



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**NONSENDROMİK KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLARIYLA
İLİŞKİLİ GEN MUTASYONLARININ DNA
MİKROARRAY TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ**

Dr. Turgut ÇELİK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Bahar ÇOLPAN**

KONYA 2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**NONSENDROMİK KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLARIYLA
İLİŞKİLİ GEN MUTASYONLARININ DNA
MİKROARRAY TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ**

Dr. Turgut ÇELİK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Bahar ÇOLPAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 18102041 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanma aşamasında desteğini esirgemeyen, üzerimde büyük emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Bahar ÇOLPAN'a, tıbbi genetik alanında engin bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan Prof. Dr. Tülün ÇORA ve Dr. Öğr. Üyesi Nadir KOÇAK' a, eğitim ve öğretim aşamasında her zaman değerli bilgilerinden yararlandığım ve bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mete Kaan Bozkurt, Prof. Dr. Kayhan ÖZTÜRK, Doç. Dr. Ömer ERDUR, Dr. Öğr. Üyesi Çağdaş ELSÜRER, Dr. Öğr. Üyesi Bülent ULUSOY, ve Dr. Öğr. Üyesi Merih ÖNAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım boyunca birlikte en çok vakit geçirdiğim ve keyifli zamanlar yaşadığım değerli mesai arkadaşlarım Dr. Meryem EĞİLMEZ KARAMAN, Dr. Kadriye ERKAN, Dr. Fuad SOFİYEYEV, Dr. Ertuğrul KİBAR, Dr. Ceren AKSOY, Dr. Dr. Ufuk KONCA, Dr. Osman GÜL, Dr. Yunus Emre TOPAN, Dr. Mustafa ÇAKIR, Dr. Ayşe DURAN, Dr. Derya ÖZER, Dr. Harun KARAKAYAOĞLU, Dr. Yasin TEPELİ, Ody. Ahmet Abdurrahman AYGÜN; Ody. Muhammed Ali KOÇAK, Ody. Seçil AKKAYA, Ody. Özlem Ulusoy, anabilim dalı sekreteri Semra ARSLAN, poliklinik hemşiresi Sariye ÇALIM ve başta Tuğba KOÇYİĞİT olmak üzere tüm klinik hemşire, sekreter ve personellerine teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak beni bu günlere getiren, ihtiyacım olan her an yanımda olan, bana her koşulda destek olan aileme ve hayatımın anlamı biricik eşim Dr. Nesibe ZEYVELİ ÇELİK'e sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Turgut ÇELİK
KONYA 2018

UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı : Dr. Turgut GELİK
Uzmanlık Dalı : Kulak Burun Boğaz
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Behar ÇOLPAK
Tezin Adı : Nonsendromik konjenital
isitme kayıplarıyla ilişkili gen mutasyonların DNA
mikrosarray taraması ile incelenmesi

Dr. Turgut GELİK hazırlamış olduğu tezini 30/10/2018 tarihinde aşağıda isimleri yazılı olan jüri huzurunda savunmuştur.

SONUÇ: TEZ BAŞARILI TEZ BAŞARISIZ ()

Jüri

S.Ü Tıp Fakültesi Hastanesi
Prof. Dr. Mete Kaan BOZKURT
K.B.B. Ana Bilim Dalı
Dip. Tes. No: 70120

Jüri

S.Ü TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ
Prof. Dr. Behar ÇOLPAK
K.B.B.A.D.
Dip. Tes. No: 99075

Jüri

Dr. Öğretim Üyesi
Mehmet Akif Dündar

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kulak anatomisi	5
2.1.1. Dış kulak anatomisi	5
2.1.2. Orta kulak anatomisi	5
2.1.3. İç kulak	7
Kemik labirent	7
Membranöz labirent	8
2.2 Embriyoloji	11
2.3 İşitme fizyolojisi	11
2.3.1 İç Kulak Fizyolojisi	12
2.4 İşitme kayıpları	13
2.4.1 Konjenital işitme kayıpları	14
Sendromik işitme kayıpları	14
Nonsendromik işitme kayıpları	18
2.4.2. Nonsendromik İşitme Kaybına Yol Açtığı Bilinen Bazı Genler	28
2.4.3.Moleküler Teknikler	33
2.4.3. Tanı ve tedavi	40
3.GEREÇ VE YÖNTEM	42
4.BULGULAR	44
5.TARTIŞMA	64
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
7.KAYNAKLAR	72
ÖZET	77
SUMMARY	78
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER	80

TABLO LİSTESİ

<u>TABLO NO</u>	<u>SAYFA NO</u>
Tablo 2.1: Nonsendromik işitme kaybına sebep olan OR genler	20
Tablo 2.2: Nonsendromik işitme kaybına sebep olan OD genler	24
Tablo 2.3: Nonsendromik işitme kaybına sebep olan X kromozomu genleri	27
Tablo 2.4: Nonsendromik işitme kaybına sebep olan mitokondriyal genler	27
Tablo 4.1: Tüm olguların demografik özelliklerini gösteren tablo	44
Tablo 4.2: Yeni nesil sekanslama sonuçlarına göre genotipleme	47
Tablo 4.3: Yeni nesil sekanslama sonuçlarına göre allel frekansları	48
Tablo 4.4: Yeni nesil sekanslamada birden fazla mutasyon görülen olgular	48
Tablo 4.5: Akraba evliliği ve ailede öyküsünün mutasyonla ilişkisi	49
Tablo 4.6: 1 No'lu hastanın mikroarray analizindeki het. PCDH15 kliniği	50
Tablo 4.7: 1 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	51
Tablo 4.8: 1 No'lu hastada arr[hg19] 9q34.3 bölgesindeki genler	51
Tablo 4.9: 4 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	55
Tablo 4.10: 6 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	55
Tablo 4.11: 11 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	55
Tablo 4.12: 12 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	56
Tablo 4.13: 12 No'lu hastada arr[hg19] 19p13.11 bölgesindeki genler	57
Tablo 4.14: 13 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	57
Tablo 4.15: 17 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	58
Tablo 4.16: 18 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	59
Tablo 4.17: 20 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	60
Tablo 4.18: 22 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	60
Tablo 4.19: 28 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	61
Tablo 4.20: 29 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	61
Tablo 4.21: 30 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	62
Tablo 4.22: 31 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	62
Tablo 4.23: 33 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları	63

ŞEKİL LİSTESİ

<u>ŞEKİL NO</u>	<u>SAYFA NO</u>
Şekil 2.1: Orta kulak (frontal kesit)	7
Şekil 2.2: Kemik labirent (Sağ lateral kesit)	8
Şekil 2.3: Membranöz labirent ve N.vestibulokohlearis	9
Şekil 2.4: Koklea (enine kesit)	10
Şekil 2.5: Gap junctionu oluşturan konnekson ve konneksin yapıları	28
Şekil 2.6: Mikroarray analizi aşamalarının şematik gösterimi	39
Şekil 4.1: 1 No'lu hastadaki het. PCDH15 mut. sistemdeki görüntüsü	54



SİMGELER VE KISALTIMA LİSTESİ

ADNSHL	Otozomal dominant nonsendromik işitme kaybı
ARNSHL	Otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı
CNV	Copy number variation
Db	Desibel
DFNA	Otozomal dominant işitme kaybı lokusu
DFNB	Otozomal resesif işitme kaybı lokusu
DFNX	X'e bağlı işitme kaybı lokusu
NSHL	Nonsendromik işitme kaybı
OR	Otozomal resesif
OD	Otozomal dominant
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SHL	Sendromik işitme kaybı
SNİK	Sensörinöral işitme kaybı
SNP	Single nucleotid polymorphisms
VUS	Variant of uncertain significance

1. GİRİŞ

İşitme kaybı dünya genelinde toplumlarda en sık rastlanan duyuşal sistem bozukluğudur. Toplumdan topluma değişmekle beraber sensorinöral işitme kaybı (SNİK), çocuklardaki işitme kayıplarının en sık sebebidir ve prevalansı artmaya devam etmektedir (0,8-1/1000 canlı doğum)(1). Tüm dünyada olmakla birlikte gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık problemidir. İşitme kaybı, derecesi ne olursa olsun çocukların konuşma ve dil gelişimini etkiler, sosyal ve duyuşal problemlere yol açar. Konuşmanın normal gelişimi, işitmenin tamamen normal olmasına bağlıdır(2).

İşitme kaybı; saf ses ortalaması derecesine (çok hafif derece: 15- 40 dB, hafif derece: 40-55 dB, orta derece: 55-70dB, ileri derece: 70-90 dB veya çok ileri derece: ≥ 90 dB), başlangıç yaşına (prelingual, perilingual veya postlingual), kaynağına (iletim, sensorinöral veya mixed) ve beraberinde sistemik bulgu bulunup bulunmamasına (nonsendromik veya sendromik) göre sınıflandırılabilir(3, 4).

Konjenital işitme kayıpları, beraberinde başka bulgu saptanmazsa nonsendromik, başka sistemik bulgu veya bulgular saptanırsa sendromik olarak adlandırılır(5). Konjenital işitme kayıplarının yaklaşık %70'i nonsendromik(NSHL), %30'u sendromiktir (SHL). Nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif(OR), %18'i otozomal dominant(OD), %2'si X'e bağlı ve mitokondriyal geçişlidir(6). Otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı(ARNSHL) akraba evliliğinin yaygın olduğu ülkelerde daha sık görülmektedir. OR, OD veya X'e bağlı NSHL sırasıyla DFNB, DFNA, DFN olarak adlandırılan gen lokuslarında yer alır(3).

Nonsendromik işitme kaybının etyolojisi karmaşıktır.90 dan fazla genin konjenital işitme kaybı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(7). Bu genlerin çoğu iç kulağın gelişimine ve işlevine etki eder dolayısıyla bu genlerdeki mutasyonlar sesin işlenmesindeki kritik aşamalarda yer alan yapıların gelişimini bozarak işitme kaybı gelişmesine yol açar. Aynı gendeki farklı mutasyonlar farklı işitme kaybı tipleri ile ilişkili olabilir ve bazı genler hem sendromik hem nonsendromik tip işitme kayıpları ile ilişkilidir. .

Nonsendromik tip işitme kaybı olan hastaların çoğunluğunda otozomal resesif tip kalıtım paterni görülmektedir. Tüm ileri, çok ileri derecede otozomal resesif tip SNİK olan hasta grubunun yarısında konneksin 26 (cx26) proteinini kodlayan GJB2

(gap junction beta 2) geninde mutasyon saptanır. Ayrıca konneksin 30 (cx30) proteinini kodlayan GJB6 genindeki mutasyonlarda otozomal resesif tipte işitme kaybı ile ilişkilidir. GJB2 ve GJB6 genlerindeki mutasyonlar konneksin proteinlerinin yapısını bozarak konneksin protein yapısının normal oluşumunu etkilerler; dolayısıyla gap junction yapısının değişmesine yol açıp işitme için gerekli olan hücrelerin işlevini ve yapısını etkilerler.

GJB3 geni konneksin 31in (cx 31) ekspresyonunda rol alır bu proteinde konneksin 26 gibi spiral ligament ve spiral limbus fibrositlerinde gap junction oluşumunda görev alır. Cx 26 gibi diğer konneksin proteinlerinin (cx30, cx31) de gap-junction fonksiyonlarını değiştirerek iç kulak fonksiyonlarını etkilediği belirlenmiştir.GJB3 (DFNA3) mutasyonunun Çinli hastalarda OD nonsendromik işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu popülasyonda GJB3'ün ARNSHL formu da gösterilmiştir. Cx 31 varyantlarının İspanyol hastalarda sendromik ve Brezilyalı hastalarda nonsendromik işitme kaybına sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(8).

Bir diğer ARNSHL'a neden olan gen ise SLC26A4'tür. Bu gendeki mutasyonlar SNİK'nın hem sendromik (Pendred Sendromu) hem de nonsendromik (DFNB4) formları ile ilişkilidir. Bu gen, tiroid bezinde ve iç kulakta iyodür ve bikarbonat için klor değiştiren bir transmembran iyon taşıyıcı protein olan pendrin'i kodlar. Pendrin kokleada epitel ve destekleyici hücrelerde eksprese edilir; pH homeostazı ve endolenfin iyon bileşiminin düzenlenmesinde rol alır(9, 10). Bu gendeki mutasyonlar tüm toplumlarda GJB2 ve GJB3 genlerinden sonra işitme kaybı etyolojisinde en sık görülen mutasyondur(11).

Otozomal dominant geçiş gösteren işitme kaybı olan hastalarda 45 farklı gende mutasyon saptanmıştır. Bazı genlerdeki mutasyonlar(GJB2, GJB6) sıklıkla otozomal resesif geçiş gösterirken otozomal dominant kalıtım paternide gösterebilmektedir. Hastaların çoğunda tek gen mutasyonu saptanmamasına rağmen KCNQ4 ve TECTA genlerindeki mutasyonlar nispeten daha sık görülür. KCNQ4 genindeki mutasyon DFNA2 olarak bilinen işitme kaybı tipine neden olur. Bu gen potasyum kanalı familyasının üyesi olan bir proteinin ekspresyonunda rol alır. Bu kanallar komşu hücreler arasında pozitif yüklü potasyum iyonları taşınmasında görevlidirler. Kanallar, hücrelerin elektrik sinyallerini üretme ve iletme yeteneklerinde önemli bir rol oynar. Bir potasyum kanalının spesifik işlevi, protein

bileşenlerine ve kanalın vücuttaki yerine bağlıdır. KCNQ4 proteinin yapısını oluşturduğu potasyum kanalları, iç kulağın belirli hücrelerinde ve olfaktör sinir arkının bir kısmında bulunur. Daha az ölçüde, KCNQ4 potasyum kanalları da kalpte ve diğer bazı kaslarda da bulunur(12).

KCNQ1 genide iç kulakta stria vaskülaristeki marjinal hücrelerde ve vestibüldeki koyu (dark) hücrelerde aynı adlı K + kanalının ekspresyonunda görevlidir.(13) Bu gendeki mutasyonların işitme fonksiyonunda dramatik değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir.

Nonsendromik işitme kaybının X'e bağlı ve mitokondriyal kalıtım paterni gösteren formları nadirdir. X e bağlı vakaların yaklaşık yarısı POU3F4 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Hastalığın bu formu DFNX2 olarak tanımlanmıştır ve X e bağlı işitme kaybı ile ilişkili en az 3 gen daha saptanmıştır. POU3F4 geni X kromozomunda yer alır ve iç kulak gelişimi için gerekli olan transkripsiyon faktörünü kodlar(14). POU3F4 geni diğer genlerin aktivitesini düzenlemeye yardımcı olan bir proteinin ekspresyonunda görev alır ve protein transkripsiyon faktörü olarak adlandırılır. Bu gen POU domain genler olarak adlandırılan daha büyük protein transkripsiyon faktörü ailesinin bir parçasıdır. POU domain ailesindeki genlerden üretilen proteinlerin her biri, POU'ya özgü etki alanı ve POU homeodomain adı verilen ve diğer genlerin DNA'sına bağlanan iki bölgeyi içerir. POU3F4 proteininin orta ve iç kulağın gelişiminde rol oynaması muhtemeldir ve ayrıca doğumdan önce beynin belirli bölgelerinde de aktiftir(15).

Mitokondriyal tip kalıtım gösteren işitme kayıpları mitokondriyal DNA daki mutasyonlardan kaynaklanır ve mt DNA daki birkaç mutasyon bu tip işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olup bu durumdaki rolleri araştırılmaktadır.

Nonsendromik işitme kaybına sık neden olan lokuslardan bir diğeri ise Wolfram sendromu tip 1 geninin (WFS1) heterozigot mutasyonu ile sonuçlanan DFNA 6/14/38'dir. WFS1 mutasyonu sendromik ya da nonsendromik işitme kaybına sebep olabilir. WFS1 OD mutasyonu ile ilişkili işitme kaybı genellikle bilateral olup 10 yaşından önce başlar ve başlangıçta 250, 500 ve 1000 Hz frekansları etkilenir. Progresif seyir gösterir. Wolfram sendromunda, diyabet insipitus, diyabet mellitus, optik atrofi ve SNİK gibi klinik antiteler görülür. WFS1, wolframin adlı fare iç kulağında postnatal gelişim boyunca iç ve dış tüylü hücreler, vestibüler tüylü

hücreler, destek hücreleri ve spiral ganglion nöronları gibi çeşitli hücre tiplerinde gösterilen ancak işlevi net olarak anlaşılamamış bir proteini kodlar(16).

Nonsendromik işitme kaybıyla ilişkili bazı genlerdeki mutasyonlar, Usher sendromu (CDH23,MYO7A), Pendred sendromu (SLC26A4), Wolfram sendromu (WFS1) ve Stickler sendromu (COL11A2) gibi sendromik işitme kayıpları ile ilişkili olabilirler.

Genetik mutasyonlara ek olarak işitme kaybı çevresel faktörlere bağlı olarak veya çevresel faktörler ile genetik faktörlerin kombinasyonu sonucu oluşabilir. Belirli ototoksik etkili ilaç kullanımı, gebelikte veya sonrasında gelişen enfeksiyonlar, uzun süre yüksek ses maruziyeti genetikten bağımsız işitme kaybına yola açabilir. Ayrıca yaşa bağlı işitme kaybında hem çevresel hemde genetik temelli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'nda non sendromik konjenital işitme kaybı nedeniyle koklear implant cerrahisi yapılan veya sadece takip edilen 16 yaş altındaki 34 çocuk hasta dahil edildi. Bu hastalardan alınan periferik venöz kan numunelerinden izole edilen DNA lar öncelikle yeni nesil sekanslama (NGS) tekniği ile analiz edilip patoloji saptanmayan 15 hastanın DNA'ları mikroarray yöntemi ile analiz edildi ve sonuçlar genetik veri tabanları taranıp değerlendirildi. Bu çalışmada amaç işitme kaybının genetik temelini anlaması ve risk grubuna prenatal dönemde tanı koyabilmek için yapılacak çalışmalara dayanak olmaktı. Elde edilen veriler literatür taranarak değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kulak Anatomisi

2.1.1. Dış Kulak Anatomisi

Kulağın seslerin orta ve iç kulağa iletilmesini sağlayan bölümüdür. Aurikula ve dış kulak yolu (DKY) olmak üzere iki bölümden oluşur. Aurikula, kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve perikonriumla çevrilmiş sarı, elastik kıkırdaktan meydana gelmektedir. Kıkırdak yağsız deri ile tamamen örtülmüştür. Aurikulanın alt kısmında bu yapının kıkırdak içermeyen tek kısmı olan lobül bulunur. Aurikulanın lateral kısmı içbükey medial kısmı ise dışbükeydir. Lateral bölümün en derin kısmı kavum konka adını alır ve dış kulak yolunun girişini oluşturur. DKY başlangıcının anteriorunda bulunan çıkıntı tragus ve bunun posteroinferiorunda bulunan daha büyük diğer çıkıntı antitragus olarak adlandırılır. Aurikulanın diğer kısımları ise ana kıvrımları oluşturan heliks ve antihelikstir.

Konkal kıkırdaktan timpanik membrana kadar uzanan S şeklindeki kanala dış kulak yolu adı verilir. Posterosüperior boyu 25 mm anteroinferior boyu ise yaklaşık 30mm'dir. Dış kulak yolunun lateral 1/3 kısmı kıkırdak, medial 2/3 kısmı ise kemikten oluşmuştur(17). Kıkırdak kısmındaki deri kemik kısmına göre cilt altında apokrin salgı bezleri ve kıl kökleri içerdiğinden daha kalındır. DKY anterior duvarı ince bir kemik lamel ile glenoid fossadan ayrılıp fossanın posterior sınırını oluşturur. Nervus trigeminusun dalı olan n.aurikulotemporalis DKY inervasyonu anterosüperiorunda n.vagusun dalı olan n.aurikularis (Arnold siniri) ile n.fasialis; posteroinferiorunda ise n.glossofaringeus tarafından sağlanır. DKY'nin kanlanması a.carotis externa terminal dalı olan a.temporalis süperfisialis ve a. aurikularis posterior tarafından sağlanır(3).

2.1.2. Orta Kulak Anatomisi

Orta kulak kavitesi sagittal planda yerleşimlidir; anteriorda internal karotid arter ve östaki tüpü, posteriorunda aditus ad antrum ve mastoid hücreler, lateralde timpanik membran (TM) ve temporal kemiğin pars skuamozası, medialde promontoryum, süperiorunda tegmen timpani ve inferiorunda juguler bulbus olmak üzere 6 duvarı bulunur(17). Östaki tüpü yoluyla nazofarinks, aditus ad antrum yoluyla mastoid hücrelerle bağlantılıdır. DKY dan timpanik membran (TM) ile ayrılır.

Orta kulak boşluğunun hacmi yaklaşık 2ml dir. Lateral duvarını oluşturan TM üç tabakalı bir yapıdan oluşur. Lateralde DKY epiteli, ortada fibröz tabaka ve medialde orta kulak mukozası yer alır. Anulus timpanikus adı verilen fibröz bir bant

membranı tama yakın çevreler ve timpanik kemiğe tutunmasını sağlar. TM anterior ve posterior malleolar ligamanlar tarafından iki bölüme ayrılmıştır. Gergin olan inferior kısmına pars tensa, gevşek olan fibröz tabaka ve anulus bulunmayan süperiordaki 1/8'lik kısma ise pars flaksida adı verilir. Malleusun uzun kolu timpanik membrana yapışır. Manubrium mallei olarak adlandırılan bu kolun timpanik membran üzerindeki belirgin olan alt ucuna umbo denir. Muayene esnasında timpanik membran üzerinde tepesi umboda tabanı anulusta olan ışık üçgeni oluşur.

Orta kulağın medial duvarında kokleanın bazal kıvrımı tarafından oluşturulan promontoryum denen kabartı yer alır. Promontoryum üzerinde sırasıyla posterosüperior ve posteroinferiorda yerleşimli oval ve yuvarlak pencereler yer alır. Oval pencere üzerine stapes tabanı yerleşir. Oval pencerenin posteriorunda fallop kanalı yerleşmiş olup bu kanalın içerisinde fasiyal sinirin timpanik segmenti yer alır. Fallop kanalının da süperior kesiminde lateral semisirküler kanalın kabartısı yer alır.

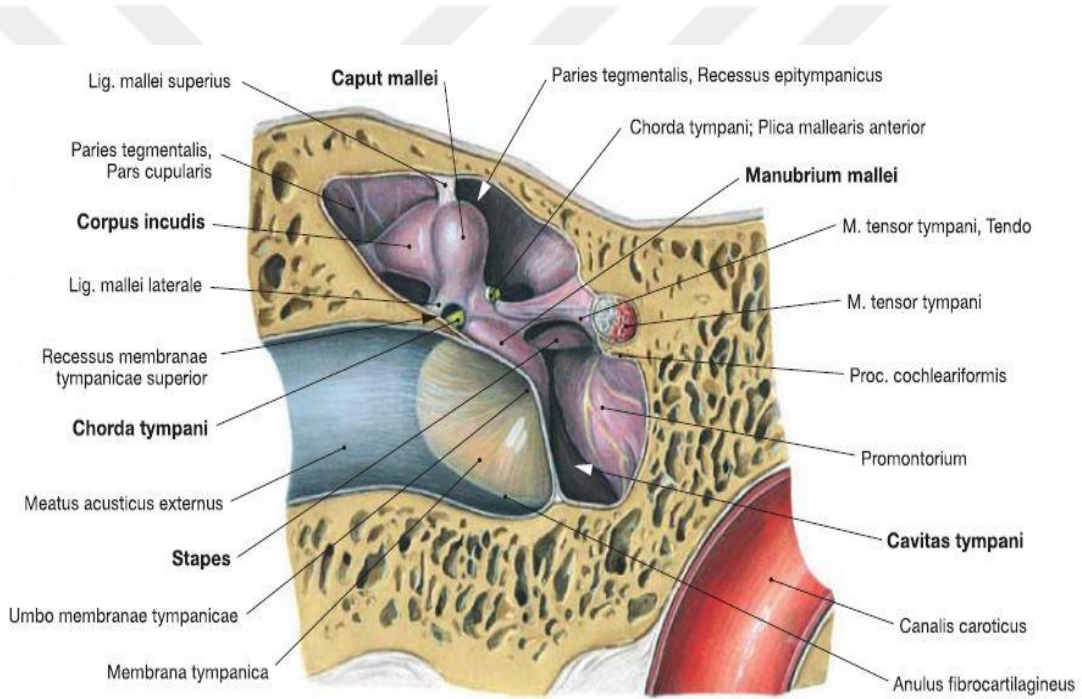
Epitimpanium denilen orta kulağın süperior boşluğunu orta kafa boşluğundan ayıran kemik lamel tegmen timpani olarak adlandırılır. Malleus başı, inkus boynu ve bu kemik yapıların bağları bu kısımda yer alır. Epitimpanium aditus ad antrum yoluyla antruma açılır. Orta kulağın alt kısmına hipotimpanium adı verilir ve bu kısmın inferior komşuluğunda v.jugularis interna bulunur. Orta kulakta ortaya çıkan sıvılar öncelikle hipotimpaniumda toplanır.

Orta kulak boşluğu önde a. karotis interna arkada ise mastoid kavite ile komşudur. Orta kulak arka duvarında aditusun hemen altında piramidal çıkıntı (eminentia piramidarium) bulunur. Bu çıkıntı içinden m.stapedius tendonu geçer ve stapes yapışır. Eminentia piramidarium alt kısmında fasiyal kanalın altına doğru uzanan girintiye ise sinüs timpani adı verilir.

Orta kulakta malleus, inkus ve stapes olarak isimlendirilen 3 adet kemikçik bulunur. Bu kemikçikler birbirleriyle eklemler yaparak sesin iletimini sağlarlar. Bu kemikçiklerin en büyüğü malleustur. Kaput, kollum ve manubrium mallei denen 3 bölümü mevcuttur. Tensör timpani kası malleusun boynuna yapışır ve kasıldığında bu kemikçiği çekerek TM'ın gerginleşmesini sağlar. İnkus da yine korpus, uzun kol ve kısa kol olmak üzere 3 bölümden oluşmuştur. İnkus uzun kolunun ucu lentiküler çıkıntı olarak adlandırılır ve bu çıkıntı stapesle eklem yapar. Stapes vücutta bulunan en küçük kemiktir. Anterior krus, posterior krus ve oval pencereye oturan basis stapesten oluşur.

Orta kulakta m. tensor timpani ve m. stapedius olmak üzere 2 adet kas bulunur. Bunlardan m. tensor timpani manubrium mallei ile östaki tüpünün kartilaj bölümü arasında uzanır ve n. trigeminus tarafından uyarılır. M. Stapedius vücuttaki en küçük iskelet kası olup stapesin boynuna ve posterior krusuna yapışır. N. fasialisin stapediale dalı tarafından uyarılır. Bu kas kasıldığında stapes tabanını laterale çekerek yüksek ses maruziyetinde iç kulağın zarar görmesini engeller.

Orta kulak a. auricularis posteriorun posterior timpanik dalı, a. maksillarisin anterior timpanik dalı, a. meningea medianın süperior dalı, timpanik asendan faringeal arterin inferior timpanik dalı ve süperfisial petrozal dalı tarafından beslenir. Venleri arterleri ile paralel seyredip süperior petrosal sinüs veya pterigoid pleksusa dökülür, lenfatikleri ise parotid ve retrofaringeal lenf nodlarına drene olur(3).



Şekil 2.1: Orta Kulak (Frontal kesit anteriordan görünüş)(18)

2.1.3. İç Kulak Anatomisi

İç kulak kohlea ve labirent olmak üzere iki sistemden oluşur. Kemik labirent ve membranöz labirent olarak incelenir.

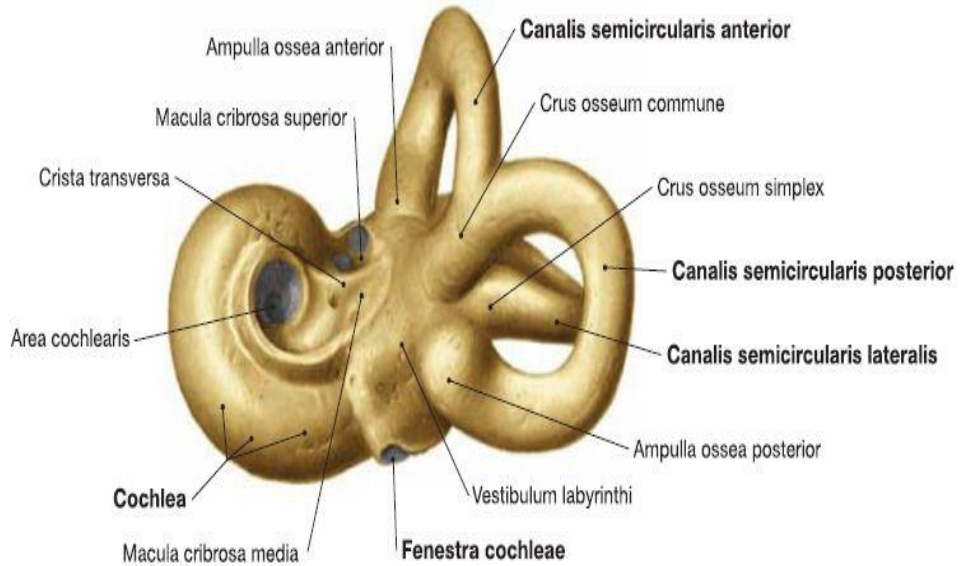
Kemik Labirent

Vestibül, internal akustik kanalın fundusu ile orta kulağın medial duvarı arasında bulunur. Vestibülün lateral duvarında oval pencere bulunur, bu pencerenin

üzeri stapes tabanı ve anüler ligament ile örtülüdür. Vestibülün medial duvarında ise vestibüler akuaduktusun başlangıç kısmı bulunur. Bu kanal petröz kemiğin posterior kısmına doğru uzanarak endolenfatik keseyi oluşturup dura altında sonlanır.

Anterior(süperior), posterior ve lateral(horizontal) semisirküler kanallar (SSK) olmak üzere 3 adet kanal sistemi vardır. Bu kanallar birbirlerine 100'er derecelik açılar ile bağlıdırlar. Lateral SSK, aditus ad antrum üzerinde bir çıkıntı olarak görülür. Semisirküler kanalların şişkin olan uç bölümlerine ampulla ossea, düz olan kısımlarına ise crus simpleks denir. Anterior ve posterior SSK ların düz uçları birleşerek crus commune adı verilen bölümü oluşturur.

Kemik kohlea erişkinlerde 2,5 dönüşlük bir sarmal yaparak modiulus denen spongios kemikten oluşan bir eksen etrafında yerleşmiştir. Tabanına basis tepesine kupula kohlea denir. Kohleadaki spiral kanal içerisinde lamina spiralis ossea adı verilen yarım bir kemik bölme vardır. Kemik labirent içinde sodyum iyon (Na^+) konsantrasyonu yüksek, potasyum iyon (K^+) konsantrasyonu düşük olan, ekstraselüler sıvı içeriğine benzeyen perilenf adı verilen sıvı bulunur. Membranöz labirent perilenf sıvısı içinde yerleşmiştir.

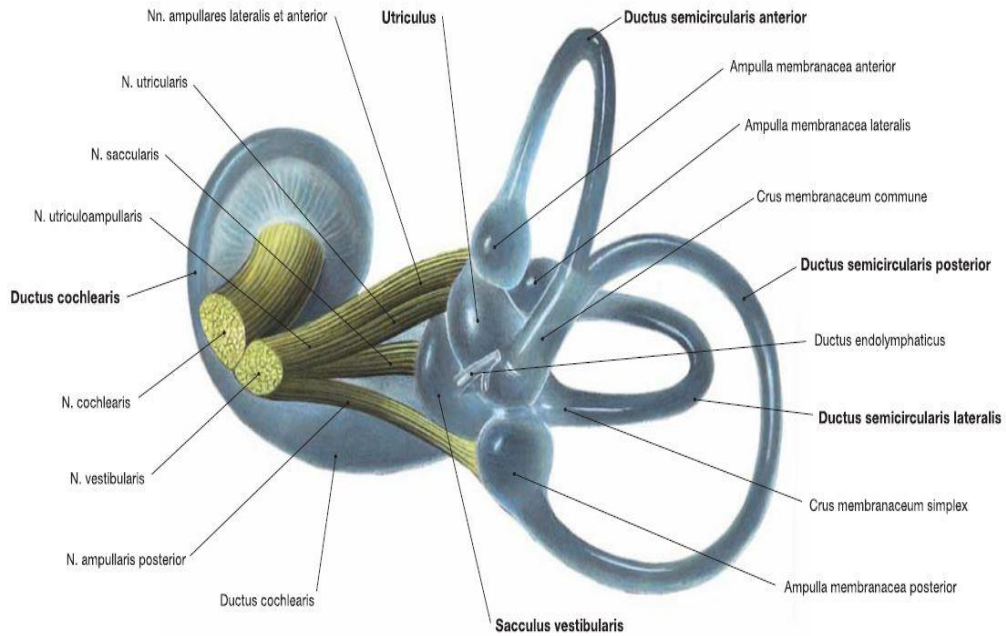


Şekil 2.2: Kemik labirent (Sağ lateral kesit)(18)

Membranöz Labirent

İç kulağın bu kısmı sodyum iyon (Na^+) konsantrasyonu düşük, potasyum iyon (K^+) konsantrasyonu yüksek olan intraselüler sıvı içeriğine benzeyen endolenfatik

sıvı olarak adlandırılan sıvıyı içerir. Vestibül iç duvarında anteriorda sferik reses içinde yer alan sakkulus, süperiorde ise eliptik reses içinde yer alan utrikulus yerleşmiştir. Utrikulus üzerinde semisirküler kanallara açılan deliklerle utrikulusu sakkulusu bağlayan duktus utrikulosakkularis bulunur. Sakkulus üzerinde duktus utrikulosakkularise ait bir delik ile duktus kohlearise bağlanan duktus reuniense ait delikler yer alır. Semisirküler kanalların membranöz duktusları utrikulusun posterioruna açılırlar. Endolenfatik duktus vestibüler akuaduktusun içerisinde yer alır. Başlangıç kısmındaki genişlemeye sinüs, vestibüler akuaduktus içine girerken daralan kısmına ise istmus adı verilir. Endolenfatik duktusun genişleyen distal bölümüne ise endolenfatik kese denir.



Şekil 2.3: Membranöz labirent ve N.vestibulokohlearis(18)

Duktus kohlearis; osseöz spiral laminadan kohlear kanalın dış yüzüne diagonal olarak uzanan tek katlı hücrelerden oluşan bir membrandır. Bu membrana reisner membranı denir. Spiral laminadan kohlear kanalın dış yüzüne uzanan diğer bir yapı ise baziller membrandır. Bu mebranın üzerinde işitmede görevli duyusal ve destek hücreleri bulunur. Bu iki membranın arasındaki bölüm skala media olarak adlandırılır. Skala medianın içerisinde endolenf sıvısı bulunur ve helikotrema denilen bölgede kör olarak sonlanır. Reisner membranının üzerinde kalan bölüme skala vestibüli denir. Baziller membranın altında kalan bölüm ise skala timpani olarak

2.2. Embriyoloji

Dış ve orta kulak embriyolojik olarak 1. ve 2. brankiyal ark ile 1. brankiyal yarık ve cepten gelişir. Önce dış kulak daha sonrada orta kulak gelişir iç kulak ise 3. haftada oditoryel plakod olarak adlandırılan farklı bir kökenden gelişmeye başlar. Embriyolojik gelişim esnasında özellikle gestasyonun 28. ve 42. günleri arasındaki patolojilere bağlı gelişim defekti hem dış hem de orta kulakta malformasyonlara neden olur.

Aurikula gestasyonun 5.-6. haftasında 1.ve 2. brankiyal arkın dorsal kısmını saran 6 adet mezenkimal tomurcuğunun 12. haftada füzyon yapmasıyla gelişmeye başlar. Dış kulak yolu gebeliğin 2. ayında 1. brankiyal yarığın oluşturduğu epitelyal çekirdeğin 1. faringeal cebe doğru ilerlemesi sonucu gelişir. Bu epitelyal çekirdek dış kulak yolunun başlangıç yapısıdır. Bu kanalın oluşumu 4. aya kadar devam eder,4. aydan itibaren ise timpanik kemik gelişmeye başlar ve 7. ayda DKY 2/3 medialinin gelişimi tamamlanır. Mastoid kemik posteroinferior planda gelişirken timpanik kavite de genişler ve fasiyal sinir normal anatomik pozisyonuna yerleşir.

Orta kulak kavitesi, mastoid kemik, timpanomastoid mukoza ve östaki tüpü 1. brankiyal cepten gelişir. Timpanik kavite gestasyonun 7.-8. ayında kemikçik zincir etrafında genişler ve mukoza ile örtülür. Mastoid kemik havalanması ancak doğumdan sonra gelişmeye başlar ve 10-15 yaşına kadar gelişmeye devam eder. Orta kulak kemikçikleri gebeliğin 2. ayında 1. ve 2. brankiyal arklardan gelişmeye başlayıp 4. ayda son halini alırlar. İnkus-malleus füzyonu kemikçik zincir ile ilgili en sık rastlanan malformasyondur(2).

2.3. İşitme Fizyolojisi

Ses enerjisi katı, sıvı ya da gaz gibi bir ortamda yayılan bir enerji kaynağından üretilen mekanik bir titreşim dalgasıdır. Bu dalga boşlukta iletilmez. Ses frekansı çok küçük parçacık ve moleküllerin sıkışma ve açılmasıyla ortaya çıkan tam bir siklus ile ortaya çıkar. Sesin frekansı bir saniyede oluşan siklusların sayısı olup hertz (Hz) birimi ile ifade edilir. Yüksek frekans tiz sesleri, düşük frekans pes sesleri tanımlar. İnsan kulağı 20-20000 Hz frekansları arasındaki sesleri işitebilme yeteneğine sahiptir. Normal konuşma sesleri 500-2000 Hz frekansları arasındadır. Şiddet ise ses enerjisinin sayısal ifadesi olup desibel(dB) ile ifade edilir.

Orta kulak, ses dalgalarının iç kulağa iletilmesinin yanında iç kulağı şiddetli sestten korumaklada görevlidir. Ses dalgaları gaz ortamdan sıvı ortama yani perilenfe geçerken enerjinin bir kısmı faz farkından dolayı geriye döner. Ortamdaki partiküllerin ses dalgalarına karşı gösterdiği dirence akustik rezistans adı verilir. İnsan kulağında havadan sıvı ortama yani perilenfe geçen ses dalgalarının bu rezistansa bağlı olarak uğradığı kayıp yaklaşık 30 dB'dir. Bu kayıp orta kulaktaki çeşitli mekanizmalarla sesin şiddeti arttırılarak telafi edilir. TM'nin pars tensa kısmı ses dalgalarıyla titreşir ve ses enerjisi manubrium mallei ve kemikçik zincire aktarılır. Kemikçik zincirin kaldıraç etkisi ve TM ile oval pencere arasındaki yüzey farkı da sesin şiddetinin artmasına yardımcı olur. Bu şekilde sesin şiddetinde 26 dB'lik bir artış elde edilir. Perilenfin titreşmesinde oval ve yuvarlak pencereler rol oynar. Perilenfin ses dalgalarıyla titreşmesi ile bazal membran uyarılır. Oval pencereye gelen ses enerjisi kemikçik zincir ve faz farkı gibi mekanizmalar nedeniyle yükselti olarak geldiği için yuvarlak pencereden fazladır. Tensor timpani ve stapedius kasları çeşitli refleks arkları ile gürültüye karşı iç kulağı korurlar. Ayrıca östaki tüpü de orta kulak basıncını dengeleyerek timpanik membranın daha etkili titreşmesini sağlar(3).

2.3.1.İç Kulak Fizyolojisi

İşitmenin iç kulakta algılanıp sinir hücrelerinde aksiyon potansiyeline dönüştürülmesi birkaç farklı aşamada gerçekleşir. Ses dalgalarının iç kulakta yer alan korti organına iletilmesi ses enerjisinin oluşturduğu mekanik bir olaydır. Korti organına iletilen akustik enerji, nöroepitelyal hücrelerde aksiyon potansiyellerine dönüştürüldükten sonra sinirler tarafından temporal lobda bulunan işitme merkezine getirilir ve burada analiz edilir. Bununla ilgili çeşitli araştırmacılar tarafından farklı teoriler ortaya konulmuştur. Bu teorilerden en çok kabul göreni Von Bekesy tarafından ortaya atılan ilerleyen dalga teorisidir.

İlerleyen dalga teorisi: Bu teoride stapes hareketi ile perilenfte oluşan dalganın baziller membranı bazaldan apekse doğru hareketlendirdiği öne sürülmektedir. Oluşan titreşimler enine ve boyuna doğru yönelim gösterirler. Kokleaya ulaşan mekanik uyarım dalgası, baziler membran üzerinde uyarının oluşturduğu frekansa uyan bölgede maksimum amplitüde ulaşır ve bu bölgede hareket oluşturarak fibrillerin uyarılmasını sağlar. Kokleaya kemikçik zincir

aracılığıyla gelen titreşimler perilenf ve endolenfde oval pencereden yuvarlak pencereye doğru bir hareket oluşmasını sağlarlar. Bu titreşim dalgaları skala vestibulide ilerledikleri sırada perilenf direnci ile her frekanstaki titreşim için özel bir alanda olmak üzere baziler membran üzerine yöneltilirler; ardından titreşimler skala timpaniye doğru yönlendirilirler. Bu esnada skala timpaninin sonunda yer alan yuvarlak pencere membranından iç kulağa giren orta kulak havasındaki ses titreşimleri bu hareketi kısmen engellerler. Bu dalgalanma hareketi korti organının uyarılmasına neden olur. Baziler membranda oluşan titreşimler esnasında, üzerindeki silyalı hücreler tektoryal membrana temas edip ayrılırlar ve uyarılan koklea bölgesinde ses dalgalarının sahip olduğu mekanik enerji elektro-kimyasal enerjiye dönüştürülür. Bu sayede impulslar oluşur ve bu impulslar n.vestibulokohlaerisin lifleri ile temporal loba iletilir. Seslerin iç kulaktan merkeze iletilirken izledikleri yol sırasıyla: koklear nükleus, superior olivar nükleus, kollikulus inferior ve medial genikulat cisimdir. Bu ses uyarıları kortekse ulaştığında daha önceden öğrenilmiş bilgilere göre tanımlanırlar. Ancak yenidoğanlarda önceden oluşturulmuş bir ses hafızası olmadığından 2-5 yaşına kadar duyduğu sesleri kortekste toplar, birleştirir ve yorumlayabilecek duruma gelir. Doğuştan itibaren olan işitme yetisine refleks işitme, sonradan öğrenilen ve kazanılan işitmeye ise bilinçli işitme denir(3).

2.4. İşitme Kayıpları

İşitme kayıplarının sınıflandırılması birçok farklı parametreye göre yapılır. Sınıflandırmalarda işitme kaybının tipi (sensörinöral, iletim, mikst), progresif olup olmaması, derecesi, başlangıç zamanı (konjenital, erken başlangıç, geç başlangıç) temel alınır. Etyolojik sınıflandırmada genetik ve genetik dışı faktörler dikkate alınır. Konjenital işitme kaybı doğumdan itibaren var olan ve nedeni bilinmeyen işitme kaybı olarak tanımlanmaktadır. Kalıtsal işitme kaybı ise doğumda var olabildiği gibi sonradan başlangıçlı da olabilir. Kalıtsal işitme kayıpları, hastaların eşlik eden kalıtsal anomalilerinin olup olmasına göre sendromik ya da nonsendromik şeklinde sınıflandırılabilir(6).

2.4.1. Konjenital İşitme Kayıpları

İnsanlarda konjenital işitme kayıplarının görülme sıklığı yaklaşık 1/1000 canlı doğumdur. Bu durumun nedeninin multifaktöriyel olmasına rağmen yaklaşık %50'sinin genetik faktörlere bağlı olduğu saptanmıştır(6).

İnsan hücrelerinde 46 kromozom bulunur ve bunların 44'ü 22 çift kromozomdan oluşan otozomal kromozomlardır. Kalan 2 kromozom ise seks kromozomları olarak isimlendirilir ve erkeklerde XY, bayanlarda XX harfleriyle gösterilir. Embriyoya anne ve babadaki kromozom çiftlerinden birer tane geçer ve böylelikle kendi DNA'sı ortaya çıkar. Bu genlerde oluşan mutasyonlar çeşitli patolojilere sebep olabilmektedir. Örneğin iç kulak yapısının oluşumunda görevli bir proteinin yapısına katkıda bulunan bir gende oluşan mutasyon sonucu işitme kaybı ortaya çıkabilmektedir(6).

Otozomal dominant (OD)geçiş görülen hastalıklarda heterozigot bireylerde de o hastalığın fenotipi görülür. OD geçişte erkek ve bayan eşit şekilde hasta olma riskine sahiptir. Cinsler arasında farklılık yoktur. Otozomal resesif (OR) kalıtımda hastalığın fenotipte ortaya çıkması için homozigot olması gerekir. Bu kalıtım paterninde de cinsel farklılık yoktur. X'e bağlı kalıtım ya dominant ya da resesif geçişlidir. Resesif karakterde ise kadınların hasta olmaları için homozigot olması gerekir. X'e bağlı geçişte ise erkekte tek bir X kromozomu olduğu için erkekler her zaman hastadırlar. Mitokondri, kendi DNA'sına sahiptir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) ovaryum hücresi sitoplazmasında bulunan mitokondriler tarafından kodlandığı için yalnızca anne tarafından gelecek nesillere aktarılır. Yani mitokondriyal geçiş gösteren patolojiler tamamen anne kaynaklıdır(6).

Sendromik İşitme Kayıpları

Sendromik işitme kayıpları işitme kaybıyla birlikte çeşitli sistemik patolojilerin bulunduğu hastalık durumlarını ifade eder. Günümüze dek SNİK görülen 400'den fazla sendrom tanımlanmıştır. Bunlardan başlıcalarından aşağıda bahsedilmiştir(6).

Waardenburg Sendromu (WS)

Petrus Waardenburg tarafından 1951 yılında tanımlanmış olup dört alt tipe ayrılmıştır. Tip I SNİK, iriste pigmentasyon bozukluğu, medial kantus ve lakrimal

punktumun farklı lokalizasyonda yerleşmesi, beyaz perçem ve distopia kantarum(gözlerin medial kantusları arasındaki mesafenin artması) ile karakterizedir.PAX3, EDN3, EDNRB, MITF, SOX10 ve SNAI2 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir(19). Tip II'de distopia kantarum bulunmaz. Tip III'te ise tip I'e ek olarak üst ekstremitelerde hipoplazi ya da kontraktür gelişimi vardır. Tip IV ise Waardenburg Sendromu ile Hirschprung hastalığının birlikte görülmesidir.

Brakiyo-Oto-Renal Sendrom

OD geçiş paterni gösterir. Brakiyal, otolojik ve renal patolojilerin birlikte görüldüğü bir sendromdur. Melnick tarafından 1975 yılında tanımlanmıştır. Otolojik bulguları; dış kulak yolu (DKY) darlığı, preauriküler çöküntü veya çıkıntı, auriküler malformasyonlar, mikrotia, ossiküler sistem malformasyonları, çeşitli segmentlerde fasiyal sinir dehisansı, oval pencere yokluğu, orta kulak boşluğu hipoplazisi, kohlear hipoplazi, kohlear displazi, geniş vestibüler akuadukt ve lateral semisirküler kanal hipoplazisidir. Bu hasta grubunda işitme kaybı %90 oranında görülür ve iletim, sensörinöral ya da mikst tip olabilir(6).

Nörofibromatozis Tip II (NFII)

NF tip II; bilateral akustik nörinom, diğer intrakraniyal ve spinal tümörlerin gelişimi ile karakterize asıl olarak fibrom gelişimiyle seyreden bir hastalıktır. İşitme kaybı genelde sensörinöral tiptir. Bu tabloya vertigo, tinnitus ve fasiyal paralizi eşlik edebilir(6).

Usher Sendromu

OR geçişlidir. Zamanla kötüleşen kısmi veya total SNİK, retinitis pigmentosa ve vestibüler disfonksiyonla karakterize bir sendromdur. ABD'de konjenital işitme kayıplı hastalar arasında görülme oranı %3-6'dır. 3 tipi vardır. Bu tipler işitme kaybının şiddeti, denge problemlerinin varlığı veya yokluğu ve belirti ve semptomların ortaya çıktığı yaş, ayrıca genetik araştırma ile ayırt edilir. En az 5 farklı Usher geni tanımlanmıştır. Bunların en yaygın olanları MYO7A gen mutasyonlarıdır, bunu CDH23, USH2A, CLRN1 ,USH1C genlerindeki mutasyonlar izler(6, 20)

Pendred Sendromu

Vaughan Pendred tarafından 1896 yılında tanımlanmıştır. OR geçiş paterni gösterir. Konjenital işitme kaybı ve tiroid bezi disfonksiyonu ile karakterizedir. Pendrin adı verilen proteini kodlayan SLC26A4 genindeki mutasyon nedeniyle oluşur. SNİK tipindeki işitme kaybı genellikle prelingual başlangıçlı bilateral ve çok ileri derecededir. Radyolojik bulgularda genişlemiş vestibüler aquadukt ve monodini displazisi saptanabilir(21).

Stickler sendromu

Bu sendrom Dr. Stickler tarafından 1965 yılında tanımlanmıştır. 6 yaşından önce başlayan miyopi, konjenital vitreus anomalisi, retina dekolmanı, paravasküler pigmentte dejenerasyon, gibi göz bulguları; eklem hiper mobilitesi, SNİK, orta hat defektleri ve kraniyofasiyal anomaliler gibi bulguların bulunduğu bir sendromdur. Şimdiye dek 6 tipi saptanmış olup %80'i tip I grubundadır. Çoğunluğu OR geçişli olup dominant geçişli formlarında mevcuttur. COL2A1, COL11A1 veya COL11A2 genlerindeki mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır(22).

Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu

Bu sendrom ilk olarak 1957'de Norveçli bir ailede Jervell ve Lange-Nielsen tarafından tanımlanmıştır. Otozomal dominant olarak kalıtılan bu sendrom konjenital işitme kaybı, EKG de QT aralığının uzaması ve egzersiz ya da duygu durumuna bağlı tetiklenen çoklu senkop atakları ile karakterizedir(23). Kromozom 11 üzerindeki KCNQ1 ve kromozom 21 üzerindeki KCNE1 genlerinin mutasyonunun Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu (JLNS) fenotipine yol açtığı, ve bu mutasyonların kalpteki ve iç kulaktaki benzer iyon taşıma kanallarının etkilediği gösterilmiştir(24).

Treacher Collins sendromu

İlk olarak 1900 yılında Edward Treacher Collins tarafından tarif edilen Treacher Collins sendromu (TCS) veya mandibulofasiyal disostoz karakteristik kraniyofasiyal anomaliler ve iletim tipi işitme kaybı ile giden bir sendromdur. OD geçişli olup %50 sine yakınında sporadiktir. Yaygın olarak ortaya çıkan özellikleri arasında, özellikle de mandibula ve zigomatik kemikte görülen hipoplazi ve buna

bağlı malokluzyon, palpebral fissürlerin aşağı çekikliği , yüksek kemerli damak ve ara sıra yarı damak tablosu ile görülür(25). Bu hastalarda eksik veya malformasyona uğramış kemikçikler, ossiküler füzyon, agenezik veya malforme oval pencere ve hatta orta kulak ve epitympanik alanın tamamen yokluğu dahil olmak üzere kemikçikler ve orta kulak boşluğu ile ilgili çok fazla varyasyon gösterilmiştir. Bu kusurlara bağlı iletim tipi olan işitme kaybı sık görülürken sinirsel veya mixt tipte olan işitme kaybı nadirdir(26).Çoğu TCS vakasında 5q32-33.1 kromozomunda bulunan TCOF1 geninin mutasyonları görülür. Bu gen treacle adı verilen fonksiyonu henüz netleştirilememiş bir proteini kodlar(27).

Alport Sendromu (AS)

Genellikle X'e bağlı (%80), OR veya OD geçiş gösterebilen tip 4 kollajen defekti ile oluşan hastalıktır. Kronik böbrek yetmezliği (KBY) ile beraber olan veya olmayan pozitif aile hikayesi, hematüri, anterior lentikonus veya makuler benekler gibi göz bulguları, ilerleyici tip SNİK ve glomeruler bazal membrandaki histolojik değişikliklerden en az 3'ünün bulunması ile tanı konur. OD ve OR geçişli olan Alport Sendromunda COL4A3/COL4A4; X'e bağlı Alport sendromunda ise COL4A5 mutasyonları saptanmıştır(28).

Mitokondriyal Sendromlar

Mitokondriyal Sendromik hastalıkların yaklaşık %70'i işitme kaybı ile birlikte. Bu hastalıklardan bazıları MERRF Sendromu, Kearns-Sayre Sendromu ve MELAS Sendromudur. MERRF sendromunda işitme kaybının yanında, serebellar ataksi, myoklonik nöbetler, demans, optik sinir atrofi, periferik nöropati ve boy kısalığı görülür. Bu sendrom görülen hastaların %80 inde tRNA^{Lys} geninde m.8344A>G mutasyonu saptanmıştır(29). Kearns-Sayre Sendromu , serebellar ataksi, kalp bloğu ve artmış BOS proteini üçlüsünden en az biri ile birlikte, erken yaşta başlayan progresif eksternal oftalmopleji veya atipik retinal pigmentasyon ile karakterize bir mitokondriyal bozukluktur. Hastaların yarısında SNİK görülür. Tipik olarak, KSS büyük ölçekli tek mtDNA delesyonlarına bağlı ortaya çıkar ve genellikle sporadiktir(30).

MELAS Sendromu, mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz ve epizodik paralizi ile karakterizedir. Bu mitokondriyal sendrom tipik olarak normal erken

gelişim, kısa boy, bulantı, migren, nöbetler ve değişken hemiparezi, hemianopi veya kortikal körlük ile kendini gösterir(31). İşitme kaybı hastaların yaklaşık% 30'unda ortaya çıkar, bazen tek semptom olup tipik olarak sensörinöral, bilateral ve progresif tiptedir. MELAS da en sık görülen mutasyon MTTL1 genindeki nokta mutasyondur (A3243G geçişi). Bu mutasyon sonucunda hatalı bir t RNA kodlanır(32).

Nonsendromik İşitme Kayıpları

Diğer sistemik bulgular eşlik etmeden sadece işitme kaybının olduğu klinik tabloya nonsendromik işitme kaybı denir(5). Konjenital işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini oluştururlar. Bunların da yaklaşık %80'i OR, % 20'si OD, geriye kalan yaklaşık %1'i X'e bağlı ya da mitokondriyal geçişlidir(33).

Otozomal Resesif Nonsendromik İşitme Kayıpları (ARSNHL)

OR nonsendromik işitme kayıpları bazı formları geç başlangıçlı olmasına rağmen çoğunlukla prelingual tiptedir. Genellikle ileri ya da çok ileri derecede tüm frekansları etkileyen SNİK görülür(33). Bu tip işitme kaybına sebep olan 71 farklı gen bulunmuştur(7).

Otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı (ARSNHL) akraba evliliğinin yaygın olduğu Türkiye gibi orta ve Uzakdoğu ülkelerinde daha sık görülmektedir. ARSNHL, DFNB olarak adlandırılan gen lokuslarında yer alır(34).

Otozomal Dominant Nonsendromik İşitme Kayıpları (ADSNHL)

Bu güne kadar OD nonsendromik işitme kaybına sebep olan 45 gen bulunmuştur(7). Bu tür kalıtım paternine sahip hastalarda genellikle postlingual, orta derece ve progresif karakterli işitme kaybı vardır(35). İşitme kaybının yüksek frekanslara doğru arttığı alçak frekanslarda normal olduğu bir tablo mevcuttur. İşitme kaybı postlingual dönemde başladığından dolayı bu çocuklarda konuşma oldukça iyidir. İşitme kaybı zamanla alçak frekansları da etkileyip derecesinde orta dereceden ileri dereceye dönüşebilmektedir. DFNA1'de farklı bir odyometrik tablo görülür. Bu gen mutasyonu olan ODNSİK hastalarında diğer DFNA genlerinin genel özelliğinden farklı olarak alçak frekansları tutan progresif işitme kaybı olur(2).

X'e Bağlı Nonsendromik İşitme Kayıpları

Bunlar nonsendromik işitme kayıplarının %1'inden daha azına neden olurlar(6). İşitme kaybı genellikle prelingual başlangıçlı olup ve progresif değildir. Nadiren progresyon saptanır. Hafif dereceden çok ileri dereceye kadar geniş bir aralıkta yer almakla beraber sıklıkla çok ileri derece ve tüm frekansları kapsayan tipte işitme kaybı gözlenir(2). Beş lokus ve 5 gen tanımlanmıştır ancak DFN1 sendromik işitme kayıplarına eklenmiştir(7). X'e bağlı nonsendromik işitme kaybına neden olan genlerden en sık görüleni POU3F4'tür. POU3F4(DFN3)'e bağlı işitme kaybı, POU3F419 olarak adlandırılan bir kopyalama faktöründeki mutasyonlara bağlı ortaya çıkar. Stapes fiksasyonu, internal akustik kanalda ve vestibulumda genişleme gibi bulgularla birlikte dir. İşitme kaybı genellikle mikst tip olarak ortaya çıkar. Diğer lokus ve genlerden kaynaklanan işitme kayıpları değişkenlik göstermektedir(6).

Mitokondriyal Nonsendromik İşitme Kayıpları

Bu tip işitme kaybı formları farklı mtDNA mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni mutasyon 1555 A-G mtDNA dır. Bu mutasyonun aminoglikozid ototoksitesitesi ile ilişkisi saptanmıştır. İşitme kaybı orta ya da yüksek frekansları tutar ve progresif bir seyir gösterir. Bunun sebebi yaşlanmış koklear hücrelerde mtDNA mutasyonunun arttığıının saptanmasına bağlı olarak presbiakuzinin de mitokondriyal sebeplerle bağlı olabileceği düşünülmektedir(6).

Tablo 2.1: İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OR genler(7)

Lokus (OMIM)	Kromozomal lokalizasyonu	Gen (OMIM)	Referans (Pubmed)
DFNB1A	13q12	GJB2	Guilford et al ., 1994 ; Kelsell et al ., 1997
DFNB1B	13q12	GJB6	Del Castillo et al ., 2002
DFNB2	11q13.5	MYO7A	Guilford et al ., 1994; Liu et al ., 1997 ;Weil et al ., 1997
DFNB3	17p11.2	MYO15A	Friedman et al ., 1995 ; Wang et al ., 1998
DFNB4	7q31	SLC26A4	Baldwin et al ., 1995 ; Li et al ., 1998
DFNB5*	14q12	Bilinmiyor.	Fukushima et al ., 1995
DFNB6	3p14 - p21	TMIE	Fukushima et al ., 1995 ; Naz et al , 2002
DFNB7/11	9q13 - q21	TMC1	Jain et al ., 1995 ; Scott et al ., 1996 ; Kurima et al ., 2002
DFNB8/10	21q22	TMPRSS3	Veske et al ., 1996 ; Bonn�e -Tamir et al ., 1996; Scott et al ., 2001
DFNB9**	2p22 - p23	OTOF	Chaib et al ., 1996 ; Yasunaga et al ., 1999
DFNB10	DFNB8'e bakınız		
DFNB11	DFNB7'e bakınız		
DFNB12	10q21- q22	CDH23	Chaib et al ., 1996 ; Bork et al ., 2001
DFNB13	7q34 - 36	Bilinmiyor.	Mustapha et al ., 1998
DFNB14	7q31	Bilinmiyor.	Mustapha et al ., 1998
DFNB15/72/95	3q21- q25 19p13	GIPC3	Chen et al ., 1997 Charizopoulou et al ., 2011, Rehman et al ., 2011
DFNB16	15q21 - q22	STRC	Campbell et al ., 1997; Verpy et al ., 2001
DFNB17	7q31	Bilinmiyor.	Greinwald et al ., 1998
DFNB18	11p14 - 15.1	USH1C	Jain et al ., 1998; Ouyang et al ., 2002; Ahmed et al ., 2002
DFNB18B	11p15.1	OTOG	Scharders et al ., 2012

Tablo 2.1(Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OR genler(7)

DFNB19	18p11	Bilinmiyor.	The Molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8 -11, 1998 (Green et al .,abstract 108)
DFNB20	11q25-qter	Bilinmiyor.	Moynihan et al., 1999
DFNB21	11q	TECTA	Mustapha et al., 1999
DFNB22	16p12.2	OTOA	Zwaenepoel et al., 2002
DFNB23	10p11.2-q21	PCDH15	Ahmed et al, 2003
DFNB24	11q23	RDX	Khan et al., 2007
DFNB25	4p13	GRXCR1	Schraders et al., 2010
DFNB26****	4q31	Bilinmiyor.	Riazuddin et al., 2000
DFNB27	2q23-q31	Bilinmiyor.	Pulleyn et al., 2000
DFNB28	22q13	TRIOBP	Walsh et al., 2000;Shahin et al, 2006; Riazuddin et al, 2006
DFNB29	21q22	CLDN14	Wilcox et al., 2001
DFNB30	10p11.1	MYO3A	Walsh et al., 2002
DFNB31	9q32-q34	WHRN	Mustapha et al., 2002; Mburu et al., 2003
DFNB32/105	1p13.3-22.1	CDC14A	Masmoudi et al., 2003; Imtiaz et al., 2017
DFNB33	9q34.3	Bilinmiyor.	Medlej-Hashim et al., 2002
DFNB35	14q24.1-24.3	ESRRB	Ansar et al., 2003; Collin et al., 2008
DFNB36	1p36.3	ESPN	Naz et al., 2004
DFNB37	6q13	MYO6	Ahmed et al., 2003
DFNB38	6q26-q27	Bilinmiyor.	Ansar et al., 2003
DFNB39	7q21.1	HGF	Schultz et al., 2009
DFNB40	22q	Bilinmiyor.	Delmaghani et al., 2003
DFNB42	3q13.31-q22.3	ILDR1	Aslam et al., 2005; Borck et al., 2011
DFNB44	7p14.1-q11.22	ADCY1	Ansar et al., 2004; Santos-Cortez et al., 2014
DFNB45	1q43-q44	Bilinmiyor.	Bhatti et al., 2008

Tablo 2.1 (Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OR genler(7)

DFNB46	18p11.32- p11.31	Bilinmiyor.	Mir et al., 2005
DFNB47	2p25.1-p24.3	Bilinmiyor.	Hassan et al., 2005
DFNB48	15q23 - q25.1	CIB2	Ahmad et al ., 2005
DFNB49	5q12.3- q14.1.	MARVELD2/B DPI	Ramzan et al ., 2004 ; Riazuddin et al ., 2006; Giroto et al ., 2013
DFNB51	11p13 -p12	Bilinmiyor.	Shaikh et al ., 2005
DFNB53	6p21.3	COL11A2	Chen et al ., 2005
DFNB55	4q12 -q13.2	Bilinmiyor.	Irshad et al ., 2005
DFNB59	2q31.1- q31.3	PJVK	Delmaghani et al ., 2006
DFNB60	5q23.2- q31.1	SLC22A4	Ben Said et al ., 2016
DFNB61	7q22.1	SLC26A5	Liu et al ., 2003
DFNB62	12p13.2 - p11.23	Bilinmiyor.	Ali et al ., 2006
DFNB63	11q13.2 - q13.4	LRTOMT / CO MT2	Du et al ., 2008; Ahmed et al ., 2008
DFNB65	20q13.2 - q13.32	Bilinmiyor.	Tariq et al ., 2006
DFNB66	6p21.2 -22.3	DCDC2	Grati et al ., 2015
DFNB66/67	6p21.31	LHFPL5	Tlili et al ., 2005; Shabbir et a l., 2006; Kalay et al ., 2006
DFNB68	19p13.2	S1PR2	Santos et al ., 2006 ; Santos-Cortez et al ., 2016
DFNB71	8p22 - 21.3	Bilinmiyor.	Chishti et al ., 2009
DFNB72	DFNB15'e bakınız.		
DFNB73	1p32.3	BSND	Riazuddin et al ., 2009
DFNB74	12q14.2- q15	MSRB3	Waryah et al ., 2009 ; Ahmed et al ., 2011
DFNB76	19q13.12	SYNE4	Horn et al ., 2013
DFNB77	18q12 - q21	LOXHD1	Grillet et al ., 2009
DFNB79	9q34.3	TPRN	Rehman et al ., 2010
DFNB80	2p16.1 - p21	Bilinmiyor.	Mosrati et al ., 2013
DFNB81	19p	Bilinmiyor.	Rehman et al ., 2011

Tablo 2.1 (Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OR genler(7).

DFNB82	1p13.1	(****)	Shahin et al ., 2010
DFNB83	DFNA47'ye bakınız		
DFNB84	12q21.2	PTPRQ / OTO GL	Schraders et al ., 2010; Yariz et al ., 2012
DFNB85	17p12-q11.2	Bilinmiyor.	Shahin et al ., 2010
DFNB86	16p13.3	TBC1D24	Ali et al ., 2012 Rehman et al ., 2014
DFNB88	2p12 - p11.2	ELMOD3	Jaworek et al ., 2013
DFNB89	16q21 - q23.2	KARS	Basit et al ., 2011
DFNB90	7p22.1 - p15.3	Bilinmiyor.	Ghazanfar et al ., 2011
DFNB91	6p25	SERPINB6	Sirmaci et al ., 2010
DFNB93	11q12.3 - 11q13.2	CABP2	Tabatabaiefar et al ., 2011
DFNB94		NARS2	Simon et al ., 2015
DFNB95	DFNB15'e bakınız.		
DFNB96	1p36.31 - p36.13	Bilinmiyor.	Ansar et al ., 2011
DFNB97	7q31.2 - q31.31	MET	Mujtaba et al ., 2015
DFNB98	21q22.3 - qter	TSPEAR	Delmaghani et al ., 2012
DFNB99	17q12	TMEM132E	Li et al ., 2015
DFNB100	5q13.2 - q23.2	PPIP5K2	Yousaf et al ., 2018
DFNB101	5q32	GRXCR2	Imtiaz et al ., 2014
DFNB102	12p12.3	EPS8	Behloul et al ., 2014
DFNB103	6p21.1	CLIC5	Seco et al ., 2015
DFNB104	6p22.3	FAM65B	Diaz-Horta et al ., 2014
DFNB105	DFNB32' ye bakınız.		Delmaghani et al ., 2016
DFNB106	11p15.5	EPS8L2	Dahmani et al ., 2015
DFNB108	1p31.3	ROR1	Diaz-Horta et al ., 2016

- * DFNB5 orijinal olarak DFNB4 olarak rapor edildi.
 ** DFNB9 orijinal olarak DFNB6 olarak rapor edildi
 *** DFNB26 dominant modifiye edici DFNM1 tarafından baskılanmıştır.
 **** DFNB82 lokusundaki gen başlangıçta Walsh ve ark 2010 tarafından GPSM2 olarak bildirilmiştir, ancak bu genin daha sonra Chudley-McCullough sendromuna neden olduğu tespit edilmiştir.(Diaz-Horta et al 2012 ve Doherty et al 2012.)

Tablo 2.2: İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OD genler(7).

Lokus (OMIM)	Kromozomal lokalizasyonu	Gen (OMIM)	Referans (Pubmed)
DFNA1	5q31	DIAPH1	Léon et al ., 1992, Lynch et al ., 1997
DFNA2A	1p34	KCNQ4	Coucke et al ., 1994, Kubisch et al ., 1999
DFNA2B	1p35.1	GJB3	Xia et al ., 1999
DFNA2C		IFNLR1	Gao et al ., 2017
DFNA3A	13q11-q12	GJB2	Chaib et al ., 1994, Denoyelle et al ., 1998, Kelsell et al ., 1997
DFNA3B	13q12	GJB6	Grifa et al ., 1999
DFNA4A	19q13	MYH14	Chen et al ., 1995, Donaudy et al ., 2004
DFNA4B	19q13.32	CEACAM16	Zheng et al ., 2011
DFNA5	7p15	GSDME	Van Camp et al ., 1995, Van Laer et al ., 1998
DFNA6	4p16.3	WFS1	Lesperance et al ., 1995, Van Camp et al ., 1999, Bernalova et al ., 2001, Young et al ., 2001
DFNA7	1q21 - q23	LMX1A	Fagerheim et al ., 1996 ; Wesdorp et al ., 2018
DFNA8	DFNA12'ye bakınız.		
DFNA9	14q12 - q13	COCH	Manolis et al ., 1996 , Robertson et al ., 1998
DFNA10	6q22 - q23	EYA4	O'Neill et al ., 1996, Wayne et al ., 2001
DFNA11	11q12.3 - q21	MYO7A	Tamagawa et al ., 1996, Liu et al ., 1997
DFNA12	11q22 - 24	TECTA	

Tablo 2.2 (Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OD genler(7).

DFNA13	6p21	COL11A2	Brown et al ., 1997, McGuirt et al ., 1999
DFNA14	DFNA6'ya bakınız.		
DFNA15	5q31	POU4F3	Vahava et al ., 1998
DFNA16	2q24	Bilinmiyor.	Fukushima et al ., 1999
DFNA17	22q	MYH9	Lalwani et al ., 1999, Lalwani et al ., 2000
DFNA18	3q22	Bilinmiyor.	Bonsch et al ., 2001
DFNA19	10 (perisentrik bölge)	Bilinmiyor.	The Molecular Biology of Hearing and Deafness, Bethesda, October 8 -11, 1998 (Green et al ., abstract 107)
DFNA20	17q25	ACTG1	Morell et al ., 2000, Yang et al ., 2000, Zhu et al ., 2003, van Wijk et al ., 2003, Kemperman et al ., 2004
DFNA21	6p21	Bilinmiyor.	Kunst et al ., 2000
DFNA22	6q13	MYO6	Melchionda et al ., 2001
DFNA23	14q21- q22	SIX1	Salam et al ., 2000 , Mosrati et al ., 2011
DFNA24	4q	Bilinmiyor.	Hafner et al ., 2000
DFNA25	12q21 - 24	SLC17A8	Greene et a l., 1999, Ruel et al ., 2008
DFNA26	DFNA20'ye bakınız		
DFNA27	4q12	REST	Fridell et al ., 1999, Peters et al ., 2008; Nakano et al ., 2018
DFNA28	8q22	GRHL2	Anderson et al ., 1999, Peters et al ., 2002
DFNA30	15q25 - 26	Bilinmiyor.	Mangino et al ., 2001
DFNA31	6p21.3	Bilinmiyor.	Snoeckx et al ., 2004
DFNA32	11p15	Bilinmiyor.	Li et al ., 2000
DFNA33	13q34 - qter	Bilinmiyor.	Bonsch et al ., 2009
DFNA34	1q44	NLRP3	Nakanishi et al ., 2017
DFNA36	9q13 - q21	TMC1	Kurima et al ., 2002
DFNA37	1p21	COL11A1	Booth et al ., 2018

Tablo 2.2 (Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OD genler(7).

DFNA38	DFNA6'ya bakınız.		
DFNA39*	4q21.3	DSPP	Xiao et al ., 2001
DFNA40	16p12.2	CRYM	Abe et al ., 2003
DFNA41	12q24 - qter	P2RX2	Blanton et al ., 2002 , Yan et al ., 2013
DFNA42	5q31.1 - q32	Bilinmiyor.	Xia et al ., 2002
DFNA43	2p12	Bilinmiyor.	Flex et al ., 2003
DFNA44	3q28 - 29	CCDC50	Modamio-Hoybjor et al ., 2003 , Modamio-Hoybjor et al ., 2007
DFNA47	9p21 - 22	Bilinmiyor.	D'Adamo et al ., 2003
DFNA48	12q13 - q14	MYO1A	D'Adamo et al ., 2003, Donaudy et al ., 2003
DFNA49	1q21-q23	Bilinmiyor.	Moreno-Pelayo et al., 2003
DFNA50	7q32.2	MIRN96	Modamio-Hoybjor et al ., 2004, Mencia et al ., 2009
DFNA51	9q21	TJP2	Walsh et al ., 2010
DFNA52	4q28	Bilinmiyor.	Xia et al ., 2002
DFNA53	14q11.2 - q12	Bilinmiyor.	Yan et al ., 2005
DFNA54	5q31	Bilinmiyor.	Gurtler et al ., 2004
DFNA56	9q31.3 - q34.3	TNC	Zhao et al ., 2013
DFNA57	19p13.2	Bilinmiyor.	Bonsch et al ., 2008
DFNA58	2p12-p21	Bilinmiyor.	Lezirovitz et al ., 2009
DFNA59	11p14.2-q12.3	Bilinmiyor.	Chatterjee et al ., 2009
DFNA60	2q21.3 - q24.1	Bilinmiyor.	Liu XZ et al . ARO meeting. Denver, February 2007.
DFNA64	12q24.31 - q24.32	SMAC/DIABLO	Cheng et al ., 2011
DFNA65	16p13.3	TBC1D24	Azaiez et al ., 2014 ; Zhang et a l., 2014
DFNA66	6q15 - 21	CD164	Nyegaard et al ., 2015
DFNA67	20q13.33	OSBPL2	Xing et al ., 2015; Thoenes et al ., 2015
DFNA68	15q25.2	HOMER2	Azaiez et al ., 2015

Tablo 2.2 (Devam): İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan OD genler(7).

DFNA69	12q21.32 - q23.1	KITLG	Zazo Seco et al ., 2015
DFNA70	3q21.3	MCM2	Gao et al ., 2015
DFNA73	12q21.31	PTPRQ	Eisenberger et al ., 2017

*DSPP'deki mutasyonlar bazı ailelerde işitme bozukluğu ile ilişkili dentinogenesis sendromuna neden olmaktadır.

Tablo 2.3: İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan X kromozomu genleri(7)

Lokus (OMIM)	Kromozomal lokalizasyonu	Gen (OMIM)	Referans (Pubmed)
DFNX1	Xq22	PRPS1	Liu et al ., 2010
DFNX2	Xq21.1	POU3F4	De Kok et al ., 1995
DFNX3	Xp21.2	Bilinmiyor.	Schraders et al ., 2011; Huebner et al ., 2011
DFNX4	Xp22	SMPX	del Castillo et al ., 1996
DFNX5	Xq26.1	AIFM1	Zong et al ., 2015
DFNX6	Xp22.3	COL4A6	Rost et al ., 2014

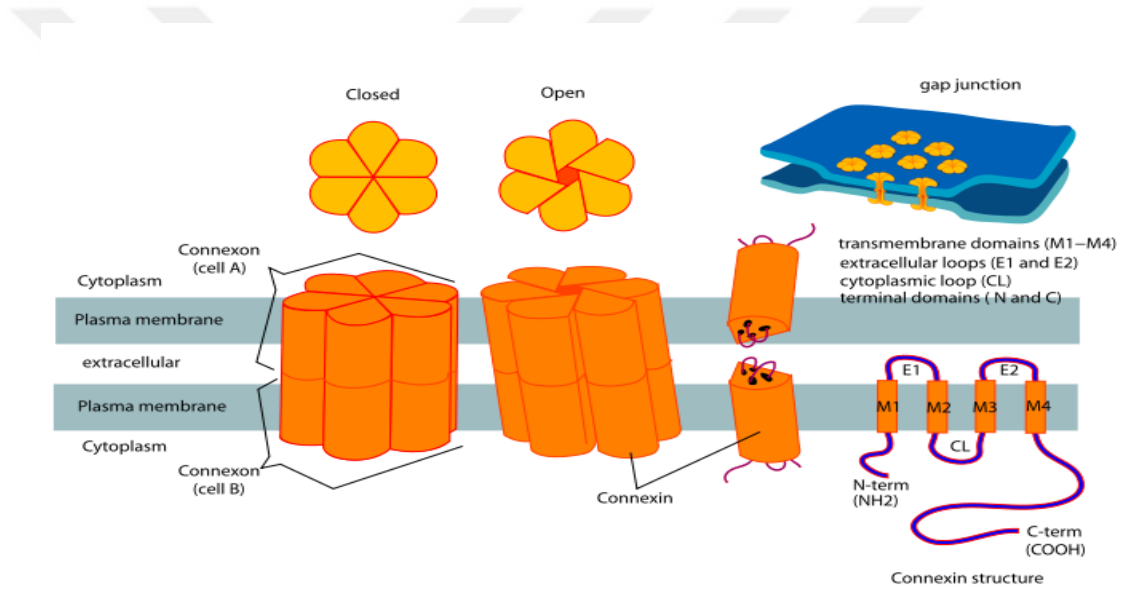
Tablo 2.4: İnsanlarda nonsendromik işitme kaybına sebep olan mitokondriyal genler(7)

Gen	Mutasyon	Referans (Pubmed)
MTRNR1	1555A->G	Prezant et al ., 1993 ; Usami et al ., 1997 ; Estivill et al ., 1998
MTRNR1	1494C->T	Zhao et al ., 2004
MTRNR1	961 (farklı mutasyonlar)	Bacino et al ., 1995 ; Casano et al ., 1999
MTTS1	7445A->G	Reid et al ., 1994 ; Fischel-Ghodsian et al ., 1995 ; Sevier et al ., 1998
MTTS1	7472insC	Tiranti et al ., 1995 ; Jaksch et al ., 1998a ; Jaksch et al ., 1998b ; Schuelke et al ., 1998 ; Verhoeven et al ., 1999
MTTS1	7510T->C	Hutchin et al ., 2000
MTTS1	7511T->C	Friedman et al ., 1999 ; Sue et al ., 1999

2.4.2. Nonsendromik İşitme Kaybına Yol Açtığı Bilinen Bazı Genler

GJB2 (Gap junction protein, konneksin 26 proteini)

GJB2 geni konneksin 26 olarak isimlendirilen 26 kD boyutunda bir konneksin proteinini kodlamaktadır. Konneksin proteinleri integral membran proteinleri olup, hücreler arası bağlantı kanallarıdır. Bu kanallar K^+ , Ca^{++} gibi iyonlar ve küçük sinyal moleküllerinin geçişinde görevlidirler. İç kulakta K^+ döngüsünde ve endolenf içeriğinin homeostazisinde hayati önem taşımaktadırlar. Konneksin 26(cx 26) proteininin, K^+ iyonunun koklear tüy hücrelerinden stria vaskularise geri alımını sağlayan hücrelerin arasındaki gap junction bağlantılarının oluşumunda ve K^+ iyonunun endolenfe geri pompalanmasında görevli olduğu belirtilmektedir(36).



Şekil 2.5: Gap junctionu oluşturan konneksin ve konneksin yapılarının diyagramı (37)

GJB2 geninin kodladığı proteinlerin stria vaskulariste, basal membranda, limbus ve spiral çıkıntıda eksprese olduğu gösterilmiştir(38). GJB2 geni 2 ekzondan oluşmakta ancak birinci ekzonun translasyonu yapılmamaktadır (39). Genin lokalizasyonu 13. kromozomun q11-q12 bölgesinde DFNB1 lokusundadır(40). Nonsendromik işitme kaybına neden olan genler içinde mutasyonu en sık saptanmış olan genidir. Bugüne kadar GJB2 geninde 150'den fazla fonksiyon kaybı yapan mutasyon tanımlanmıştır(41). Bu gende meydana gelen mutasyonların farklı populasyonlarda genetik nedenlere bağlı işitme kayıplarının %20-50'sini oluşturduğu yapılan farklı çalışmalarda bildirilmiştir.(42).

SLC26A4 (Solute carrier family 26, member 4 proteini)

PDS geni olarak da adlandırılan SLC26A4 geni bir anyon taşıyıcı protein olarak bilinen Pendrin'i kodlamaktadır. Tiroid bezi, iç kulak ve böbrekte bulunan bu transmembran proteinin klor, iyot, bikarbonat ve format anyonlarını taşımasında görev aldığı gösterilmiştir(43, 44). Genin kokleada endolenf geri emilim bölgesinde eksprese olduğu ve SLC36A4 mutasyonlarının endolenf sıvısının homeostazisini bozarak işitme kaybına yol açtığı bulunmuştur(45). Bu gen 7q31 bölgesinde lokalizedir ve 21 ekzondan oluşmaktadır. Birinci ekzonun translasyonu yapılmaz(44). Doğuştan işitme kaybı ile tiroid bezinde aşırı büyümeyle seyreden guatrın da saptandığı Pendred sendromunda da bu gendeki mutasyonlar saptanmıştır. Aynı zamanda temporal kemik anomalilerinin eşlik ettiği progresif işitme kaybı olgularında da SLC26A4 geninde mutasyonlar tespit edilmiştir. Temporal kemik anomalileri; mutasyon saptanan kişilerde genişlemiş vestibüler akuadukt, Mondini deformitesi ve koklear spiral kanalın hipoplazisi (normal de 2,5 dönüşten oluşan kokleanın 1,5 dönüşe sahip olması) gibi çeşitlilik göstermektedir. Son yapılan çalışmalarda, nonsendromik işitme kaybı olgularının yaklaşık %4'üne bu gendeki mutasyonların sebep olduğu saptanmıştır(46). SLC26A4 geninde günümüze kadar 120 den fazla mutasyon tanımlanmış olup bunların bir kısmı Pendred sendromuna, bir kısmı da genişlemiş vestibüler kanala yol açmaktadır(41).

MYO7A (Myosin VIIA proteini)

Miyozin ağır zincir 7A olarak adlandırılan ancak kasta yer almayan bu proteini kodlayan MYO7A geni kromozom 11' in q13.5 bölgesindeki DFNB2 lokusunda haritalanmıştır. Gendeki mutasyonlar, Usher sendromu tip 1B, resesif kalıtılan atipik Usher Sendromu, otozomal resesif (DFNB2) ve otozomal dominant (DFNA11) nonsendromik işitme kaybına neden olurlar. Genin 49 ekzonundan 48'i translasyona uğramaktadır. Kodlanan miyozin proteini klasik olmayan miyozin yapısında olup 2215 aminoasitten oluşmaktadır. Gen; koklea, vestibül, retina, testis, akciğer ve böbrekte eksprese olmaktadır(47). Gendeki mutasyonlar, fotoreseptörlerdeki mikrotübüllerde, sperm hücrelerinde, nazal silia hücrelerinde anormal organizasyona neden olmaktadır. Aynı zamanda iç kulakta semisirküler kanal ve utrikulun tip 1 ve tip 2 tüysü hücrelerinde, steriyosilyalarda, kutikuler yapılarda ve hücre gövdesinde eksprese olan MYO7A'daki mutasyonlar korti organının dejenerasyonuna da neden

olarak işitme kaybına yol açarlar(47, 48). MYO7A'daki ilk mutasyonlar prelingual işitme kaybı, vestibüler bulgular ve retinitis pigmentosa ile seyreden Usher sendromu tip 1B'li bir hastada tanımlanmıştır(48, 49). Günümüze kadar ise, 340 farklı mutasyon ve 248 protein varyantı saptanmıştır(47).

MYO15A (Myosin XVA proteini)

DFNB3 lokusunda, 17p11.2 kromozomal bölgesinde lokalize olan bu gen, miyozin 15A proteinini kodlamasında görevlidir (50). Gen 66 ekzon içermekte olup kodladığı klasik olmayan protein yapısındaki ürün, 3530 aminoasit içermektedir. Bu protein kokleada kutikuler plak üzerinde yer alan tüy hücrelerinde eksprese olup, tüy hücrelerindeki aktin organizasyonu için gereklidir(51). Nörosensöriyal epitel hücrelerinde, sakkulus, utriculus ve krista ampullariste de eksprese olduğu kanıtlanmıştır (52). MYO15A genindeki mutasyonlar doğuştan nonsendromik işitme kaybı ile ilişkili bulunmuştur (53). Gende şimdiye kadar 25 farklı mutasyon saptanmıştır (54).

OTOF (Otoferlin proteini)

Otoferlin proteinini kodlayan OTOF geni, DFNB9 lokusunda ve 2p23-22 kromozom bölgesinde lokalizedir (55). OTOF geni C-terminal bölgesi ile hücre membranına bağlanan ve membran yapısındaki veziküllerin plazma membranından hücre içine taşınmasında rol oynadığı düşünülen bir proteini kodlamaktadır. Bu proteine otoferlin adı verilir. Otoferlin proteininin uzun ve kısa izoformları mevcuttur(56, 57). Proteinin uzun izoformunda OTOF geninin 48 ekzonunun tamamı mRNA oluşumu için translasyona uğrarken, kısa izoformunun mRNA'sının oluşturulması için genin ilk 19 ekzonu translasyona uğramaz(56, 58). OTOF geninin korti organında iç tüy hücrelerinde, utrikulus, sakkulusta ve beyin çeşitli kısımlarında yüksek seviyede ekspresyonu olurken; kalp, plasenta, akciğer, pankreas, iskelet kası ve böbrekte daha düşük düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır(56, 59). OTOF genindeki mutasyonların işitme kaybının klasik sınıflamadan farklı bir tipi olan nonsendromik otozomal resesif akustik nöropatiye neden olduğu tespit edilmiştir(60). Hastalardaki işitme kaybı değişik düzeylerde olmasına rağmen, otoakustik emisyon cevapları doğaldır(61). Bugüne kadar bu gende 40'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır(62).

CDH23 (Otocadherin proteini)

Hücreler arası adezyon proteinleri süper ailesinden olan kadherini kodlayan olan bu gen DFNB12 lokusunda ve 10q21-22 kromozom bölgesinde lokalizedir. CDH23 geni 69 ekzondan oluşur(63). Kadherin glikoproteini kalsiyuma bağlı hücrelerin birbirine adhezyonunda görev almaktadır. Kadherin 3354 aminoasit, bir transmembran domaini ve 27 kaderin tekrarı içermektedir(64). Bu proteinlerin sterosilyanın tüy hücreleri kohezyonunda görevli olduğu saptanmıştır. Ayrıca tüy hücrelerinin erken farklılaşmasında ve sterosilyaların organizasyonunda da görevli olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur(65). Retinada ve kokleada eksprese edildiği gösterilmiştir(66). CDH23 genindeki mutasyonlar, otozomal resesif patern gösteren işitme kaybına neden olmakla beraber; işitme kaybı ile birlikte, retinitis pigmentosanın da bulunduğu Usher sendromu Tip 1D'ye de sebep olmaktadır(61). CDH23 geninde bugüne kadar 35'den fazla mutasyon rapor edilmiştir (41).

TMIE (Transmembrane inner ear-expressed protein)

Bu gen transmembran iç kulak proteini adlı bir proteinin kodlamasında görevlidir. TMIE geni 3p21 kromozom bölgesinde saptanmış olup, DFNB6'da lokalizedir. Translasyona uğrayan 4 ekzondan oluşan genin birçok farklı dokuda eksprese olduğu bilinmektedir(67, 68). TMIE geni etkilenmiş fareler üzerinde yapılan çalışmalarda görülen koklea patolojisi; bu genin normal bir doğumdan itibaren kokleadaki duyuşal tüy hücrelerinin olgunlaşması ve sterosilyaların da normal gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir(45). Gendeki mutasyonlar otozomal resesif geçiş gösteren, konjenital ya da prelingual dönem başlangıçlı, ileriden totale kadar olabilen, iç kulak anomalilerinin görülmediği sensörinöral tipte işitme kaybına neden olmaktadır(54). Şimdiye kadar gende 6 farklı mutasyon bildirilmiş olup, ekzon 3'de görülen p.R84W mutasyonunun Türkiye'de olası founder etkiye bağlı olarak daha sık görüldüğü bildirilmiştir(50).

TECTA (Tectorin, Alpha)

TECTA geni α -tektorin adlı bir proteini kodlamakta olup α -tektorin tektoryal membranların kollajen olmayan temel bileşen proteini(61). Tektoryal membran korti organındaki özelleşmiş tüy hücrelerinin sterosilyaları ile bağlantı halindedir. Gen translasyona uğrayan 23 ekzondan oluşmakta olup, 11q23-q25 kromozom

bölgesinde lokalizedir(69, 70). α - tectorin proteini 2155 aminoasitten oluşmaktadır.TECTA genindeki mutasyonlar sonucu etkilenen protein domainine bağlı olarak, farklı fenotipik bulgular ortaya çıkmaktadır. Bu genin mutasyonlarına bağlı olarak otozomal dominant geçişle birlikte otozomal resesif geçiş gösteren işitme kaybıda oluşmaktadır. Bugüne kadar TECTA genide 13 farklı mutasyon tanımlanmıştır (41).

PCDH15 (Protocadherin 15)

PCDH15 geni protokaderin 15 olarak adlandırılan, kaderin protein ailesinin bir üyesi olan proteini kodlar. Bu protein Ca^{++} bağımlı hücre-hücre birleşmesinde görevli olup normal koklea işlevi için önemlidir. PCDH15 geninin koklea tüy hücre steriosiliyası ve retina fotoreseptörlerinde eksprese edildiği yapılan immunohistokimyasal çalışmalar ile kanıtlanmıştır(71). CDH23 ile birlikte bu iki genin tüy hücrelerinin mekanotransdüksiyon olayının gelişim ve rejenerasyon süreçlerinde önemli rol oynadığı da in vitro çalışmalarla saptanmıştır(72). PCDH15 geni 10q21-q22 kromozomal bölgesinde haritalanmıştır, 33 ekzon içermektedir ve kodladığı protein 1955 aminoasitten oluşmaktadır (73). Gendeki mutasyonlar, otozomal resesif işitme kaybı ve Usher Sendromu tip 1F ile ilgili bulunmuştur. Bu gende günümüze kadar 14'den fazla mutasyon tanımlanmıştır(41).

TMC1 (Transmembrane Channel-Like Protein 1)

TMC1 geni TMC gen ailesinden olup, çok geçişli bir transmembran proteinini kodlamasında görevlidir. Gen 9. kromozomda q13-q21 bölgesinde haritalanmıştır. Gen 24 ekzona sahip olup, 3201 baz çifti büyüklüğünde mRNA'yı kodlamaktadır, kodladığı protein 7-kD büyüklüğündedir (74). Proteinin iç kulaktaki fonksiyonu tam bilinmemekle beraber, farelerde yapılan çalışmalarda iç kulaktaki dış tüy hücrelerinde eksprese olduğu belirtilmektedir(75). TMC1 genindeki mutasyonlarının hem otozomal dominant (DFNA36) hem de otozomal resesif (DFNB7/DFNB11) geçiş gösteren işitme kaybına neden olduğu saptanmıştır. Günümüze kadar 31 farklı otozomal resesif mutasyon belirlenmiştir. Genin resesif mutasyonları ağır veya total, konjenital işitme kaybına neden olmaktadır. Gendeki dominant mutasyonlar ise progresif tipte işitme kaybına yol açmaktadır (75).

TMPRSS3 (Transmembrane Protease, Serine 3)

Bu gen 21q22.3 kromozom bölgesinde haritalanmış olup, transmembran serin proteaz 3 olarak adlandırılan bir proteini kodlamaktadır. Gen 13 ekson bölgesi içermektedir(76). TMPRSS geninin birçok dokuda özellikle stria vaskulariste ve korti organındaki destek hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir(77). Bu genin ekspresyonunda görevli olduğu proteinin amiloride duyarlı sodyum kanallarında ve endolenften sodyum geri emiliminde görevli olduğu öne sürülmektedir(78). TMPRSS3 mutasyonlarının konjenital ve çocukluk çağı başlangıçlı olmak üzere iki farklı formda otozomal resesif işitme kaybına yol açtığı saptanmıştır (77). Günümüze kadar bu gende 19 farklı mutasyon bildirilmiştir(78).

TMHS (Tetraspan Membrane Protein of Hair cell Stereocilia)

Tüy hücrelerinin sterosiliasında bulunan tetraspan membran proteinini kodlayan gen, dört ekzon içermekte olup, 2162 baz çiftlik bir mRNA yı kodlamaktadır. Gen, ilk olarak farede 17. kromozom üzerinde belirlenmiş olup, insanda 6p21.31 kromozomal bölgesiyle homoloji göstermektedir(79). Genin kodladığı protein ise 219 amino asitten oluşmakta ve dört transmembran helikazını içerdiği belirtilmektedir(80). Farelerde bu proteine %60'dan fazla homoloji gösteren iki protein (LHFL3, LHFL4) daha saptanmış olup bu proteinler TMHS ile birlikte tetraspan süper ailesinin üyesidirler. Memelilerde bu protein ailesi başlıca beyin, spinal kord, retina gibi nöral dokularda eksprese edilirler. TMHS kokleada apikal membran ve tüy hücreleri sterosiliasında bulunduğu bilinen tek tetraspan proteindir. Tüy hücrelerinin yapısal gelişiminde görevli olduğu ve bu gen mutasyonlarının vestibüler fonksiyon bozukluğuna, korti organ dejenerasyonuna ve kokleadaki tüy hücre kümelerinde anomalilere neden olabileceği belirtilmektedir(79). TMHS mutasyonları otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş ve günümüze kadar 4 mutasyon tanımlanmıştır(41).

2.4.3.Moleküler Teknikler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)

Bu yöntem ilk olarak 1985 yılında Mullis K. tarafından geliştirilmiş olup özel bir DNA dizisinin in vitro bir ortamda çoğaltılması esasına dayalıdır(81). Çok az miktardaki DNA ile hızlı biçimde çalışma imkânı sunması nedeniyle kullanım alanı oldukça yaygındır.

Yöntem temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır:

1. DNA'nın çift zincirli heliks yapısının yüksek ısı ile denatürasyonu, zincirlerin ayrılması (denatürasyon-ayrılma)
2. Amplifikasyon hedeflenen DNA bölgesine özgül sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing-yapışma)
3. Yüksek ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak zincirin uzatılması (polimerizasyon- uzama)

Bu üç aşamanın tamamına bir PCR siklusu denir ve çoğaltılacak DNA'nın miktarı bu siklusun tekrarlanma sayısına bağlı olarak değişir. Bir döngü yaklaşık olarak 3-5 dakika (dk) sürer, ortalama 20- 40 kez tekrarlanır ve kalıp DNA'nın istenilen bölgesi, döngü sayısı katı kadar çoğaltılmış olur (2n) . Denatürasyon aşamasında yaklaşık 90-95 °C ısıya, 5-10 dakika süre ile maruz bırakılarak tek zincirli hale gelen DNA, daha sonraki aşamada 50-70 °C arasında bir ısıya maruz kalır. Denatürasyon aşamasından sonra tek zincirli DNA segmentinin uç bölgelerine komplementer olan oligonükleotidlerin bağlanması sağlanır. DNA sentezi 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda, bir önceki basamakta bağlanan oligonükleotidlerin kalıp DNA'nın sentezi için primer olarak görev yapması ile gerçekleşir. Isıya dirençli DNA polimeraz enziminin kullanıldığı bu aşamada, nükleotidler 5' ucundan 3' ucuna doğru eklenerek hedef DNA'nın iki zincirli kopyası oluşturulur.

PCR'da dikkat edilmesi gereken durumlar özetlenecek olursa;

Bu reaksiyonun en kilit noktasında yer alan DNA polimeraz enziminin etkin olabilmesi için uygun koşulların sağlanması çok önemlidir. Her enzim gibi DNA polimeraz enziminin de en etkin olduğu bir pH aralığı vardır ve reaksiyon boyunca bu pH değerlerinin korunabilmesi için tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzimin etkin olmasını sağlayan en önemli iyon olan Mg^{+2} , oligonükleotidlerin DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Fazla miktardaki Mg^{+2} iyonu, enzimin özgülüğünü azaltırken, az miktardaki Mg^{+2} enzimin etkinliğini düşürür ve hatta inaktivasyonuna neden olur. Primerlerin hedef bölgeye bağlanma sırasındaki sıcaklık, annealing (yapışma) ısı olarak da belirtilmektedir ve oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu aşamada kullanılan uygun sıcaklık değerleri reaksiyonun spesifikliğini ve hızını arttırmaktadır. Oligonükleotidlerin uzunluğu (tercihen ortalama 15-30 nükleotid), amplifikasyonu hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunması ve nükleotid içeriklerinin orantılı ve rastgele

olması ayrıca tekrarlayan diziler içermemesi önemlidir. Kullanılan tüm deoksinükleotid trifosfatın (dNTP) türlerinin konsantrasyonunun eşit olması ayrıca miktarının yeterli olması gerekmektedir. dNTP miktarının az olması ürün miktarının azalmasına, fazla miktarda kullanımında hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğaltılmasına neden olmaktadır(81).

DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)

DNA dizi analizi veya DNA sekanslama; DNA'daki nükleotid dizilerinin belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Maxam A. ve Gilbert W.'nin geliştirdiği kimyasal yöntem ile Sanger F. ve arkadaşlarının geliştirdikleri dideoksinükleotid metodu DNA sekans analizi için iki temel tekniktir. Bu tekniklerin her ikisinde de analiz edilecek DNA'nın hazırlanması, zincir reaksiyonları ve yüksek voltajlı jel elektroforezinden oluşan üç temel aşama mevcuttur. Maxam A. ve Gilbert W.'nin kimyasal yönteminde; DNA'nın belirli bazların arasından kırılır, öncelikle dizisi belirlenecek DNA segmentinin bir zinciri kullanılır. Bu zincirin 5' ucu polinükleotid kinaz enzimi aracılığıyla radyoaktif fosfat ile işaretlenir. Bu işaretleme, elektroforezden sonra hedeflenmiş bir DNA segmentinin belirlenmesini sağlayacaktır. Bir sonraki aşamada, her baz için bir tane olmak üzere dört farklı kimyasal restriksiyon reaksiyonu meydana gelir. Sonuçta farklı pozisyonlarda bulunan hedef nükleotidlerden kesilmiş diziler elde edilir ve kesildiği pozisyona göre, tümü 5' ucundan işaretlenmiş olup, boyları farklılık göstermektedir. Elde edilen bu reaksiyon ürünleri, poliakrilamid jel üzerinde, ardışık dört adet paralel çukura uygulanır ve uzunluklarına göre elektroforezde ayrılır. DNA segmentlerinin uçları önceden, radyoaktif fosfat ile işaretli olduğu için otoradyografi yöntemiyle bantlar görüntülenir ve böylece DNA segmentinin dizisi okunabilir(81).

Fred Sanger F. ve arkadaşları tarafından geliştirilen diğer bir yöntemde ise, belirli bir bazla sona eren bir DNA zincirinin sentezlenmesi esasına dayanır. Sentez reaksiyonunda DNA polimeraz enzimi görev almaktadır. Dizisi belirlenecek olan DNA segmenti yeni sentezlenecek DNA segmenti için kalıp olarak kullanılır. Bu yöntemde de, polimeraz zincir reaksiyonunda olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama döngülerinin belirli kez tekrarlanmasıyla sentez gerçekleştirilmektedir(81). Bu yöntemde kullanılanlar; dizisi saptanacak DNA dizisi; DNA polimeraz enzimi, substratlar (oligonükleotid, dört farklı dNTP ve ddNTP) ile tampon görevi için

kullanılan maddelerdir. Reaksiyonda substrat olarak kullanılan ddNTP'lerin 3' uç kısmında hidroksil (OH) grubu bulunmaz. Bundan dolayı bu moleküller yeni sentezlenen DNA molekülüne katılır fakat 3' uç kısmında hidroksil grubu bulunmadığı için kendisine nükleotid eklenemez ve zincirin sentezi sonlanır. Böylece farklı uzunlukta DNA zincirleri elde edilir. Kimyasal yöntemde olduğu gibi elde edilen ürünler jel üzerinde, yan yana dört paralel çukura uygulanır ve uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılıp, DNA segmentleri otoradyografi ile belirlenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru olacak şekilde okunur ve DNA dizisi saptanmış olur.

Günümüzde sekans analizi için bilgisayar destekli otomatize sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerde radyoaktif izotoplar yerine floresan boyalar tercih edilir. Sonuçta temelde PCR ürünlerinin floresan boya ile işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesi esasına dayanan bu sistemlerde ilk PCR sonrası ortaya çıkan ürünler sekans döngüsü (cycle sequencing) denilen yeni bir PCR döngüsüne tabi tutulur. Bu ikinci PCR aşamasında, ilk döngüde edilen ürünler kalıp DNA görevini görür. DNA polimeraz enzimi ortama eklendiğinde primer segmentin yardımıyla floresan boya ile işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire eklenir ve reaksiyon klasik bir PCR siklusu gibi ilerler. İki PCR arasındaki temel fark primer segmentinin uzaması esnasında işaretlenmiş dideoksinükleotitlerin (ddNTP) bağlanması ile zincirin uzamasının sonlandırılmasıdır. Son aşama olarak floresan boya işaretli bazlar kullanılan bu sistemlerde, amplifikasyon sonrasında ortaya çıkan ürünler kapiller jelle yüklenir ve sistemdeki lazer ile farklı özellikteki floresan boyaları algılanır. Bilgisayar programları yardımı ile her bir baz kendine özel bir renk eğrisi ile gösterilir ve bu şekilde istenilen DNA bölgesinin nükleotid dizisi belirlenmiş olur(81).

Çalışmamızda DNA dizi analizi için yeni ve gelişmiş bir teknoloji olan yeni nesil sekanslama sistemi (Illumina Miseq Nexera XT) kullanıldı. MLPA gibi eski tekniklerde sadece araştırılan gene ait delesyon veya duplikasyon araştırılabilirken bu teknikte birden fazla gen veya tüm genom SNV vb. dahil tüm mutasyonlar açısından taranabilmektedir. 96 kapillerli 3730 DNA Analizör, yüksek performanslı, numune başına düşük maliyetli DNA fragman analizleri ve geleneksel DNA sekans uygulamalarının yapılabildiği bir sistemdir. Yüksek optik hassasiyeti ve çoklu otomasyon özellikleri ile insan kaynaklı hataları minimuma indirir. Bu sistem ile

RFLP (Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi), mikrosatellit analizi, SSCP (Tek zincirli uygunluk polimorfizmi) LOH (Heterozigotluk Kaybı), SNP (Tek nükleotid polimorfizmi) tarama gibi geniş çapta sekanslama ve fragman analizi uygulamaları yapılabilmektedir.

Mikroarray Analizi

Mikroarray teknolojisi, küçük hacimlerde numune kullanılarak tek bir deneyde, gen ekspresyon analizleri ve SNP (tek nükleotid polimorfizmi) genotiplenmeleri yapmayı sağlayan, tek array üzerinde tüm genomu analiz etmeye olanak sağlayan son derece gelişmiş ve hızlı bir yöntemdir. İlk olarak 1997 yılında Solinas-Toldo ve arkadaşları hedef bir DNA dizisini cam matriks üzerine sabitleyerek mikroarraylerin temelini atmışlardır (98). Sonraki çalışmalarda, Pollack ve arkadaşları array platformu üzerine cDNA (komplementer DNA) dizisini sabitleyerek genom düzeyinde DNA'daki kopya sayısı değişmelerini inceleyip değerlendirmişlerdir(82). Sonraki yıllarda bilgisayar ve mühendislik alanındaki gelişmelere paralel olarak ilerleyen bu teknoloji ile cam matriks üzerinde her biri özel bir geni belirten binlerce farklı DNA segmentinin (sentetik oligonükleotidler, cDNA'lar, kozmitler ve PCR ürünleri) yapıştırılması ile elde edilen arrayler ile daha hızlı ve güvenilir veriler elde edilmeye başlanmıştır. SNP mikroarraylerin da yardımı ile hastalığa veya hastalık yatkınlığına neden olan gen mutasyonları saptanabilmekte ayrıca bu teknoloji kanser etyoloji araştırma çalışmalarında, gen haritalamasında, DNA sekans incelemelerinde ve epigenetik modifikasyonların araştırılmasında da kullanılabilir.

Bu yöntem temel olarak aşağıdaki basamaklar ile özetlenebilir:

- 1.** İncelenmesi istenilen hedef DNA, RNA ya da cDNA dizilerine komplementer diziler içeren problemlardan oluşan mikroarray platformları hazırlanır veya ticari olarak satın alınıp temin edilir.
- 2.** İncelenecek örnekten floresan ile işaretli DNA, RNA ya da cDNA kalıpları hazırlanır.
- 3.** İşaretlenmiş DNA ya da cDNA kalıpları ile mikroarray platformu uygun şartlarda hibridizasyona tabi tutulur.
- 4.** Hibridizasyon işleminden sonra fazlalık olan işaretli örnekleri ortamdan uzaklaştırmak için cam matriks yıkanır.

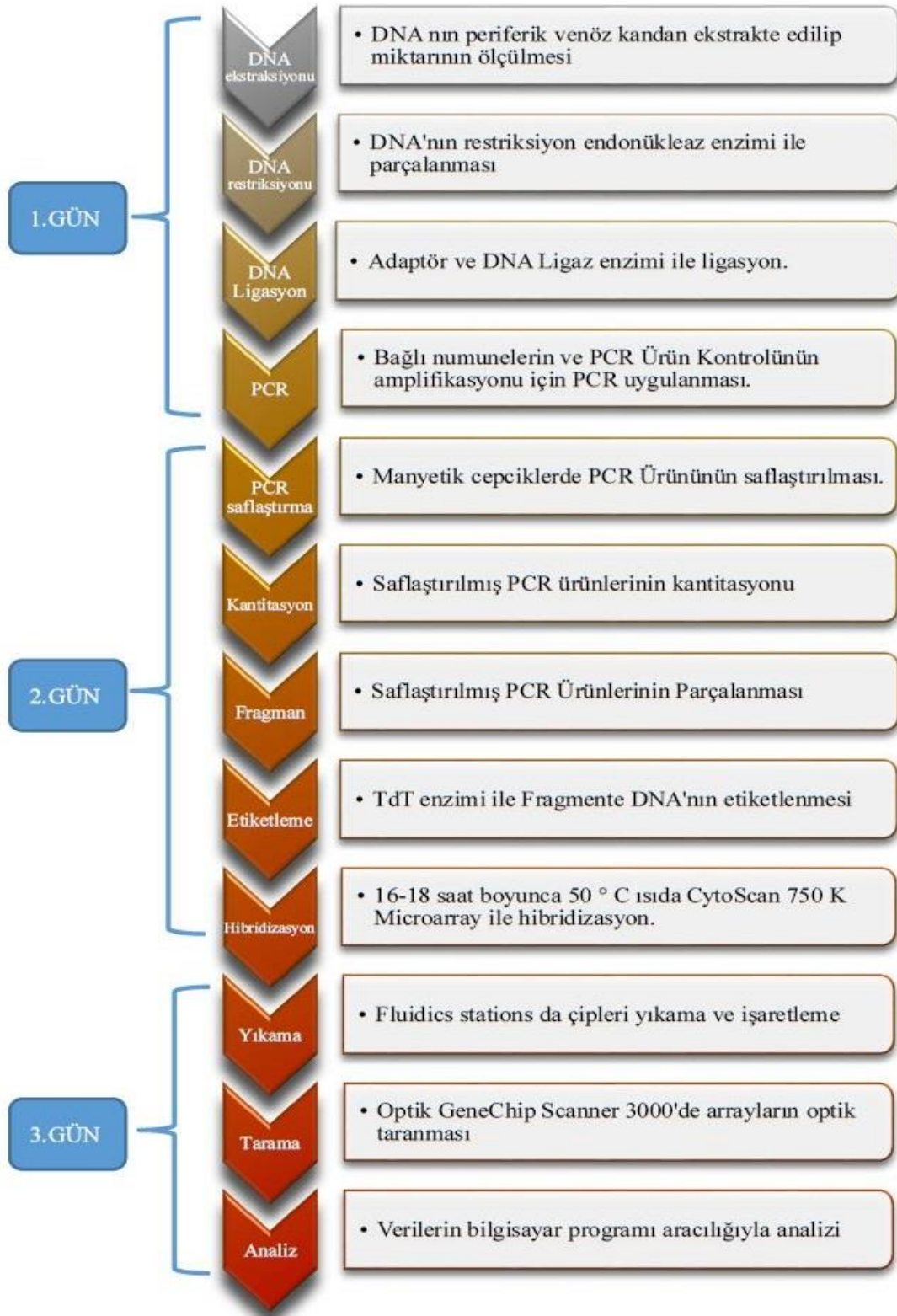
5. Yıkamadan sonra platform yüzeyindeki hibridizasyonun varlığı, floresan ile elde edilen ışımalar sayesinde lazerli bir dedektör yardımıyla algılanır.
6. Spektrofotometrede ışımaya emisyon spektrumu ölçülür.
7. Ölçülen emisyon spektrumu bilgisayar ortamına aktarılıp depolanır.
8. Depolanan görüntüler spesifik bir bilgisayar yazılımı aracılığıyla değerlendirilir.

Bu aşamalardan sonra mikroarray platformu üzerindeki noktaların hangisinde hibridizasyonun gerçekleştiği ve gerçekleşmiş hibridizasyonun sayısal olarak seviyesi değerlendirilerek yorumlanması yapılır(83). Tüm bu aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.(Şekil 2.6)

Araştırmamızda kullandığımız Thermo Fisher™ CytoScan™ 750K (Applied Biosystems™) Array Genotipleme teknolojisi ise, oldukça çok sayıda genotiplemenin çok az miktarda numune ve sarf malzemesi kullanılarak yapılabilirdiği, oldukça geniş uygulama alanı bulunan yeni bir yöntemdir. Bu yöntem veri kalitesinin yanında çözünürlüğünde oldukça yüksek olmasından dolayı kullanılmaktadır. Mikroarray yönteminde kullanılan pleytler mikroskop slaydı boyutlarındadır (63 mm x 19 mm). Her bir pleyt 24 alt array ve her bir alt array’de 64 çukurcuktan oluşur. Sonuçta pleytlerin üzerine yerleştirilmiş 1536 reaksiyon çukurcuğu bulunmaktadır. Her bir çukurcuk 300 µm çap ve 300 µm derinlikte olup, 33-nL’lik reaksiyon kapasitesine sahiptir. 256 SNP’ ye kadar Thermo Fisher™ genotipleme testlerinin (araştırmacının seçtiği), liyofilize halde pleyte yüklemesi yapılır ve kullanıma hazır halde araştırmacıya gönderilir.

Genotipleme çalışması, aynı zamanda allelik diskriminasyon çalışması olarak da adlandırılmakta olup, bilinmeyen bir örneğin genotipini saptamaya dönük kullanılan son nokta deneyidir. Bu yöntem ile SNP’lerdeki iki alleli birbirinden ayırt edip tespit etmemiz mümkün olabilmektedir.

Bu arrayda bulunan her bir probun 5’ ucunda raportör boya bulunmaktadır. VIC® boyası incelenen SNP’teki 1. allelin, FAM™ boyası ise 2. allelin 5’ ucunda yer alır. Ayrıca her bir probun 5’ ucunda ileri ve geri başlangıç noktası olarak kullanılan DNA parçacıkları (primerler) bulunmaktadır. Ayrıca her bir probda; probun uzunluğunu arttırmadan, erime sıcaklığının artmasına olanak sağlayan “Minör Groove Binder” adlı modifikasyon bulunur ve bu modifikasyon prob boylarının daha kısa tasarlanmasına olanak sağlar. Ayrıca problemlerin 3’ ucunda



Şekil 2.6: Mikroarray analizi aşamalarının şematik gösterimi

floresan vermeyen “quencher”lar bulunur ve bu durum, gerçek zamanlı (real time) PCR sistemlerinin roportör floresan boyayı doğru olarak saptamasını sağlar.

Sonuç olarak bu yöntem bize örneğimizin, 1. allel homozigot, 2. allel homozigot ya da her iki alleli de taşıyarak heterozigot olduğunu belirtir. Floresan boyalar kullanılarak elde edilen görüntüler son aşama olarak diğer yöntemlerde olduğu gibi bilgisayar yazılımları aracılığıyla değerlendirilip raporlanır.

2.4.4. Tanı Ve Tedavi

İşitme kaybı ile başvuran hastaların değerlendirilmesinde kulak burun boğaz uzmanı, klinik genetik uzmanı, odyolog ve oftalmolog birlikte çalışmalı ve koordinasyon kulak burun boğaz uzmanı tarafından sağlanmalıdır. İyi bir anamnez alınması, fizik muayene ve odyolojik değerlendirmenin yapılması etyolojinin ortaya konmasında çok önemlidir. Sendromik işitme kayıplarının değerlendirilmesinde anamnez ve fizik muayenede sistemik bulgulara yönelik de inceleme yapılması gerekir. Ayrıca gebelikte geçirilen intrauterin enfeksiyonlar, menenjit, hipoksi ve ototoksik ilaçlar gibi işitme kaybı yapan başka sebepler de detaylıca araştırılmalıdır(6).

Odyolojik değerlendirme tanıda oldukça değerli olup işitsel beyin sapı cevapları (BAEP, ABR) ve otoakustik emisyon (OAE) gibi elektrofizyolojik testler işitme bozukluklarının tespitinde çok önemli rol oynar. Yaşı 6 ayı geçen çocuklarda ise davranışsal testler yapılabilir(6).

Çok iyi bir anamnez ve fizik muayeneden sonra dahi hastaların %30’unda işitme kaybının etyolojisi saptanamayabilir. Bu durumda tanı için ek araştırmalar yapmak gerekir. Geçmişte bunlar için birçok test yapılırken günümüzde genetik tarama bu testlerin neredeyse tamamının yerini almıştır. GJB2 mutasyonları için tam bir tarama yapılmalıdır. DFNB1 tanısı konduysa ilave ileri testlere ihtiyaç yoktur çünkü nedeni saptanmayan işitme kayıplarının %20-50 si bu gen mutasyonuna bağlı oluşmaktadır(42). Tanı için kazanılmış konjenital işitme kayıpları nedenleri de akılda tutulmalıdır. En sık neden gebelikte maruz kalınan sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonudur. İnceleme yenidoğan döneminde mutlaka yapılmalıdır. Kalıtsal işitme kayıplarının incelenmesinde NFII şüphesi durumunda, progresif işitme kaybı varsa ve odyolojik incelemelerde retrokoklear patoloji düşünülüyorsa MR incelemesi

yapılmalıdır. Bunların dışında tiroid fonksiyon testleri, idrar tetkiki, renal USG , EKG gibi tetkikler de yapılabilir(6).

Eğer GJB2 mutasyonu saptandı ise genellikle ek testlere ihtiyaç yoktur çünkü genellikle eşlik eden hastalık yoktur. Bu durumda hasta ve ailelerine klinik genetik uzmanınca genetik danışmanlık verilmelidir. Green ve ark. yaptıkları çalışmada çocuklarında işitme kaybı olup normal işitmesi olan ebeveynlerin ikinci çocuklarında işitme kaybı ortaya çıkma olasılığını % 17,5 olarak bulmuşlardır(6).

Çok ileri derecede işitme kaybı olan hastalarda koklear implant tedavisi gittikçe önem kazanmaktadır. Konuşma gelişiminin ve çocuğun kognitif fonksiyonlarının normal kabul edilen düzeyde olabilmesi, olumsuz etkilenmemesi için işitme kayıplarının erken teşhis ve tedavisi çok önemlidir. Yenidoğan işitme tarama programı erken teşhiste büyük öneme sahiptir. Çocuklarda en geç ilk 6 ayda kesin tanı konularak işitme cihazı ile rehabilitasyona başlanmalı ve sonrasında uygun hastalara koklear implant tedavisi uygulanmalıdır(6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 2009 yılından itibaren nonsendromik konjenital işitme kaybı tanısı konulan veya daha önce tanısı konmuş olan ailesinde bir veya daha fazla konjenital işitme kaybı tanılı kişi bulunan 0-16 yaş arasında 34 hasta dahil edildi. Bu hastaların tamamına kliniğimizde kohlear implant operasyonu uygulanmış olup bu hastaların tümünde işitme kaybı prelingual dönemde saptanmış, konjenital nonsendromik çok ileri derecede olup SNİK tipte idi. Ayrıntılı klinik değerlendirmeye tabi tutularak, muayene edilen hastalarda işitme kaybının etyolojisinin herhangi bir sendromla alakalı olmaması için özellikle Usher, Pendred, Brakio-Oto-Renal (BOR), Waardenburg, Treacher Collins, Jervell-Lange Nielsen ve Alport gibi sendromlar klinik olarak elimine edilmiştir.

Çalışmanın başlamasından önce Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2018/308 karar sayısı ile onay alınmıştır. Çalışmaya alınan tüm hastaların velilerine yaptığımız çalışma hakkında sözlü ve yazılı olarak bilgi verildi ve aydınlatılmış onam formu imzalatıldı. Olguların ayrıntılı öyküsü alınıp, detaylı fizik muayeneleri yapıldı ve odyolojik incelemeler uygulandı.

Çalışmamızda hasta grubunun oluşturulması ve numunelerin toplanması Selçuk Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda, işitme kaybıyla ilişkili genlerde yeni nesil sekans analizi incelemesi Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda ve bu genlerde mutasyon saptanmayan hastalarda mikroarray yöntemi genomun detaylı analiz edilip taranması ise dış merkezde özel genetik laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu için klasik spin metot yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için, araştırmaya katılan hastalardan, 5.4 mg 0,5 M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren (BD Vacutainer, ABD) polietilen 2 adet tüp içerisine 3'er mL tam kan numunesi alındı. Alınan bu kan numuneleri +4 °C sıcaklıkta belirli süre saklandı. Kan örneklerinin toplanması tamamlandıktan sonra bu örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA'ların miktarını ölçmek için spektrometre cihazında mikrolitredeki DNA miktarları örneklerde ölçüldü.

Elde edilen DNA'larda yeni nesil sekanslama tekniği (NGS) ile işitme kaybı gen paneli çalışıldı. Elde edilen 34 genomik DNA örneğinin tamamına 6 gende gene (GJB2, GJB3, GJB6, KCNQ1, KCNQ4, WFS1) mutasyon olup olmadığına bakıldı.

Bu genlerin tamamı toplumumuzda en sık işitme kaybına yol açan genler arasından dikkatlice seçilmiştir.(84) Bu genleri amplifiye etmek ve dizi analizi yapmak için 2 çift primer kullanıldı. 1. primer çifti ile amplifiye edilen ve dizi analizi sonrasında okunamayan bölgeleri için 2. primer çifti kullanılarak işlemler tekrarlandı. Dizi analizi için kalıp DNA olarak temizlenen PCR ürünleri kullanıldı. Kalıp dizisi ilk PCR işleminde kullanılan dizi ile aynı idi. Reaksiyonlarda CEQ2000XL (Beckman Coulter, ABD) cihazı kullanıldı. Ardından temizlenip sekans analizi için hazırlanmış olan PCR ürünleri ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile kaplandı. Bu ürünler otomatik yeni nesil sekanslama cihazına Illumina Miseq (Illumina, ABD) folyo paketinden çıkartılarak yüklendi. Cihazdan alınan veriler doğrultusunda analiz edilen 6 gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) referans gen dizileri ile karşılaştırılarak analiz edildi. Herhangi bir mutasyon, delesyon yada anomali saptanmayan hastalarının DNA'larında DNA mikroarray tekniği ile delesyon, duplikasyon, SNP (Single Nucleotid Polymorphisms), CNV (Copy Number Variation) analizi yapıldı.

Yeni nesil sekanslama sonucunda 6 genin tamamında mutasyon saptanmayan 15 hastaya Affymetrix Cytoscan 750 K Microarray yöntemi ile genomda taramalar yapılmıştır. Affymetrix Cytoscan 750 K Microarray sistemi, CNV tespitinde 550.000 işaretleyici marker ve SNP tespitinde 200.000 yüksek performanslı proba sahip olup; doğruluğu >% 99 olan, tüm genom çapında bir analiz yapılmasına olanak sağlayan bir sistemdir. Tüm problemler mükemmel performans için ampirik olarak seçilmiştir. Mikroarray platformuna yerleştirilip çalışılacak olan SNP'ler pga.gs.washington.edu sitesinden alınıp belirlendi. Her bir gen için seçilen SNP'ler de dikkat edilen husus; öncelikle genlerin içinden ve 15000 baza kadar 5' ve 3' tarafından olması idi. Küçük allel frekansı 0.2 veya üzerinde olan ve birbiriyle LD (linkage disequilibrium) bağlantı dengesizliği olmayan (LD 0,8'in üzerinde olan SNP ler çalışmaya alınmadı) SNP' ler çalışmaya dahil edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda nonsendromik konjenital işitme kaybı tanısı konulan veya daha önce tanısı konmuş olan 0-16 yaş arası 34 hasta dahil edilmiştir. Çalışma grubuna dahil edilen hastaların 14'ü erkek (%41,1); 20'si kız (%59,9) cinsiyettedir. Grubun yaş aralığı 1-16 yıl olup ortalaması 8.4 yıldır.(Tablo 4.1)

4.1 Yeni Nesil Sekanslama İncelemesinin Sonuçları

Tüm olgulardan alınan periferik venöz kandan izole edilen DNA'lar fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda toplumda işitme kayıplı hastalarda sık görülen 6 gene (GJB2, GJB3, GJB6, KCNQ1, KCNQ4, WFS1) yönelik yeni nesil sekanslama yöntemiyle sekans analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları elde edildikten sonra negatif sonuç çıkan örnekler üzerinde DNA mikroarray yöntemi ile çok daha etkili ve kapsamlı bir analiz yapılmış olup analiz sonuçları klinik ve genetik veritabanları ile aşağıda değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1: Tüm olguların demografik özellikleri, işitme kaybı dereceleri, tedavi yöntemi, aile öyküsü, akraba evliliği ve yeni nesil sekanslama sonucunda saptanan mutasyonları gösteren tablo.(C: Cinsiyet, İK: İşitme Kaybı, B: Bilateral, T: Tek taraflı)

No	Yaş	C	Tedavi	İK Derecesi	Ailede İK kişi	Akraba evliliği	Özgeçmiş	Mutasyon
1	4y	K	Kİ(B)	Çok İleri	5	Yok	Doğal	
2	3y	E	Kİ(B)	Çok İleri	2	Yok	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.)
3	10y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	GJB3 Geni; c.317 G>A (Het. SNV missense varyant.) WFS1 Geni; c53 C>T(het. Missense mut.) WFS1 Geni; c862-4C>G (het. Missense mut.)

Tablo 4.1 (Devamı): Tüm olguların özellikleri

4	3y	E	Kİ(B)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
5	7,5y	K	Kİ(T)	Çok İleri	6	Var	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.) WFS1 geni; c.1294C>G (Het. SNV, missens varyant)
6	6y	E	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
7	5.5y	E	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	GJB3 Geni; c.317 G>A (Het. SNV missense varyant.)
8	14y	E	Kİ(T)	Çok İleri	5	Var	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.)
9	7y	E	Kİ(B)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
10	9,5y	E	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
11	10y	K	Kİ(T)	Çok İleri	5	Var	Doğal	
12	3,5y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
13	1,5y	K	Kİ(B)	Çok İleri	5	Var	Doğal	
14	3,5y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
15	12y	E	Kİ(T)	Çok İleri	6	Var	Düşük doğum ağırlığı	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.) WFS1 geni; c.1294C>G (Het. SNV, missens varyant)
16	2,5y	K	Kİ(B)	Çok İleri	7	Var	Doğal	KCNQ1 Geni; c.152_153insC GCGCCCAT (Het. insersiyon varyantı) KCNQ1 Geni; c.197 C>T (Het. SNV Missense varyant)

Tablo 4.1 (Devamı): Tüm olguların özellikleri

17	11y	K	Kİ(T)	Çok İleri	5	Var	Doğal	
18	8y	E	Kİ(T)	Çok İleri	4	Var	Doğal	
19	7.5y	K	Kİ(T)	Çok İleri	8	Yok	Doğal	GJB2 Geni; c.299_300delAT (Het. Del.) GJB2 Geni; c.229T>C (Het. SNV)
20	15y	K	Kİ(T)	Çok İleri	5	Var	Doğal	
21	11,5 y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	KCNQ1 Geni; c.1294 T>C (Het. SNV Missense varyant)
22	7.5y	K	Kİ(B)	Çok İleri	2	Yok	Doğal	
23	8y	E	Kİ(T)	Çok İleri	5	Yok	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.)
24	6y	K	Kİ(B)	Çok İleri	4	Yok	Doğal	WFS1 Geni; c.1414C>T (Het. SNV, missens varyant)
25	7,5y	E	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.)
26	6y	K	Kİ(B)	Çok İleri	5	Var	Doğal	GJB2 Geni; c35delG (Hom. del.)
27	8y	E	Kİ(B)	Çok İleri	4	Var	Doğal	
28	16y	K	Kİ(T)	Çok İleri	1	Yok	Doğal	
29	15y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
30	15y	E	Kİ(T)	Çok İleri	1	Yok	Doğal	
31	16y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
32	13y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Yok	Doğal	
33	3y	K	Kİ(T)	Çok İleri	2	Var	Doğal	
34	12y	E	Kİ(T)	Çok İleri	2	Yok	Doğal	

34 hasta DNA'sında uygulanan yeni nesil sekanslama sonucunda GJB2 geninde 7 hastada (%20,5) homozigot c.35delG mutasyonu, bir hastada (%2,9) heterozigot c.299_300delAT mutasyonu ve bir hastada da (%2,9) heterozigot c.229T>C mutasyonu saptandı. Çalışmamızda yeni nesil sekanslama sonucunda en sık bulunan mutasyon GJB2 geninde bulunan c.35delG mutasyonu olmuştur.

Çalışmamızda GJB2 dışında incelenen genlerden GJB3 geninde iki olguda (%5,8) heterozigot c.317 G>A mutasyonu saptandı.

Yeni nesil sekanslama tekniği ile incelediğimiz genlerden KCNQ1 geninde bir hastada heterozigot c.197 C>T mutasyonu(%2,9), bir hastada heterozigot c.1294 T>C mutasyonu(%2,9) ve bir hastada heterozigot c.152_153insCGCGCCCAT mutasyonu (%2,9)saptandı. Toplamda bir kişide iki farklı KCNQ1 mutasyonu olmak üzere iki bireyde KCNQ1 mutasyonu tespit edildi.

Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer gen WFS1 genidir. Yeni nesil sekanslama uyguladığımız bu grupta iki hastada heterozigot c.1294C>G mutasyonu (%5,8) , bir hastada heterozigot c.862-4C>G mutasyonu (%2,9), bir hastada heterozigot c.1414C>T mutasyonu(%2,9) ve bir hastada heterozigot c.53 C>T mutasyonu (%2,9) saptandı. Toplamda bir kişide iki farklı WFS1 mutasyonu olmak üzere 4 bireyde WFS1 mutasyonu tespit edildi.(Tablo 4.2)

Çalışmamızda yeni nesil sekanslama tekniği ile araştırdığımız GJB6 ve KCNQ4 genlerinde ise hiçbir hastada mutasyon saptanmadı.

Tablo 4.2: Yeni nesil sekanslama sonuçlarına göre genotipleme

GRUPLAR	VAKA (N=34)		
	NORMAL	HOMOZİGOT	HETEROZİGOT
GENOTİP			
MUTASYONLAR			
GJB2; c35delG	27	7	0
GJB2; c.299_300delAT	33	0	1
GJB2; c.229T>C	33	0	1
GJB3; c.317 G>A	32	0	2
KCNQ1; c.197 C>T	33	0	1
KCNQ1; c.1294 T>C	33	0	1
KCNQ1; c.152_153insCGCGCCCAT	33	0	1
WFS1; c.862-4C>G	33	0	1
WFS1; c.1294C>G	32	0	2
WFS1; c.1414C>T	33	0	1
WFS1; c53 C>T	33	0	1

Çalışmamızda GJB2; c.35delG'nin 54 (%79,4) normal alleli, 14 (%20,6) mutant alleli tespit edilmiştir. Yine GJB2; c.299_300delAT nin 67 normal alleli, 1 mutant alleli ve GJB2; c.229T>C nin de 67 normal alleli 1 mutant alleli saptanmıştır. Diğer genlerin allel frekansları da tablo 4.3 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Yeni nesil sekanslama sonuçlarına göre allel frekansları

GRUPLAR	VAKA (N=34)	
	NORMAL	MUTANT
ALLEL		
MUTASYONLAR		
GJB2; c35delG	54	14
GJB2; c.299_300delAT	67	1
GJB2; c.229T>C	67	1
GJB3; c.317 G>A	66	2
KCNQ1; c.197 C>T	67	1
KCNQ1; c.1294 T>C	67	1
KCNQ1; c.152_153insCGCGCCCAT	67	1
WFS1; c862-4C>G	67	1
WFS1; c.1294C>G	66	2
WFS1; c.1414C>T	67	1
WFS1; c53 C>T	67	1

Çalışma grubumuzda 5 hastada birden fazla mutasyon saptanmış olup en sık saptanan mutasyon birlikteliği iki hastada görülen heterozigot GJB2; c35delG / WFS1; c.1294C>G mutasyonudur. Çalışma grubundaki tüm hastaların işitme derecesi çok ileri derecededir.(Tablo 4.4)

Tablo 4.4: Yeni nesil sekans analizi sonuçlarında birden fazla mutasyon görülen olguların genotipleri ve işitme kaybı dereceleri

	VAKA	İK Derecesi
KCNQ1; c.197 C>T/ KCNQ1; c.152_153insCGCGCCCAT	1	Çok İleri
GJB2; c.299_300delAT / GJB2; c.229T>C	1	Çok İleri
GJB2; c35delG / WFS1; c.1294C>G	2	Çok İleri
GJB3; c.317 G>A / WFS1; c53 C>T / WFS1; c862- 4C>G	1	Çok İleri

Çalışmamızda toplamda 24 bireyde akraba evliliği vardır. Çalışma grubumuzdaki akraba evliliği olan olgulardan 9 tanesinde (%37,5) mutasyonlardan bir veya daha fazlası görülmüştür. Mutasyon görülmeyenler ise 15 hastadır (%62,5). (Tablo 4.5).

Ailesinde işitme kaybı olan toplam birey sayısı 32'dir. Vaka grubunda yer alan ve ailesinde işitme kaybı olan 13 hastada (%41,9) mutasyon görülürken, yine vaka grubunda yer alan ve ailesinde işitme kaybı olan 19 hastada (%58,9) herhangi bir mutasyon görülmemiştir. (Tablo 4.5).

Çalışmamızda yer alan olgulardan 24 tanesinde ise hem akraba evliliği hem de ailede işitme kaybı vardır. Hem akraba evliliği hem ailede işitme kaybı olan hastalardan 9 tanesinde (%37,5) mutasyon görülürken; 15 hastada (%62,5) mutasyon görülmemiştir. (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Yeni nesil sekanslama uygulanan grupta akraba evliliği ve ailede işitme kaybı öyküsü olmasının mutasyonla ilişkisi

	VAKA (N=34)	
	Mutant (N=13)	Normal (N=21)
Akraba evliliği	9	15
Ailede işitme kaybı öyküsü	13	19
Hem akr. Evl. Hemde ailede İK.	9	15

4.2 Mikroarray Analizinin Sonuçları

Çalışmamızda kullandığımız Thermo Fisher™ CytoScan™ 750K microarray analizi sonuçları aşağıda yer almakta olup her hastada bulunan mutasyon, delesyon, duplikasyonlar ayrı ayrı açıklanmıştır. Kullanılan yöntemde 750 000 prob ile tüm genom taranmış olup 3 veya daha fazla probta olan sinyal değişiklikleri anlamlı kabul edilmiştir. Daha sonra bu değişiklikler Decipher ve Database of Genomic Variants gibi veritabanlarında taranmıştır.

750 k SNP array analiz sonrasında (5marker 1 kb filtreleme ile) toplam 900 CNV saptanmıştır. Bu CNV'lerin tamamı 3 aşamada değerlendirilmiştir.

1. Aşama kalite kontrolü: Marker sayısı yetersiz olan 600 CNV ilk aşamada elenmiştir.

2. Aşama ortalama prob kontrolü: Log değeri 0.3 altında olan 200 CNV analiz edilmiş, false pozitif olduğu düşünülmüştür.

3. CNV yorumlanması: 100 CNV hastalık ilişkisi açısından değerlendirilmiştir. Toplumda sık görülen CNV'ler analize dahil edilmemiştir. Klinik anlamı bilinmeyen ya da hastalıkla ilişkili olabilecek CNV 'ler hasta hasta aşağıdaki tablolarda olduğu gibi listelenmiştir

NO:1 (4y, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Hastamızda; PCDH15 (Protocadherin 15) geninin ekzon 3-4' de heterozigot delesyonu bulunmakta, bu gendeki homozigot mutasyonlar hastalığa yol açabilmektedir(71). Bu gendeki mutasyonlar sıklıkla aşağıdaki tablodaki durumlar ile ilişkilendirilmiştir.

Tablo 4.6: 1 No'lu hastanın mikroarray analizinde saptanan PCDH15 gen mutasyonunun klinik sonuçları

Klinik	OMIM No	Kalıtım	Ekzon
Sağırılık DFNB23 (Deafness, Autosomal recessive 23)	609533	AR	3
Usher sendromu, tip, 1D/F digenic	601067	DR, AR	3
Usher sendromu, tip 1F	602083	AR	3

Bu hastada ayrıca APP geninde ekzon 2 ve 3'de delesyon ve RAI1 geninde ekzon 2 de duplikasyon saptanmıştır. APP geninin delesyonları Alzheimer tip 1 (ailesel) ve Serebral Amiloid Anjiyopati hastalıkları ile ilişkilidir(85). İşitme kaybı

ile ilişkisi bilinmemektedir. RAI1 gen delesyonları Smith-Magenis Sendromu'nda görülür. Bu sendrom; konuşmada gecikme, mental retardasyon (IQ 20-78), uyku bozuklukları ve yapısal beyin anomalilerinin beraber bulunduğu ağır bir sendromdur. İşitme kaybı bildirilmiştir(86). Hastamızda bu genin 2. ekzonun duplikasyonu saptanmıştır. Hastalıkla ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.7: 1 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO:1	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 21q21.3(27,309,397-27,329,776)x1(del)	20.379	APP (104760)
	arr[hg19] 10q21.1(56,258,201-56,378,236)x1(del)	120.035	PCDH15 (605514)
	arr[hg19] 17p11.2(17,614,946-17,654,594)x3(del)	39.648	RAI1 (607642)
	arr[hg19] 9q34.3 (139,381,821-140,064,479)x3(dup)	682.658	NOTCH1 (190198), EGFL7 (608582), MIR126 (611767), AGPAT2 (603100), FAM69B (614543), LCN10 (612904), LCN6 (609379), LCN8 (612902), CCDC183 (615955), RABL6 (610615), PHPT1 (610167), MAMDC4 (617208), EDF1 (605107), TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), PAXX (616315), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057), MAN1B1 (604346), DPP7 (610537), GRIN1 (138249), LRRC26 (613505)

Tablo 4.8: 1 No'lu hastada arr[hg19] 9q34.3(139,455,689-140,073,020)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.)

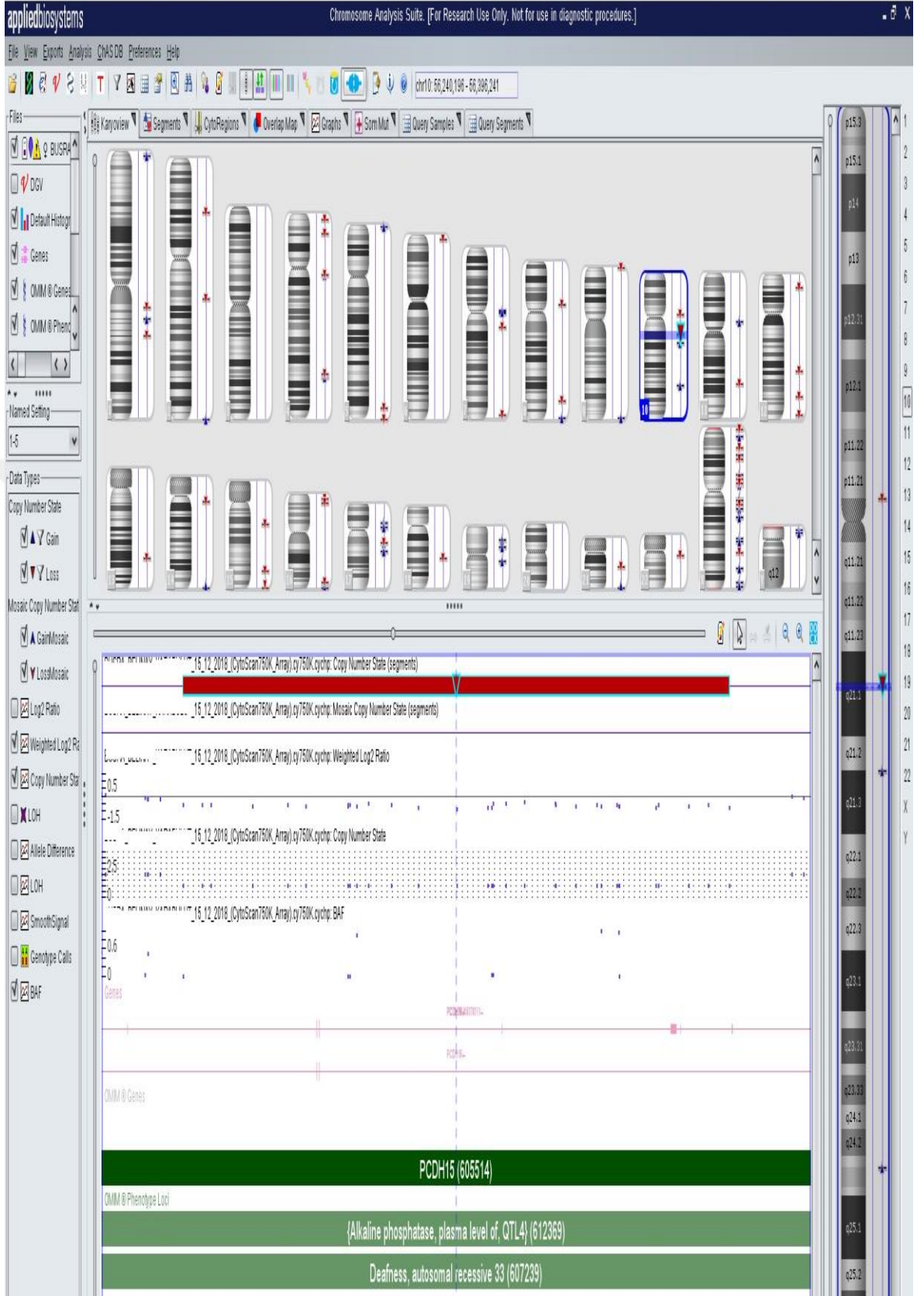
	GEN	OMIM	PROTEİN	PATOLOJİ
1	EGFL7	*608582	EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE 7; EGFL7	
2	MIR126	*611767	MICRO RNA 126; MIR126	

Tablo 4.8 (Devam): 1 No'lu hastada arr[hg19] 9q34.3 bölgesindeki genler

3	AGPAT2	*603100	ACYLGLYCEROL-3-PHOSPHATE O-ACYLTRANSFERASE 2; AGPAT2	
		#608594	LIPODYSTROPHY, CONGENITAL GENERALIZED , TYPE 1; CGL1	Lipodystrophy, congenital generalized, type 1
4	DIPK1B	*614543	FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 69, MEMBER B; FAM69B	
5	LCN10	*612904	LIPOCALIN 10; LCN10	
6	LCN6	*609379	LIPOCALIN 6; LCN6	
7	LCN8	*612902	LIPOCALIN 8; LCN8	
8	CCDC183	*615955	COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 183; CCDC183	
9	RABL6	*610615	RAB-LIKE PROTEIN 6; RABL6	
10	PHPT1	*610167	PHOSPHOHISTIDINE PHOSPHATASE 1; PHPT1	
11	MAMDC4	*617208	MAM DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 4; MAMDC4	
12	EDF1	*605107	ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION-RELATED FACTOR 1; EDF1	
13	TRAF2	*601895	TNF RECEPTOR - ASSOCIATED FACTOR 2; TRAF2	
14	FBXW5	*609072	F-BOX AND WD40 DOMAIN PROTEIN 5; FBXW5	
15	C8G	*120930	COMPLEMENT COMPONENT 8, GAMMA SUBUNIT; C8G	
16	LCN12	*612905	LIPOCALIN 12; LCN12	
17	PTGDS	*176803	PROSTAGLANDIN D2 SYNTHASE, BRAIN; PTGDS	
18	PAXX	*616315	PARALOG OF XRCC4 AND XLF; PAXX	
19	CLIC3	*606533	CHLORIDE INTRACELLULAR CHANNEL 3; CLIC3	
20	ABCA2	*600047	ATP - BINDING CASSETTE, SUBFAMILY A, MEMBER 2; ABCA2	

Tablo 4.8 (Devam): 1 No'lu hastada arr[hg19] 9q34.3 bölgesindeki genler

21	FUT7	*602030	FUCOSYLTRANSFERASE 7; FUT7	
22	NPDC1	*605798	NEURAL PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, AND CONTROL PROTEIN 1; NPDC1	
23	ENTPD2	*602012	ECTONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE 2; ENTPD2	
24	SAPCD2	*612057	SUPPRESSOR APC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2; SAPCD2	
25	MAN1B1	*604346	MANNOSIDASE, ALPHA , CLASS 1B, MEMBER 1; MAN1B1	
		#614202	MENTAL RETARDATION, AUTOSOMAL RECESSIVE 15; MRT15	Mental retardation,autosomal recessive
26	DPP7	*610537	DIPEPTIDYL PEPTIDASE VII; DPP7	
27	GRIN1	*138249	GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, N-METHYL -D-ASPARTATE, SUBUNIT 1;GRIN1	
		#614254	NEURODEVELOPMENTAL DISORDER WITH OR WITHOUT HYPERKINETIC MOVEMENTS AND SEIZURES , AUTOSOMAL DOMINANT ; NDHMSD	Neurodevelopmental disorder with or without hyperkinetic movements and seizures, autosomal dominant,
		#617820	NEURODEVELOPMENTAL DISORDER WITH OR WITHOUT HYPERKINETIC MOVEMENTSAND SEIZURES, AUTOSOMAL RECESSIVE; NDHMSR	Neurodevelopmental disorder with or without hyperkinetic movements and seizures, autosomal recessive,
28	LRRC26	*613505	LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN 26; LRRC26	
29	ANAPC2	*606946	ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX, SUBUNIT 2; ANAPC2	



Şekil 4.1: 1 No'lu hastanın PCDH15 genindeki heterozigot delesyonun microarray sistemi üzerindeki görüntüsü

NO:4 (3y, E, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü yok)

Bu olguda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.9)

Tablo 4.9: 4 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 4	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954- 72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok

NO:6 (6y, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Hastamızda; CRT1 (CREB-regulated transcription coactivator 1) geninde 1. intronda duplikasyon saptanmıştır. Mukoepidermoid karsinom ile ilişkilidir(87). Duplikasyonun işitme kaybı kliniğine etkisi bilinmemektedir.

SKA1 geni (spindle- and kinetochore-associated complex, subunit 1) olarak adlandırılmaktadır. Hastamızda bu gende duplikasyon saptanmış olup hastalıkla ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.10: 6 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO:6	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 19p13.11(18,800,701- 18,821,955)x3(dup)	21.254	CRT1 (607536)
	arr[hg19] 18q21.1(47,877,704- 47,965,828)x3(dup)	88.124	SKA1 (616673)

NO:11 (10y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü var)

Bu hastamızda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.11)

Tablo 4.11: 11 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 11	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954- 72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok

NO:12 (3,5y, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Hastamızda; APP (Amyloid beta a4 Precursor Protein) geninde ekzon 2 ve 3'de delesyon saptanmıştır. APP geninin delesyonları Alzheimer tip 1 (ailesel) ve Serebral Amiloid Anjiyopati hastalıkları ile ilişkilidir(85). İşitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

Bu hastada ayrıca CBFA2T3 geninde (Core Binding Factor Alpha subunit 2, Translocated to 3) duplikasyon saptanmış olup bu duplikasyonun işitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

Hastamızda; CRT1 geninde (CREB Regulated Transcription Co-activator 1) 1. intronda duplikasyon saptanmıştır. Mukoepidermoid karsinom ile ilişkilidir(87). Duplikasyonun işitme kaybı kliniğine etkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.12: 12 No'lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO:12	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 21q21.3(27,309,397- 27,329,776)x1(del)	20.379	APP (104760)
	arr[hg19] 16q24.3(88,961,368- 89,089,172)x3(dup)	127.804	CBFA2T3 (603870)
	arr[hg19] 19p13.11(18,635,795- 18,821,955)x3(dup)	186.16	FKBP8 (604840), KXD1 (615178), UBA52 (191321), CRLF1 (604237), TMEM59L (617096), CRT1 (607536)
	arr[hg19] 9q34.3(139,381,821- 140,186,072)x3(dup)*	804.251	NOTCH1 (190198), EGFL7 (608582), MIR126 (611767), AGPAT2 (603100), FAM69B (614543), LCN10 (612904), LCN6 (609379), LCN8 (612902), CCDC183 (615955), RABL6 (610615), PHPT1 (610167), MAMDC4 (617208), EDF1 (605107), TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), PAXX (616315), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057), MAN1B1 (604346), DPP7 (610537), GRIN1 (138249), LRRC26 (613505), ANAPC2 (606946), SSNA1 (610882), TPRN (613354), TMEM203 (616499), NDOR1 (606073), SLC34A3 (609826), TUBB4B (602660), NELFB (611180)

*arr[hg19] 9q34.3 (139,381,821- 140,186,072)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.) Tablo 4.8' de gösterilmiştir.

Tablo 4.13: 12 No'lu hastada arr[hg19] 19p13.11(18,637,476-18,821,955)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler. (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.)

	GEN	OMIM	PROTEİN	PATOLOJİ
1	FKBP8	*604840	FK506-BINDING PROTEIN 8; FKBP8	
2	KXD1	*615178	KXDL MOTIF-CONTAINING PROTEIN 1; KXD1	
3	UBA52	*191321	UBIQUITIN A- 52 - RESIDUE RIBOSOMAL PROTEIN FUSION PRODUCT ; UBA52	
4	CRLF1	#272430	CRISPONI/COLD-INDUCED SWEATING SYNDROME 1; CISS1	Cold-induced sweating syndrome 1
		*604237	CYTOKINE RECEPTOR-LIKE FACTOR 1; CRLF1	
5	TMEM59L	*617096	TRANSMEMBRANE PROTEIN 59-LIKE; TMEM59L	
6	CRTC1	*607536	CREB-REGULATED TRANSCRIPTION COACTIVATOR 1; CRTC1	Mucoepidermoid salivary gland carcinoma

NO:13 (1,5y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Bu hastamızda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada CBFA2T3 geninde (Core Binding Factor Alpha subunit 2, Translocated to 3) duplikasyon saptanmış olup bu duplikasyonun işitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.14: 13 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 13	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 16q24.3(88,961,368-89,105,217)x3(dup)	143.849	CBFA2T3 (603870)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954-72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok

NO:17 (11y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü var)

Bu olgumuzda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.15)

Bu hastamızda; CRTC1 (CREB-regulated transcription coactivator 1) geninde 1. intronda duplikasyon saptanmıştır. Mukoepidermoid karsinom ile ilişkilidir(87). Duplikasyonun işitme kaybı kliniğine etkisi bilinmemektedir. Ayrıca bu olguda APP (Amyloid beta a4 Precursor Protein) geninde ekzon 2 ve 3'de delesyon saptanmıştır. APP geninin delesyonları Alzheimer tip 1 (ailesel) ve Serebral Amiloid Anjiyopati hastalıkları ile ilişkilidir(85). İşitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.15: 17 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 17	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954- 72,664,055)x1	52.101	Gen yok
	arr[hg19] 19p13.11(18,800,701- 18,821,955)x3(dup)	21.254	CRTC1 (607536)
	arr[hg19] 21q21.3(27,309,397- 27,329,776)x1	20.379	APP (104760)

NO:18 (8y, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Bu hastamızda ATF1 (Transcription Factor 1) geninde exon 3,4 delesyonu saptanmıştır. Genetik veritabanları araştırıldığında sağlıklı kişilerde bu delesyon görülmemiştir ancak işitme kaybı ile ilişkisi kesin değildir. Ayrıca bu hastamızda APP (Amyloid beta a4 Precursor Protein) geninde ekzon 2 ve 3'de delesyon saptanmıştır. APP geninin delesyonları Alzheimer tip 1 (ailesel) ve Serebral Amiloid Anjiyopati hastalıkları ile ilişkilidir(85). İşitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

NOTCH2 geni Alagille sendromu tip 2 ve Hajdu-Cheney Sendromu ile ilişkilendirilmiştir(88). Ancak hastamızda olduğu gibi bu genin duplikasyonları sıklıkla sağlıklı kişilerde bulunmaktadır.

Tablo 4.16: 18 No’lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO:18	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 19p13.11(18,637,476-18,821,955)x3 (dup)*	184.479	FKBP8 (604840), KXD1 (615178), UBA52 (191321), CRLF1 (604237), TMEM59L (617096), CRT1 (607536)
	arr[hg19] 1p12p11.2(120,527,494-120,617,367)x1 (dup)	89.873	NOTCH2 (600275)
	arr[hg19] 21q21.3(27,309,397-27,329,776)x1 (del)	20.379	APP (104760)
	arr[hg19] 12q13.12(51,186,424-51,206,466)x1(del)	20.042	ATF1 (123803)
	arr[hg19] 9q34.3(139,455,689-140,073,020)x3 (dup)**	617.331	EGFL7 (608582), MIR126 (611767), AGPAT2 (603100), FAM69B (614543), LCN10 (612904), LCN6 (609379), LCN8 (612902), CCDC183 (615955), RABL6 (610615), PHPT1 (610167), MAMDC4 (617208), EDF1 (605107), TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), PAXX (616315), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057), MAN1B1 (604346), DPP7 (610537), GRIN1 (138249), LRRC26 (613505), ANAPC2 (606946)

* arr[hg19] 19p13.11(18,637,476-18,821,955)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler. (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.)Tablo 4.13’ de gösterilmiştir.

**arr[hg19] 9q34.3(139,455,689-140,073,020)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler. (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.)Tablo 4.8’ de gösterilmiştir.

NO:20 (15y, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Bu hastamızda TRAP1 geninde (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1) delesyon saptanmış olup bu gen HSP 90 ailesine mensup proteinlerin kodlanmasında görevlidir. Veritabanlarında bu genin sağlıklı insanlarda nadiren delesyonu bildirilmiş olup işitme kaybı ile ilişkisi saptanmamıştır(89).

RAI1 gen delesyonları Smith-Magenis Sendromu’nda görülür. Bu sendrom; konuşmada gecikme, mental retardasyon (IQ 20-78), uyku bozuklukları ve yapısal beyin anomalilerinin beraber bulunduğu ağır bir sendromdur. İşitme kaybı

bildirilmiştir(86). Hastamızda bu genin 2. ekzonun duplikasyonu saptanmıştır. Hastalıkla ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.17: 20 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 20	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 17p11.2(17,612,506- 17,654,594)x3 (dup)	42.088	RAI1 (607642)
	arr[hg19] 16p13.3(3,726,594- 3,756,065)x1 (del)	29.471	TRAP1 (606219)

NO:22 (7,5y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü yok)

Bu hastamızda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.18)

DNM3 geni dinamin ailesine ait proteinlerin ekspresyonunda görevli olup daha çok beyinde hipokampüsde postsinaptik alanlarda eksprese edilir. Dinamin 3 proteini hücre membranı aktin etkileşiminde aktif görevli protein ailesinden olup bu genin mutasyonlarında işitme kaybı ile ilgili patoloji bildirilmemiştir(90).

Ayrıca bu hastamızda; CRTCl (CREB-regulated transcription coactivator 1) geninde 1. intronda duplikasyon saptanmıştır. Mukoepidermoid karsinom ile ilişkilidir(87). Duplikasyonun işitme kaybı kliniğine etkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.18: 22 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 22	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 1q24.3(171,777,993- 171,957,822)x3(dup)	179.829	DNM3 (611445)
	arr[hg19] 19p13.11(18,800,701- 18,821,955)x3(dup)	21.254	CRTCl (607536)

NO:28 (16y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü yok)

Bu hastamızda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.19)

Hastada genomun diğer alanları polimorfik yani benign olarak saptanmıştır.

Tablo 4.19: 28 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 28	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954- 72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok

NO:29 (15y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü var)

Bu hastamızda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.20)

HSPH1 geni (Heat-Shock 105/110-kd Protein 1); şaperon düzenlenmesinde görev alan bir protein ailesini kodlar ve bu gendeki duplikasyonun işitme kaybı ile ilişkisi saptanmamış, bu gen mutasyonlarının kolorektal kanserlerde kemoterapiye yanıt verme oranını artırdığı bildirilmiştir(91)

B3GLCT (Beta-3-Glucosyltransferase) genindedede duplikasyon saptanmış olup bu durumun literatürde işitme kaybı ile ilişkisi saptanmamış olup Peters-plus olarak adlandırılan bir sendroma neden olduğu bildirilmiştir(92).

Tablo 4.20: 29 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 29	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954- 72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok
	arr[hg19] 13q12.3(31,726,177- 31,864,314)x3(dup)	138.137	HSPH1 (610703), B3GLCT (610308)

NO:30 (15y, E, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü yok)

Bu olguda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.21) Olgumuzda CBFA2T3 geninde (Core Binding Factor Alpha subunit 2, Translocated to 3) duplikasyon saptanmış olup bu duplikasyonun işitme kaybı ile ilişkisi bilinmemektedir.

Tablo 4.21: 30 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 30	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 9q34.3(139,381,821 - 140,186,072)x3*	804.251	NOTCH1 (190198), EGFL7 (608582), MIR126 (611767), AGPAT2 (603100), FAM69B (614543), LCN10 (612904), LCN6 (609379), LCN8 (612902), CCDC183 (615955), RABL6 (610615), PHPT1 (610167), MAMDC4 (617208), EDF1 (605107), TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), PAXX (616315), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057), MAN1B1 (604346), DPP7 (610537), GRIN1 (138249), LRRC26 (613505), ANAPC2 (606946), SSNA1 (610882), TPRN (613354), TMEM203 (616499), NDOR1 (606073), SLC34A3 (609826), TUBB4B (602660), NELFB (611180)
	arr[hg19] 16q24.3(88,961,368-89,105,217)x3(dup)	143.849	CBFA2T3 (603870)

*arr[hg19] 9q34.3(139,381,821 -140,186,072)x3 bölgesinde bulunan duplikasyona uğramış genler (bu genlerin hastamızın kliniği ile ilişkisi saptanmamıştır.) Tablo 4.8' de gösterilmiştir.

NO:31 (16y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü var)

Bu olguda işitme kaybı ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır.

Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.22)

Tablo 4.22: 31 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 31	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 7q11.23(72,611,954-72,664,055)x1(del)	52.101	Gen yok

NO:33 (3y, K, Çok ileri derecede işitme kaybı, Aile öyküsü mevcut)

Bu hastamızda PCDH7 (protokadherin 7) geninde duplikasyon saptanmış olup bu genin beyinde astrositlerdeki konneksin 43 proteinin ekspresyonunda rol aldığı saptanmıştır(93). Bu gen duplikasyonunun işitme kaybı fenotipine yol açtığına dair bir yayın literatürde saptanmamıştır. Hastamızda PCDH7 genine ek olarak başka anomali bulunmamıştır. Ek olarak hastada aşağıdaki değişiklikler saptanmıştır.(Tablo 4.23)

Tablo 4.23: 33 No' lu hastanın mikroarray analizi sonuçları

HASTA NO: 33	TAM LOKASYON	BÜYÜKLÜK (KB)	GENLER (OMIM)
	arr[hg19] 4p15.1(30,761,823- 31,197,115)x3(dup)	435.292	PCDH7 (602988)



5. TARTIŞMA

İşitme kaybı; bireyin dış dünya ile uyum ve iletişimde, sosyal ve duygusal gelişiminde kendini ifade etme, kavrama ve algılama süreçlerinde belirgin değişikliklere yol açabilen en yaygın duyuşal fonksiyon bozukluğudur. Toplumdaki işitme kaybı sıklığı yenidoğan taramalarında 1/1000 olarak bulunmuştur(1). Konjenital işitme kayıplarının yaklaşık olarak yarısından genetik nedenlerin, diğer yarısından ise çevresel faktörlerin sorumlu olduğu düşünölmektedir. Genetik temelli işitme kayıpları ise sendromik olan ve sendromik olmayan olarak iki gruba ayrılır. İşitme kaybına başka hiçbir organ sisteminde veya laboratuvar bulgusunda patolojinin eşlik etmediğı durumlarda sendromik olmayan (nonsendromik) işitme kaybı söz konusudur. Nonsendromik olarak adlandırılan bu grup genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70-80' ini oluşturmaktadır. Sendromik olmayan işitme kaybı için belirlenen gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak isimlendirilmiş ve otozomal dominant lokuslar için DFNA, otozomal resesif lokuslar için DFNB ve X'e bağılı lokuslar için de DFN ifadeleri kullanılmıştır. Aynı gendeki mutasyonlar hem resesif hem de dominant tipte işitme kaybına yol açabilirken, yine aynı gendeki mutasyonlar hem sendromik olan hem de sendromik olmayan işitme kaybına yol açabilmektedir. Günümüze kadar yapılan fazla sayıda araştırmaya rağmen, halen işitme kaybının etiyolojisi ve gelişimi ile ilgili büyük belirsizlikler mevcuttur. İç kulağın ve işitme fonksiyonunun son derece karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle çok sayıda farklı genin işitmede rol alması beklenen bir durumdur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen veriler insan genomundaki genlerin en az %1'inin işitme ile ilgili olduğunu göstermiştir. İşitme kaybının yaklaşık %80'lik kısmının otozomal resesif geçiş göstermesi nedeniyle özellikle Türkiye gibi akraba evlilikleri oranının yüksek olduğu ölkelerde bu konu oldukça önem kazanmıştır.

İşitme kayıplarının önemli gruplarından birisi de konjenital işitme kayıpları olup nonsendromik işitme kayıpları, konjenital işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Nonsendromik işitme kaybına sebep olan genlerden en önemlisi GJB2 genidir; bu gende günümüze kadar 150 den fazla mutasyon saptanmıştır. Beyaz ırkta en sık görölen GJB2 mutasyonu c.35delG'dir. Her iki ucunda timin (T) bulunan ardışık altı guanin bazından (G) birinin delesyonu sonucu çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu oluşmakta ve sonucunda erken stop (premature stop) kodonu oluşturmaktadır. Bu delesyon ve frameshift mutasyonu sonucunda ortaya çıkan erken

stop kodonu, fonksiyonel bölgesi olmayan defektif bir protein oluşumuna yol açmaktadır. Bu defektif proteinin GJB2 gen ürününün major fonksiyonunda önemli bir kayba neden olarak fenotip üzerinde ciddi etkilere sahip olabileceği belirtilmektedir(94). c.35delG mutasyonu kuzey ve güney Avrupalılarda sık görülür. Bazı Avrupa ülkelerinde işitmesi normal olan populasyonda c.35delG mutasyon prevalansı %2-4'tür(95). Orta Avrupa'da işitme kaybı olan hastalarda yapılan çalışmalarda p.W24X mutasyonunun c.35delG mutasyonundan sonra ikinci sıklıkta olduğu raporlanmıştır. p.W24X mutasyonunun en yüksek insidansı Asyalılarda, Avrupa'da ise Roman ırkında görülür(96). IVS1+1G >A mutasyonu ise Çek, Macar, ve Türk popülasyonunda sıklıkla görülür(97).

Dünyada farklı ülkelerde yapılan birçok çalışmada farklı oranlarda homozigot c.35delG mutasyonu saptanmıştır. Romanya'da 75 hasta üzerinde C. Lazar ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada c.35delG homozigot mutasyonu oranı %25,3, heterozigot mutasyon oranı ise %13,3 olarak bulunmuştur(96).

N. Bazazzadegan ve ark. 2012 yılında İran'da 12 yıl süren birçok etnik grubun dahil olduğu bir çalışma yayınlamışlardır. Çalışmaya 2322 aileden NSHL olan hastalar dahil edilmiştir. Bu çalışmada en sık saptanan mutasyon %65 sıklıkla c.35delG'dir. Bu mutasyon en sık Fars ve Türk ırkında saptanmıştır. Diğer sık saptanan mutasyonlar ise delE120(%4,7), p.R127H(%4), IVS1+1G>A(%3,9) ve p.W24X(%3,7)'dir.(98)

Chinetti V. ve ark. 2011 yılında İtalya'da farklı etnik gruplar üzerinde yaptıkları bir çalışmada 129 hasta üzerinde GJB2, GJB6 ve GJB3 genlerini incelemişlerdir. Bu hastalardan 49'unda(%38) GJB2 mutasyonu saptamışlardır. Bu hastaların 48'inde bilateral işitme kaybı mevcuttur. Bu mutasyonları %75'inin c.35delG olduğu bulunmuştur. GJB6 ve GJB3 genlerinde ise mutasyon saptanmamıştır(99).

Diana P. Popova ve ark. yine 2011 yılında Bulgaristan'da 51 hasta üzerinde GJB2 gen mutasyonlarını araştırmışlardır. Bu hastalardan 20' sinde (%39) homozigot 35delG mutasyonu tespit edilmiş olup bu hastaların etnik kökenine bakıldığında, 17'si Bulgar, 3 tanesi ise Türktür. Hastalardan 4'ünde (%8) heterozigot c.35delG mutasyonu saptanmış olup bu hastaların tamamı Bulgar etnik kökendedir. Bu çalışmada Arnavut kökenli bir hastada ise heterozigot W24X mutasyonu saptanmıştır(100).

Ülkemizde Akdeniz Bölgesi'nde Tarkan Ö. ve ark. 2012 yılında koklear implant uygulanan nonsendromik işitme kayıplı 96 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada 12 hastada (%12,7) homozigot c.35delG mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir(94). Kalay E. ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında 93 hastanın 20 tanesinde (%21,5) homozigot, 4 tanesinde (%4,3) ise heterozigot c.35delG mutasyonu saptamışlardır(101). Tekin M. ve ark. 2005 yılında farklı illerde yaptıkları benzer bir çalışmada 371 hastadan 56 tanesinde (%15) homozigot, 29 hastada (%7,8) heterozigot c.35delG mutasyonu bildirmişlerdir(102). Ancak yapılan bu çalışmalarda yalnızca nonsendromik işitme kayıplı hastalar araştırmaya dahil edilmiş olup, aynı toplumdaki işitmesi normal olan bireyler araştırmada yer almamışlardır.

Bizim çalışmamızda 34 nonsendromik konjenital işitme kaybı nedeniyle koklear implant uygulanmış olan 16 yaşından küçük hastalarda yeni nesil sekanslama yöntemi ile GJB2 gen mutasyonları taranmış olup 7 hastada (%20,5) homozigot c.35delG mutasyonu saptanmış olup tüm vaka grubunda en sık saptanan mutasyondur. Ayrıca bir hastada (%2,9) heterozigot c.299_300delAT mutasyonu ve bir hastada da (%2,9) heterozigot c.229T>C mutasyonu saptanmıştır. Bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Nonsendromik konjenital işitme kaybı olan hastalarda GJB3 gen mutasyonu GJB2 geninden sonra en sık rastlanan mutasyonlar arasındadır. Uyguner ve ark. ülkemizde yaptıkları bir çalışmada bir hastada GJB3 geninde heterozigot P223T mutasyonu saptamışlardır.(103) GJB3 (DFNA3) mutasyonunun Çinli hastalarda OD nonsendromik işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu populasyonda GJB3'ün ARNSHL formu da gösterilmiştir. Cx 31 gen ürünü varyantlarının İspanyol hastalarda sendromik ve Brezilyalı hastalarda nonsendromik işitme kaybına sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(8).Bizim çalışmamızda yeni nesil sekanslama sonucunda iki hastada heterozigot c.317 G>A missense mutasyonu saptanmış olup ancak literatürde bu mutasyonun patojenitesi hakkında yayınlanmış bir veri bulunmamış ve VUS (variant of uncertain significance) olarak değerlendirilmiştir.

GJB6 geninde oluşan mutasyonlar da işitme kaybına neden olmaktadır. 2013 yılında Anne-Ce'cile Boulay ve ark. nın fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada konneksin 30 protein yokluğunun işitme kaybına neden olduğu gösterilmiştir(104). Tekin ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları farklı bir çalışmada 167delT

mutasyonu, Türk toplumundan alınan kapsamlı bir örnek grubunda hiç saptanmazken yine Türk toplumunda 2003 yılında yaptıkları başka bir çalışmada 1 allelde (% 0,3) bu mutasyon bildirilmiştir(105). Aşkenazi etnik yahudilerinde GJB6 mutasyonlarından olan 167delT mutasyonunun %84 oranında görüldüğü bildirilmiştir. Bu mutasyonun Aşkenazi etnik yahudilerindeki taşıyıcılık sıklığı ise %2-4 aralığında olduğu bildirilmiştir(106). Bizim çalışmamızda ise bu mutasyona vaka grubunda hiç rastlanmamıştır.

KCNQ1 genide iç kulakta stria vasküleristeki marjinal hücrelerde ve vestibüldeki koyu (dark) hücrelerde aynı adlı K + kanalının ekspresyonunda görevlidir.(13) Bu gendeki mutasyonların işitme fonksiyonunda dramatik değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca bu genin sendromik işitme kaybı nedenlerinden olan Jervell-Lange Nielsen Sendromu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir(107). Bizim çalışmamızda yeni nesil sekanslama sonucunda bir hastada heterozigot c.197 C>T missense mutasyonu, bir hastada heterozigot c.1294 T>C missense mutasyonu ve bir hastada heterozigot c.152_153insCGCGCCCAT insersiyonu saptanmış olup genetik veri tabanlarında bu mutasyonların patojenitesi hakkında yayınlanmış bir veri saptanmamış ve VUS olarak değerlendirilmiştir.

WFS1 geninin mutasyonu ile ilişkili işitme kaybı genellikle bilateral olup 10 yaşından önce başlar ve başlangıçta 250, 500 ve 1000 Hz frekansları etkilenir. OD geçiş paterni vardır ve progresif seyir gösterir. Wolfram sendromu, WFS1 geninde homozigot veya birleşik heterozigot kalıtılan frameshift, insersiyon, delesyon veya missense mutasyona bağlı olarak oluşmaktadır(108). Hastalarda çeşitli çalışmalarda 15 farklı nonsense mutasyon, 12 insersiyon veya delesyona bağlı frameshift mutasyon, 8 inframe delesyon mutasyonu tanımlanmıştır(108, 109). Gasparin ve ark. Brezilya da yaptığı çalışmasında WFS'li olan 27 hastada WFS1 geninde ekzon 8' de yeni mutasyonlar olduğunu saptamıştır(110). Bizim çalışmamızda yeni nesil sekanslama sonucunda bir hastada heterozigot c.862-4C>G missense mutasyon, bir hastada heterozigot c.1414C>T missense mutasyonu, bir hastada heterozigot c.53 C>T missense mutasyonu ve iki hastada heterozigot c.1294C>G missense mutasyonu saptanmıştır. Genetik veri tabanlarında bu mutasyonların patojenitesi hakkında yayınlanmış bir veri saptanmamış olup VUS olarak değerlendirilmiştir.

Yeni nesil sekanslama ile 6 gende mutasyon saptanmayan 15 hasta mikroarray yöntemi kullanılarak tüm genom delesyon, duplikasyon, insersiyon vb. mutasyonlar açısından incelenmiştir. Araştırmamızda kullanılan Thermo Fisher™

CytoScan™ 750K Array Genotipleme sistemi, çok fazla sayıda genotiplendirmenin oldukça az miktarda numune ve sarf malzemesi kullanılarak yapılabildiği, çok geniş uygulama sahası bulunan yeni bir platformdur. Bu sistem veri kalitesi ve çözünürlüğünün oldukça yüksek olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu tarama yönteminin genellikle seçilme sebebi araştırmaya dahil edilen hastaların tamamında ebeveynlerin akraba olması ve ailede en az iki kişinin işitme kaybından etkilenmiş olması sebebiyle aynı atadan kalıtılmış olan genetik değişikliklerin, homozigot olma ihtimalinin yüksek olmasıdır. Bu şekilde hasta bireylerde homozigot genomik bölgeler taranarak genetik değişikliğin nerede olduğu saptanabilmektedir. Sonuç olarak bakıldığında yöntemin analiz aşaması; anne, baba ya da sağlıklı kardeşlerde heterozigot olan genomik bölgelerde, hasta kişi ya da kişilerde homozigot blokların taranması temeline dayanmaktadır. Ailelerdeki geçiş paterni göz önüne alınarak yorum yapılmıştır. Uygulanan bu tarama yöntemi ile genomun ancak belirli bölümleri taranabildiğinden, araştırılan homozigot blokların belirli boyuttan küçük olması durumunda, o gende mutasyon olması halinde bile, gen bölgesi gözden kaçırılarak, saptanamayabilir. Ayrıca yöntem kesin sonuç vermemekte ve rutinde kullanılan sekans analizleri ile doğrulama gerektirmektedir. Fakat aynı zamanda aday gen araştırmalarında önceden bilinen genlerin elimine edilip tekrar taranmaması için kullanılabilir hızlı ve etkili bir yöntemdir. Çalışmamızda Thermo Fisher™ CytoScan™ 750K Array Genotipleme (Applied Biosystems, ABD) ile bir hastada PCDH15 geninde heterozigot ekzon 3-4 de 120 035 kB büyüklüğünde heterozigot delesyon, bir hastada ise PCDH7 geninde 435.292 kB büyüklüğünde duplikasyon saptandı. Kalan 19 hastada projemiz kapsamında uygulanan yöntemler ile işitme kaybına neden olduğu literatürde yayınlanmış herhangi bir genetik değişiklik saptanamamıştır.

Hasta grubumuzda heterozigot delesyon saptanan PCDH15 geni protokaderin 15 olarak adlandırılan, kaderin protein ailesinin bir üyesinin ekspresyonunda görevlidir. Bu protein Ca⁺⁺ bağımlı hücre-hücre birleşmesinde görevli olup kokleanın normal işlevi için önemlidir. PCDH15 geninin koklea tüy hücrelerinin stereosiliası ve retinanın fotoreseptörlerinde eksprese edildiği yapılan immunohistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir(71). PCDH15 geni 10q21-q22 kromozomal bölgesinde yer alır, 33 ekzon içerir ve kodladığı protein 1955 aminoasitten oluşmaktadır (73). Gendeki mutasyonlar, otozomal resesif işitme kaybı (DFNB23) ve Usher Sendromu tip 1F ile ilgili bulunmuştur. Bu gende günümüze kadar 14'den fazla mutasyon

tanımlanmıştır(41). Jouret G. ve ark. Tarafından yapılan Usher sendromunun genetiğinin araştırıldığı Usher sendromu tanısı olan 684 hastalık 11 çalışma ve nonsendromik işitme kaybı ve retinitis pigmentosa gibi bulguların olduğu ancak Usher sendromu tanısı konulmamış 2476 hasta içeren 21 çalışmanın derlendiği meta analiz çalışmasında PCDH15 geninde %3 oranında mutasyon saptanmıştır(111). Ülkemizde 2017 yılında yapılan nonsendromik işitme kayıplarının genetiğinin araştırıldığı bir çalışmada aile içinde en az üç kişide işitme kaybı olan 21 aile taranmış ancak PCDH15 geninde mutasyon saptanmamıştır(112). Chen S. ve ark. 2016 da yaptığı bir çalışmada 116 nonsendromik işitme kaybı olan hastada saptanan 30 gene ait 195 farklı mutasyondan 11 tanesi (%5,6) PCDH15 geninde olup sıklık olarak üçüncü sıradadır(113). Sloan-Hegen CM. ve ark. İran popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada 302 tane GJB2 negatif NSHL olan proband üzerinde en sık görülen gen mutasyonları araştırılmış ve PCDH15 geninin bu popülasyonun % 5 inde mutasyona uğramış olduğu saptanmıştır(114). Bu gen ile ilgili ülkemizde çok fazla çalışma bulunmamaktadır ve bu nedenlerle mikroarray platformuna ilave edilerek çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışma grubumuzdaki 15 hastadan sadece bir tanesinde işitme kaybı ile ilişkili PCDH15 geninde heterozigot delesyon saptanmıştır. Bu genin otozomal resesif geçiş gösteren mutasyonlarında hastalık ortaya çıkmakta olup bizim hastamızda başka bir patolojinin saptanmaması bu genin geçiş paterninin farklı olabileceğini gösterebilir. Ayrıca başka bir hastamızda PCDH7 geninde duplikasyon saptanmış olup bu duplikasyonunun işitme kaybı fenotipine yol açtığına dair bir yayın literatürde saptanmamıştır. PCDH7 (protokadherin 7) genindeki 435 292 kB'lık duplikasyonun hastada başka patoloji olmamasından dolayı işitme kaybı fenotipi ile olan ilişkisi araştırılmalıdır. Çünkü bu kadar büyüklükte bir duplikasyonun işitmede önemli görevi olduğu saptanan protokadherin ailesi proteinlerinin yapısını bozmuş olabileceği düşünülmektedir. Bu genin beyinde astrositlerdeki konneksin 43 proteinin ekspresyonunda rol aldığı saptanmıştır(93).

İşitme kaybının erken tanı ve tedavisinin sağlanması yeni nesil sekanslama ve mikroarray gibi genetik testler sayesinde mümkün olacağını öngörmekteyiz. İşitme kaybının erken dönemde tespit edilmesi ve etyolojisinin belirlenmesi gerekli tedavinin mümkün olan en kısa sürede başlanmasına, çocuğun dil ve zeka gelişiminin iyi bir şekilde ilerlemesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca bu genler için taşıyıcı olduğu bilinen ebeveynlerin gebelik öncesi ve sırasında gerekli takipleri ve

tetikleri yapılarak muhtemel doğacak işitme kayıplı çocuğa erken tanı konulup müdahalede bulunulmasının etkili biçimde gerçekleşebileceğini öngörmekteyiz.

Konjenital işitme kaybı için mikroarray temelli genetik testlerin, klinik olarak yaygın hale gelmesi ve işitme kaybının genetik temelini erken, etkili ve kesin şekilde ortaya koyması beklenmektedir. Mikroarray ve diğer yeni testlerin yakın gelecekte işitme kaybının genetik tanısında standart yöntemlerden bir tanesi olması beklenmektedir. Mikroarray temelli testler yeni doğan işitme taraması gibi standart bir araştırma ile entegre edilebilir. İşitme kaybının altta yatan nedenlerinin genetik temellerinin aydınlatılabilmesi için mikroarray temelli testler geliştirilmekte olup fenotip genotip ilişkisi kurularak genetik danışmanlık ile işitme kaybının moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına çalışılmaktadır ancak bizim çalışmamızda sadece bir hastada heterozigot mutasyon saptanmış olup işitme kaybının genetik temelini anlaşılmasında mikroarray analizinin pozitif etkisini saptayamadık.

Bu çalışma ile Türk toplumunda konjenital işitme kaybına sıklıkla neden olan genlerin ve bu genlerdeki mutasyonların mikroarray yöntemi ile belirlenmesi, ilerleyen dönemlerde işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve bunun yanı sıra sonraki kuşaklar için verilecek genetik danışmanlık hizmetine katkıda bulunabilmek planlanmış olup 12 hastada patolojik olabilecek genetik değişiklik saptanmıştır. Bu tespit ettiğimiz mutasyonlar ve yeni yapılacak geniş kapsamlı çalışmalar ile tüm bireylere işitme kaybı açısından preimplantasyon genetik tanı imkanı sunmanın mümkün olabileceği öngörülmektedir.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamıza dahil edilen 34 hastanın tamamında nonsendromik konjenital çok ileri derecede sensörinöral işitme kaybı mevcuttu. Çalışma grubumuzdaki 7 hastada GJB2 (cx 26) geninde homozigot c.35delG mutasyonu, 1 hastada heterozigot c.229T>C mutasyonu ve 1 hastada ise heterozigot c.299_300delAT mutasyonu saptandı.

GJB2 geni dahil yeni nesil sekanslamada taranan tüm genlerin hiçbirinde mutasyon saptanmayan 15 hasta mikroarray yöntemi kullanılarak tüm genom işitme kaybına yol açtığı bilinen genler açısından incelendi. Çalışmamızda bir hastada PCDH15 (Protocadherin 15) geninde ekzon 3-4' de heterozigot delesyonu mutasyonu saptandı. Uygulanan mikroarray tarama yöntemi ile genomun sadece belli aralıkları taranıp incelenebildiğinden, homozigot blokların küçük olması durumunda araştırılan gende mutasyon olsa dahi yakalanamayabilmektedir. Ayrıca bu yöntem kesin sonuç vermemekte ve rutinde kullanılan sekans analizleri ile doğrulamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca aynı zamanda gen araştırmalarında daha önceden bilinen genlerin elimine edilip tekrar çalışılması için kullanılabilir etkili, hızlı ve ucuz bir genetik yöntemdir. Çalışmamızda değerlendirilen otuz dört hastanın 19 unda tezimiz kapsamında uygulanan araştırma, analiz yöntemleri ile herhangi bir genetik değişiklik (mutasyon vb.) belirlenemedi. Daha yeni, gelişmiş ve kapsamlı tekniklerle sonraki çalışmalarda bu hastalarda ve ailelerinde işitme kaybına neden olan genetik değişikliklerin araştırılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Morton C. , Nance W.E. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med*, 2006. 354(20): 2151-64.
2. Çelik O. Otoloji ve Nörootoloji. 1.Baskı. İstanbul: Elit Ofset Matbaacılık; 2013
3. Devranoğlu İ. Dış ve Orta Kulak Cerrahisi. 1.Baskı. İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık; 2011
4. Shames G.H. and Wiig .E. H. Human Communication Disorders. Columbus: Merrill Publishing Company: 1990
5. Kheterpal U, Lalwani AK. Nonsyndromic hereditary hearing impairment, In: Lalwani A, Grundfast K, editors. *Pediatric Otology and Neurotology*. Lippincott-Raven; Philadelphia, PA: 1998. pp. 313–40.
6. Cummings C.W. Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. 4.Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi: 2007
7. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available from: <https://hereditaryhearingloss.org>.
8. Oh S.K., et al. Evaluation of the pathogenicity of GJB3 and GJB6 variants associated with nonsyndromic hearing loss. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2013. 1832(1): 285-291.
9. Ammar-Khodja F., et al. Diversity of the causal genes in hearing impaired Algerian individuals identified by whole exome sequencing. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2015. 3(3): 189-196.
10. Dossena S., et al. Identification of allelic variants of pendrin (SLC26A4) with loss and gain of function. *Cellular physiology and biochemistry*, 2011. 28(3): 467-476.
11. Chai Y., et al. Molecular etiology of non-dominant, non-syndromic, mild-to-moderate childhood hearing impairment in Chinese Hans. *Am J Med Genet A*, 2014. 164a(12): 3115-9.
12. Kubisch C., et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 1999. 96(3): 437-446.
13. Nicolas M.T., et al. KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hearing research*, 2001. 153(1-2): 132-145.
14. Naranjo S. et al. Multiple enhancers located in a 1-Mb region upstream of POU3F4 promote expression during inner ear development and may be required for hearing. *Human genetics*, 2010. 128(4): 411-419.
15. Phippard D. et al. Changes in the subcellular localization of the Brn4 gene product precede mesenchymal remodeling of the otic capsule. *Hearing research*, 1998. 120(1-2): 77-85.
16. Bramhall N.F. et al. A novel WFS1 mutation in a family with dominant low frequency sensorineural hearing loss with normal VEMP and EcochG findings. *BMC medical genetics*, 2008. 9(1): 48.
17. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. 2.Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi: 2013
18. 23 ed. Sobotta atlas of human anatomy, ed. F.P.a.J. Waschke. Vol. 1. 2011, Munich: Elsevier.
19. Pingault V. et al. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human mutation*, 2010. 31(4): 391-406.
20. Aparisi M.J. et al. Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 2014. 9(1): 168.
21. Bizhanova A. Kopp P. Genetics and phenomics of Pendred syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 2010. 322(1-2): 83-90.
22. Acke F.R. et al. Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review. *Orphanet journal of rare diseases*, 2012. 7(1): 84.
23. Jervell A. and Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *American heart journal*, 1957. 54(1): 59-68.
24. Schulze-Bahr E. et al. KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature genetics*, 1997. 17(3): p. 267.
25. Trainor P.A, Dixon J, Dixon M.J. Treacher Collins syndrome: etiology, pathogenesis and prevention. *European Journal of human genetics*, 2009. 17(3): 275.
26. Phelps P.D, Poswillo D, Lloyd G.A. The ear deformities in mandibulofacial dysostosis (Treacher Collins syndrome). *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 1981. 6(1):15-28.
27. Kadakia S. et al. Treacher Collins Syndrome: the genetics of a craniofacial disease. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2014. 78(6): 893-898.

28. Fallerini C. et al. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clinical genetics*, 2014. 86(3): 252-257.
29. Yoneda M. et al. A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA (Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochemistry international*, 1990. 21(5): 789-796.
30. Phadke M. et al. Kearns Sayre Syndrome--case report with review of literature. *Indian J Pediatr*, 2012. 79(5): 650-4.
31. Pavlakis S.G. et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 1984. 16(4): 481-488.
32. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu} (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990. 348(6302): 651.
33. Morton N. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991. 630(1): 16-31.
34. Tabatabaiefar M.A. et al. Genetic linkage analysis of 15 DFNB loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Iranian journal of public health*, 2011. 40(2): 34.
35. Van Camp G, Willems P.J, Smith R. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *American journal of human genetics*, 1997. 60(4): 758.
36. Kelsell D.P. et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 1997. 387(6628): 80.
37. Ruiz M. The diagram shows a gap junction and its main element. connexon. together with the structure of the connexin. 2006; Available from: <http://www.wikizeroo.com/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRmlsZTpDb25uZXhvb19hbmRfY29ubmV4aW5fc3RydWN0dXJlLnN2Zw>.
38. Kenna M.A. et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2001. 127(9): 1037-1042.
39. Kiang D.T. et al. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene*, 1997. 199(1): 165-171.
40. Mignon C. et al. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11→ q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 1996. 72(2-3): 185-186.
41. Stenson P.D. et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med*, 2009. 1(1): 13.
42. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British medical bulletin*, 2002. 63(1): 73-94.
43. Scott D.A. et al. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature genetics*, 1999. 21(4): 440.
44. Brownstein Z.N. et al. A novel SLC26A4 (PDS) deafness mutation retained in the endoplasmic reticulum. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2008. 134(4): 403-407.
45. Mitchem K.L. et al. Mutation of the novel gene Tmie results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6. *Human molecular genetics*, 2002. 11(16): 1887-1898.
46. Albert S. et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *European journal of human genetics*, 2006. 14(6): 773.
47. Sun Y. et al. Novel missense mutations in MYO7A underlying postlingual high-or low-frequency non-syndromic hearing impairment in two large families from China. *Journal of human genetics*, 2011. 56(1): 64.
48. Weil D. et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nature genetics*, 1997. 16(2): 191.
49. Liu X.Z. et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nature genetics*, 1997. 16(2): 188.
50. Friedman T.B. et al. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nature genetics*, 1995. 9(1): 86.
51. Piatto V.B. et al. Molecular genetics of non-syndromic deafness. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 2005. 71(2): 216-223.
52. Liang Y. et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics*, 1999. 61(3): 243-258.

53. Wang A. et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 1998. 280(5368): 1447-1451.
54. Shearer A.E. et al. Mutations in the first MyTH4 domain of MYO15A are a common cause of DFNB3 hearing loss. *The Laryngoscope*, 2009. 119(4): 727-733.
55. Yasunaga S.I, Petit C. Physical map of the region surrounding the OTOFERLIN locus on chromosome 2p22-p23. *Genomics*, 2000. 66(1): 110-112.
56. Yasunaga S.I. et al. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *The American Journal of Human Genetics*, 2000. 67(3): 591-600.
57. Migliosi V. et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *Journal of medical genetics*, 2002. 39(7): 502-506.
58. Rodríguez-Ballesteros M. et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Human mutation*, 2008. 29(6): 823-831.
59. Yasunaga S.I. et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature genetics*, 1999. 21(4): 363.
60. Varga R. et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *Journal of medical genetics*, 2003. 40(1): 45-50.
61. Petersen M, Willems P. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clinical genetics*, 2006. 69(5): 371-392.
62. Wang D.Y. et al. Screening mutations of OTOF gene in Chinese patients with auditory neuropathy, including a familial case of temperature-sensitive auditory neuropathy. *BMC medical genetics*, 2010. 11(1): 79.
63. Wagatsuma M. et al. Distribution and frequencies of CDH23 mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss. *Clinical genetics*, 2007. 72(4): 339-344.
64. Bolz H. et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nature genetics*, 2001. 27(1): 108.
65. Di Palma, F. et al. Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nature genetics*, 2001. 27(1): 103.
66. Bork, J.M. et al. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *The American Journal of Human Genetics*, 2001. 68(1): 26-37.
67. Naz S. et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *The American Journal of Human Genetics*, 2002. 71(3): 632-636.
68. Sirmaci A. et al. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clinical genetics*, 2009. 75(6): 562-567.
69. Verhoeven K. et al. Mutations in the human α -tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature genetics*, 1998. 19(1): 60.
70. Hughes D.C. et al. Mapping of the α -tectorin gene (TECTA) to mouse chromosome 9 and human chromosome 11: a candidate for human autosomal dominant nonsyndromic deafness. *Genomics*, 1998. 48(1): 46-51.
71. Ahmed Z.M. et al. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human molecular genetics*, 2003. 12(24): 3215-3223.
72. Alagramam K.N. et al. Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS one*, 2011. 6(4): e19183.
73. Alagramam K.N. et al. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nature genetics*, 2001. 27(1): 99.
74. Hilgert N. et al. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clinical genetics*, 2008. 74(3): 223-232.
75. Hildebrand M.S. et al. Mutations in TMC1 are a common cause of DFNB7/11 hearing loss in the Iranian population. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 2010. 119(12): 830-835.
76. Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2005. 69(5): 621-647.
77. Scott H.S. et al. Insertion of β -satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature genetics*, 2001. 27(1): 59.

78. Lee K. et al., Novel Tmprss3 variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clinical genetics*, 2012. 82(1): 56-63.
79. Longo-Guess C.M. et al. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(22): 7894-7899.
80. Shabbir M.I. et al. Mutations of human *TMHS* cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *Journal of medical genetics*, 2006. 43(8): 634-640.
81. Akar N. *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Ankara: AÜTF Antip AS Yayınları. 1999: 508-509.
82. Pollack J.R. et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature genetics*, 1999. 23(1): 41.
83. Başaran E, Aras S, Cansaran Duman D. *Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlara Genel Bakış ve Uygulama Alanları*. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*: 85.
84. Duman D. et al. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2011. 15(1-2): 29-33.
85. Reddy P.H. et al. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(12): 1225-40.
86. Slager R.E. et al. Mutations in *RAI1* associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat Genet*, 2003. 33(4): 466-8.
87. Wu L. et al. Transforming activity of *MECT1-MAML2* fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *Embo j*, 2005. 24(13): 2391-402.
88. Isidor B. et al. Truncating mutations in the last exon of *NOTCH2* cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet*, 2011. 43(4): 306-8.
89. Chen B. et al. The *HSP90* family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*, 2005. 86(6): 627-37.
90. Gray N.W. et al. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with *mGluR5* and *Homer*. *Curr Biol*, 2003. 13(6): 510-5.
91. Dorard C. et al. Expression of a mutant *HSP110* sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med*, 2011. 17(10): 1283-9.
92. Reis L.M. et al. Mutation analysis of *B3GALTL* in Peters Plus syndrome. *Am J Med Genet A*, 2008. 146a(20): 2603-10.
93. Chen Q. et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, 2016. 533(7604): 493-498.
94. Tarkan Ö. et al. Connexin 26 and 30 mutations in paediatric patients with congenital, non-syndromic hearing loss treated with cochlear implantation in Mediterranean Turkey. *The Journal of Laryngology & Otology*, 2013. 127(1): 33-37.
95. Piatto V.B. et al. Prevalence of the *GJB2* mutations and the del (*GJB6-D13S1830*) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hearing Research*, 2004. 196(1-2): 87-93.
96. Lazăr C. et al. Prevalence of the c. 35delG and p. W24X mutations in the *GJB2* gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2010. 74(4): 351-355.
97. Feldmann, D., et al., A new large deletion in the *DFNB1* locus causes nonsyndromic hearing loss. *European journal of medical genetics*, 2009. 52(4): 195-200.
98. Bazazzadegan N. et al. The spectrum of *GJB2* mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss—a twelve year study. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2012. 76(8): 1164-1174.
99. Chinetti, V. et al. Mutational analysis for *GJB2*, *GJB6*, and *GJB3* genes in Campania within a universal neonatal hearing screening programme. *International journal of audiology*, 2011. 50(12): 866-870.
100. Popova D.P. et al. Prevalence of *GBJ2* mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2012. 269(6): 1589-1592.
101. Kalay E. et al. *GJB2* mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hearing research*, 2005. 203(1-2): 88-93.
102. Tekin M. et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the *GJB2* gene in Anatolia. *Clinical genetics*, 2005. 67(1): 31-37.
103. Uyguner O. et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet*, 2003. 64(1): 65-9.
104. Boulay A.C. et al. Hearing is normal without connexin30. *Journal of Neuroscience*, 2013. 33(2): 430-434.

105. Tekin M. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. İşitme kaybının genetik özellikleri. Ankara: 2002. 211-216.
106. Snoeckx R.L. et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. The American Journal of Human Genetics, 2005. 77(6): 945-957.
107. Wang Z. et al. Compound heterozygous mutations in KvLQT1 cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Molecular genetics and metabolism, 2002. 75(4): 308-316.
108. Khanim F. et al. WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. Human mutation, 2001. 17(5): 357-367.
109. Strom T.M. et al. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. Human molecular genetics, 1998. 7(13): p. 2021-2028.
110. Gasparin M.R.R. et al. Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. European journal of endocrinology, 2009. 160(2): p. 309-316.
111. Jouret G. et al. Genetics of Usher Syndrome: New Insights From a Meta-analysis. Otol Neurotol, 2019. 40(1):121-129.
112. Subasioglu A. et al. Research of genetic bases of hereditary non-syndromic hearing loss. Turk Pediatri Ars, 2017. 52(3): 122-132.
113. Chen S. et al. Targeted Next-Generation Sequencing Successfully Detects Causative Genes in Chinese Patients with Hereditary Hearing Loss. Genet Test Mol Biomarkers, 2016. 20(11): 660-665.
114. Sloan-Heggen C.M. et al. Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran. J Med Genet, 2015. 52(12): 823-9.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NONSENDROMİK KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLARIYLA İLİŞKİLİ GEN MUTASYONLARININ DNA MİKROARRAY TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

Dr. Turgut ÇELİK

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2018

Amaç: Bu çalışmanın amacı nonsendromik konjenital işitme kayıplı çocuklarda mikroarray yöntemini kullanarak genlerdeki en sık görülen mutasyonları ve bu mutasyonların yol açtığı sonuçların sıklığını tespit etmektir.

Yöntem: Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda 2009 yılından itibaren konjenital işitme kaybı tanısı konan veya daha önce tanısı konmuş olan 0-16 yaş arası 34 hasta dahil edildi. Hastaların periferik venöz kanları alındıktan sonra genetik analizleri yeni nesil sekanslama ve mikroarray tekniği ile yapıldı. Genetik incelemelerin sonuçları veritabanları baz alınarak değerlendirilip yorumlandı.

Bulgular: İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan bu çalışmada yeni nesil sekanslama sonucunda en sık görülen mutasyon GJB2 genindeki c.35delG (%20,5) olmuştur. Ayrıca nadir görülen mutasyonlar da bu çalışmada tespit edilmiştir. GJB3 geninde c.317 G>A mutasyonu %5,8 oranında saptanmıştır. WFS1 geninde %11,7, KCNQ1 geninde ise %5,8 oranında mutasyon tespit edilmiştir. Yapılan mikroarray analizi sonrasında bir hastada heterozigot PCDH15 delesyonu saptanmış olup diğer olgularda patoloji saptanmamıştır. Akraba evliliği ve ailede işitme kaybı görülmesinin işitme kaybı riskini anlamlı derecede arttırdığını tespit ettik.

Sonuç: Bu çalışma ile bölgemizde konjenital nonsendromik işitme kayıplı hastalarda öncelikle GJB2, GJB3, GJB6, KCNQ1, KCNQ4 ve WFS1 gen mutasyonları incelenmiştir. Literatürle uyumlu olarak en sık mutasyon GJB2 geni ve bu gendeki c.35delG mutasyonu olmuştur. Yapılan mikroarray analizi sonrasında bir hastada heterozigot PCDH15 delesyonu saptanmıştır. Günümüzde gen tarama protokollerinin gün geçtikçe kapsamlarının artması prenatal tanıdan itibaren erken tanı ve tedavi olanaklarını bizlere sunmaktadır. Gen mutasyonu tespit edilen hastalar içinse genetik danışmanlık imkanları sağlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: İşitme kaybı, mutasyon, mikroarray, GJB2, PCDH15, WFS1

SUMMARY

THE ANALYSIS OF GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH NON-SYNDROMIC CONGENITAL HEARING LOSS BY DNA MICROARRAY TECHNIQUE

Objective: The aim of this study was to determine the most common mutations in genes and the frequency of these mutations by using microarray method in children with nonsyndromic congenital hearing loss.

Method: This study included 34 patients aged 0 -16 years who were diagnosed or diagnosed previously with congenital hearing loss in Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology since 2009. Peripheral venous blood samples were taken from patients and the genetic analysis was performed with new generation sequencing and microarray technique. The results of genetic studies were evaluated and interpreted based on databases.

Results: In Central Anatolia, the most common mutation as a result of next generation sequencing was c.35delG in the GJB2 gene(%20,5). In addition, rare mutations were also detected in this study. In the GJB3 gene, c.317 G> A mutation was found as 5.8%. The mutation was 11.7% in the WFS1 gene and 5.8% in the KCNQ1 gene. After microarray analysis, heterozygous PCDH15 deletion was detected in one patient and no pathology was found in other cases. It has determined that consanguineous marriages and families have hearing loss significantly increase the risk of hearing loss

Conclusion: In this study, GJB2, GJB3, GJB6, KCNQ1, KCNQ4 and WFS1 gene mutations were investigated in patients with congenital nonsyndromic hearing loss in our region. The most common mutation consistent with the literature was the c.35delG mutation in the GJB2 gene. After microarray analysis, heterozygous PCDH15 deletion was detected in one patient. Today, the increase of gene screening protocols scope by day, presents to us opportunities of early diagnosis and treatment. Genetic counseling facilities are provided for the gene mutation detected patients.

Keywords: Hearing loss; mutation; microarray, GJB2, PCDH15, WFS1

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana Pozantı'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Pozantı'da tamamladıktan sonra 2007 yılında Kozan Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenimime başladım. Bu fakülteden 2013 yılında mezun oldum.2013-2014 yılları arasında Ağrı/Patnos Toplum Sağlığı Merkezi ve 10 nolu Aile Hekimliği biriminde çalıştım. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniğinde uzmanlık eğitimime başladım. Halen bu görevi sürdürmekteyim. İyi düzeyde İngilizce biliyorum.

Adı Soyadı: Turgut ÇELİK

Medeni durumu: Evli

E-Posta: drturgutcelik@gmail.com

Lisans: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi - 2013

Görev yerleri: Patnos Toplum Sağlığı Merkezi 2013-2014

Yabancı Dil: İngilizce

EKLER

Ek 1. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulundan alınmış etik kurul onayı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIğI

GİRİşİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2018/17

Toplantı Tarihi : 12.09.2018

Karar Sayısı 2018/308 S.Ü. Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Bahar ÇOLPAN'ın "Non-sendromik konjenital işitme kayıplarıyla ilişkili gen mutasyonlarının DNA mikroarray tekniği ile incelenmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 23.07.2018 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Bahar ÇOLPAN'ın "Non-sendromik konjenital işitme kayıplarıyla ilişkili gen mutasyonlarının DNA mikroarray tekniği ile incelenmesi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.

