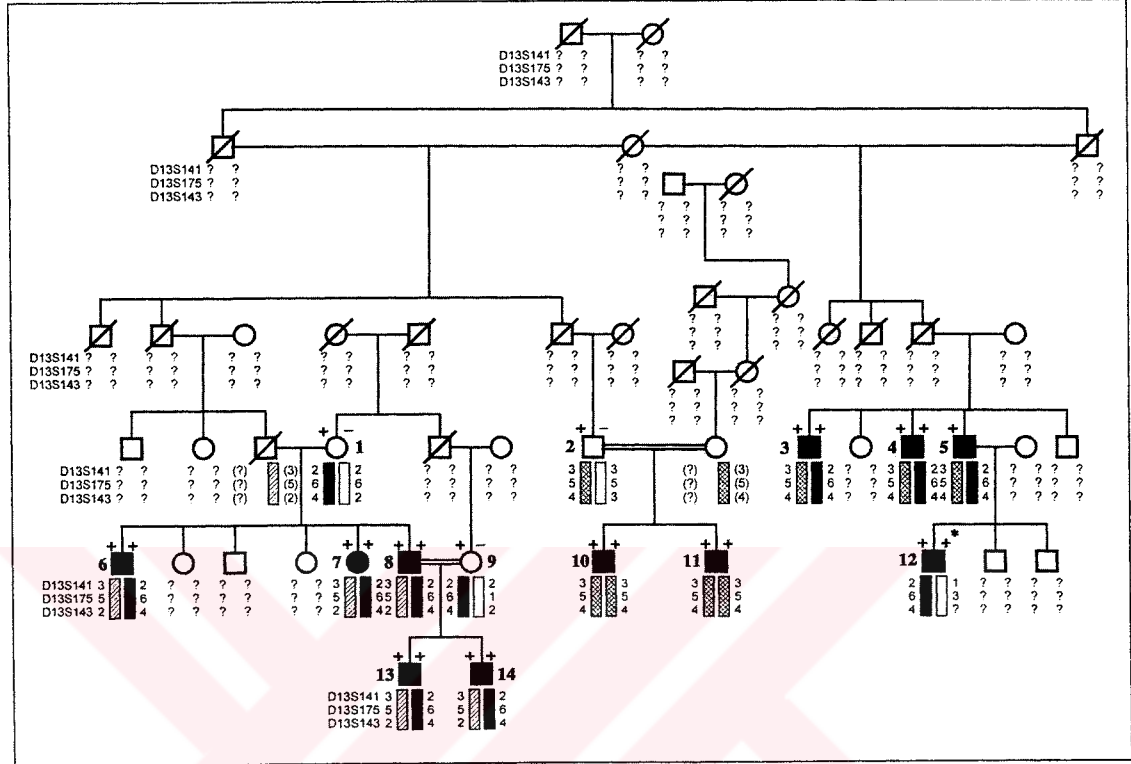


→ 35delG mutasyonunu farklı haplotiplerle taşıyan kromozomlar

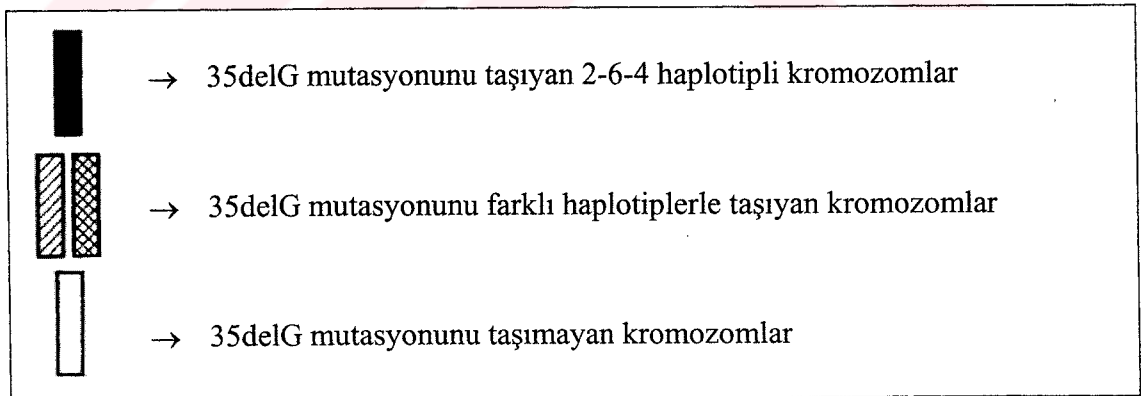


→ 35delG mutasyonunu taşımayan kromozomlar

(b) Doğu Karadeniz kökenli ikinci ailemize ait haplotip analizi sonuçları



* 35delG mutasyonunu heterozigot olarak tek bir allelinde taşıyan 12 no'lu hasta, ikinci allelinde Cx26 geninde görülen 184-186delGAG mutasyonunu taşımaktadır.



Şekil 4.4. Doğu Karadeniz kökenli iki ailemize ait haplotip analizi sonuçları

D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak yapılan haplotip analizleri sonucunda birbirleriyle akrabalık ilişkisi olmayan Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizde, mutant kromozomlarda görülen 2-6-4, ortak haplotip olarak belirlenmiştir. Bu iki ailemizde, 2-6-4 haplotipli mutant kromozomlar sayıldığında, birinci ailemizde, ailesel 2-6-4 haplotipinin dışında, aile ile akrabalığı olmayan dört Doğu Karadeniz kökenli bireyin 35delG mutasyonunu, 2-6-4 haplotipli kromozomlar ile aile içine taşıdığı saptanmıştır. İkinci ailemizde ise, 35delG mutasyonunu 2-6-4 haplotipli kromozomlarda taşıyan (birbirleriyle ve aile ile akrabalık ilişkisi bulunmayan) iki birey tespit edilmiştir. Sonuç olarak iki ailemizde, 2-6-4 haplotipli toplam 7 mutant kromozom tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

2-6-4 haplotipi her iki ailede de, sadece 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipi olup, mutasyonun taşınmadığı sağlıklı kromozomlarda bulunmamaktadır. Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizde 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan tüm haplotipler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Doğu Karadeniz kökenli iki ailemizde 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipleri (Kaynak: Şekil 4.4, EK 1)

AİLE NO	35delG mutasyonu taşıyan kromozomların haplotipleri	Haplotiplerin kökeni
(1)	2-6-4	ailesel haplotip
	2-6-4	7 no'lu birey
	2-6-4	52 no'lu bireyin annesi
	2-6-4	52 no'lu bireyin babası
	2-6-4	53/54/55 no'lu bireylerin annesi
	2-3-2	ailesel haplotip
(2)	2-6-4	6/7/8 no'lu bireylerin annesi
	2-6-4	3/4/5 no'lu bireylerin annesi
	3-5-2	6/7/8 no'lu bireylerin babası
	3-5-4	ailesel haplotip

4.4. Türkiye Genelinde, Doğu Karadeniz Bölgesi Dışında Farklı Kökenlerden Gelmiş Olan 13 Hastanın 35delG Mutasyonu Taşıyan Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi

Türkiye genelinde farklı kökenlerden gelmiş olan, 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıyan hastaların mutant kromozomlarında, Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipinin durumunu analiz etmek amacıyla, nonsendromik prelingual işitme kaybı tanısı alan 72 hasta incelemeye alınmıştır. 72 hasta ilk olarak Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir. SSCP metodu kullanılarak yapılan analizler sonucunda; 72 hastanın 9'unun 35delG mutasyonunu homozigot olarak, 7'sinin heterozigot olarak taşıdığı tespit edilirken, 56 hastanın mutasyonu her iki allelinde de taşımadığı sonucuna ulaşılmıştır. 72 hastanın 35delG mutasyon analizi sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Nonsendromik prelingual işitme kaybı tanısı alan 72 hastaya ait 35delG mutasyon analizi sonuçları

	HASTA SAYISI (n: 72)
35delG +/+	9
35delG +/-	7
35delG -/-	56

35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen toplam 16 hastadan, ebeveynlerine ulaşabildiğimiz 13'ü çalışmamız kapsamına alınmıştır. 13 hastada da, 35delG mutasyonunun ailesel olarak kalıtıldığı gösterilmiştir (Şekil 4.5).

35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastaya ait bilgiler ve hastalara verilen numaralar Tablo 4.4'de verilmiştir.

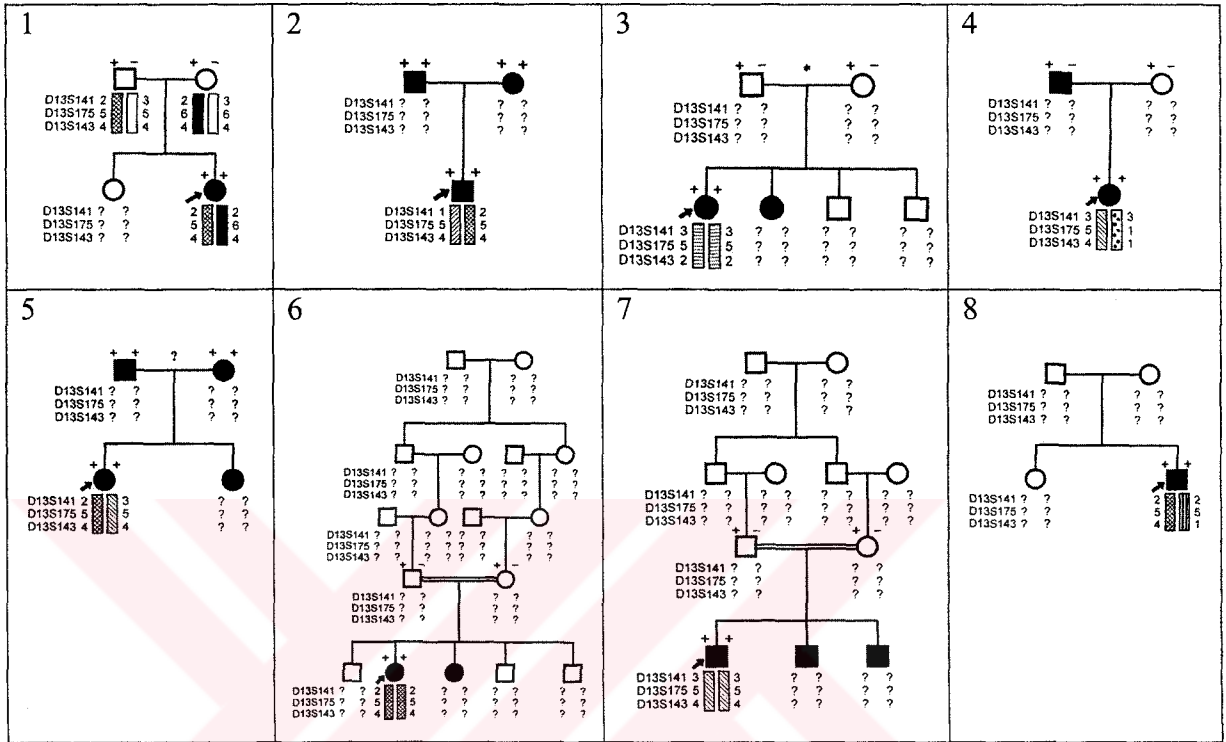
Tablo 4.4. 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastaya ait bilgiler ve hasta numaraları

35delG	HASTA NO	AKRABALIK	KÖKEN BİLGİSİ	
			ANNE	BABA
HOMOZİGOT (+ / +)	(1)	yok	Isparta/Yalvaç(Ayıplar Köyü)	Isparta/Yalvaç(Yarıkkaya Köyü)
	(2)	yok	Bolu/Gerede	Ankara/Çamlıdere
	(3)	var	Çorum/Dağönü Köyü	Çorum/Dağönü Köyü
	(4)	yok	Denizli/Acıpayam	Burdur/Yeşilova
	(5)	bilinmiyor	Ankara/Çubuk	Ankara/Çubuk
	(6)	var	Ankara/Çubuk	Ankara/Çubuk
	(7)	var	Bingöl/Solhan	Bingöl/Solhan
	(8)	yok	Kırşehir Merkez	Konya/Karaman
HETEROZİGOT (+ / -)	(9)	yok	Kayseri Merkez	Kayseri Merkez
	(10)	yok	Isparta Merkez	Isparta Merkez
	(11)	yok	Bolu/Çivril Köyü	Bolu/Aşağıkaraköy
	(12)	yok	Kastamonu/İnebolu	Kastamonu/İnebolu
	(13)	yok	Mardin Merkez	Kırşehir Merkez

13 hastanın mutant kromozomlarında, 2-6-4 haplotipinin durumunu analiz etmek amacıyla; D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak haplotip analizi yapılmıştır. Allellerin kromozom üzerindeki dizilimlerinin kesinleştirilip, 35delG mutasyonunu taşıyan kromozomların haplotiplerinin belirlenmesi amacıyla, gerekli olan hastaların (1, 9, 10, 11, 12 ve 13 no'lu hastalar) ebeveynleri haplotip analizi çalışmalarına dahil edilmiştir.

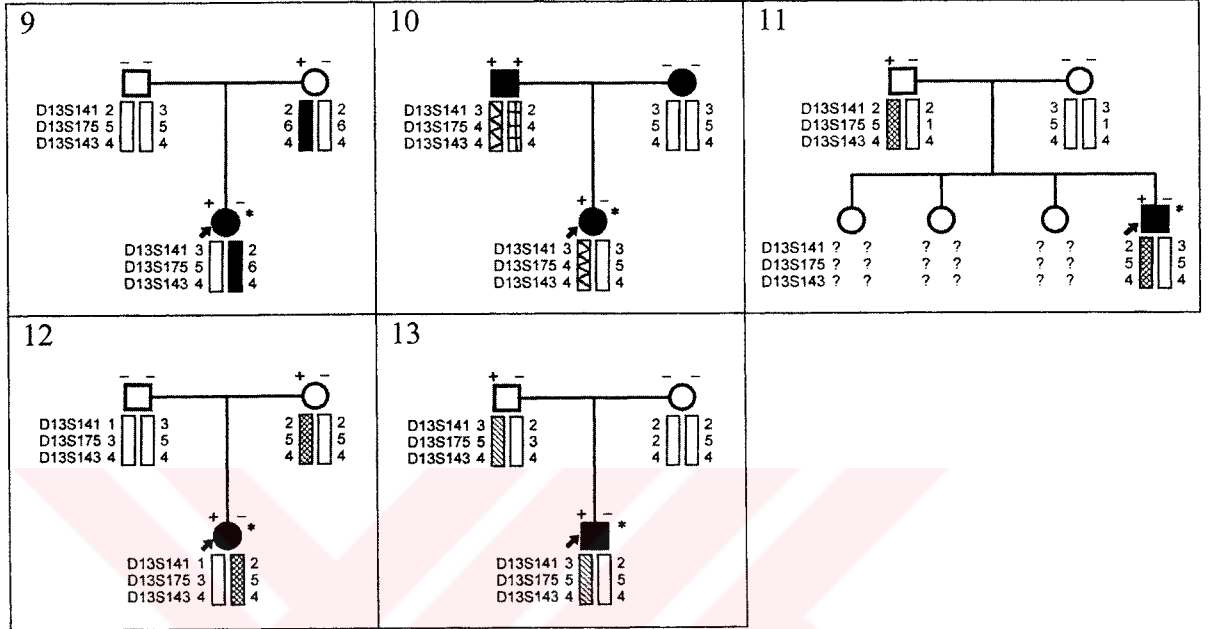
35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastanın haplotip analizi sonuçları Şekil 4.5'de aile ağaçları üzerinde gösterilmiştir.

(a) 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıdığı tespit edilen 8 hastanın haplotip analizi sonuçları



* 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan 3 no'lu bireyin ebeveynlerinin akraba oldukları bilinmektedir. Aile sorgulaması sırasında yeterli bilgi alınmadığından, akrabalık derecesi aile ağacı üzerine yerleştirilememiştir.

(b) 35delG mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 5 hastanın haplotip analizi sonuçları



* 35delG mutasyonunu heterozigot olarak tek bir allelinde taşıyan hastalar, ikinci allellerinde Cx26 geninde görülen ikinci bir mutasyon taşımaktadırlar.

Şekil 4.5. 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 13 hastanın haplotip analizi sonuçları

13 hastada yapılan haplotip analizi çalışmaları sonucunda, Türkiye genelinde 35delG mutasyonunun farklı haplotipli kromozomlarda taşındığı sonucuna varılmıştır. Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipi; mutasyonu homozigot olarak taşıyan 1 no'lu hastanın kromozomlarından birinde ve mutasyonu heterozigot olarak taşıyan 9 no'lu hastanın 35delG mutasyonunu taşıyan kromozomunda saptanmıştır. Aile sorgulaması sonucunda, hastaların kökenlerinin sırasıyla Isparta'nın Yalvaç ilçesine ve Kayseri iline dayandığı tespit edilmiştir.

Türkiye genelinde incelenen 13 hastanın 35delG mutasyonunu taşıyan kromozomlarında, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %9.52 olarak saptanmıştır. Türkiye genelinde incelenen 13 hastada 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlara ait haplotipler Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. Türkiye genelinde incelenen 13 hastada 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipleri

35delG mutasyonunun taşındığı kromozomların haplotipleri	Kromozom sayısı (n= 21)
2-6-4	2
2-5-4	8
3-5-4	5
3-5-2	2
3-4-4	1
2-5-1	1
3-1-1	1
1-5-4	1

4.5. Doğu Karadeniz Kökenli 8 Hastanın 35delG Mutasyonu Taşıyan Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi

Çalışılan 13 hasta arasında kökeni Doğu Karadeniz Bölgesi’ne dayanan bulunmamaktadır. Bu nedenle; en az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi’nde (Trabzon/Rize) yaşamış oldukları bilinen 8 hastanın mutant kromozomlarında, atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipinin durumu analiz edilmiştir.

8 hastanın mutasyon analizleri, KTÜ. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yapılmış olup, hastaların 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıdıkları ve ebeveynlerinin bu mutasyon açısından taşıyıcı bireyler oldukları saptanmıştır.

35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan Doğu Karadeniz kökenli 8 hastada, D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak haplotip

analizi çalışmaları yapılmıştır. Tablo 4.6'da, çalışılan 8 hastaya ait haplotip analizi sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.6. 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan 8 Doğu Karadeniz kökenli hastanın haplotip analizi sonuçları

	MARKER	HASTA NUMARALARI							
		1*	2	3*	4*	5	6*	7	8
HASTA HAPLOTİPLERİ	D13S141	2 3	3 3	3 2	3 2	2 3	2 3	2 2	2 2
	D13S175	6 5	5 5	6 5	6 1	5 5	6 5	5 5	3 3
	D13S143	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
AKRABALIK		-	+	-	-	+	-	+	+

* Hastaların ebeveynleri haplotip analizi çalışmalarına dahil edildiğinden allellerin kromozom üzerindeki diziliminde hata yoktur.

Doğu Karadeniz kökenli 8 hastanın haplotip analizleri sonucunda, atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipi, iki hastanın (1 ve 6 numaralı hastalar) birer kromozomlarında saptanmıştır.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %39.13 olarak saptanmıştır (Tablo 4.2 ve Tablo 4.6).

Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 2-6-4 haplotipinin 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki dağılımı Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 2-6-4 haplotipinin 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki dağılımı

Kromozomlar	Türkiye Geneli	Doğu Karadeniz Bölgesi (Trabzon&Rize)
2-6-4 haplotipi (+) 35delG mutasyonu (+)	2 (%9.52)	9* (%39.13)
2-6-4 haplotipi (-) 35delG mutasyonu (+)	19 (%90.48)	14 (%60.87)
TOPLAM	21	23

* Doğu Karadeniz kökenli 8 hastanın iki kromozomunda ve iki geniş Doğu Karadeniz kökenli ailemizin yedi kromozomunda 35delG mutasyonu 2-6-4 haplotipi ile taşınmaktadır.

4.6. Mutant Kromozomlarda 2-6-4 Haplotipinin Görülme Sıklığının, Türkiye Geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi Arasında Karşılaştırılması

35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipinin, Türkiye genelindeki görülme sıklığı (%9.52) ile Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki görülme sıklığı (%39.13) χ^2 Testi (2x2) kullanılarak karşılaştırılmıştır. Aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunması ile ($\chi^2=5.13$ / df.=1/ p=0,023) Doğu Karadeniz Bölgesi'ne özgül olarak, mutasyonun 2-6-4 haplotipli kromozomlarında taşındığı saptanmıştır.

4.7. Mutant Kromozomlarda Saptanan Tüm Haplotiplerin Görülme Sıklıklarının, Türkiye Geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi Arasında Karşılaştırılması

35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan tüm haplotiplerin görülme sıklıkları, Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi arasında karşılaştırıldığında da, 2-6-4 haplotipinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır. ($\chi^2=4.1$ / df.=1/ p=0,04). Mutant kromozomlarda saptanan, 2-6-4 dışındaki diğer haplotiplerin her iki grup yönünden görülme sıklıkları arasında belirgin bir fark saptanamamıştır. Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan haplotiplerin görülme sıklıkları Tablo 4.8'de gösterilmektedir.

Tablo 4.8. Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 35delG mutasyonunun taşıdığı kromozomlarda saptanan haplotiplerin görülme sıklıkları

35delG MUTASYONU TAŞIYAN KROMOZOMLARIN HAPLOTİPLERİ	KROMOZOM SAYISI	
	TÜRKİYE GENELİ	DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ
2-6-4	2 (%9.52)	9 (%34.5)
2-5-4	8 (%38.1)	4 (%16.7)
3-5-4	5 (%23.8)	6 (%23.1)
3-5-2	2 (%9.52)	1 (%3.8)
3-4-4	1 (%4.8)	- (%0)
2-5-1	1 (%4.8)	- (%0)
3-1-1	1 (%4.8)	- (%0)
1-5-4	1 (%4.8)	- (%0)
3-6-4	- (%0)	2 (%7.7)
2-1-4	- (%0)	1 (%3.8)
2-3-4	- (%0)	2 (%7.7)
2-3-2	- (%0)	1 (%3.8)
TOPLAM	21	26

4.8. Doğu Karadeniz Bölgesi Kontrol Populasyonundaki Taşıyıcı Bireylerin Mutant Kromozomlarında 2-6-4 Haplotipinin Analizi

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki kontrol populasyonunda (işitme kaybı görülmeyen, en az üç nesil boyunca bu bölgede yaşamakta olan ve birbirleriyle akrabalığı olmayan bireyler), 35delG mutasyonu taşınan kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığına bakmak amacıyla, 50 kişide (100 kromozom) 35delG mutasyonu taraması yapılmıştır. Doğu Karadeniz Bölgesi kontrol populasyonunda taranan 100 kromozom içinde 35delG mutasyonunu taşıyan kromozom saptanamamıştır.

4.9. 2-6-4 Haplotipinin Görülme Sıklığının, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Sağlıklı ve Mutant Kromozomlar Arasında Karşılaştırılması

Doğu Karadeniz Bölgesi için, 2-6-4 haplotipinin atasal haplotip olduğunun desteklenmesi amacıyla, bu haplotipin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki sağlıklı

kromozomlardaki görülme sıklığı ile 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki görülme sıklığı karşılaştırılmıştır. Sağlıklı kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığını belirlemek için, çalışılan bireylerin anne ve babalarına ulaşmak gerekmektedir. Ancak bu şekilde, allellerin kromozom üzerindeki dizilimleri tespit edilerek haplotipler oluşturulabilir. Sağlıklı bireylerin ebeveynlerine ulaşmanın imkansızlığı nedeniyle; Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonu ile beraber kalıtıldığını düşündüğümüz 6 no'lu allelin frekansı Doğu Karadeniz kökenli kontrol popülasyonunda hesaplanmış (%14.3) ve tüm 6 no'lu alleli bulunduran kromozomların 2-6-4 haplotipli olduğu varsayılmıştır. (Çalışmalarımız sırasında 6 no'lu allel, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki sağlıklı kromozomların aksine, 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda sık görülmüş, mutasyon ile birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki olduğu düşünülmüştür. Bunun yanısıra, tüm ailelere ait aile ağaçları incelendiğinde; D13S141'in 2 no'lu, ve D13S143'ün 4 no'lu allelleri mutant ve sağlıklı tüm kromozomlarda çok sık görülürken, D13S175'e ait 6 no'lu allel özellikle 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda sık görülmüştür).

2-6-4 haplotipinin; Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki sağlıklı kromozomlardaki görülme sıklığı (%14.3) ile 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki görülme sıklığı (%39.13) χ^2 Testi (2x2) kullanılarak karşılaştırılmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=7.46 / df.=1/ p\leq 0,01$).

Orta Doğu'dan köken alıp Neolitik popülasyonların göçleriyle iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülen 35delG mutasyonu, ikinci rotayı takiben Tuna ve Ren vadileri ile Kuzey Avrupa'ya doğru ilerlerken, popülasyonumuz gen havuzuna 2-6-4 atasal haplotipli kromozomlar ile Doğu Karadeniz Bölgesinden girmiş olabilir. Çalışmalarımız sonucunda 35delG mutasyonunun; Türkiye genelindeki diğer bölgelerden farklı olarak, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 2-6-4 haplotipli kromozomlarda taşındığı, dolayısı ile bu bölgede mutasyonun taşındığı atasal kromozomların haplotipinin 2-6-4 olduğu sonucuna varılmıştır.

TARTIŞMA

İşitme kaybı, iç kulakta görülen hataların en sık rastlanana olmakla beraber, gelişmiş ülkelerde işitme kayıplarının yaklaşık olarak %60'ı genetik bir nedene bağlı olarak meydana gelmektedir (2). Prelingual nonsendromik (izole form) işitme kayıpları; sık karşılaşılan kalıtsal sensör hatalardan olup, otozomal resesif kalıtım gösteren formları (DFNB), işitme kayıplarının yaklaşık %80'inden sorumludur (4). Nonsendromik işitme kaybına neden olan genler içinde en önemli yeri, DFNB1 lokusunda sorumlu gen olan “*Connexin 26*” (GJB2 / Cx26) tutmaktadır (4,12).

Bu gendeki mutasyonların, resesif kalıtılan prelingual işitme kayıplarının yaklaşık %50'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (8). Şu ana kadar Cx26 proteinini kodlayan bu gende 93 mutasyon tanımlanmış olup arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşan 35delG (30delG) mutasyonu, en sık rastlanan mutasyondur (6,9). Cx26 mutant allellerinin %82'sinde bulunan 35delG mutasyonu, otozomal resesif kalıtım gösteren ailelerde ve sporadik vakalarda genetik nedene bağlı işitme kaybının temel etkeni olarak gösterilmiştir (10).

İlk yapılan çalışmalar sonucunda, Akdeniz çevresi, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli, otozomal resesif kalıtılan işitme kaybı olgularının yaklaşık yarısı bu mutasyona bağlı olarak ortaya çıktığından; 35delG populasyonlar arasında sık tekrarlayan (“*recurrent*”) bir mutasyon olarak kabul edilmiştir (4,12). Fakat ilerleyen zamanlarda coğrafi, etnik ve kültürel açıdan farklı populasyonlar arasında, 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansında görülen değişiklikler, bu mutasyonun çok eski dönemlerde oluşan, ortak bir atadan türeyen atasal (“*founder*”) bir mutasyon olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır (10).

35delG mutasyonunun ülkeler arasındaki taşıyıcı frekansı değerleri ve hesaplanan yaşı, onun Avrupa, Akdeniz Bölgesi ve İngiltere'ye yayılışı hakkında birtakım ipuçları vermektedir. Mutasyonun Orta Doğu'dan köken aldığı ve Neolitik populasyonların göçleriyle iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmektedir. Buna göre birinci rota Akdeniz kıyılarını takiben İtalya ve İspanya,

ikinci rota ise Tuna ve Ren vadileri ile Kuzey Avrupa olmakla beraber göçler sonucunda Avrupa'dan Amerika'ya doğru ilerlemiştir (13).

Türkiye coğrafi konumu nedeniyle bu iki mutasyon göç rotasının da üzerinde yer almaktadır. Orta Doğu'nun başlı başına büyük ülkelerinden biri olan Türkiye; Asya ve Avrupa arasında köprü görevi görmesi nedeniyle, tarih öncesi zamanlarda etnik, irksal ve kültürel açıdan birçok farklı popülasyonu bünyesinde barındırmış ve Çin'i Batı'ya bağlayan eski bir ticaret yolu olan İpek Yolu'nun üzerinde yer almıştır (42,43). Bu nedenle, genetik heterojenitenin görüldüğü ülkemizin, 35delG mutasyonunun popülasyonların gen havuzlarına katılmasında önemli bir rol oynadığı düşünülebilir.

Popülasyonlarda, ortak atadan bahsetmek, ancak popülasyonlar arasında yapılan haplotip analizi çalışmaları sonucunda ortak haplotipin tespit edilmesiyle mümkündür (13). Ortak haplotipin bulunması, mutasyon ile komşu polimorfizmlerin birlikte kalıtıldığını göstermektedir. Haplotip analizi ile gene yakın veya gen içi polimorfik belirleyiciler kullanılarak mutant ve normal kromozomlar tiplendirilmektedir (40). Kullanılan polimorfik belirleyici ve hastalık lokusu birbirine ne kadar yakınsa, rekombinasyon olasılığı o kadar küçüktür ki, bu da ortak haplotipin ortaya çıkarılmasında önemlidir (44).

35delG mutasyonunun çok eski dönemde oluşmuş bir mutasyon olması nedeniyle, ortak haplotip ancak çok dar bir kromozom aralığında gözlenebileceğinden, yapılan haplotip analizi çalışmalarında mutasyon bölgesine en yakın polimorfik belirleyiciler kullanılmalıdır (13,14). Nitekim, Belçika, İngiltere ve Amerika'daki beyaz ırkta yapılan haplotip analizi çalışmalarında, üç popülasyon arasında, 76 kb.'lık bir bölgede ortak haplotip gözlenmiş, mutasyon bölgesine 731bç. uzaklıkta bulunan bir SNP ile mutasyonun birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki bulunarak, mutasyonun atasal bir orijini olabileceği yönünde ilk kesin kanıtlar elde edilmiştir (13). Haplotip analizi çalışmamızda, SNP polimorfik belirleyicilerinin çalışılmasındaki zorluklar nedeniyle, Cx26 gen bölgesine en yakın D13S141, D13S175 ve D13S143 (CA)n polimorfik belirleyicileri kullanılmıştır. Belirleyicilerin

35delG mutasyon bölgesine uzaklıkları sırasıyla 39.204bç., 84.718bç., ve 1.510.295bç.'dir. Türkiye popülasyonunda akraba evliliği oranının yüksek olduğu (%20-25) (45) düşünülecek olursa, mutasyon bölgesini çevreleyen 1.471.091bç.'lik bir bölgede de ortak haplotip gözlemek mümkündür.

Yapmış olduğumuz ön çalışmamızda; en az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi'nin Trabzon ilinde yaşamakta olan iki geniş ailemizde, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan 2-6-4 haplotipi, ortak haplotip olarak tespit edilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi (Trabzon ili ve çevresi), 35delG mutasyonunun göç rotası üzerinde yer aldığından, bu mutasyonun Türkiye popülasyonuna katıldığı bölgelerden biri olma ihtimali yüksektir. Bu nedenle planladığımız bu çalışmamızda; 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan 2-6-4 haplotipinin, Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olma özelliği araştırılmıştır.

Yüzyıllar boyunca önemli bir liman kenti ve ticaret merkezi olma niteliğini koruyan, 35delG mutasyonu ikinci göç rotasının üzerinde yer alan Doğu Karadeniz Bölgesinin Trabzon ili, M.Ö.7. yüzyılda kurulmuş olup, aynı yüzyılda sırasıyla İyon kökenli Miletoslular, Kafkasya'dan gelen Kimmerler ve İskitlerin akınına uğramıştır. M.Ö.6. yüzyılda ise Perslerin egemenliğine giren Trabzon M.Ö. 280 yılında Pontus devleti sınırları içinde kalmıştır. M.Ö 66 yılında Roma yönetimine girmiş, 276 yılında Doğu Karadeniz Bölgesi'ne akınlar yapan Gotların saldırısına uğramış ve 395 yılında Roma/Bizans İmparatorluğu'na dahil edilmiştir. Müslüman Araplar 8. yüzyılın başlarından itibaren Doğu Karadeniz Bölgesi ve Trabzon'a göç etmişlerdir. 1297-1330 yılları arasında ise İtalya'dan gelen denizciler Trabzon yönetimini ellerine geçirmişlerdir. Birinci Dünya Savaşı'nda Ruslar tarafından işgal edilen kent 1918 yılında Türkiye sınırlarına dahil edilmiştir (46). Bütün bu tarih süreci boyunca birçok popülasyonun dış göçlerine maruz kalan ve çok eski bir yerleşim bölgesi olan Trabzon, yaklaşık olarak 500 jenerasyon önce oluşmuş bir mutasyon olan 35delG'nin popülasyonumuz gen havuzuna katıldığı bölgelerden biri olma olasılığını taşımaktadır.

İki geniş Doğu Karadeniz kökenli ailemize ek olarak, en az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (Trabzon & Rize) yaşamış oldukları bilinen 8 hasta, Cx26 gen bölgesine en yakın D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak haplotip analizine alınmıştır. Haplotip analizi çalışmalarımız sonucunda, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %39.13 olarak hesaplanmıştır. Türkiye genelinde, Doğu Karadeniz Bölgesi dışında farklı kökenlerden gelmiş olan, 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot formda taşıyan hastaların mutant kromozomlarında da, 2-6-4 haplotipinin durumu analiz edildiğinde; Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipi, 35delG mutasyonu taşıyan 21 kromozomdan sadece ikisinde saptanmıştır. Hastaların aile sorgulamasında kökenlerinin Doğu Karadeniz Bölgesine dayanmadığı tespit edilmiştir. Türkiye geneline bakıldığında, 13 hastanın 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarında, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %9.52 olarak saptanmıştır.

35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda; Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal haplotip olduğunu düşündüğümüz 2-6-4 haplotipinin, Türkiye genelindeki görülme sıklığı (%9.52) ile Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki görülme sıklığı (%39.13) χ^2 Testi (2x2) kullanılarak karşılaştırılmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($\chi^2=5.13/ df.=1/ p=0.023$). 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan tüm haplotiplerin görülme sıklıkları, Türkiye geneli ile Doğu Karadeniz Bölgesi arasında karşılaştırıldığında da; 2-6-4 dışındaki diğer haplotiplerin her iki grup yönünden mutant kromozomlardaki görülme sıklıkları arasında belirgin bir fark saptanamazken, 2-6-4 haplotipinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($\chi^2=4.1/ df.=1/ p=0.04$).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 35delG mutasyonu taşıyan 2-6-4 haplotipli kromozomlar için Türkiye genelinin aksine saptanmış olan bu yüksek değer (%39.13) ve sağlıklı kromozomlar ile 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklıkları arasında gözlenen anlamlı farklılık ($\chi^2=7.46/ df.=1/ p\leq 0,01$), bize mutasyonun Doğu Karadeniz Bölgesi'ne 2-6-4 haplotipli kromozomlar ile katıldığını kanıtlamış, bölgeye ve o bölgede yaşayan

populasyona özgül bir profil ortaya çıkarmıştır. 35delG mutasyonu, Türkiye populasyonu gen havuzuna Doğu Karadeniz Bölgesi'nden atasal 2-6-4 haplotipli kromozomlar ile girdikten sonra, zamanla ülkemizin diğer bölgelerine kaymış ve uzun yıllar sürecinde birçok farklı etnik kökenlerin populasyonumuza dahil olmasıyla Türkiye genelindeki mutant kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı düşmüştür.

Türkiye, Doğu Karadeniz Bölgesi dışında, Akdeniz Bölgesi ile birinci mutasyon göç rotasının da üzerinde yer almaktadır. Bu bize, 2-6-4 haplotipi dışında Türkiye genelinde 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda görülen diğer haplotiplerin, farklı atalar ile Akdeniz kıyılarından populasyonumuza dahil edilebileceğini düşündürmektedir. Bu olasılığın kesinlik kazanması ancak farklı haplotipli kromozomları taşıyan bireylerin kökenlerinin detaylı olarak araştırılmasıyla mümkün olacaktır. Bunun yanısıra, 35delG mutasyonunun yaklaşık 500 kuşak önce meydana gelen bir mutasyon olduğu düşünülecek olursa, populasyonumuza 2-6-4 haplotipli kromozomlarla girdikten sonra, 10.000 yıllık bir zaman süreci içerisinde rekombinasyonlarla haplotipin değişmiş olma olasılığı gözönünde bulundurulmalıdır. Mutant kromozomlarda görülen 2-6-4 haplotipi dışındaki haplotiplerin, 3-6-4, 2-5-4 gibi benzer haplotipler olması bu olasılığı da kuvvetlendirmektedir. Türkiye genelinde 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda görülen haplotiplerin çok çeşitli olmasının bir başka olası nedeni de; mutasyon oluşuktan sonraki bu uzun zaman süreci içerisinde, populasyona özgül olarak 35delG'nin farklı haplotiplerle yeniden oluşması olabilir. Fakat 2-6-4 haplotipi, Türkiye populasyonunda her ne kadar farklı haplotipler arasında dilüe olmuş da olsa, Doğu Karadeniz Bölgesi'ne özgül olarak 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda gözlenmektedir. Bu da bize 2-6-4 haplotipinin Türkiye için coğrafi kökeninin Doğu Karadeniz Bölgesi olduğunu, populasyonumuz gen havuzuna bu bölgeden atasal bir etki ile girdiğini göstermektedir.

Türkiye genelinde, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda görülen diğer haplotipler, sağlıklı kromozomlarda sık olarak görülürken, 2-6-4 haplotipinin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki 35delG mutasyonu taşımayan sağlıklı

kromozomlarda düşük frekansta görülmesi, bunun yanısıra çalıştığımız hastalar arasında 35delG dışındaki farklı mutasyonlar taşıyan kromozomlarda da görülmemesi, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonunun taşındığı atasal kromozomların haplotipinin 2-6-4 olduğunun kanıtıdır.

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki kontrol popülasyonunda (işitme kaybı görülmeyen), 35delG mutasyonu taşınan kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığına bakmak amacıyla; kökenleri en az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesine dayanan 50 bireyde 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı hesaplanmış, yapılan mutasyon analizleri sonucunda taşıyıcı birey saptanamamıştır. Daha önce yapılan üç ayrı çalışmada, Türkiye için 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansları hesaplanmış, %0.8 (47) , %2.7 (14) ve %1.8 (11) oranlarında taşıyıcı frekansı değerleri elde edilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi için incelediğimiz birey sayısı 50 kişiyle sınırlı kaldığından, %0.8'lik en düşük taşıyıcı frekansı değerini gözönüne aldığımızda bile bir taşıyıcı birey saptayabilmemiz için en az 120 birey çalışmamız gerekirdi. Doğu Karadeniz Bölgesi için hesaplanmış olduğumuz 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı değerinin, Wollnik ve grubu tarafından Türkiye popülasyonu için hesaplanmış olan %0.8'lik değere yakın olduğu düşünüldüğünde, Doğu Karadeniz Bölgesi için hesaplanan taşıyıcı frekansı değerinin Türkiye için hesaplanan değerle yaklaşık olarak aynı çıkması normaldir. Mutasyonun çok eski bir mutasyon olduğu düşünülecek olursa, gerçekleşen iç ve dış göçler, mutasyonun bölgeye ilk girdiği zamanki taşıyıcı frekansı değerini bu uzun zaman periyodunda büyük oranda düşürecektir. Bununla beraber, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sanayi; daha çok tarım, ormancılık ve balıkçılığa dayanmaktadır. Bölge sanayi kuruluşları açısından kısıtlı olduğundan, Türkiye'nin başka bölgelerine göç oranı fazladır. Bunun yanısıra, son yıllarda işitme engelliler için kurulmuş olan okullar, genellikle Ankara gibi Türkiye'nin merkez illerinde bulunduğundan, işitme engelli çocukları olan ailelerin okulların bulunduğu illere yerleşmeyi tercih ettikleri de unutulmamalıdır. Bu olasılıklar gözönünde bulundurulduğunda, Doğu Karadeniz Bölgesi için hesaplanan 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı değerinin, Türkiye için daha önce hesaplanmış olan %0.8'lik değerin üstüne çıkmaması beklenilendir.

Orta Asya'lı Türk populasyonlarına (Türkiler) ait 35delG mutasyonu frekansı hesaplamaları sonucunda, Türkiye populasyonu için hesaplanan değere yakın taşıyıcı frekansları (%0.5-1.8) elde edilmiştir (48). 2002 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, Türkiye'ye komşu ülkelerden biri olan ve birçok farklı etnik populasyondan oluşan İran'da da %1 oranında 35delG mutasyonu taşıyıcı frekansı hesaplanmıştır (49). Bu bize; çok eski bir mutasyon olan 35delG'nin oluştuktan sonra, genetik kayma ile birbirine komşu olan populasyonların gen havuzlarına katıldığını ve coğrafi konumu birbirine yakın olan populasyonlar arasında benzer taşıyıcı frekansı değerleri oluştuğunu göstermektedir.

35delG mutasyonu rekombinasyonların ve mutasyonların oluşma olasılığı yüksek bir bölgede yer almasına rağmen, tekrarlayan bir mutasyon olduğu ile ilgili kesin kanıtları elde etmek mümkün olmamaktadır. Bunun yanısıra, aynı mutasyon bir populasyonun gen havuzuna atasal bir etkiyle katılırken başka bir populasyona tamamen bağımsız olarak katılabilir. Bu nedenle birbirlerinden coğrafi, dini, ve diğer nedenlerle ayrı olan populasyonlarda aynı mutasyonun farklı haplotipli kromozomlarda görülmesi mutasyonun tekrarlayan bir mutasyon olduğunu her zaman kanıtlamaz. Hatta bizim populasyonumuz gibi farklı etnik kökenleri barındıran bir populasyonda, aynı mutasyon, atasal etkinin yanında zaman sürecinde kendiliğinden de ortaya çıkmış olabilir. Nitekim, 35delG'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (Trabzon ve Rize çevresi) 2-6-4 haplotipli kromozomlarda taşınırken, Türkiye genelinde farklı haplotipli kromozomlarda taşınması yukarıda ifade edilen görüşümüzü desteklemektedir. 1999 yılında Glaser ve arkadaşlarının ailesel hiperinsülinemi hastalarında SUR 1 (sulfonil üre reseptörü) mutasyonları için yapmış oldukları haplotip analizi çalışmalarında da sık görülen 3992-9g→a mutasyonunun 9 farklı intergenik haplotiple ilişkili olduğu ve Yahudi hastalarda tek bir atasal mutasyondan köken almasına rağmen Yahudi olmayan hastalarda bu mutasyonun bağımsız olarak oluştuğu gösterilmiştir (44). Ayrıca, populasyonlar arasında 35delG mutasyonu için benzer taşıyıcı frekanslarının görülmemesi bu mutasyonun sık tekrarlayan bir mutasyon olması olasılığını azaltırken, atasal mutasyon olduğu yönündeki görüşleri kuvvetlendirmektedir.

Populasyonlarda yapılacak olan haplotip analizi çalışmaları ile mutant ve normal kromozomların polimorfik belirleyicilerle tiplendirilmesi 35delG mutasyonunun kökeni hakkında yeni ipuçları sağlayacaktır. Bu nedenle, ileri dönemde yapmamız gereken, Doğu Karadeniz Bölgesi için atasal 2-6-4 haplotipinin, ikinci göç rotası üzerinde yer alan diğer populasyonların 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarındaki durumunun belirlenmesi olacaktır. 2-6-4 haplotipinin çalışılan populasyonların mutant kromozomlarında da gözlenmesi durumunda, 35delG mutasyonunun atasal niteliğinin olduğu yönünde yeni bir kanıt daha elde edilmiş olacaktır.



SONUÇLAR

- D13S141, D13S175 ve D13S143 polimorfik belirleyicileri kullanılarak yapılan haplotip analizleri sonucunda; birbirleriyle akrabalık ilişkisi olmayan iki geniş Trabzon kökenli ailemizde, 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan 2-6-4 haplotipi, ortak haplotip olarak tespit edildi.
- Trabzon kökenli iki ailemize ek olarak, en az üç kuşak boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (Trabzon ve Rize) yaşamış oldukları bilinen 8 hastanın 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarında 2-6-4 haplotipinin durumu analiz edildi. Çalışılan 16 mutant kromozomdan ikisinde, 2-6-4 haplotipi saptandı.
- Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %39.13 olarak hesaplandı.
- Türkiye genelinde, Doğu Karadeniz Bölgesi dışında farklı kökenlerden gelmiş olan, 35delG mutasyonunu homozigot veya heterozigot olarak taşıyan 13 hastanın mutant kromozomlarında, 2-6-4 haplotipinin durumu analiz edildi. İncelenen 21 mutant kromozomdan ikisinde, 2-6-4 haplotipi saptandı.
- Türkiye genelinde 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda, 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığı %9.52 olarak hesaplandı.
- 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin, Türkiye genelindeki görülme sıklığı (%9.52) ile Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki görülme sıklığı (%39.13) χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($\chi^2=5.13$ / df.=1/ p=0.023).

- 35delG mutasyonunun taşındığı kromozomlarda saptanan tüm haplotiplerin görülme sıklıkları, Türkiye geneli ve Doğu Karadeniz Bölgesi arasında χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldı. 2-6-4 dışındaki diğer haplotiplerin her iki grup yönünden mutant kromozomlardaki görülme sıklıkları arasında belirgin bir fark saptanamazken, 2-6-4 haplotipinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıktı ($\chi^2=4.1$ / df.=1/ p=0.04).
- 2-6-4'ün, Doğu Karadeniz Bölgesi için, 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda görülen atasal haplotip olduğunun kanıtlanması amacıyla, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki 35delG mutasyonu taşımayan sağlıklı kromozomlardaki görülme sıklığı hesaplandı. Yaklaşık %14.3 oranında değer elde edildi.
- Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, 2-6-4 haplotipinin sağlıklı kromozomlardaki görülme sıklığı (~%14.3) ile 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlardaki görülme sıklığı (%39.13) χ^2 Testi (2x2) kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($\chi^2=7.46$ / df.=1/ p \leq 0.01). 2-6-4 haplotipinin sadece 35delG mutasyonu taşıyan kromozomlarda görüldüğü dolayısı ile Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bu mutasyonun taşındığı atasal kromozomların haplotipinin 2-6-4 olduğu kanıtlandı.
- Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki kontrol popülasyonunda (işitme kaybı görülmeyen), 35delG mutasyonu taşınan kromozomlarda 2-6-4 haplotipinin görülme sıklığına bakmak amacıyla, kökenleri Doğu Karadeniz Bölgesi'ne dayanan 50 bireyde 35delG mutasyonu taraması yapıldı ve taşıyıcı birey saptanmadı.

KAYNAKLAR

1. Morton, N.E. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 630, 16-31 (1991).
2. Cohen, M.M. Jr., Gorlin, R.J. Epidemiology, aetiology and genetic patterns. In: Gorlin R.J., Toriello H.V., Cohen M.M. Jr (eds) *Hereditary hearing loss and its syndromes*. Oxford University Press, Oxford, 9-21 (1995).
3. Petit, C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat. Genet.*, 14, 385-391 (1996).
4. Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M.A. ve ark. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 6 (12), 2173-2177 (1997).
5. Belgin, E. ve ark. The children population with sensory-neural hearing loss in Türkiye. 2nd International Meeting in Audiology for Mediterranean Countries, 6th Panhellenic Meeting in Otolaryngology-Head&Neck Surgery, Thessaloniki-Greece (1991).
6. Van Camp, G., Smith, R. Hereditary Hearing Loss Homepage. (1998)
<http://dnlab-www.uia.ac.be/dnlab/hhh/>
7. Gasparani, P., Estivill, X., Volpini, V. ve ark. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness in Mediterranean families. *Eur. J. Hum. Genet.*, 5, 83-88 (1997).
8. Wilcox, S.A., Sounders, K., Osborn, A.H. ve ark. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum. Genet.*, 106, 399-405 (2000).
9. Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P. ve ark. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387, 80-89 (1997).
10. Rabionet, R., Zelante, L., Lopes-Bigas, N. Ve ark. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum. Genet.*, 106, 40-44 (2000)

11. Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G. ve ark. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 8, 19-23 (2000).
12. Carrasquillo, M.M., Zlotogora, J., Barges, S. ve ark. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 2163-2172 (1997).
13. Van Laer, L., Coucke, P., Mueller, R.F. ve ark. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J. Med. Genet.*, 38, 515-518 (2001).
14. Tekin, M., Akar, N., Cin, Ş. ve ark. Connexin 26(GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum. Genet.*, 108, 385-389 (2001).
15. Kalatzis, V., Petit, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet.*, 7 (10), 1589-1597 (1998).
16. Steel, K.P., Palmer, A. Basic mechanisms of hearing and hearing impairment. "Genetics and Hearing Impairment" (Ed. A. Martini, A. Read ve D. Stephens)'da, Athenaeum Press, England, (1996), s.3-17.
17. H.A. Chapman Institute of Medical Genetics., Hereditary Nonsyndromic Hearing Loss, Connexin 26 gene analysis.
http://genetics.hillcrest.com/services/lab/mollab/hearing_loss.htm
18. Willems, P.J. Genetic causes of hearing loss. *N. Engl. J. Med.*, 342, 1101-1109 (2000).
19. Parving, A. Hearing disorders in childhood, some precedures for detection, identification and diagnostic evaluation. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 9, 31-57 (1985).

20. Zelante, L., Gasparani, P., Estivill, X. ve ark. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1605-1609 (1997).
21. Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L. ve ark. Gap junctions in the mammalian cochlea. *Brain Res. Rev.*, 32, 163-166 (2000).
22. Kumar, N.M., Gilula, N.B. The gap junction communication channel. *Cell*, 84, 381-388 (1996).
23. Rozental, R., Giaume, C., Spray, D.C. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res. Rev.*, 32, 11-15 (2000).
24. Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J. ve ark. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.*, 383, 725-737 (2002).
25. Falk, M.M. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. Cell Biol.*, 79, 564-574 (2000).
26. Lefebvre, P.P., Van De Water, T.R. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res. Rev.*, 32, 159-162 (2000).
27. Steel, K.P. Perspectives: biomedicine. The benefits of recycling. *Science*, 285, 1363-1364 (1999).
28. Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L. ve ark. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.*, 191, 101-118 (1995).
29. Wangemann, P. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells. *Hear. Res.*, 90, 149-157 (1995).

30. Lefebvre, P.P., Weber, T., Rigo, T.M. ve ark. Potassium-induced release of an endogenous toxic activity for outer hair cells and auditory neurons in the rat cochlea: a new pathophysiological mechanism in Mènière's disease? *Brain Res.*, 47, 94 (1990).
31. Weizmann Institute, Gene Card for GJB2.
<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?GJB2>
32. Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D. ve ark. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin- 26 gene defect: implications for genetic counselling. *The Lancet*, 353.(17), 1298-1303 (1999).
33. Kelley, P.M., Harris, D.J., Comer, B.C. ve ark. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 62, 792-799 (1998).
34. Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, L.J. ve ark. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N. Engl. J. Med.*, 339, 1500-1505 (1998).
35. Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H. ve ark. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J. Med. Genet.*, 37, 41-43 (2000).
36. Brobby, G.W., Müller-Myhsok, b.,Hortstmann, R.D. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl. J. Med.*,338, 548-549 (1998).
37. Milder, S.A., Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc. Ac. Res.*, 28, 1215 (1988)
38. Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods In Enzymology.*, 155, 335-350 (1987).

39. Hayashi, K. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *GATA*, 9 (3), 73-79 (1991).
40. Klug, W.S., Cummings, M.R. *Concepts of Genetics*. (Fifth Ed.) Prentice-Hall, Inc. New Jersey, (1977) s.626-627.
41. Klug, W.S., Cummings, M.R. *Concepts of Genetics*. (Fifth Ed.) Prentice-Hall, Inc. New Jersey, (1977) s.66-67.
42. Tadmouri, G.O., Tüzmen, Ş., Özçelik, H. ve ark. Molecular and population genetic analyses of β -Thalassemia in Turkey. *Am. J. Hematol.*, 57, 215-220 (1998).
43. Tadmouri, G.O., Garguier, N., Demont, J. ve ark. History and origin of β -Thalassemia in Turkey: sequence haplotype diversity of β -Globin genes. *Hum. Biol.*, 73 (5), 661-674 (2001)
44. Glaser, B., Furth, J., Stanley, C.A. ve ark. Intragenic single nucleotide polymorphism haplotype analysis of SUR1 mutations in Familial Hyperinsulinism. *Hum. Mut.*, 14, 23-29 (1999).
45. Tuncbilek, E. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk. J. Pediatr.*, 43 (4), 277-279 (2001).
46. TürkTelekomünikasyon A.Ş., Trabzon'un Tarihçesi
<http://www.ttrabzon.telekom.gov.tr/ilimiz/tarihçe/tarihçe.htm>
47. Uyguner, O., Emiroğlu, M., Hafız, G. Spectrum of Connexin 26 gene (GJB2) mutations in Turkish families with inherited non-syndromic deafness and determination of the GJB2 35delG mutation carrier frequency in Turkish population. *Eur. J. Hum Genet.*, 9, SUPPL 1, 283 (2001)
48. Anichkina, A., Kulenich, T., Zinchenko, S. ve ark. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. *Eur. J. Hum Genet.*, 9, 151 (2001)

49. Najmabadi, H., Cucci, R.A., Sahebjam, S. ve ark. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Hum. Mut., Mut. in Brief #504 (2002)

