

**GENETİK İŞİTME KAYIPLARINA NEDEN OLAN
CONNEXIN 26 (GJB2) GENİNDEKİ
MUTASYONLARIN NANOCHIP- MİKRODİZİN
YÖNTEMİ İLE BÖLGESEL ARAŞTIRILMASI**

Nilnur EYERCİ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İbrahim PİRİM**

Doktora - 2010

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GENETİK İŞİTME KAYIPLARINA NEDEN OLAN
CONNEXIN 26 (*GJB2*) GENİNDEKİ MUTASYONLARIN
NANOCHIP- MİKRODİZİN YÖNTEMİ İLE BÖLGESEL
ARAŞTIRILMASI**

Nilnur EYERCİ

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İbrahim PİRİM**

**Doktora Tezi
ERZURUM- 2010**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

GENETİK İŞİTME KAYIPLARINA NEDEN OLAN
CONNEXIN 26 (*GJB2*) GENİNDEKİ MUTASYONLARIN
NANOCHIP- MİKRODİZİN YÖNTEMİ İLE BÖLGESEL ARAŞTIRILMASI

Nilnur EYERCİ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.12.2010

Tezin Sözlü Savuma Tarihi : 28.12.2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Enver ALTAŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bünyami ÜNAL

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ersan KALAY

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Özgür YÖRÜK

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Aralık 2010

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

ONAY	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZGEÇMİŞ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ	IX
KISALTMA ve SİMGELER	XI
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Kulağın Yapısı	3
1.1.1. Koklea ve korti organı	3
1.2. İşitme Fizyolojisi.....	5
1.2.1. Ses iletiminde tüy hücrelerinin rolü.....	6
1.3. İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması	9
1.3.1. İşitme seviyesinin belirlenmesi	9
1.4. İşitme Kaybının Genetik Olarak Sınıflandırılması.....	11
1.4.1. Sendromik işitme kayıpları	12
1.4.2. Nonsendromik işitme kayıpları	16
1.5. Gap Junction	20
1.5.1. Connexin proteinin genel yapısı	20
1.5.2. <i>GJB2</i> ; Connexin 26; Gap Junction protein	23
1.5.2.1. Connexin 26 proteinin kulak içindeki yerleşimi.....	24
1.5.2.2. Connexin 26 proteinin işitmedeki rolü.....	25
1.5.2.3. Farklı connexin tipleri.....	27
1.5.3. Connexin <i>GJB2</i> geni	29
1.5.4. İşitme kaybına yol açan connexin 26 mutasyonları ve polimorfizmleri.....	30
1.5.4.1. Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren <i>GJB2</i> Mutasyonları.....	31
1.5.4.2. Otozomal resesif kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları	33
1.5.4.3. Polimorfizmler (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , SNP).....	36
1.6. Mitokondrial Mutasyonlar ve İşitme Kaybı.....	37

1.6.1. Mitokondrial mutasyonlar.....	38
1.7. Mikrodizin Teknolojisi	41
1.7.1. Moleküler hibridizasyon.....	41
1.7.1.1. Erime sıcaklığı ve hibridizasyon özgülüğünün sağlanması	42
1.7.2. Mikrodizin teknolojisinde SNP değişimlerinin saptanması	43
1.7.3. Microarrayin kullanım alanları	44
1.7.4. Mikroarrayin çalışma prensibi	44
1.7.4.1. Mutant - yabanıl tip işaretleyici.....	45
1.7.4.2. Stabilizer (Sabitleyici)	45
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
2.1. İncelenen Örneklerin Toplanması.....	48
2.2. Kan örneklerinden DNA izolasyonu.....	48
2.2.1. Hücrelerin parçalanması	49
2.2.2. Proteinlerin çöktürülmesi.....	49
2.2.3. DNA'nın çöktürülmesi.....	50
2.3. Mikrodizin Analiz Çalışması	50
2.3.1. Mikrodizin çalışmasında kullanılan stok çözelitler ve hazırlanışları	50
2.3.2. Mikrodizin analiz yöntemi ile Mutasyon Analizi.....	51
2.3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Polymerase Chain Reaction, PZR) ve gen bölgelerinin çoğaltılması.....	52
2.3.2.1.1. Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 5'UTR (promoter bölge), 12S rRNA bölgesinin çalışılması	52
2.3.2.2. PZR ürünlerinin saflaştırılması	56
2.3.2.3. Örneklerin cihaza yüklenmesi	57
2.3.2.4. Örneklerin nanogen moleküler biyoloji çalışma istasyonu ile hibridizasyon ve okutmasının yapılması	58
2.3.2.5. Okuma sonuçlarının değerlendirilmesi	62
2.4. DNA Dizi Analiz Çalışması	63
2.4.1. DNA Dizi analizi ve hazırlık aşamaları	63
2.4.1.1. PZR'ın hazırlanışı.....	64
2.4.1.2. PZR şartları	65
2.4.1.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması	65

2.4.2. DNA Dizi analiz reaksiyonu	66
2.4.2.1. PZR şartları	67
2.4.2.2. Dizi analizi yapılacak PZR ürünlerinin saflaştırılması	68
2.4.3. Kromatogramların değerlendirilmesi	68
3. BULGULAR	70
3.1. Mikrodizin Sonuçları	70
3.1.1. <i>Connexin 26 İkinci Ekzonun çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması</i> ...	70
3.1.2. <i>Connexin 26 promoter bölge (5' UTR) ve 12S rRNA bölgesinin çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması</i>	70
3.2. Mikrodizin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	71
3.2.1. <i>Connexin 26 ekzon 2 mikrodizin analiz sonuçları</i>	73
3.2.2. <i>GJB2 5'UTR Promoter bölge IVS1+1A>G mutasyonu mikrodizin analiz sonuçları</i>	75
3.2.3. <i>Mitokondrial DNA 12S rRNA A1555G mutasyonu mikrodizin analiz sonuçları</i>	75
3.3. DNA Dizi Analizi	75
3.3.1. <i>Connexin 26 ikinci ekzonun çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması</i> ...	75
3.1.2. <i>Connexin 26 ikinci ekzonunun DNA dizi analizi sonuçları</i>	75
3.4. Probandlarda Saptanan Mutasyonlar ve İşitme Kaybı Sonuçları	77
3.5. Olgu Grubunda Akrabalık ve Seçici Eşleşme Sonuçları	77
3.6. Türkiyede <i>GJB2</i> 'nin coğrafik dağılımı ve bu çalışma sonuçları	80
3.7. Çalışma sonucunda bulunan mutasyonların Cx26 üzerindeki yerleşimi	80
3.8. Ülkemizde <i>GJB2</i> geni ile ilgili çalışmalarda saptanan mutasyon ve polimorfizmlerin bu çalışma ile karşılaştırılması	81
4. TARTIŞMA	83
SONUÇLAR	94
KAYNAKLAR	95
EK-1	105
EK-2	106

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yürütölmek üzere ‘Genetik İşitme Kayıplarına Neden Olan Connexin 26(*GJB2*) Genindeki Mutasyonların Nanochip- Mikrodizin Yöntemi ile Bölgesel Araştırılması” adlı tez konusunun Nilnur EYERCİ tarafından çalışılması uygun görölmüş, seçilen konu incelenmek üzere Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu’nun 25.12.2007 tarih ve 2007.4.1/7 karar nosu ile tez çalışması olarak uygun görölmüştür.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve aynı zamanda tez hocam sayın Prof. Dr.İbrahim PİRİM hocama,

Hasta seçimi konusunda bilgi veren ve yönlendiren Kulak Burun Boğaz hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr.Enver Altaş'a ve hastaların işitme testi sonuçlarını paylaşan sayın Kürşat AKKEÇE'ye,

Hasta bilgilerinin toplanmasında yardımlarını sunan Erzurum Dedekorkut İşitme Engelliler İlköğretim Okulu çalışanlarına ve okul müdürü Vedat KARSLI'ya,

Laboratuvar da birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma, numune toplama ve DNA izolasyon aşamasında büyük emeği geçen Melek ÖKSÜZ ve Nuriye GİNİŞ'e,

DNA dizi analizi çalışmalarımnda sabrını ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili çalışma arkadaşım Eda DIYARBAKIR'a,

Beni bugünlere getiren, çalışmalarım sırasında her zaman özveri gösterip, sabır, destek ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli aileme teşekkür ederim.

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2004/210 ve 2008/118 sayılı projeler ile desteklenmiştir. Bu araştırmanın gerçekleştirilmesine katkı sağlayan üniversiteme teşekkür ederim.

Nilnur EYERCİ

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Erzurum da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erzurum da tamamladı. 1997 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde bir yıl eğitim gördükten sonra Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne yatay geçiş yaparak 2001 yılında mezun oldu. 2003-2005 yılları arası Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümünde Yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2005 yılında Tıbbi Biyoloji bölümünde doktora programına başladı. Halen aynı bölümde uzman olarak görev yapmaktadır.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Koklea, korti organı ve tüy hücreleri.	5
Şekil 1.2. Tüy hücrelerinde depolarizasyon ve hiperpolarizasyon.	7
Şekil 1.3. Korti organındaki iç ve dış tüy hücreleri	8
Şekil 1.4. Connexinler ve gap junctionların organizasyonu.....	21
Şekil 1.5. Connexin 26 proteinin hücre membranında yerleşimi.	22
Şekil 1.6. Connexin 26 protein alanları.....	23
Şekil 1.7. Kokleanın yapısı ve <i>GJB2</i> 'nin ifade edildiği alanlar.	25
Şekil 1.8 Kokleadaki potasyum döngüsü	27
Şekil 1.9. 13. kromozom üzerinde <i>GJB2</i> geninin yerleşimi.....	29
Şekil 1.10. Connexin 26 geni ekzon 1, intron ve ekzon2 bölgesi.....	30
Şekil 1.11. Connexin 26'nın promoter bölgesi.	30
Şekil 1.12. 35delG'nin taşınma sıklığının ülkelere göre dağılımı verilmiştir	33
Şekil 1.13. 12S rRNA geninde A1555G mutasyonunun konumu	39
Şekil 1.14. Hibridizasyon sırasında stabilizör ve diziye özgül probun hedef bölgeye bağlanması	45
Şekil 1.15. PZR ürününe stabilizör (sabitleyici) ve reporter (işaretleyici)'nin base stacking enerjisi ile bağlanması	46
Şekil 2.1. Connexin 26 ikinci ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.	52
Şekil 2.2. Connexin 26 promoter bölge primer oturma bölgeleri.....	53
Şekil 2.3. Mitokondrial genomda A1555G için primer oturma bölgeleri.....	53
Şekil 2.4. Dizi analizi için kullanılan 943 bp lik connexin 26 Exon 2 bölgesi ve primer oturma bölgeleri.	63
Şekil 3.1. Connexin 26 Ekzon 2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntü	70
Şekil 3.2. Connexin 26 promoter bölge (5'UTR) ve 12S rRNA bölgesi PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	71
Şekil 3.3. Mutasyon okutması yapıldığında chipe yüklenen örneklerden elde edilen analiz edilmemiş görüntü.....	71
Şekil 3.4. Nanogen mikrodizin cihazında çalışılmış wild , heterozigot, mutant örneklerin analiz grafiği.....	72

Şekil 3.5. Nanogen mikrodizin analiz yöntemi ile çalışılmış connexin 26 genindeki bir mutasyonunun floresan sinyal oranları, analiz sonucunda belirlenen genotip	72
Şekil 3.6. Connexin 26 Ekzon 2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	75
Şekil 3.7. İşitme kayıplı olgularda 327-328delGGinsA mutasyonu ve aynı bölgenin sağlıklı olgulardaki kromatogram görüntüsü.	77
Şekil 3.8. Çalışma sonucunda Connexin 26 proteinin de bulunan tüm değişimlerin konumları.	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. İşitme kaybının sınıflandırılması	10
Tablo 1.2. Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri.	15
Tablo 1.3. Sendromik olgularda dominant kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları.....	16
Tablo 1.4. Nonsendromik işitme kaybı ile ilgili gen ürünlerinin işlevleri ve gen lokusları	18
Tablo 1.5. Connexin tiplerinden bazıları ve ifade edildiği dokular.....	28
Tablo 1.6. Otozomal dominant kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları	32
Tablo 1.7. Otozomal resesif kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları.....	34
Tablo 1.8. İşitme kaybı ile ilişkili mitokondrial mutasyonlar	40
Tablo 1.9. A1555G mutasyonunun işitme kaybı olan çeşitli toplumlarda görülme sıklığı	41
Tablo 2.1. Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 5'UTR (promoter bölge), 12S rRNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer dizileri..	53
Tablo 2.2. Connexin 26 geni için 50 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	54
Tablo 2.3. Connexin 26 promoter bölge ve 12S rRNA bölgesi için PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	54
Tablo 2.4. Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 promoter bölge ve 12S rRNA da bulunan A1555G mutasyonun tespiti için kullanılan PZR ısı değişkenleri.....	55
Tablo 2.5. Chipe yüklenen kontrol örneklerinin bileşenleri ve miktarları.....	58
Tablo 2.6. Hibridizasyon aşamasında kullanılacak wild, mutant, stabilizer, universal (Ur) oligonukleotidlerin miktarları	59
Tablo 2.7. Her bir mutasyona doğru analiz yapılabilmesi için gerekli okutma sırası	59
Tablo 2.8. 35delG,167delT, IVS 1+1 G>A okutma protokolü	60
Tablo 2.9. W24X, L90P, delE120, Q124X okutma protokolü	60
Tablo 2.10. M34T, R184P, A1555G okutma protokolü.....	61
Tablo 2.11. 235delC okutma protokolü	61
Tablo 2.12. Herbir çalışma sonunda uygulanan chip temizleme protokolü	62
Tablo 2.13. Dizi analizi için kullanılan forward ve revers primer dizileri	64

Tablo 2.14. Connexin 26 geni için 30 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	64
Tablo 2.15. Connexin 26 ekzon 2 PZR ısı değişkenleri	65
Tablo 2.16. Connexin 26 Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılması için PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	67
Tablo 2.17. Connexin 26 Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılmasında kullanılan PZR ısı değişkenleri.....	67
Tablo 3.1. Connexin 26 geninin ikinci ekzonun da mikrodizin analiz verilerine göre mutasyon saptanan olgular	73
Tablo 3.2. Mutasyon saptanan olgularda aile mikrodizin analizi verileri	74
Tablo 3.3. Connexin 26 geninin ikinci ekzonun da DNA dizi analiz verilerine göre mutasyon saptanan olgular	76
Tablo 3.4. Mutasyon saptanan olgular ve aile DNA dizi analizi verileri	76
Tablo 3.5. Probandlarda (56 olgu) saptanan mutasyonların olgu grubu içindeki yüzdeleri, allelik frekanları ve işitme kaybı seviyeleri, yüzdeleri.	78
Tablo 3.6. Olguların öyküleri.	79
Tablo 3.7. Akralık ve seçici eşleşmenin olgu grubu içindeki yüzdeleri.	79
Tablo 3.8. Türkiye'de <i>GJB2</i> 'nin coğrafik dağılımı.....	80
Tablo 3.9. Ülkemizde <i>GJB2</i> geni ile ilgili çalışmalarda saptanan mutasyon ve polimorfizmlerin bu çalışma ile karşılaştırılması.....	81
Tablo 3.10. Ülkemizde IVS1+1G>A çalışma sonuçlarının bu çalışma ile karşılaştırılması	82
Tablo 3.11. Ülkemizde A1555G çalışma sonuçlarının bu çalışma sonuçları ile karşılaştırılması	82

KISALTMA ve SİMGELER

bp	: Baz Çifti.
Cx26	: Connexin 26
dB	: Desibel
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
DFN	: Cinsiyete bağlı lokus.
DFNA	: Otozomal dominant lokus.
DFNB	: Otozomal resesif lokus.
EC	: Hücre dışı.
ER	: Endoplazmik Retikulum.
GENDAF	: European Thematic Network on Genetic Deafness
GJA	: Alfa connexinler.
GJB	: Beta connexinler
GJC	: Gamma connexinler
GJP	: Gap junction plak
IC	: Hücre içi
OD	: Optik dansite
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPK	: Palmoplantar keratoderma
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
TBE	: Tris-Borat-EDTA
UTR	: İfade edilmeyen bölgeler (Untranslated region)
µl	: mikrolitre

ÖZET

**GENETİK İŞİTME KAYIPLARINA NEDEN OLAN
CONNEXIN 26 (*GJB2*) GENİNDEKİ MUTASYONLARIN
NANOCHIP- MİKRODİZİN YÖNTEMİ İLE BÖLGESEL
ARAŞTIRILMASI**

Bir gap junction proteinini kodlayan *GJB2* gen bölgesindeki mutasyonlar tüm dünyada non sendromik otozomal resesif sağırlığın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Doğu Anadolu Bölgesinden seçilen birden fazla işitme kayıplı çocuğa sahip ailelerde, otozomal resesif işitme kaybı olan 56 probandin *GJB2* ekzon 2, IVS 1+1 G>A, mitokondrial A1555G değişimleri araştırıldı. İlk olarak 56 proband ve ailelerine çalışılacak bölgelerdeki değişimlerin tespiti için mikrodizin analizi yapıldı. Mutasyon görülmeyen ve birleşik heterozigot olgular için DNA dizi analizi yöntemi uygulandı. Tüm *GJB2* mutasyonları arasında en sık allel frekansı 35delG (%13.4) de bulundu. Diğer saptanan mutasyonların allel frekansları delE120 (%4.5), W24X (%1.8), R184P (%0.9) dir.

Olgu gurubunda, 2 olguda daha önce literatürde tanımlanmayan (%2.7)'lik allel frekansı ile 327-328delGGinsA mutasyonu belirlendi. Ayrıca V27I (%0.9) ve V153I (%1.8) polimorfizimleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Otozomal resesif sağırılık, Connexin 26, mtA1555G, Doğu Anadolu, Mikrodizin, DNA dizi analizi

ABSTRACT**EVALUATION OF MUTATIONS IN THE CONNEXIN 26(GJB2) GENE
CAUSING GENETIC HEARING DEFICIENCY BY MICROARRAY-
NANOCHIP METHOD; REGIONAL INVESTIGATION**

Mutations at the *GJB2* region that encodes one of the gap junction protein covers high portion of non syndromic deafness in the world. Enrolled families for the study whose at least one proband has deafness have been examined for *GJB2* exon 2, IVS 1+1 G>A and mt A1555G. Initially, choosen probands and their families were searched for the SNPs by microarray method. The samples which have no SNP got diverted to DNA sequence analysis. The most frequent mutated allele was 35delG (%13.4). Other alleles apparence was as follow delE120 (%4.5), W24X (%1.8), R184P (%0.9).

Our work's contribution was to find out *GJB2* gene mutation of 327-328 delGGinsA (%2.7), which has not been come across in the literaturate. Moreover, two polymorphisms V27I (%0.9) and V153I (%1.8) have been maintained by the sequence analysis.

Key Words: Non-syndromic deafness, Connexin 26, mtA1555G, East of Turkey, Microarray, DNA sequence

GİRİŞ ve AMAÇ

İşitme kaybı dünya da ve Türkiye’de en yaygın görülen duyuşal bozukluktur.¹ Dünyada her 1000 çocuktan 1 yada 2’sinde konjenital işitme kaybı görülürken yetmiş milyondan fazla insanın da işitme kaybından etkilendiğı bilinmektedir.² İşitme kaybı yenidoğanda dil kazanımını ve eğitiminin ilerlemesini, çocukluk ve yetişkin dönemde ise kişilerin sosyal ve iş yaşamlarını ciddi şekilde etkilemektedir.

İşitme kaybı klinik ve genetik açıdan heterojen bir yapı gösterir. İşitme kaybının çok sayıda sebebi vardır. Genetik ve çevresel sebeplerin katkısı olabileceğı gibi genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynayabileceğı durumlarda söz konusudur. İşitme kaybına endüstrileşmemiş ülkelerde çevresel sebepler daha çok katkıda bulunurken, gelişmiş ülkelerde genetik faktörler katkıda bulunur.

Sağırlığın epidemiyolojik araştırmaları göstermiştir ki; çocukluk çağı sağırılığına genetiğın katkısı %50 dir. Çünkü bu araştırmalar da kişilerin önemli bir kısmında sebep belirlenememiştir. Son moleküler çalışmalar, sağırılığın bilinmeyen sebepleri grubunda genetik sebeplerin yaygın ve heterojen olduğunu göstermektedir.

Sesin tanınması ve iletiminin hayatımızdaki rolünü düşündüğümüzde insan genomunda 130’dan fazla lokus ve 54 otozomal dominant, 67 otozomal resesif, sekiz X’e bağı, bir Y kromozomuna bağı ve iki mitokondrial genin belki de daha fazlasının işitme sistemi için gerekli olduğı bugün artık bilinmektedir.³ İşitme kaybı basit olarak iletim, sensorinöral veya ikisinin birleşimi; sendromik veya sendromik olmayan; prelingual ve postlingual olarak sınıflandırılabilir. Sendromik ve sendromik olmayan grupta, klasik Mendel kalıtım tiplerinden biri veya mitokondriyal kalıtım şekli görölmektedir. Sendromik olmayan işitme kaybı genetik işitme kaybının %70’ini oluşturur. Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan genler içinde önemli yeri, DFNB1 lokusunda yer alan “Connexin 26” (*GJB2/Cx26*) tutmaktadır. İşitme kaybı ile ilgili gen tanımlanması ve mutasyon taraması konusunda en önemli adım 1997’de Kelsell’in *GJB2* genini bulması ile atılmıştır. “Gap Junction” kanallarının oluşumundan sorumlu olan “Connexin 26” proteinini kodlayan bu gendeki mutasyonların, resesif kalıtılan prelingual sendromik olmayan işitme kayıplarının yaklaşık %50’sinden sorumlu olduğı gösterilmiştir.⁴

Genel olarak işitme bozukluğu ile ilişkili olduğu bilinen genlerin bir toplumdaki sıklığının belirlenmesi oldukça önemlidir. Birçok sağır kişi ve aileleri sağırlıklarının sebebini bilmeyi ister, özellikle de genetik olup olmadığının belirlenmesini ister. Genetik teşhisler, doğru genetik danışmanlık ve aile planlamasına izin verir. Akrabalar için taşıyıcı testleri ve çevresel risk faktörleri hakkında gerekli bilgiyi sağlarlar. (örneğin, mtDNA 12S rRNA genindeki A1555G mutasyonlu kişilerde aminoglikozid antibiyotiklerinin kullanımı) Buna ek olarak prenatal dönemde yapılacak moleküler tanı testlerine zemin hazırlanması, koklear implant ve gelecekte gen terapisi gibi terapilerin başarıya ulaşması ve planlamasının yapılması için de önemlidir.⁵

Dünyada birçok laboratuvar ve merkez işitme kaybının genetik haritasını tamamlamak için uğraş vermektedirler. Bu çalışmalar işitme kaybı için genetik tarama programlarının yapılmasını sağlayarak hastalığın daha erken teşhisine yardımcı olmaya yöneliktir. Türk toplumunda işitme kaybının genetik etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda LHFPL5, ESSRB, LRTOMT (DFNB63), FGF3 genleri Türk bilim adamları tarafından tanımlanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, otozomal resesif non sendromik işitme kaybı ile ilişkili olduğu bilinen *GJB2* ve mtDNA 12S rRNA gen bölgesi değişimlerini Doğu Anadolu bölgesinde görülen non sendromik işitme kaybı vakalarında araştırmaktır. Non sendromik sağırlığa yol açan genler arasında connexin 26 proteinini kodlayan *GJB2* geni ve mitokondrial 12S rRNA seçilmiştir. Bu genlerin başka populasyonlarda da sağırlık üzerine büyük ölçüde etki gösterdikleri literatür çalışmaları ile tespit edilerek bu çalışma organize edilmiştir. Bu çalışmada polimeraz zincir reaksiyonu, daha önce yapılan çalışmalar ile toplumda sıkça rastlanan mutasyonların belirlenmesini sağlayan mikrodizin analizi ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılıp, seçilen gen bölgelerdeki değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kulağın Yapısı

İşitmenin meydana gelebilmesi için bir ses kaynağı, ses dalgalarını ileten bir ortam ve bunları algılayan reseptör organ, kulak gereklidir. Oldukça karmaşık bir yapıya sahip olan insan kulağı, dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Dış kulak, kulak kepçesi, kulak kanalı ve kulak zarını; orta kulak, işitme kemiklerini; iç kulak ise işitme ile ilgili olan koklea ve akustik olmayan vestibular organı taşır.⁶

Dış kulağın görevi ses dalgalarını toplayarak kulak zarına iletmektir. Havada yayılan ses dalgaları kulak zarını titreştirir. Bu titreşimler orta kulaktan iç kulağa hareketli üç kemikten oluşan sistem aracılığıyla iletilir. Böylece ses basınç dalgaları mekanik harekete dönüştürülür. İşitme sistemindeki bu kemikler; kulak zarına bağlı olan örs, vestibulum oval penceresine tutunmuş olan çekiç ve örs ile çekiç arasında her ikisiyle de temas halindeki özensidir. Kulak kemikleri kulak zarı ile iç kulak arasında bağlantıyı sağlarlar. Kulak zarının yüzey alanı, üzensi kemiğinin taban alanından yaklaşık 25 defa daha geniştir. Buna göre, üzensi kemiğinin iç kulak üzerine yaptığı basınç, kulak zarını titreten hava basıncından kat kat fazladır. Böylece, kulak zarının hafif titreşimleri, birçok kez büyütülmüş olarak iç kulağa yansıtılır.^{6,7}

İç kulak, temporal kemiğin petroz kısmının içindeki kemik labirentten oluşur. Kemik labirent vestibuler ve işitme sistemlerinin her ikisinde bulunduğu membranöz labirenti içine alır.

Semisirküler kanallar, vestibul ve koklea olmak üzere 3 yapı içermektedir. Semisirküler kanallar olarak adlandırılan 3 lob ve onlara bitişik yer alan utrikül ve saccul vestibular yapıyı oluşturmakta olup yatay ve açısal hızlanma sonucunda oluşan sıvı hareketlerine yanıt vererek vücudun dengede kalmasını sağlamaktadır.^{6,7}

1.1.1. Koklea ve korti organı

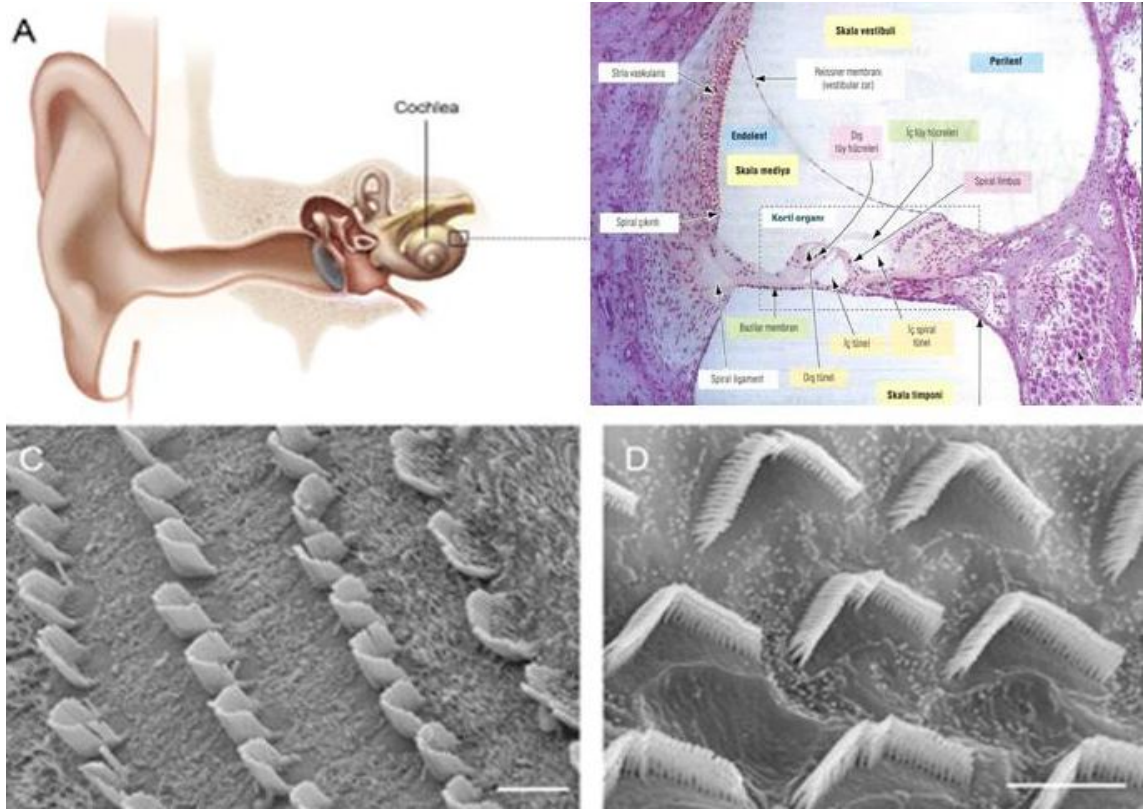
İç kulağın işitmeden sorumlu olan kısmı kokleadır. İnsan kokleası 20Hz ile 20kHz arasındaki ses frekanslarını tanıyabilir. Koklea 2,5 devir yapan ve işitme reseptörlerini taşıyan spiral bir borudur. İçinde iki membranla ayrılmış üç farklı kanal

bulunur. Kokleada 3 ekstrasellüler sıvı belirlenmiştir. Endolenf, perilenf ve intrastrial sıvılar. Kanallardan skala vestibuli ve skala timpani yüksek sodyum ve düşük potasyum iyonu konsantrasyonuna sahip kimyasal olarak serebrospinal sıvıya benzeyen perilenf ile dolu olup, birbirinden kokleanın üçüncü kanalı olan skala media ile ayrılır. Skala media ise stria vaskularis tarafından salgılanan endolenf sıvısı ile doludur. İntrastrial sıvılar stria vaskularisteki küçük ekstrasellüler yüzeyleri doldurur.⁸

Kokleanın üstün hassaslığı, sinir impulslarına ses dalgalarının transdüksiyonuna aracılık eden, endokoklear potansiyele bağlıdır ve sensör fonksiyonun ayakta kalmasını sağlayan özelleşmiş bir çevre gerektirir. Endolenfin içeriği intrasellüler sıvıların içeriğine benzer. Sitozolda de en fazla bulunan iyon olan K^+ , sensör transduksiyonu için major yük sağlar ve ideal yük taşıyıcısıdır.⁷ Endolenf sadece yüksek K^+ ve düşük Na^+ için muhteşem bir sıvı değil ayrıca düşük Ca^{+2} , yüksek HCO_3^- konsantrasyonu ve düşük protein içeriğiyle de özellikli bir sıvıdır. Yüksek HCO_3^- konsantrasyonunun pH ayarlanmasında gerekli olduğu, düşük Ca^{+2} konsantrasyonun ise kokleadaki sensor transduksiyon için önemli olduğu düşünülmektedir. K^+ ve Ca^{+2} birlikte tüy hücrelerine girer, transduksiyon mekanizmasının adaptasyonuna ek olarak mekano-elektriksel akımın oluşmasını sağlar.⁷

Endolenf, sensor ve epitelyum hücrelerini içeren yaklaşık 12 farklı heterojen yapıda epitelyumla kaplıdır⁹ (Şekil 1.1). Endolenf, skala medianın dış duvarında yoğun olarak bulunan vaskularize epitelyum “Stria vaskularis” tarafından salgılanır.

Skala media bölmesini skala vestibuli den ayıran zarsı yapıya Reissner membranı adı verilir. Reissner membranının görevi, ses alıcı tüy hücrelerinin normal fonksiyonu için gerekli sıvıyı skala media içinde tutmaktır. Baziller membran ise skala media ile skala timpaniyi ayırmaktadır. Endolenf ile perilenf arasında her zaman +80 ile 100 mV’luk bir elektropotansiyel fark bulunmaktadır. Bu potansiyele endokohlear potansiyel denir. Böylece skala medianın içi pozitif, dışı negatif tutulmaktadır. Baziller membran yukarı hareket edince, bu potansiyel fark azalır, aksi yönde harekette ise artar.^{7, 10, 11}



Şekil 1.1 Koklea, korti organı ve tüy hücreleri (A) Salyangoz biçimindeki koklea. (B) Korti organı. (C) Kokleadaki tüy hücreleri. Solda 3 sıra halinde dış tüy hücresi, sağda bir sıra iç tüy hücresi (D) Dış tüy hücrelerinin büyütülmüş görüntüsü, 5 μ m.

İşitme reseptörü olan korti organı koklea içinde konumlanmıştır. Korti organı basillar membranın üst yüzeyinde yerleşen, birçok hücreden yapılmış bir organdır ve tektorial membran tarafından sarılmıştır. Burada duyu ve destek olmak üzere iki tip hücre grubu vardır. Korti organı, Claudius, Boettcher, Hensen, Deiters, Pillar ve iç sınır hücreleri denen destek hücreleri içermektedir. Bu hücreler tüy hücrelerini desteklemektedirler. Ses iletimini sağlayan duyu hücreleri, üst yüzeylerinde bulunan mikrovililer nedeniyle tüy hücreleri (hair cell) olarak isimlendirilirler. Bunlar iç kulağın mekanik reseptörleridirler.^{7,9}

1.2. İşitme Fizyolojisi

İşitme, başın çevresinde oluşan ses dalgalarının dış kulak, orta kulak ve iç kulak aracılığı ile beyin sapından geçip korteksteki işitme merkezi tarafından algılanmasıdır. Dış ortamdan gelen ses dalgalarının karşılaştığı ilk organ kulak kepçesidir. Kulak

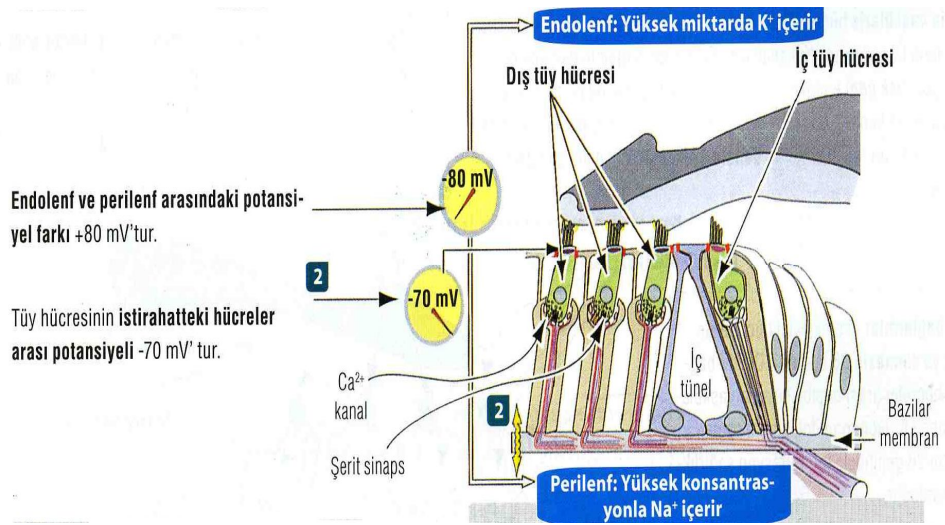
kepçesi, sesleri toplamaya ve dış kulak yoluna iletmeye yarar. Ayrıca yapı özelliği nedeniyle sesi süzme ve amplifiye etme görevi de vardır. Kulak zarı, dış kulak yolundan gelen ses dalgalarını kulak kemikçikleri aracılığı ile oval pencereye iletirken, bu ses dalgalarının yuvarlak pencereye ulaşmasını da engeller. İç kulaktaki kokleaya ulaşan ses dalgaları kokleanın perilenf sıvısı ile dolu olan skala vestibuli bölgesinde baskı dalgaları yaratır. Perilenfin hareketi tektoriyal membranı hareketlendirir ve bazilar membranın titreşimine neden olur. Tektoriyal membran alfa ve beta-tektorin proteinleri içerir ve kemik spiral laminanın spiral limbusundan sensori epitel üzerinden dışa doğru uzanır. Tektoriyal membran tüy demetlerinin uzun stereosilyaları ile yakın ilişkidir. Baziller membran ve korti organı yer değiştirdiğinde birbirlerine köprüler yardımı ile tutunmuş kısıdan uzuna sıralanan stereosilyalar tektoriyal membrana çarpar. Bu eğilme hareketiyle tüylerin tektoriyal membrana sürtünmesi tüy hücresinde 200-300 adet katyon iletici kanalın açılmasını sağlar ve yüksek potasyum konsantrasyonu içeren endolenf sıvısından tüy hücrelerine doğru pozitif yüklü potasyum iyonları akar. Bu pozitif yük tüy hücresinin depolarizasyonuna neden olur. Baziller zarın aşağı doğru hareketi ile silyalar zıt yönde bükülür, hücre içindeki Ca^{+2} artışı, kalsiyuma duyarlı potasyum geçiş yollarını açar; potasyum iyonları hücreden dışarı çıkarlar. Bu durum hücreyi normal dinlenme potansiyeline döndürür ve yeni bir döngü başlar. Bu sayede tüy hücrelerinde değişken bir reseptör potansiyeli yaratılarak hücrenin tabanı ile sinaps yapan koklear sinir hücreleri uyarılmış olunur. Son olarak, K^{+} iyonları tüy hücrelerinden ayrıldıktan sonra korti organının destek hücreleri tarafından alınır ve gap junction aracılığı ile endolenfe pompalanmak üzere stria vaskularise geri gönderilir.^{6-8, 12}

1.2.1. Ses iletiminde tüy hücrelerinin rolü

Tüy hücreleri, hücre yüzeyinden sert çubuklar şeklinde tipik bir org borusu diziliminde uzayan, çapraz bağlı aktin iplikçikleri ile dolu ve bileteral simetrik olarak sıralanmış, 50-150 adet kinosilyumu olmayan dev mikrovillusa (stereosilya) sahiptir. Bu tip her bir dizilimin boyutları, olağanüstü bir doğrulukla, tüy hücresinin kulaktaki yerleşimine ve yanıtlaması gereken sesin frekansına uygun olarak belirlenmiştir. Tüy demetleri ses kaynaklı mekanik uyarıyı elektrik uyarısına dönüştürebilme yeteneğine sahip en etkileyici mekanik reseptörlerdir. Simetri düzlemine paralel olan tüy demetinin en uzun stereosile doğru yer değiştirmesi tüy hücresini depolarize, en kısa stereosile

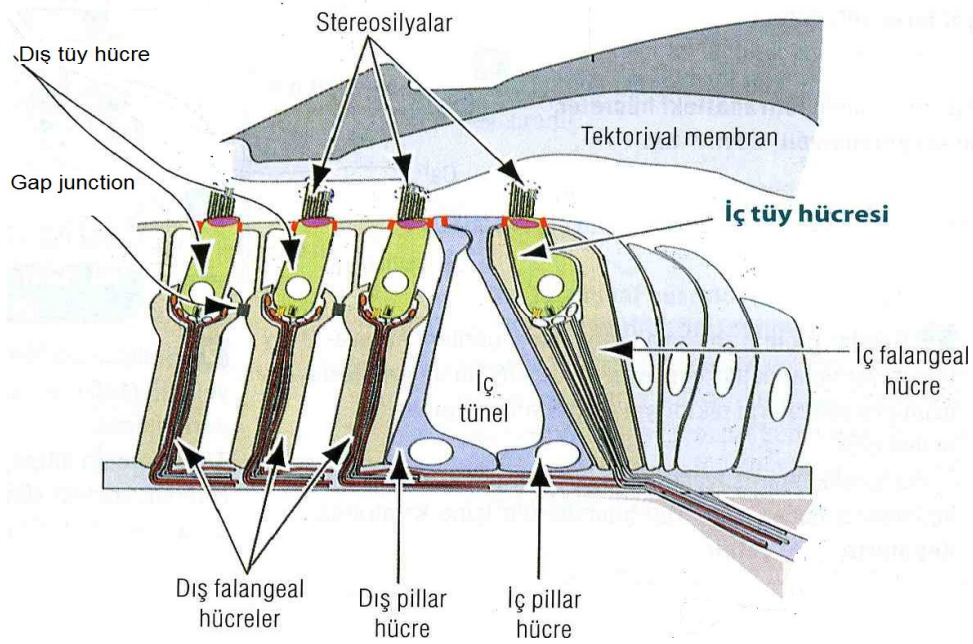
doğru hareketi ise hiperpolarize eder. Tüy hücreleri stereosil demetinin bu şekilde yer değiştirmesini 10 mikro saniye gibi kısa sürede elektrik potansiyeline çevirebilir.^{7, 8}

İşitme süreci sırasında iki faktör rol oynar. Birincisi endolenf içindeki potasyumun yüksek konsantrasyonu ile perilenf içindeki sodyumun yüksek konsantrasyonu elektrik yük farklılığını belirler. İyon konsantrasyonundaki bu fark stria vaskularisin emici ve salgılayıcı aktivitesi ile düzenlenir. İkinci ise skala timpani içindeki sıvının hareketi baziller membranın hareketini sağlar. Bu da tektorial membrandaki uzun stereosilyaları hareket ettirir. Bitişik stereosiller gerildikleri zaman katyon-seçici transdüksiyon kanallarını açarlar. Hücre içerisine doğru K^+ iyonlarının geçmesine izin verirler. Tüy hücresi -45 ile -60 mV arası bir dinlenme potansiyeline sahiptir. Dinlenme potansiyelindeyken transdüksiyon kanalların bir kısmı açıktır. Tüy hücresi en uzun stereosil yönüne doğru eğildiğinde daha fazla transdüksiyon kanal açılır ve potasyum hücre içerisine girerek hücrenin depolarizasyonuna neden olur. Bu olay tüy hücre membranında bulunan voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının açılmasına ve kalsiyum iyonlarının tüy hücresi içine doğru hücum etmesine yol açar. Kalsiyumun bu şekilde hücreye girmesi hücrenin bazal membranından işitme sinirlerine doğru transmitterlerin salınmasına neden olur. Tüy hücreleri ile sinaps yapan koklear sinir uçları uyarıyı alır, lifler oluşturarak korti organında yer alan “spiral ganglion” a gelir. Buradan da koklear sinir aracılığıyla merkezi sinir sistemine ulaşır. Böylece tüy hücreleri mekanik enerjiyi nöral sinyallere dönüştürürler.^{7, 11}



Şekil 1.2 Tüy hücrelerinde depolarizasyon ve hiperpolarizasyon.

İki çeşit tüy hücresi bulunur. İç tüy hücreleri duyu hücreleridir ve bazal yüzeylerinde afferent sinirler ile ilişkidirler. İşitme sinirlerinin yaklaşık %90'ı iç tüy hücreleri tarafından uyarılır. Dış tüy hücreleri ise alınan seslerin hassasiyetini ve frekans seçiciliğini sağlayan sensöri ve motor elementlerin her ikisine de sahiptir. Dış tüy hücreleri akustik olarak uyarıldıklarında uzar ve kasılır.⁷



Şekil 1.3. Korti organındaki iç ve dış tüy hücreleri

İnsanlarda ve diğer memelilerde, işitsel tüy hücrelerinin yaşam süreleri sonsuz olmalıdır. Hastalıklar, toksinler veya aşırı derece yüksek ses nedeni ile yok edilirse, yeniden oluşmazlar ve sonuçta oluşan işitme kaybı kalıcıdır. Diğer omurgalıları ise, işitsel tüy hücreleri yıkıldığında, destek hücrelerin bölünmesi tetiklenir ve kaybolan tüy hücrelerinin yerini almak için farklılaşacak yavruları oluşturan kök hücreler olarak görev yaparlar. Bu yenilenme işleminin nasıl düzenlendiğinin daha iyi anlaşılmasıyla, bir gün, insanlarda da işitsel epitelin kendini onarması sağlanabilir.¹³

Koklear hemostazın bozulmasına neden olan gap junctionları kodlayan genlerdeki değişimler hem sendromik hem de non-sendromik işitme kayıplarını oluşturan birçok işitme kaybı formuna neden olur.

1.3. İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması

İşitme kaybı doğuştan, çocukluk ya da hayatın geç evrelerinde ortaya çıkabilir. İşitme kaybı konuşmanın gelişiminden önce ortaya çıkmış ise prelingual, hayatın ileri evrelerinde ortaya çıkmış ise postlingual olarak sınıflandırılır. İşitme kayıpları klinik olarak sensörinöral, konduktif, miks ve merkezi tip olmak üzere 4'e ayrılır.

Sensörinöral işitme kaybı, işitme sinirlerinin veya iç kulaktaki koklea hücrelerinin yaşlanma, yüksek ses, hastalık, yaralanma, enfeksiyon, baş travması, ilaçların toksik etkileri ile zarar görmesi nedeni ile ya da kalıtsal olarak ortaya çıkar. Kalıtsal işitme kaybında etkilenmiş bireylerde zaman zaman işitme ile ilgisi olmayan ek klinik özellikler görülmektedir. Bu tip kalıtsal işitme kaybına sendromik işitme kaybı denir. Sendromik işitme kaybından daha sık olarak görülen nonsendromik işitme kaybında ise olgular işitme kaybından başka herhangi bir ek klinik özellik taşımazlar. Nonsendromik işitme kaybı genellikle monogenik olarak görülse de yüksek derecede heterojenite göstermektedir. Kalıtsal işitme kaybının yaklaşık %60-70'i nonsendromiktir ve hasar çoğunlukla sensörinöral orijinlidir. Sensörinöral işitme kaybı toplam işitme kayıplarının %90'ından sorumludur.^{14, 15}

Konduktif işitme kaybı, en sık rastlanan işitme kayıpları arasında ikinci sırayı almaktadır. Dış kulakta kulak kiri birikmesi, otitis media veya kulak zarının delinmesi gibi dış veya orta kulak hasarları sonucu ses dalgalarının yükseltgenmesinin ve iç kulağa geçişinin engellenmesi ile ortaya çıkar.

Merkezi tip işitme kaybı beyin sapı ya da beyinde meydana gelen bir hasar sonucu oluşan ve oldukça nadir olarak görülen bir sağırliktır.

Miks işitme kaybı ise konduktif ve sensörinöral işitme kaybının bir kombinasyonudur.^{16, 17}

1.3.1. İşitme seviyesinin belirlenmesi

İşitme, sesin şiddetine verilen değer ile ölçülür. Sesin şiddeti bulunduğu ortamda oluşturduğu basınç değişikliğine göre belirlenir. Ses şiddetindeki değişimleri ölçmek için kullanılan birim desibel'dir (dBL). Ses şiddetindeki değişiklikleri ifade etmek için desibel sistemi kullanılmasının nedeni, iletişimde kullanılan olağan ses şiddeti sınırları içinde kulakların ses şiddetindeki yaklaşık bir desibellik bir değişikliği ancak

ayırtebilmesidir. Desibel, bir hastada işitme eşiğinin elde edilmesi için gereken uyarının akustik gücü ile normal bir bireydeki aynı akustik güç arasındaki oranın logaritmik olarak artan birimidir. Lineer olarak artmadığından 1dBL ile 5 dBL arasındaki fark 5 dBL ile 10dBL arasındaki fark ile aynı değildir. Normal işiten insanların algılayabildiği en küçük ses 0 dBL'dir ve odyometri testinde bu değer referans olarak kabul edilir. Her frekansta ölçüme hastayı rahatsız etmeyecek mümkün olan en yüksek seviyeden başlanır. Uyarı şiddeti, 10 dBL'lik azaltmalar ile hastanın duymadığı seviyeye kadar indirilir. Daha sonra 5 dBL'lik arttırmalar yapılır. Hastanın tekrar duymaya başladığı seviyedeki ses şiddeti işitme eşiği olarak odiyogram adı verilen bir grafik üzerinde işaretlenir. Fısıltı şeklinde konuşma 0-40 dBL normal konuşma ise 40-80 dBL dir.⁶

İşitme kayıpları birçok şekilde sınıflandırılabilmektedir. Genetik sağırlığın odyolojik kriterleri 1996 yılında "European Workshop on Genetic Hearing Loss" adlı çalıştayda belirlenmiştir.^{18,19} Genel olarak odyolojik fenotipe ve etkene göre Tablo1.1'de sınıflandırma yapılmıştır.^{20,21}

Tablo1.1. İşitme kaybının sınıflandırılması

A.Odyolojik fenotipe göre sınıflandırma				
1. Tip	2. İlerleme	3. Frekans	4. Şiddet	5. Başlangıç
Sensörinöral	İlerleyici	Düşük (<500 Hz)	Normal <20 dBL	Doğumsal
Konduktif	Durağan	Orta (501-2000Hz)	Hafif 21-40 dBL	Çocukluk
Miks	Değişken	Yüksek (>2000 Hz)	Orta 41-70 dBL	Erişkin
Merkezi			İleri 71-95 dBL	
			Çok ileri 95> dBL	
B.Etkene göre sınıflandırma				
1.Genetik nedenler (%50-60)		2.Genetik olmayan nedenler (%40-50)		
1a. Fenotip	1b. Kalıtsal	1c. Multigenik		
Sendromik (%30-40)	Otozomal resesif (%70-80)	Kromozomal anomaliler	Teratojen etkiler (CMV, Rubellla) Prematüre	
Non-sendromik (%60-70)	Otozomal dominant (%10-20)	Trizomi 13;18;21	Postnatal enfeksiyon (menenjit, otitis media)	
	Cinsiyete bağlı (%1-2)	Mozaik Trizomi 8	Ototoksik ilaçlar	
	Mitokondriyal (%0-20)	Turner sendromu	Akustik ve kranial travma	
		22q11 delesyonu		

İşitme kaybının genetik formları otolojik, odyolojik, fiziksel muayene, aile hikayesi, yardımcı testler (örneğin; temporal kemik CT) ve moleküler genetik testler ile teşhis edilebilir. Moleküler genetik testler, sendromik ve sendromik olmayan birçok işitme kaybı türünün teşhis edilmesine imkan tanır.²⁰

1.4. İşitme Kaybının Genetik Olarak Sınıflandırılması

Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgular sendromik ve nonsendromik olarak ikiye ayrılır. Kalıtsal sağırılıkta, etkilenmiş bireyler işitme kaybı ile birlikte başka klinik belirtiler de gösteriyorsa buna sendromik işitme kaybı denir. Eğer tek klinik belirti işitme kaybı ise buna non sendromik işitme kaybı denir. Sendromik ve sendromik olmayan olgularda gözlenen mutasyonlar çok çeşitlilik göstermektedir. Aynı gende meydana gelen farklı mutasyonlar hem non sendromik otozomal resesif işitme kaybına hem de bir sendroma neden olabilir.

Bugüne kadar işitme kaybı ile ilgi birçok lokus saptanmıştır. Bu lokuslar için kalıtım modelleri göz önüne alınarak özel isimlendirmeler kullanılmıştır. Non sendromik işitme kaybına neden olan gen lokusları DFN (**DeaFN**ess) olarak isimlendirilmekte ve keşfedilişlerinin kronolojik sırasına göre her lokusa numara verilmektedir.^{16,22} 1992 yılında aktin polimerizasyonundan sorumlu ilk otozomal gen DFNA1 haritalanmıştır.⁸

- DFNA : Otozomal dominant lokus
- DFNB : Otozomal resesif lokus
- DFN : X kromozomuna bağlı lokus
- DFNY : Y kromozomuna bağlı lokus

Bu isimlendirmeye göre klasik olarak otozomal dominant formda mutasyonun allellerden sadece birinde olması hastalığın ortaya çıkması için yeterlidir. Resesif formda ise hastalığın olması için her iki allele de mutasyonun görülmesi gereklidir. Bunlara ek olarak cinsiyete bağlı ve mitokondrial kalıtım da gözlenir. Modifiye edici genler, multiallelik kalıtım ve epigenetik mekanizmalar da sağırılığın genetiğine katkı da bulunmaktadır.

1.4.1. Sendromik işitme kayıpları

Toplam işitme kaybının %30-40'ını oluşturur ve olguların çoğunda konduktif ya da miks tip işitme kaybı görülmektedir. Bu tür olgularda işitme kaybı sendrom ile ilişkili olarak primer veya sekonder fenotip olarak ortaya çıkmaktadır. Birçok sendromik form Mendel kalıtımına uymasına rağmen bazıları kromozomal düzensizlik ve mitokondrial mutasyonlar nedeni ile olabilir. Sebep her zaman genetik olmayabilir yada bilinmeyebilir. Shprintzen ve ark.²³'a göre sendromlar iki gruba ayrılır. Bunların ilki sebebi bilenen sendromlardır. Bu sendromlar kromozomal, genetik, teratojenik yada mekanik nedenli olabilir. Sebebi bilinmeyen sendromlar ise tekrarlayan bir paterne yada tek bir paterne uyup uymadığına göre iki kategoriye ayrılır.

İşitme kaybı ve diğer anomalilerin birlikte seyrettiği 440 dan fazla sendromik durum bildirilmiştir. Örneğin Jervell ve Lange-Nielsen sendromu iç kulak homeostatisi, Vohwinkel gap junction, Alport ve Stickler de ekstrasellüler matriks elemanı kollajen, Norrie sendromunda norrin, Waardenburg sendromunda hücre iskeleti, Usher de miyozin benzeri proteinlerin, Pendred sendromunda sulfat taşıyıcılarında görülen mutasyonların sendromik işitme kaybına yol açtığı ortaya konulmuştur. En yaygın görülen sendromlar Waardenburg, Usher, Alport, Pendred, Brankiootorenal Sendrom (BOR), Treacher-Collins Sendromudur.^{5, 11, 24}

Waardenburg Sendromu (WS): Cilt anomalileri ve işitme kaybının birlikte seyrettiği en yaygın ve en önemli sendromlardan biridir. Otozomal dominant geçişli olup yüksek penetrans göstermesine rağmen aynı aile içinde bile klinik bulgular değişkenlik gösterebilmektedir. *Klinik olarak dört tipi vardır.*

Tip 1: Sağırılık, iki iç kantal arasındaki mesafenin artması (distopia canthorum), saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri vardır.

Tip 2: Sağırılık, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri vardır. Distopia canthorum yoktur.

Tip 3: Sağırılık, distopia canthorum, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri ve ek olarak ekstremitelerde kontraktürleri vardır.

Tip 4: Sağırılık, distopia canthorum, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri ve ek olarak Hirschprung hastalığı vardır.²⁰

Usher Sendromu: Sensorinöral işitme kaybı ile birlikte retinitis pigmentosa bulunması Usher sendromunun tipik bulgusudur. Usher sendromunda vestibüler bulgular da görülebilmektedir. Klinik olarak 3 tipi mevcuttur: Tip 1'de doğumsal olarak şiddetli veya derin işitme kaybı, vestibüler yanıt yokluğu ve körlüğe kadar ilerleyen retinitis pigmentosa bulguları vardır. Tip 2'de vestibüler fonksiyon bozukluğu yoktur ve sağırılığın şiddeti daha azdır. Tip 3 ilerleyici işitme kaybı ve retinitis pigmentosanın değişken zamanlarda başlaması ile karakterizedir. Fonksiyon bozukluğu eşlik edebilir. Usher sendromu genetik olarak heterojendir. Yapılan çalışmalarda değişik ailelerde 10 farklı gen bölgesi saptanmıştır. İncelenen lokalizasyonlarda altı farklı gende mutasyonlar ortaya çıkarılmıştır.²⁵

Alport Sendromu: Sensörinöral işitme kaybı ile birlikte ilerleyen nefrit görülür. İlerleyen böbrek yetmezliği ve ölümle sonuçlanır. Bu hastalıktan etkilenen bireylerin yaklaşık %50'si ilerleyen tipte bilateral işitme kaybına sahiptir.²⁶

Pendred Sendromu: Pendred Sendromu otozomal resesif geçiş gösterir. Pendred sendromunun en önemli klinik bulguları konjenital sensörinöral işitme kaybı ile guatrdir. Fakat guatr olguların tümünde bulunmayabilir. Hastaların yaklaşık yarısında hipotiroidi saptanmaktadır.

Hastaların çoğunda radyolojik görüntüleme yöntemleri ile saptanabilecek Mondini malformasyonu veya genişlemiş vestibüler kanallar gibi iç kulak anomalileri eşlik etmektedir. İşitme kaybı doğuştan görülebildiği gibi erken çocukluk döneminde de ortaya çıkabilir. Pendred sendromuna neden olan "PDS" geni 7q31 kromozomda lokalizedir ve 21 ekzondan oluşur. Bu gen sulfat transportu yapan transmembran proteinlerine benzer 780 aminoasitten oluşan pendrin proteinini kodlamaktadır. Pendrin proteini iyon/klor taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır. Endolenfatik dengenin sağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. PDS mutasyonları non-sendromik işitme kayıpları ile de ilişkilidir.^{23, 25}

Brankiootorenal Sendrom (BOR): Brankial sinüs ve fistüller, basit ve belirgin dış kulaklar, iç kulakta Mondini malformasyonu ve basit üriner sistem malformasyonundan renal agenezise kadar değişen üriner sistem patolojileri ile karakterize bir sendromdur.²⁷

Treacher-Collins Sendromu: Otozomal dominant kalıtım görülebilmektedir. Anomaliler simetrik ve bilateralidir. Özellikle dış ve orta kulak malformasyonu görülür. Yüzde simetrik olarak zigomatik kemiklerin az gelişmesi, alpebral fissürlerin aşağı çekikliği, mikrognati ve kulaklar ileri derece küçük veya belirgin olabilmektedir.²⁵

Bu sendromlara neden olan genler ve kodladıkları moleküller Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri.

Sendrom	Kalıtım	Gen	Kodladığı molekül	Lokalizasyon	Sıklığı
Waardenburg tip1	Otz.Dom.	PAX3	Transkripsiyon faktörü	2q35-q37	%1-4
Waardenburg tip2	Otz.Dom.	MITF	Transkripsiyon faktörü	3p14.1-p12.3	
Waardenburg tip3	Otz.Dom.	PAX3	Endotel ligand ve reseptör	2q35	
Waardenburg tip4	Otz.Dom.	EDN3,EDNRB	Endothelin-3, ligand	20q13.2-q13.3	
Treacher Collins	Otz.Dom.	TCOF1	Nükleolar fosfoprotein	5q31.3-q33.1	1%
Branchio-oto-renal	Otz.Dom.	EYA1	Transkripsiyon faktörü	8q13.1	2%
Jarvel ve Lange-Nielsen	Otz.Res.	KCNQ1,KCNE1	İyon kanalı	11p15.5	%0.25-0.5
Pendred Sendromu	Otz.Res.	SLC26A4	Anyon transporter	7q31	%4-10
Alport Sendromu	X e bağlı	COL4A5/6	Kollagen alfa 5	Xq22	1%
	Otz.Res.	COL4A3/COL4A4	Kollagen alfa 3	2q35-q37	
Muckle Wells	Otz.Dom.	CIAS1	Pyrin benzeri protein		
Non-muscle miyozin ağır zincir IIA	Otz.Dom.	MYHIIA	Non-muscle miyozin ağır zincir IIA		
Norrie	X e bağlı	NDP	Ekstrasellüler matriks protein	Xp11.3	
Stickler	Otz.Dom.	COL2A1, COL11A1, COL11A2	Yapısal kollajen	12q13.11-q13.2 1p21 6p21.3	
Usher tip 1A	Otz.Res.	Bilinmiyor		14q32	
	Otz.Res.	MYO7A	Tip 7 myosin	11q13.5	%4-6
Usher tip 1C	Otz.Res.	USH1C	PDZ domain protein	11p15.2-p14	
Usher tip 1D	Otz.Res.	CDH23	Cadherin	10q21-q22	
Usher tip 1E	Otz.Res.	PCD15	Protocadherin	10q21-q22	
Usher tip 1F	Otz.Res.	PCDH15		10q21-q22	
Usher tip 1G	Otz.Res.	SANS		17q24-25	
Usher tip 2A	Otz.Res.	USH2A	Ekstrasellüler matriks protein	1q41	
Usher tip 2B	Otz.Res.	Bilinmiyor		3p23-24.2	
Usher tip 2C	Otz.Res.	VLGR1			
Usher tip 3	Otz.Res.	USH3A	Tranmembran protein	3q21-q25	
Bartter sendromu	Otz.Res.	BSND	Klor kanalı		Orta Doğuda çok yaygın
Paratiroidizm, sağırılık ve renal displazi	Otz.Dom.	GATA3	Transkripsiyon faktörü		
Piebaldizm ve sağırılık	Otz.Dom.	c-KIT	Tirozin kinaz reseptör		
Renal tübüler asidozis ve sağırılık	Otz.Res.	ATPB6B1	İyon pompası		Kuzey Afrikalılarda

Aynı gende meydana gelen farklı mutasyonların hem nonsendromik otozomal resesif işitme kaybına hem de sendroma neden olduğu (özellikle cilt hastalıklarında) gösterilmiştir. Örneğin DFNB1 lokusu hem Palmopantar Keratoderma ve Keratitis Ichthyosis deafness sendromunda hem de nonsendromik işitme kaybında rol oynar. Yine anyon transport proteinini kodlayan Pendrin geninde meydana gelen mutasyonlar hem sendromik (Pendred sendromu) hem de nonsendromik (DFNB4) işitme kaybına yol açmaktadır.^{28, 29}

Non-sendromik olgularda yüksek oranda mutasyon belirlenen *GJB2* geninin, sendromik olgular ile dominant kalıtım gösteren mutasyonları Tablo 1.3'te gösterilmiştir.

Tablo 1.3. Sendromik olgularda dominant kalıtım gösteren *GJB2* mutasyonları. KID: Keratitis ichthyosis sağırılık sendromu HID:Hystrix-like ichthyosis sağırılık sendromu BPS:Bart-Pumphery sendrom PPK:palmopantar kerotoderma VS:vohwinkel sendromu.

Mutasyon adı	Sendrom	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
G12R	KID	G34C	12. kodon Gly→Arg	IC1
S17F	KID	C50T	17. kodon Ser→Phe	IC1
D50N	KID-HID	G148A	50. kodon Asp→Gln	EC1
N54K	BPS	Tanımlanmamış	54. kodon Asn→Lys	EC1
G59A	PPK	C176G	59. kodon Glu→Arg	EC1
D66H	VS	G196C	66. kodon Asp→His	EC1
R75W	PPK	C223T	75. kodon Arg→Trp	EC1
R75Q	PPK	G224A	75. kodon Arg→Gln	EC1

1.4.2. Nonsendromik işitme kayıpları

Nonsendromik işitme kaybının otozomal resesif formu %70-80 oranında prelingual aşamada görülmekte, çoğunlukla koklear hasarlara ve ileri derecede işitme kaybına yol açmaktadır. Connexin 26 (*GJB2*) gen bozuklukları ise bu grubun altında % 60-70 gibi geniş bir olgu potansiyelini kapsamaktadır. Otozomal resesif kalıtım modeli gösteren işitme kayıpları, Türkiye gibi, akraba evliliği sıklığı (%20-25) yüksek olan

ülkelerde daha sık görülmektedir.³⁰ Otozomal dominant işitme kaybı %10-20 oranında görülmekte, otozomal resesif forma göre daha az şiddetli ve ilerleyici tipte işitme kaybına yol açmakta ve postlingual olguların büyük kısmını oluşturmaktadır. X kromozomuna bağlı işitme kaybı %1-2 ve mitokondriyal işitme kaybı %0-20'den daha az oranda görülmektedir.²²

Bugüne kadar insan genomunda 130'dan fazla lokusun işitme kaybı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Pozisyonel klonlama, aday gen yaklaşım çalışmaları ve fare modellerinin kullanımı sayesinde nonsendromik otozomal resesif işitme kaybından sorumlu otozomal resesif kalıtım gösteren 67 bölge haritalanmış, 28 sağırılık geni tanımlanmıştır. 54 otozomal dominant lokusdan 22 gen, sekiz X-bağlı lokusda iki gen, bir Y kromozomuna bağlı gen, iki mitokondriyal genin nonsendromik işitme kaybına yol açtığı tespit edilmiştir. Hereditary Hearing Loss adlı siteden (<http://hereditaryhearingloss.org>) de ayrıntılı bilgiye ulaşılabilir.

Nonsendromik işitme kaybından sorumlu genlerin hücrede oynadıkları işlevlere bakılarak; tüy hücre demetlerinin oluşumu; hücre iskelet proteinleri, adhezyon proteinleri, motor proteinler, iyon homeostasisin sağlanması, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin kompozisyonunun belirlenmesi ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere genel bir sınıflandırma yapılabilir.^{1, 5} Tablo 1.4 'te non-sendromik işitme kaybı ile ilgili gen lokusları ve gen ürünlerinin işlevleri verilmiştir.

Tablo 1.4. Nonsendromik işitme kaybı ile ilgili gen ürünlerinin işlevleri ve gen lokusları.

Gen	Protein	Lokus
Tüy Hücre Demetlerinin Oluşumu		
<i>Hücre iskelet Proteinleri</i>		
<i>ACTG1</i>	γ -actin	DFNA20/26
<i>DIAPH1</i>	diaphenous 1	DFNA1
<i>ESPN</i>	Espin	DFNB36
<i>RDX</i>	Radixin	DFNB24
<i>TRIOBP</i>	TRIO ve filamenöz actin bağlayıcı protein	DFNB28
<i>CCDC50</i>	Ymer	DFNA44
<i>Adhezyon proteinleri</i>		
<i>CDH23</i>	cadherin 23	DFNB12-USH1D
<i>PCDH15</i>	protocadherin 15	DFNB23-USH1F
<i>TMHS (LHFPL5)</i>	lipoma HMGIC fusion partner-like 5	DFNB67
<i>VLGR1b (GPR98)</i>	G protein-coupled receptor 98	USH2C
<i>USH2A</i>	Usherin	USH2A
<i>Motor proteins</i>		
<i>MYO6</i>	myosin VI	DFNA22-DFNB37
<i>MYO7A</i>	myosin VIIA	DFNA11-DFNB2-USH1B
<i>MYH9</i>	myosin, heavy chain 9, non-muscle	DFNA17
<i>MYO15A</i>	myosin XVA	DFNB3
<i>MYO3A</i>	myosin IIIA	DFNB30
<i>Scaffolding proteinler</i>		
<i>WHRN</i>	Whirlin	DFNB31-USH2D
<i>USH1C</i>	Harmonin	DFNB18-USH1C
<i>SANS (USH1G)</i>	SANS	USH1G
Ekstraselüler matriks proteinler		
<i>TECTA</i>	α -tectorin	DFNA8/12-DFNB21
<i>COL11A2</i>	collagen, type XI, alpha 2	DFNA13-DFNB53-STL3
<i>STRC</i>	Stereocilin	DFNB16
<i>OTOA</i>	Otoancorin	DFNB22
<i>COCH</i>	Cochlin	DFNA9

Tablo 1.4. (devam)

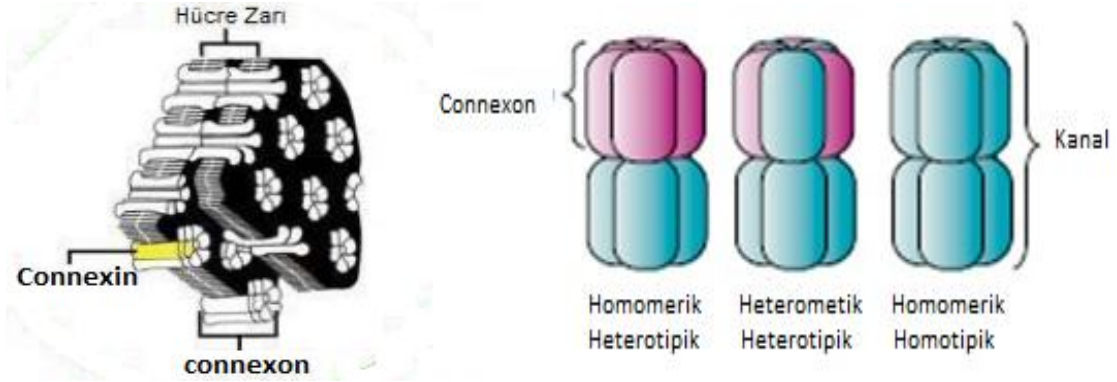
İyon homeostasis proteinleri		
<i>Connexinler</i>		
<i>GJB2</i>	connexin 26	DFNA3-DFNB1
<i>GJB3</i>	connexin 31	DFNA2
<i>GJB6</i>	connexin 30	DFNA3-DFNB1
<i>GJA1</i>	connexin 43	
<i>İyon kanalları</i>		
<i>KCNQ4</i>	potasyum voltaj kapılı kanal, KQT-benzeri altailesi, üye 4	DFNA2
<i>SLC26A4</i>	solute carrier family 26, üye 4	DFNB4-PDS
<i>SLC26A5</i>	solute carrier family 26, üye 5 (prestin)	
<i>Sıkı Bağlantılar</i>		
<i>CLDN14</i>	claudin 14	DFNB29
<i>TRIC (MARVELD2)</i>	tricellulin (MARVEL domain containing 2)	DFNB49
<i>Diğerleri</i>		
<i>CRYM</i>	μ-crystallin	
<i>WFS1</i>	Wolframin	DFNA6/14/38-WFS
Transkripsiyon faktörler		
<i>EYA4</i>	eyes absent homolog 4 (Drosophila)	DFNA10
<i>POU4F3</i>	POU class 4 homeobox 3	DFNA15
<i>POU3F4</i>	POU sınıf 3 homeobox 4	DFN3
<i>TFCP2L3 (GRHL2)</i>	grainyhead-like 2 (Drosophila)	DFNA28
<i>ESRRB</i>	estrogen-related receptor beta	DFNB35
Fonksiyonu Tam Anlaşılmayan Proteinler		
<i>TMPRSS3</i>	transmembran proteaz, serine 3	DFNB8/10
<i>TMCI</i>	transmembran channel-like 1	DFNA36-DFNB7/11
<i>MYO1A</i>	myosin Ia	DFNA48
<i>MYH14</i>	myosin, heavy chain 14	DFNA4
<i>DFNA5</i>	DFNA5	DFNA5
<i>PJVK</i>	Pejvakin	DFNB59
<i>TMIE</i>	transmembrane inner ear	DFNB6
<i>OTOF</i>	Otoferlin	DFNB9

1.5. Gap Junction

Çok hücreli organizmalarda doku-organ homeostazının sağlanması için hücreler arası iletişim önemlidir. Hücreler arasındaki etkileşim, iletişim kuracakları hücrelere sinyal yolları yada hücrelerarası kanallar yoluyla sağlanır. Gap junction, tight junction, adherens junction, desmozom, hemi-desmozom, fokal adhezyonlar, kimyasal sinapslar ve immunolojik sinapslar çok elemanlı kompleks membran yapılarıdır. Hücre sinyalizasyonu ve yapısal doku organizasyonu sağlarlar. Bütün bu yapılar farklı transmembran yapılardan oluşurlar. Genelde scaffold proteinler, anchor proteinler ve sinyalizasyon proteinleri transmembran proteinlere yapışıktırlar ve aktin, mikrotübül ve intermediate filament ağıyla bağlantılıdırlar. Gelişim, doku fonksiyonu ve hücre homeostazisinin hücrelerarası koordinasyonuna aracılık etmede önemli bir fonksiyona sahiptirler. Gap junctionları oluşturan birimlerin, yani connexinlerin bir araya gelip toplanması karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir.³¹⁻³³

1.5.1. Connexin proteinin genel yapısı

Connexin grubu proteinler gap junctionları oluşturan birimler olup hem omurgalı (connexin, pannexin) hem de omurgasız hayvanlarda (innexin) bulunur. Memelilerde, gap junction kanallar iki hemi kanaldan oluşur, connexon olarak adlandırılan bu yapılar iki komşu hücrenin her biriyle oluşur. Bitişik hücre membranları arasında bir boşluk bırakmasına rağmen iki connexon ekstrasellüler yüzeyde sıkı ilişki içindedirler. Yapısal analizler göstermiştir ki her bir connexin 6 polipeptik transmembran altünitesinden oluşmuştur ve connexin denilmektedir. Connexon kanalında bulunan connexin proteinleri özdeş olursa “homomerik”, farklı olursa; “heteromerik” connexon oluşmaktadır. Kanallarda bu oluşuma göre homotipik, heterotipik ve heteromerik kanal şeklinde farklı isimler almaktadır.³⁴

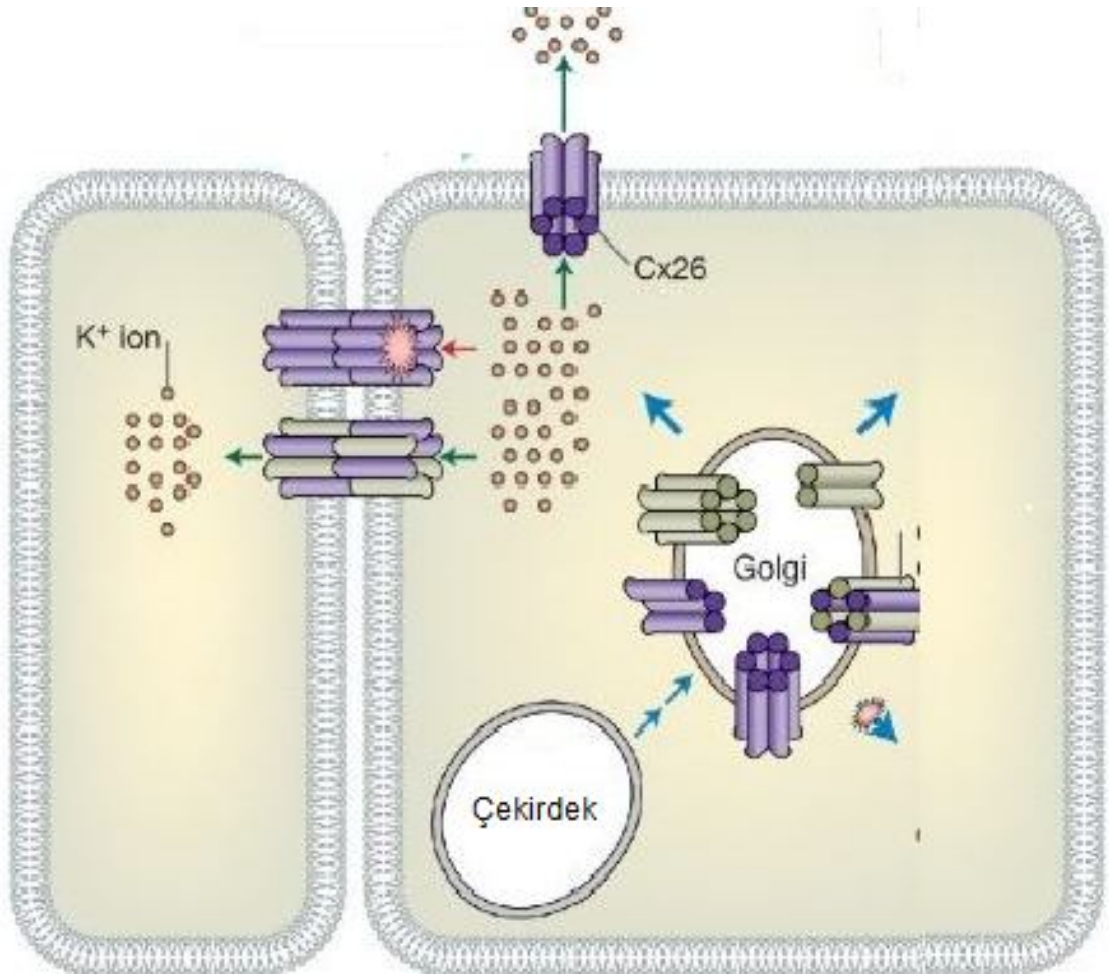


Şekil 1.4. Connexinler ve gap junctionların organizasyonu

Connexinler en az 22 izoformdan oluştuğu tahmin edilen büyük bir gen ailesi tarafından kodlanır.³⁵ 25-62 kDa büyüklüğünde, C terminal domainin uzunluğunda farklılık görülen, glikozillenmemiş yapısal olarak korunmuş özellik gösterirler.³⁶

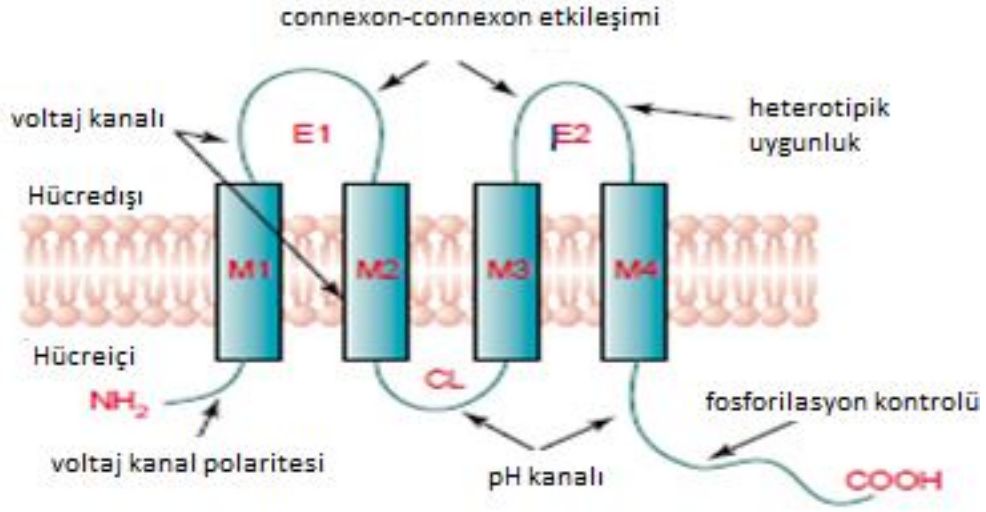
Connexinler; gen yapıları, gen homolojileri, spesifik sekans motiflerine göre alfa, beta ve gama gruplarına ayrılır. Ayrıca connexinler literatürde moleküler kütlelerine göre (26kDa=Cx26) ve evrimsel sınıflandırmaya göre (*GJB2*=Cx26) gruplandırılırlar.

Birçok farklı gap junction kanal alt ünitesi eksprese edilir. Endoplazmik retikulum membranının da connexin alt unitelerinin biyosentezini içeren işlemler çok sıkı düzenlenir. Hekzamerik hemi kanallara uygun altunitelerin oligomerizasyonu, plazma membranına connexinlerin yerleştirilmesi, ekstrasellüler alanda connexinlerin uygun connexinler ile başa baş bağlanmaları, dinamik, spatial, temporal organize olmuş plakların düzenlenmesi, degradasyon ile kanalların sitoplazmaya gönderilmesini içeren birçok işlem gerçekleşir.³³



Şekil 1.5. Connexin 26 proteininin hücre membranında yerleşimi.

Connexin 26 proteininde dört zargeçer alan (M1-M4), iki ekstrasellüler alan (E1-E2), bir sitoplazmik alan (CL), bir N-terminal alan (NT) ve bir C-terminal alan (CT) bulunmaktadır. N terminal alan aminosit ile çevrili bir ortamda kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar yaparak voltaj değişiminde rol oynar. Zar geçen alanlar gap junction kanal porlarının oluşması ve kanal geçirgenliğinin belirlenmesini sağlamaktadır. M1 alanı voltaj sensörü olarak çalışır. M2 alanı connexinlerin oligomerizasyonu için gereklidir. M3 alanı amfipatik özellik gösterir. Kanal ayırımında gereklidir. Ekstrasellüler alan ise connexinler ile bitişiğinde bulunan hücrelerin uygun bir biçimde örtüşmesini sağlayacak 3 sistein rezidülü korunmuş bir bölge içerir.³⁷



Şekil 1.6. Connexin 26 protein alanları. Dört zargeçer alan (M1-M4), iki ekstrasellüler alan (E1-E2), bir sitoplazmik alan (CL), bir N-terminal alan (NH₂) ve bir C-terminal alan (COOH).

Plazma membranındaki connexinler dinlenme durumunda kapalıdır. Düşük ekstrasellüler Ca^{+2} , membran depolarizasyonu, membranda oluşabilecek mekanik stres ve metabolik inhibisyon etkisi ile açılabilir. Connexinler; hücre içi ve dışı pH, fosforilasyon, redoks gibi çok sayıda faktörden etkilenirler.³²

Olgun memeli kohlasında 5 connexin izoformu vardır. Bunlar; Cx26, Cx29, Cx30, Cx31 ve Cx43' tür.³⁸ Son bulgular göstermiştir ki connexinler tek ve spesifik fonksiyonlara sahiptirler. Her bir connexin izoformu farklı doku dağılımı sağlamasına rağmen birçok hücre tipi bir connexin izoformundan daha fazlasını eksprese eder. Farklı connexin izoformlarının oligomerizasyon davranışı araştırıldığında bütün connexinlerin heterooligomerik connexin formuna katılmadığı görülür. Bu gözlemler göstermiştir ki connexin izoform interaksyonu selektiftir. Birçok farklı kanal tipinin niçin olduğunu bilmesek de, muhtemelen eksprese edildikleri çeşitli hücrelerin birçok farklı spesifik ihtiyaçlarını sağlamada gerekli oldukları görülmektedir.³³

1.5.2. GJB2; Connexin 26; Gap Junction protein

Gap junction komşu hücrelerin karşılıklı membranların da köprü olarak iş gören hidrofilik kanal formunda hücreden hücreye sinyal moleküllerinin direkt geçişine izin veren tek hücresel yapıdır. İyonların (K, Ca), siRNA, ikincil habercilerin (cAMP,

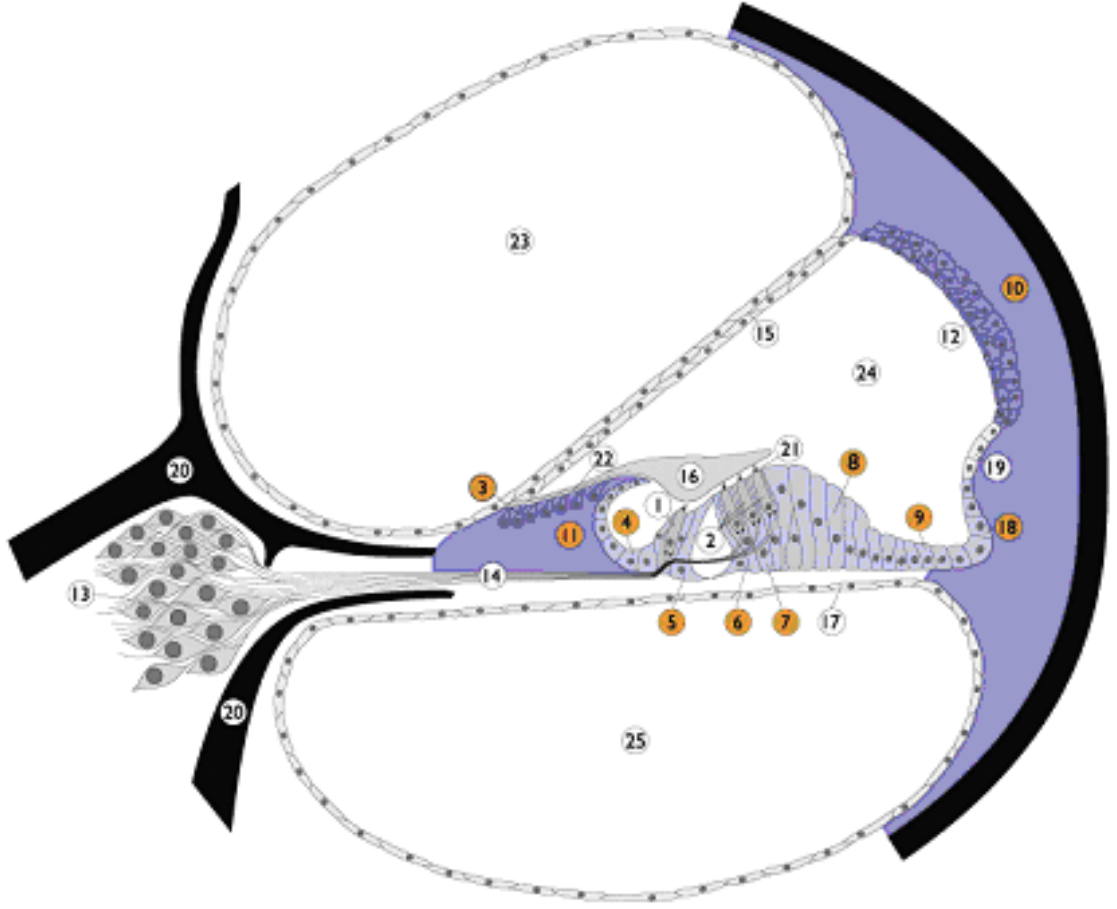
cGMP ve IP3), küçük metabolitlerin (glukoz) geçmesine izin vererek hücreler arasında elektriksel ve biyokimyasal dengenin sağlanmasına izin verir^{33,39}. Bu proteinlerden biri de connexin 26 dır. Protein ürünü 26215 Da olup karaciğerden saflaştırılmıştır (Protein Data Bank No: P29033).⁴⁰

1.5.2.1. Connexin 26 proteinin kulak içindeki yerleşimi

Memeli kokleası çoğunlukla tüy ve destek hücreleri olarak bilinen sensör hücrelerden oluşur. Kokleadaki destek hücreleri pillar, deiter, hensen, claudius, hücrelerinden oluşur. Bu destek hücreler elektriksel ve metabolik olarak gap junction kanalları tarafından eşitlenir. Kokleadaki çoğu hücre gap junctionlar tarafından bağlanmasına rağmen sensör hücreler “iç ve dış tüy hücreler” de bulunmaz.

Koklea içerisinde iki farklı gap junction ağı tanımlanmıştır.

- *Non-sensör epitelyum hücreler arasındaki epitelyal gap junction ağı*; *nonsensory epitelyal* hücreler, *spiral limbusun* interdental hücreleri, iç ve dış *sulcus* hücreleri, korti organının destekleyici hücreleri ve spiral ligamentin kök ödevi gören hücreler.
- *Konnektif doku hücreleri arasındaki konnektif doku gap junction ağı*; spiral ligament ve *spiral limbusdaki* birçok fibrosit hücreleri, *stria vascularis*deki bazal ve intertermediat hücreler, *scala vestibuli* boyunca uzanan mezenkimal hücreler.⁴¹



Şekil 1.7.Kokleanın yapısı ve *GJB2*'nin ifade edildiği alanlar. 1. İç tüy hücresi, 2. Dış tüy hücresi, 3. Interdental hücre, 4. İç sulkus hücre, 5. İç pillar hücre, 6. Dış pillar hücre, 7. Deiter hücre, 8. Hensen hücre, 9. Klaudius hücre, 10. Spiral ligament, 11. Spiral limbus, 12. Stria vaskularis, 13. Spiral ganglion, 14. İşitme siniri, 15. Reissner membran, 16. Tektorial membran, 17. Baziller membran, 18. Eksternal sulkus hücre, 19. Spiral çıkıntı, 20. Kemiksi spiral lamina, 21. Retiküler lamina, 22. IDC ve TM arası bölge, 23. Skala vestibuli, 24. Skala media, 25. Skala timpani. (*GJB2*'nin ifade edildiği alanlar sarı renk ile gösterilmiştir.)

1.5.2.2. Connexin 26 proteinin işitmedeki rolü

Hayvan dokularındaki hücrelerin iskelet kas hücreleri ve kan hücreleri gibi son farklılaşma geçirenler haricinde çoğunluğu komşu hücreler ile aralıklı kavşaklar yoluyla iletişime girerler. Her aralık kavşak, geleneksel elektron mikrograflarında, iki komşu hücrenin zarlarının 2-4 nm civarında düzenli, dar bir aralık ile ayrıldığı bir yama olarak görünmektedir. Kavşak boyunca kanal oluşturan proteinler “connexin”ler uzanmaktadır. Oluşturdukları kanallar yani konneksonlar bir hücrenin sitoplazmasından, diğer hücrenin sitoplazmasına, inorganik iyonların ve suda çözünen moleküllerin doğrudan

geçişlerine izin vererek, hücreleri hem elektriksel hem de metabolik olarak birbirlerine kenetlerler. Boya enjeksiyon deneyleri, bağlayıcı kanalların azami gözenek büyüklüğünü 1.5-2 nm olarak göstermektedir, bu kenetlenmiş hücrelerin küçük molekülleri birbirleri ile paylaştıklarını (inorganik iyonlar, şekerler, amino asitler, nükleotidler, vitaminler, halkasal amp ve inozitol trifosfat), büyük moleküller (proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler) için ise bunun söz konusu olmadığını düşündürmektedir. Bu hücre eşleşmesinin, ancak yeni yeni anlaşılmaya başlanan birçok işlevsel sonuçları vardır.^{41, 42}

Bu gap junction ağları koklear iyonik homeostazdan sorumludur. Koklea, sensör hücreleri iyonik çevreden ayıran bir yapıdır. İki ana sıvı dolu kompartıman içerir perilenf ve endolenf. Perilenf ekstrasellüler sıvılara benzer şekilde yüksek Na^+ düşük K^+ , buna karşın endolenf yüksek K^+ düşük Na^+ kompozisyonuna sahiptir.¹²

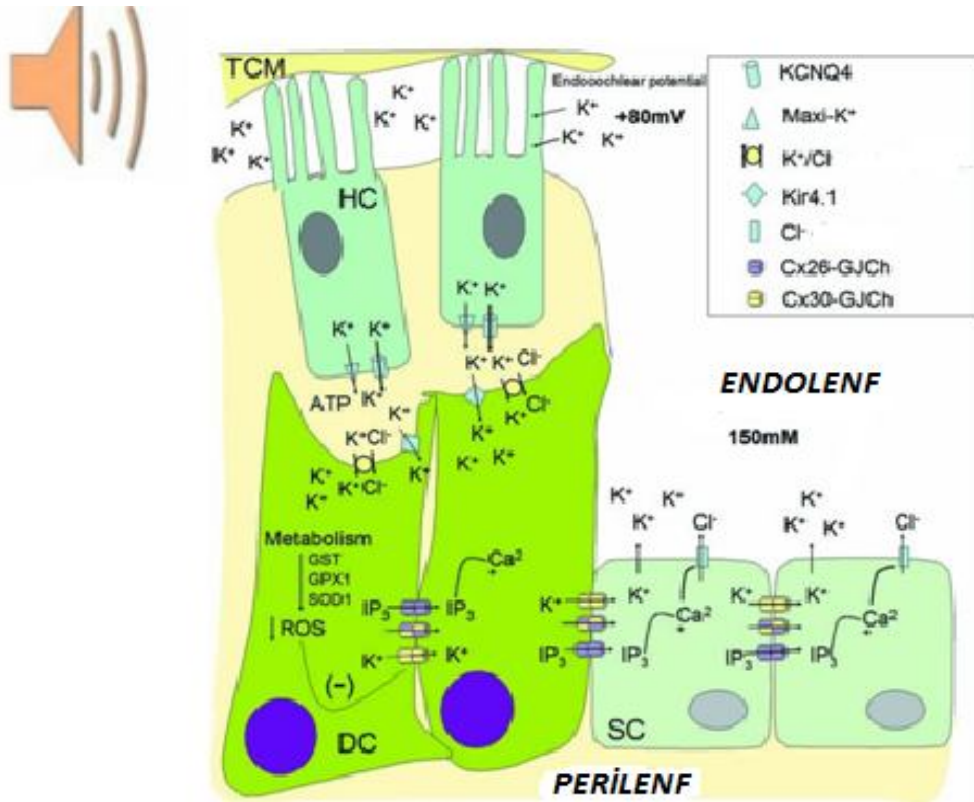
Gap junctionlar, özellikle *GJB2* ve *GJB6*, stria vaskularisin bazal ve intermediate hücrelerini bağlar. Endokoklear potansiyelin oluşumu için önemlidir ve işitme için gereklidir. Gap junctionlar hücreler arasında metabolitlerin paylaşılması için gereklidir. Korti organının lateral duvarlarında metabolik eşitlik önemlidir. Bağlı hücreler HCO_3^- , serbest radikal, Ca^{+2} ve metabolitler için buffer sistemi sağlarlar. Destek hücrelerindeki gap junction ağının koklear K^+ iyonlarının resirkülasyonunda kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir.⁴²

İşitme de ses dalgaları skala timpani içindeki sıvıyı hareketlendirerek baziller membranın hareketini sağlar. Bu da tektoriyal membrandaki uzun stereosilyaları hareket ettirir. Böylece hücre içine K^+ akışı başlar. Tüy hücrelerinin bazal membranındaki KCNQ4 ve maxi-K iyon kanallarından K^+ hücre dışına çıkar. Potasyum K^+/Cl^- kanalı ve K^+ kanalı gibi iş gören Kir 4.1 yardımı ile Deiter hücrelerinin içine alınır. Bu hücreleri bağlayan gap junctionlar yardımı ile destek hücreler arasında K^+ dağıtılır. ATP gibi ek sinyaller bu hücrelerde IP3 ve Ca^{+2} un salınımını sağlar. İkincil haberci niteliği taşıyan bu moleküller birçok hücre fonksiyona aracılık eder.^{31, 43}

Örneğin Betramello ve ark. wild tip Cx26 ve sağırlıkla ilişkili Cx26 V84L mutasyonlu hastalarda IP3 ilişkili kanalı karşılaştırmış başlangıçta hem wild hem de mutant kanal eşit bir biçimde K^+ iyonlarını geçirirken IP3 geçişi mutant ve wild tipte farklılık göstermiştir. V84L mutant kanal K^+ iyonuna geçirgenken, IP3 transferi mutant

proteini eksprese eden hücreler arasında bozulmuştur. Yine Cx30' un IP3 permeabilitesi araştırılmış ve Cx26'nın yaklaşık yarısı kadar olduğu görülmüştür. Bu da Koklea hücrelerinde her ne kadar Cx30 gereksiz görünmese de Cx26'nın telafisini sağlamadığını düşündürmektedir.

Ayrıca kokleadaki bu yüksek metabolizma reaktif oksijen türlerinin de artışına neden olmaktadır. Bu moleküller gap junctionların negatif düzenleyicileridirler. Yaşlanma sonucu ortaya çıkan işitme kaybında rol oynadıkları düşünülmektedir.³¹



Şekil 1.8 Kokleadaki potasyum döngüsü³¹

1.5.2.3. Farklı connexin tipleri

Kokleada *GJB2* ve *GJB6* ya ek olarak *GJA1*, *GJA7* ve *GJE1* connexinleri de bulunmuştur. Örneğin, *GJA1* ve *GJA7* gelişimin çeşitli hücrelerinde eksprese edilir. Yetişkin farelerde, *GJA1* ekspresyonu spiral ligament, stria vaskularis ve otik kemik kapsül ile sınırlıdır, *GJA7* ekspresyonu ise kapiller endotel hücrelerine sınırlıdır. *GJE1*

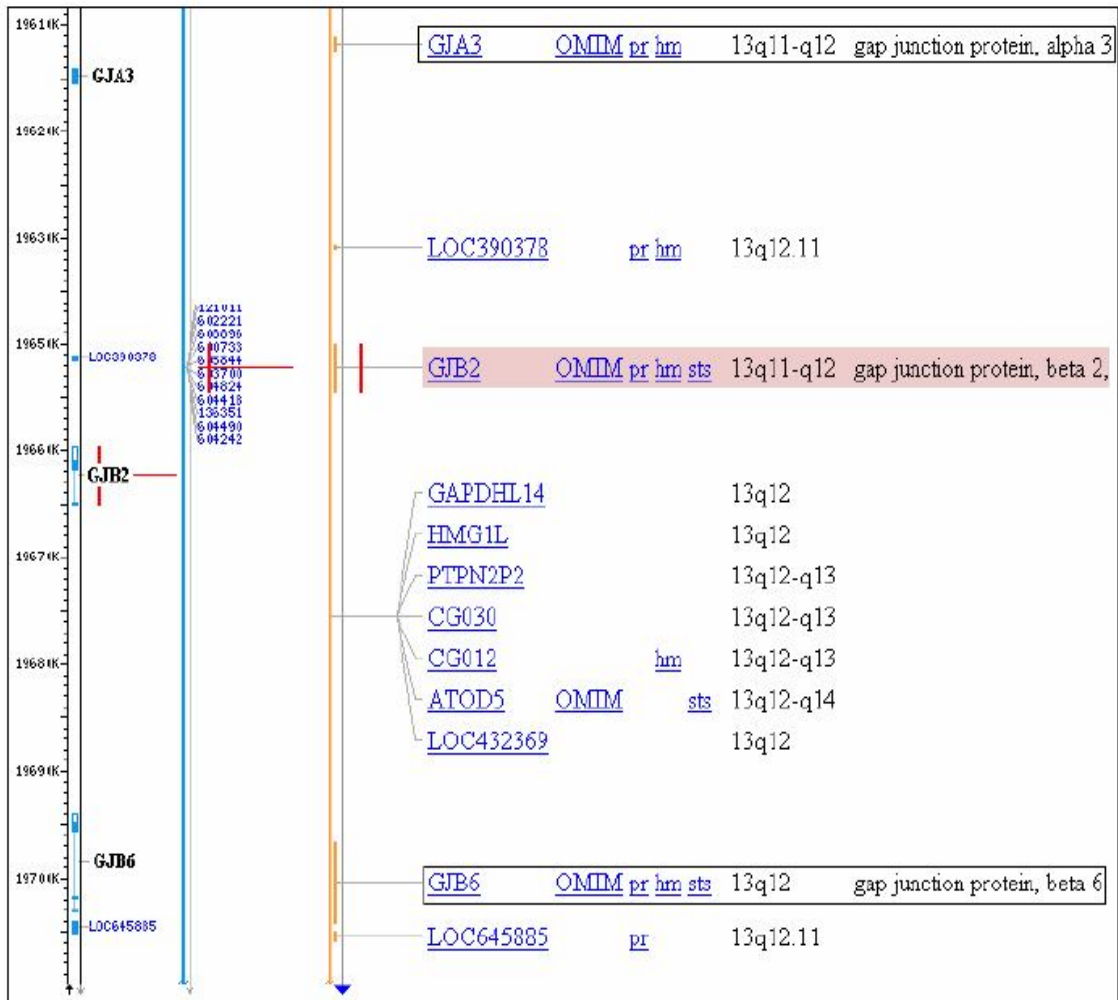
spiral ganglionun schwann hücrelerinde eksprese edilir. *GJA7* ve *GJE1* mutasyonlarının insan sağırılığında sorumlu olup olmadıkları açık değildir. Ayrıca farklı connexin proteinlerinin farklı dokularda ifade edildikleri saptanmıştır. Connexin tiplerinden bazıları ve ifade edildiği dokular⁴⁴ Tablo 1.5’de verilmiştir.

Tablo 1.5. Connexin tiplerinden bazıları ve ifade edildiği dokular

Gen	Ekspresyon	Kalıtsal Hastalık
GJB7(Cx25)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
GJB2(Cx26)	Koklea,deri,karaciğer,plasenta,meme	DFNB1,DFNA3,KID sendromu,lchthyosis
GJB6(Cx30)	Koklea,deri,beyin	Sağırılık,DFNB1,DFNA3
GJB4(Cx30.3)	Deri	Eritrokeratoderma çeşitleri
GJB3(Cx31)	Deri,plasenta	Sağırılık,DFNA2,Eritrokeratoderma çeşitleri
GJB5(Cx31.1)	Deri	Bilinmiyor
GJE1(Cx31.3)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
GCI1(Cx31.9)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
GJB1(Cx32)	Karaciğer,oligodendrosit, schwann hücreleri	Charot-Marie-Tooth hastalığı
Cx32.4	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Cx36	Nöronlar	Bilinmiyor
GJA4(Cx37)	Endotelyum	Bilinmiyor
GJA5(Cx40)	Kalp,endotelyum	Bilinmiyor
Cx40.1	Bilinmiyor	Bilinmiyor
GJA1(Cx43)	Kalp,lens,beyin,adrenal bezler	Oküloodontodijital diplazi
GJA7(Cx45)	Kalp,düz kas, nöronlar	Bilinmiyor
GJA3(Cx46)	Lens	Konjenital katarakt
GJA12(Cx47)	Spinal kord,beyin	Bilinmiyor
GJA8(Cx50)	Lens	Konjenital katarakt
Cx62	Overler	Bilinmiyor

1.5.3. Connexin *GJB2* geni

Connexin geni ilk kez bağlantı analizleri yardımı ile prelingual, ağır işitme kaybı olan Tunus’lu 2 geniş ailede gösterildi.⁴⁵ *GJB2* geni, 1997 yılında ilk kez DFNB1A lokusunda tanımlandı. Kelsell ve ark.⁴ bu çalışmada *GJB2* geninde 3 ailenin üyelerini etkileyen homozigot mutasyon tanımlamıştır. İmmunohistokimyasal boyama yaparak insan koklea hücrelerinde Cx26 nın yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermiştir. Yine Yeni Zellanda, İtalya ve Pakistanda’ da aynı lokusun prelingual sağırılığa katkı da bulunduğu gösterildi.⁴⁶ Sitogenetik bandı, 13. kromozomun 13q11-q12 bölgesinde yerleşim gösteren Cx26 geni sentromerik yönde *GJA3* ve telomerik tarafta ise *GJB6* arasında yer alır.



Şekil 1.9. 13. kromozom üzerinde *GJB2* geninin yerleşimi (NCBI, Mapviewer).

Gen iki ekzon ve bir introndan oluşmaktadır. Gen 5509 nukleotid içermektedir. Ekzon 1; 158 bazdan oluşur ve transkript edilmez. İki ekzon arasında geniş bir intron bölgesi bulunmaktadır. Ekzon 2 ise 681 bazdan oluşur ve 226 aminoasidlik gen ürününü oluşturan kısım bu bölgededir.



Şekil 1.10. Cx 26 geni ekzon 1, intron ve ekzon2 bölgesi

İnsan *GJB2* geninin 5'UTR ve promotor bölgesi guanin ve sitozine zengindir. Cx26 proksimal promotor bölge 128bp den oluşmaktadır. Bu bölge içinde TATA motifi (TTAAAA) -24 bölgesinde yer almaktadır. İki GC kutusu ise -93 ve -81 bölgelerinde 6 nukleotid ile ayrılmıştır (GCGGCG). Bu bölge Sp1 transkripsiyon faktörleri tarafından tanınmaktadır.⁴⁷ Promotor ve translasyona uğramayan bölgelerdeki mutasyonlar, *GJB2*'nin düzenlenmesini etkileyebilmektedir. Bu mutasyonlar, sadece tek allel de *GJB2* mutasyonu tanımlanan, işitme kaybı olgularında patogenezin oluşumuna katkı da bulunabilir.

```

-128
CGGGAAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCGCGGCGCCGCCCCCTC

CGTAACTTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCCGGGGTGTGGGGTGC GGTTAAAAGGCG
-1
CCACGGCGGGAGAC

```

Şekil 1.11: Cx26'nın 128 bp'lik promotor bölgesi. TATA motifi -24 ile -18 alanda, iki GC kutusu ise -93 ile -81 alanında yer almaktadır.

1.5.4. İşitme kaybına yol açan connexin 26 mutasyonları ve polimorfizmleri

Cx26 da görülen mutasyonlar dört sınıfa ayrılabilir. 1. Hücre membranında yerleşim gösterme ve gap junctionların toplanması için gerekli hemikanal trafiğini değiştirme. 2. Fonksiyonel olmayan kanal formasyonu oluşturma. 3. Mutasyonun

fonksiyonel kanal oluşturması ancak kanalın açılıp kapanması ve geçirgenlik özelliklerinin değişmesi, rneğin IP3 geçirgenliğinin azalması. 4. Mutasyonların fonksiyonel kanallar oluşturabilmesi fakat hücre canlılığını azaltan yaşamsal metabolitlerin homeostasisini veya iyonik dengeyi etkilemesi.

Mutasyonlar çoğunlukla voltaj sensörü, kanal açıp kapama ve hemikanal geçirgenliğini sağlayan bölgelerde bulunur. *GJB2* geninde kodlanmayan bölgedeki mutasyonlar özellikle promoter bölgedeki mutasyonlar *GJB2* transkripsiyonun düzenlenmesini etkileyebilmektedir.

Bugün farklı toplumlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *GJB2* geni üzerinde tanımlanan 100’den fazla mutasyon ve polimorfizmin etkili olduğu bilinmektedir.⁴⁸ Bütün Cx26 sendromik mutasyonlar dominant kalıtılmaktadır. Non-sendromik olgularda kalıtım şekli olarak en sık otozomal resesif (% 70-80), ikinci otozomal dominant (% 10-120) ve nadir olarak da X’e bağlı (% 1-2) kalıtım örüntüsü görülmektedir.²⁵

1.5.4.1. Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren *GJB2* Mutasyonları

GJB2 geninde tanımlanmış mutasyonlardan çok azının otozomal dominant işitme kaybı ile beraber çeşitli tiplerde cilt hastalıklarına neden olduğu saptanmıştır. Palmoplantar kerotoderma gibi cilt fenotipleriyle (misens mutasyonlar G59A, R75W, DE42), Vohwinkel sendromu (D66H) ve Keratitis ichthyosis-deafness (D50N, G12R ve S17F mutasyonu) hastalıklarında da görülür. Bu mutasyonlar daha çok hücre içi trafiğin sağlanmasıyla sorumlu amino u ve birinci ekstrasellüler bölgede toplanarak connexonların birleşmesinde bozukluklara neden olmaktadırlar. RNA interferans kullanılarak *GJB2* dominant allellerin süpresyonu dominant işitme kaybının bazı formlarını tedavi etmek için uygun bir strateji olabilir.³⁶

Tablo 1.6 ‘da saptanmış dominant mutasyonlar verilmiştir.⁴⁸

Tablo 1.6. Otozomal dominant kalıtım gösteren *GJB2* mutasyonları.

Otozomal Dominant non-sendromik lokuslar				
Lokus	Lokalizasyon	Gen	Kodladığı molekül	İşitme kaybı grubu
DFNA1	5q31	HDIA1	Aktin polimerizasyonu	Post-lingual sensorinöral, progresif
DFNA2	1p33-p35	GJB3	Gap junction protein	Post-lingual
		KCNQ4	Voltaj kapılı potasyum kanalı	Post-lingual
DFNA3	13q12	<i>GJB2</i>	Gap junction protein	Pre-lingual
		GJB6	Gap junction protein	Pre-lingual
DFNA4	19q13.33(?)	MYH14	Sınıf 2 Non-muscle myosin ağır zinciri	Sensorinöral
DFNA5	7p15	DFNA5	Bilinmiyor	Post-lingual
DFNA6/14	1p16.3	WFS1	Zargeçer protein	Pre-lingual Sensorinöral
DFNA8/12	11q22-q24	TECTA	Tektorial memb yapısal elemanı	Bilinmiyor
DFNA9	14q12-q13	COCH	Olasılıkla ECM proteini	Post-lingual sensorinöral, progresif
DFNA10	6q22.23	EYA4	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual progresif
DFNA11	11q12.3-q21	MYO7A	Motor molekül myosin	Post-lingual
DFNA13	6p21	COL11A2	Yapısal molekül	Pre-lingual non- progresif,sensorinöral
DFNA15	5q31	POU4F3	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual,progresif
DFNA17	22q12.2-13.3	MHY9	Non-musle myosin ağır zinciri	Post-lingual,progresif
DFNA20/26	17q25.3	ACTG1	Alfa aktin	Sensorinöral, progresif
DFNA22	6q13	MYO6	Motor molekül myosin	Post-lingual, sensorinöral
DFNA28	8q22	TFCP2L3	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual, sensorinöral,progresif
DFNA36	9q13-q21	TMC1	Zargeçer protein	Post-lingual
DFNA38	4p16	WFS1	Wolframin proteini	Post-lingual, progresif
DFNA39	4q21	DSPP	Sialofosfoprotein	Sensorinöral, progresif
DFNA48	12q13-q14	MYO1A	Unconventional myosins	Post-lingual

1.5.4.2. Otozomal resesif kalıtım gösteren *GJB2* mutasyonları

Avrupa, Kuzey Amerika ve Akdeniz popülasyonlarında en yaygın mutasyon 35delG olarak bilinen 6 guanin serisindeki tek guanin nukleotidinin delesyonudur. Yapılan araştırmalar, 35delG'nin yaklaşık olarak 500 kuşak önce oluşmuş ve 10.000 yaşında olan çok eski bir mutasyon olduğu saptanmıştır. Mutasyonun Orta Doğu'dan köken aldığı ve popülasyonların göçleriyle Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmüştür.⁴⁹ Bu mutasyon *GJB2* mutant allellerinin yaklaşık %70-80'ninden sorumludur. Avrupa ve Akdeniz'deki 35delG taşıyıcı sıklığı, kistik fibrozise sebep olan $\Delta F508$ mutasyonu sıklığından daha fazladır.⁵⁰ Bu mutasyonun taşıyıcı frekansı bütün Avrupa da 1/51 olarak belirlenmiştir fakat bazı popülasyonlarda bu oranın daha da yüksek olduğu görülmüştür. 35delG'nin hot-spot delesyon olduğu düşünülse de son kanıtlar göstermiştir ki bu mutasyonun çok eski dönemlerde ortaya çıkan ve ortak bir atadan türeyen atasal (founder) mutasyon olduğu, bu atasal mutasyonunda heterozigot avantaj nedeniyle geniş yayılıma sahip olabileceği düşünülmektedir.^{51, 52}

Şekil 1.12'de 35delG'nin taşınma sıklığının ülkelere göre dağılımı verilmiştir.



Şekil 1.12. Dünyadaki 35delG taşıyıcı frekansının dağılımı. Yunanistan, İtalya, Estonya ve Venezuela da taşıyıcı frekansı en yüksek, Güney Asya, Gana ve Güney Mısır da en düşük taşıyıcı frekansı görülmektedir.

Diğer etnik grup çalışmaları göstermiştir ki farklı mutasyonlar daha yaygın olabilir. Örneğin 167delT mutasyonun Ashkenazi Yahudilerinde prevalansı en yüksek, taşıyıcı frekansı %3-4 tür. Yine founder etki nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Doğu Asya popülasyonlarında 235delC mutasyonu en yaygın mutasyondur, W24X, W77X ve Q124X mutasyonlar ise Hindistan'ın farklı bölgelerinde yaşayan ailelerde yaygın bulunmuştur.

Şimdiye kadar saptanmış resesif mutasyonlar⁴⁸ Tablo 1.7'de verilmiştir

Tablo 1.7. Otozomal resesif kalıtılan *GJB2* mutasyonları

No	Mutasyon adı	Protein bölgesi
IVS1+1 G > A	G -3172A	
G-3170A	G -3170A	
M1V (p.0)	A1G	IC1
T8M	C23T	IC1
31del38	31-69del38 nt	IC1
31del14	31-45del14 nt	IC1
G12V	G35T	IC1
30delG	30-35delG	IC1
35insG	30-35insG	IC1
35delG	30-35delG	IC1
35delG	30-35delG	IC1
K15T	A44T	IC1
51del12insA	51-63 12 nt del ve ins A	IC1
S19T	G56C	IC1
I20T	T59C	IC1
W24X	G71A	TM1
V27I+E114G	G79A +A341G	TM1+IC2
R32C	C94T	IC1
R32L	G95T	IC1
R32H	G95A	IC1
V37I	G109A	TM1
A40E	C119A	EC1
A40G	C119G	EC1
W44X	G132A	EC1
G45E	G134A	EC1
E47X	G139T	EC1
E47K	G139A	EC1
167delT	167delT	EC1
Q57X	C169T	EC1
176-191del16	176-192del 16nt	EC1
C64X	C192A	EC1

Tablo 1.7. (devam)

Y65X	C195A	EC1
Y65X	C195G	EC1
W77R	T229C	TM2
W77X	G231A	TM2
235delC	233-235delC	TM2
L79P	T236C	TM2
Q80X	C238T	TM2
Q80P	A239C	TM2
Q80R	A239G	TM2
I82M	C246G	TM2
V84L	G250C	TM2
S85P	T253C	TM2
A88S	G262T	TM2
L90V	C268G	TM2
L90P	T269C	TM2
269insT	269insT	TM2
M93I	G279A	TM2
V95M	G283A	IC2
Y97X	Tanımlanmamış	IC2
290-291insA	Frameshift	IC2
H100Y	C298A	IC2
H100L	A299T	IC2
299-300delAT	299delAT	IC2
302del3	302delAGA	IC2
E101G	A302G	IC2
310del14	314-328del 14nt	IC2
312del14	312-326del 14nt	IC2
314del14	310-324del 14nt	IC2
333-334delAA	333-335del AA	IC2
S113R	T339G	IC2
delE120	360delGAG	IC2
K122I	A365T	IC2
Q124X	C370T	IC2
R127H	G380A	IC2
W133X	G398A	IC2
Y136X	C408A	IC2
S139N	G416A	IC2
R143W	C427T	TM3
E147K	G439A	TM3
E147X	G439T	TM3
469delG	469delG	EC2
486insT	486insT	EC2
R165W	C493T	EC2
504insAAGG	504insAGG	EC2
509insA	509insA	EC2
509del14	509-523del 14nt	EC2
515del17	515-532del 17nt	EC2
W172X	G516A	EC2

Tablo 1.7. (devam)

C174R	T520C	EC2
P175T	C523T	EC2
V178A	T533C	EC2
R184W	C550G	EC2
R184P	G551C	EC2
572delT	572delT	EC2
S199F	C596T	TM4
605ins46	605-651ins 46 nt	TM4
I203K	TC608AA	TM4
N206S	A617G	IC3
631delGT	631-632delGT	IC3
L214P	T641C	IC3
645-648delTAGA	645delTAGA	IC3

1.5.4.3. Polimorfizmler (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*)

Diğer genomlar gibi, insan genom DNA'sı da statik değildir, aksine, değişik tiplerde kalıtsal değişikliklere (mutasyon oranı 1.6) maruz kalmaktadır. Yeni mutasyonlar bir bireyin germinal veya somatik hücrelerinde oluşur. Eğer germinal hücrelerde gerçekleşen bir mutasyon bireyin üremesine engel olmuyorsa gelecek nesillere aktarılabilir ve popülasyondaki frekansı artabilir. Allelik dizilerdeki varyasyon, (eğer bir varyantın frekansı 0,01'den büyükse) DNA polimorfizmi olarak tanımlanır (şansla açıklanamayacak kadar büyük bir oran). İnsan genomik DNA'sının ortalama heterozigotluk oranı 0,0037 olarak hesaplanmıştır (allelık diziler yaklaşık her 250 - 300 bazda bir farklılık göstermektedir). Allelik dizilerdeki varyasyon, mutasyon oranı relatif olarak düşük olduğundan nadiren yeni mutasyonların bir sonucu olarak meydana gelir. Bu nedenle, bir bireydeki farklı allelik diziler *de novo* mutasyonlarla ortaya çıkmaz, kalıtlanır.⁵³

Genomik DNA üzerinde gözlenen polimorfizmler; popülasyon genetiği, ilaç çalışmaları, adli tıp çalışmaları, organ nakli, kanser ve genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bakış açıları oluşturmaktadır.

Cx26 geni üzerinde birçok polimorfizm saptanmıştır. Genel olarak toplumlarda görülen polimorfizmler ve işitme kaybı ile birliktelik gösteren değişimler verilmiştir.⁴⁸

1.6. Mitokondrial mutasyonlar ve işitme kaybı

Mitokondrial DNA (mtDNA)'nın sekans analizi ilk kez 1981 yılında yapılmıştır. Her mitokondride sayısı 2-10 arasında değişen mtDNA vardır. Ancak bu sayı aynı dokuyu oluşturan hücreler arasında bile farklılık göstermektedir. İnsan mtDNA'sı 16,569 bp uzunluğunda biri ağır diğeri hafif olmak üzere çift zincirli ve dairesel formda olup replikasyon ve transkripsiyonu mitokondri içinde olmaktadır. 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 mRNA olmak üzere toplam 37 gen bulunmaktadır. Genler içinde intron bölgeleri yer almaz.⁵⁴

MtDNA kalıtımı sitoplazmik bir kalıtım olup, bu kalıtım anne yoluyla yavrulara aktarılmaktadır. Böylece hasta annenin çocuklarının cinsiyet ayrımı olmaksızın tamamının hasta olması, hasta babanın ise tüm çocuklarının sağlıklı olması sitoplazmik kalıtımın karakteristik özelliğidir.

Mitokondrial DNA, nükleer DNA'dan bağımsız olarak replikasyon yapar. Mitokondrinin bu otonom özelliği nedeniyle hücre bölünmesi sırasında mtDNA heteroplazmik bir segregasyon gösterebilir. mtDNA'da oluşabilecek mutasyonlar sonucu hücre içinde mutant ve normal mtDNA'lar yavru hücrelere rastgele dağılır. Bu durum mtDNA ile geçiş gösteren hastalıkların kliniğinde farklılıklar oluşturmaktadır.

Mitokondrial sağırılık sensorineural, bilateral ve genellikle progresif seyreder. Mitokondrial genler prelingual işitme kaybının nadir sebebi olarak görülür. Non sendromik, sendromik olabilir ayrıca bir ailedeki bireyler arasında bile işitme farklılık arz eder.^{55, 56}

İşitme kaybının nedeni Korti, stria vaskularis ve destek hücrelerini içeren koklear dejenerasyondur. MtDNA mutasyonlarının nasıl işitme kaybına neden olduğu hala çok açık olmasada, işitme kaybının dış tüy hücre fonksiyonunun kaybı nedeniyle kokleada olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve apoptotik sinyalizasyonun değişmesi ana patojenik faktörlerdir. Korti organı yoğun enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Azalan ATP üretimi, ATPaz ve nörotransmitterlerin salınımını baskılar.⁵⁷

Bir başka görüşte iyon transportunun bozulması yönündedir. ATP bağımlı çalışan pompalar iyonik gradiente karşı endolenfe potasyum iyonlarını geri pompalar.

Mitokondrial mutasyonlar nedeni ile ATP üretimin azalması bu pompaların daha yavaş çalışmasına neden olur. Bu durum iç kulak da iyonik dengenin bozulmasına yol açar. Azalan ATP üretimi seçici olmayan katyon kanallarını, strial marjinal hücrelerdeki Isk kanallarını ve dış tüy hücrelerindeki Ca^{+2} -ATPaz'ı inaktive eder.⁵⁸

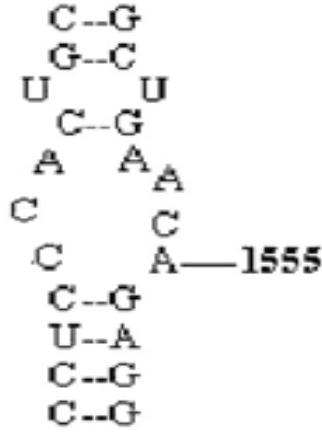
Koklear sinir hücreleri etkilenmemiş ise koklear implantasyon başarılıdır.⁵⁷

1.6.1. Mitokondrial mutasyonlar

Birkaç mitokondrial mutasyon tanımlanmıştır. Bunların en önemlisi 1992 yılında bir Arab-İsrail ailesinde tanımlanmış 12S rRNA *MTRNR1* geninde ki A1555G mutasyonudur.⁵⁵ Etkilenen kişilerin çoğunda çocukluk döneminde ağır ve derin işitme kaybı görülmüş, diğer aile üyelerinde ise yetişkinlikte işitme kaybı veya bazılarında normal işitme görülmüştür. Mutasyon, 12S rRNA'nın yüksek korunumlu bölgesinde, aynı zamanda bakterilerde de aminoglikozidlerin bağlandığı noktada olmaktadır.⁵⁹

Gentamisin, streptomisin, kanamisin ve tobramisin gibi aminoglikozid antibiyotikler aerobik gram negatif bakterilerin yol açtığı infeksiyonların tedavisinde kullanılır⁶⁰. Aminoglikozidlerin kullanımı sık sık renal, vestibüler ve işitme sisteminde toksisiteye yol açar. Bu ilaçlar böbrek tubullerindeki hücrelerde, iç kulaktaki perilenf ve endolenftde toplanabilir. Streptomisin ve gentamisin vestibuler hasara neden olurken, neomisin ve kanamisin koklear hasara neden olur. Tobramisin ise eşit oranda etkilemektedir.⁶¹

Aminoglikozidler antibakterial etkilerini bakteri ribozomlarının 16S rRNA'nın spesifik bir G nükleotidine bağlanarak yapmaktadırlar.^{62,63} 12S rRNA bölgesinde meydana gelen mutasyon ribozomun aminoglikozid duyarlılığını değiştirmektedir. Mitokondriyal DNA üzerinde, 12S rRNA kodlayan bölgede 1555. adenin yerine guanin nükleotidi gelmesiyle oluşmaktadır. 12S rRNA daki 1555. nükleotiddeki oluşan değişiklik *Escherichia coli* bakterisinin 16S rRNA dizine çok benzemektedir. Aminoglikozidler mutant 12S rRNA'ya bağlanarak iç kulakta ototoksik etkilere neden olmaktadır.^{55, 58, 64}



Şekil 1.13. 12S rRNA geninde A1555G mutasyonunun konumu

Nükleer genler, mtDNA haplotipleri, çevresel ajanlar, doku-spesifik etkiler gibi birçok faktör bağımsız veya birlikte klinik ekspresiviteyi etkilemektedir⁶⁵.

İspanya, Japonya ve Çin de yapılan çalışmalar, sensörinoral duyma kaybından etkilenmiş ancak aminoglikozid kullanmamış kişilerde de bu mutasyona sıklıkla rastlanıldığını göstermiştir. Bu durum karşısında *MTRNR1* genini modifiye eden başka bir genin varlığı düşünülmüş ve bağlantı (*linkage*) analizi yapılan A1555G mutasyonu taşıyan birçok aile ile yapılan çalışmalar sonucunda bu modifiye edici gen 8p23.1 bölgesinde haritalanmıştır.⁶⁶

Özetle non-sendromik mitokondrial sağırılık çoklu jenerasyonlu ailelerde düşünülmesi gerekir. Aminoglikozid antibiyotikler kullanılsın kullanılmasın bir erkekten sağırılık geçişi bilgisi olmadıkça böyle düşünülmelidir.⁶³

İşitme kaybı ve aminoglikozidle ilişkili diğer mutasyonlar⁶⁷ Tablo 1.8’de verilmiştir.

Tablo 1.8. İşitme kaybı ile ilişkili mitokondrial mutasyonlar

Gen	Mutasyon	Hastalık	Aminoglikozid ototoksitesi
12S rRNA	A1555G	Non-sendromik SNHL	+
	C1494T	Non-sendromik SNHL	+
	T961G	Non-sendromik SNHL	+
	T961delT/insC	Non-sendromik SNHL	+
	T1095C	Non-sendromik SNHL	+
	T1005C	Non-sendromik SNHL	+
	A1116G	Non-sendromik SNHL	+
	T1243C	Non-sendromik SNHL	+
	T1291C	Non-sendromik SNHL	+
	A827G	Non-sendromik SNHL	+
tRNA			
tRNA ^{Ser(UCN)}	A7445G	Non-sendromik SNHL, palmoplantar keratoderma	+
	7472insC	Non-sendromik SNHL, nörolojik bozukluk	-
	T7510C	Non-sendromik SNHL	-
	T7511C	Non-sendromik SNHL	-
	T7512C	Progresif myoclonic epilepsy, ataxia ve işitme kaybı	-
	G7444A	Non-sendromik SNHL	+
tRNA ^{Leu(UUR)}	A3243G	MELAS ve MIDD1	-
	C3256T	MERRF	-
tRNA ^{Lys}	A8344G	MERRF	-
	T8356C	MERRF	-
	A8296G	MIDD	-
tRNA ^{Glu}	T14709C	MIDD	-
Çeşitli	Geniş delesyon	KSS	-
Çeşitli	Geniş delesyon/duplikasyon	MIDD	-
Çeşitli	Rastgele	Presbycusis	-

A1555G mutasyonun farklı toplumlardaki görülme sıklığı⁶⁸⁻⁷⁵ Tablo 1.9’da gösterilmiştir.

Tablo 1.9. A1555G mutasyonunun işitme kaybı olan çeşitli toplumlarda görülme sıklığı

Ülke adı	Görülme sıklığı
Brezilya	4/203 (Kişi)
Endonezya	4/75 (Kişi)
İngiltere	0/75 (Kişi)
İspanya	21/6 (Kişi)
İtalya	2/128 (Kişi)
Rusya	3/410 (Kişi)
Tunus	1/100 (Kişi)
Yunanistan	2/478 (kişi)

1.7. Mikrodizin Teknolojisi

Temeli Northern ve Southern blot tekniklerine dayanan mikrodizin teknolojisi, oligonükleotidlerin veya cDNA parçalarının yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkmıştır. Yöntemin temelini baz eşleşmesi yani hibridizasyon oluşturmaktadır.

1.7.1. Moleküler hibridizasyon

Moleküler hibridizasyon metodu baz dizisi bilinen prob ile baz dizisi araştırılan nükleik asit molekülünün belirlenmesinde kullanılır. Moleküler hibridizasyon biri etiketli prob diğeri hedef olmak üzere iki farklı kaynaktan gelen tek zincirli nükleik asitlerin karıştırılmasıdır. Çift zincirli olan moleküller kullanılmadan önce tek zincirli hale getirilir. Hibridizasyonun amacı, proba benzer diziler taşıyan fragmentleri tespit etmektir.

Çalışmada nükleik asit veya oligonükleotid problemler kullanılır. Nükleik asit prob, benzer dizileri tanımlamak amacıyla hibridizasyon çalışmalarında kullanılan etiketlenmiş herhangi bir DNA (veya RNA) parçasıdır. Nükleik asit problemleri tek zincirli veya çift zincirli olabilir fakat çalışma anında mutlaka tek zincirli olmalıdır. Oligonükleotid problemler ise tipik olarak 15-50 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli ve kimyasal olarak sentezlenen DNA parçacıklarıdır. Oligonükleotid problemler genellikle

hedef DNA hakkındaki bir ön bilgi ışığında tasarlanırlar. 5' uçlarına ^{32}P eklenerek yada floresan boya ile etiketlenirler.⁵³

1.7.1.1. Erime sıcaklığı ve hibridizasyon özgüllüğünün sağlanması

Prob DNA'nın denatürasyonu genellikle ısıtılarak komplementer zincirleri bir arada tutan hidrojen bağlarının kopartılması ile gerçekleşir. Tamamen komplementer iki zinciri birbirinden ayırmak için gerekli olan enerji birkaç faktöre bağlıdır. Bu faktörler zincir uzunluğu, baz kompozisyonu ve kimyasal ortamdır. Zincir uzunluğu; uzun homodupleksler çok sayıda hidrojen bağı içerdiğinden bunları kırmak için daha fazla enerji gerekmektedir. Baz kompozisyonu; GC baz çiftleri bir fazla hidrojen bağı içerdiklerinden GC oranı yüksek zincirleri ayırmak daha zordur. Kimyasal ortam; Na^+ gibi monovalent katyonların varlığı çiftzinciri daha kararlı yaparken formamid, üre, NaOH gibi denatürantlar hidrojen bağlarını koparak çiftzinciri kararsız yapar.⁵³

Nukleik asitlerin kararlılığını ifade eden kullanışlı bir ölçüm, çift zincirli formdan tek zincirli forma geçişteki sıcaklık değişim aralığının orta noktasına tekabül eden erime sıcaklığıdır (T_m). Bu geçiş DNA'nın optik yoğunluğunu ölçerek takip edilir. Nukleik asit bazları 260 nm dalga boyundaki ultra viyole (UV) ışığı güçlü bir şekilde absorbe ederler. Çift zincirli DNA'nın absorpsiyon miktarı serbest nükleotidlerden daha azdır. Hypochromic etki denen bu fark yanyana bulunan ve DNA'da paralel bir şekilde dizilmiş olan bazların elektron sistemlerinin etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Çift zincirli DNA ısıtılmaya başlandığında 260 nm'de (optik yoğunluk – OD_{260}) absorbe olan ışıktaki serbet bazları karakterize eden düzeye doğru bir artış olur. Bu değişimin orta noktasını belirleyen sıcaklık T_m olarak alınır.⁵³

Baz kompozisyonunun %40 'ı GC olan memeli genomu fizyolojik şartlarda yaklaşık olarak T_m 87 °C'de denature olur. Hibridizasyon şartları genellikle heteroduplex formasyonuna imkan verecek şekilde düzenlenir ve hibridizasyon sıcaklığı T_m 'nin 25 °C altına kadar düşürülür. Böylece hibridizasyon ve fazla problemlerin uzaklaştırılmasından sonra, hibridizasyona daha sıkı ve spesifik şartlarda devam edilerek birbiriyle çok sıkı bir şekilde bağlanan dizilerin dışında kalan tüm çiftzincirlerin ayrılması ve ortamdan uzaklaşması sağlanır. Eğer komplementasyon tam olarak gerçekleşirse prob-hedef heteroduplexleri çok kararludur. İki zincir arasında yanlış eşleşmelerin olması

heteroduplexin T_m deęerini dūřūrūr; normal DNA problarında %1'lık bir yanlış eřleşme T_m 'yi yaklaşık 1 °C dūřūrūr. Prob homodupleksleri daha kararlıdır, heteroduplexlerde de yeterince uyum varsa (>100 bp) sınırlı düzeylerdeki uyumsuz eřlenmeler tolere edilebilir. NaCl konsantrasyonunu artırıp sıcaklıęı dūřūrūrsek hibridizasyon özğüllüęü azalır ve yanlış eřleşmeleri kararlı hale getiririz. Hibridizasyon özğüllüęünü yükseltmek için uyumsuz eřlenmeler taşıyan heteroduplexlerin denaturasyona uğrayacakları şekilde tuz konsantrasyonunu azaltıp sıcaklıęı artırabiliriz. Eęer komplementer bölge oligonukleotid problarda olduęu gibi küçükse (tipik olarak 15-20 nukleotid) hibridizasyon şartları tek bir yanlış eřlenmeyi bile tolere etmez.⁵³

Mikrodizin teknolojisinde tek zincirli işaretlenmiş DNA molekülü chipin üzerindeki oligonükleotidlere bağlandığı gibi yine tek zincirli DNA molekülünün chipin üzerine bağlanması sağlanarak işaretili oligonukleotidlerin chipe bağlanan DNA ile eşleşmesi sağlanır. Böylece mikrodizin cihazı işaretili örneklerden yayılan ışımayı değerlendirerek örneğin genotiplendirilmesini yapmaktadır.⁷⁶

1.7.2. Mikrodizin teknolojisinde SNP değişimlerinin saptanması

Önceden tanımlanmış tek nükleotid değişimlerinin güvenilir, kısa ve verimli bir metod ile teşhisi özellikle rutin tanı ve genetik epidemiyoloji çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır. İnsan genomunda yaklaşık 30.000 gen bulunduğu varsayılmaktadır. Bu kadar çok genin tek tek analizi mümkün değildir. Fakat günümüzde, geliştirilen otomasyona dayalı sistemlerle çok fazla sayıdaki genin aynı anda analizi mümkün hale gelmiştir.

Mikrodizin teknolojisi moleküler biyoloji yöntemleriyle fizikokimya yöntemlerinin ilerlemesinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkan ve günümüzde halen gelişimi devam eden bir bilim dalıdır. Son yıllarda membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretleycilerin alması ve nukleik asit parçacıklarının belli noktalara bağlanmasını sağlayabilecek hassas yöntemlerin geliştirilmesi bu tür çalışmaların verimliliğini ve elde edilen bilgilerin miktarını artırmıştır. Eskiden bu bilgileri birkaç yüz insan bir araya gelerek değerlendirirken şimdi biyoinformatik alanındaki gelişmeler ve hızlı bilgisayar teknolojisiyle kısa zamanda milyonlarca bilgi bir kişi tarafından değerlendirilebilmektedir.

1.7.3 Mikrodizinin kullanım alanları

Mikrodizin teknolojisi, çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimi izleme, farmakolojik uyarılara karşı ekspresyon değişikliklerini inceleme, kanser genlerinde heterozigot mutasyonları tespit etme, polimorfizm ve toksikoloji çalışmalarında kullanılmaktadır.

1.7.4. Mikrodizinin çalışma prensibi

Bu çalışmada kullanılan Nanochip 100 adet test alanına sahip olan mikrodizin platformudur. Chip yüzeyindeki DNA test alanları ve ek olarak bulunan kanal sistemi örneklerin test alanlarına gönderilmesi, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasını sağlar.

Kullanılan chipler nonizotopik etiketleme prensibine göre dizayn edilmiştir. Nonizotopik sistemlerin çoğunda modifiye edilmiş bir işaretleyici molekül bir nukleotid öncüsüne kimyasal olarak eklenir. DNA'ya katıldıktan sonra işaretleyici moleküle karşı yüksek afinite gösteren bir ligand kendisine eklenen marker grupla beraber işaretleyici moleküle bağlanır. Yaygın olarak kullanılan bu nonisotopik etiketleme sistemi, birbirine karşı çok yüksek afinite gösteren iki ligant kullanır. Bunlar biotin (doğal bir vitamin) ve bakteriyel protein streptavidin. Biotin eklenmiş nukleotidler DNA'nın çoğaltılması esnasında kolayca DNA'ya katılabilirler. Ayrıca probe, DNA'ya katıldıklarında molekülden dışa doğru çıkıntı yaparak ligandları tarafından kolayca tesbit edilmelerini sağlayacak bir ara grup ihtiva ederler.⁷⁷⁻⁸⁰

Chip yüzeyindeki DNA test alanları streptavidin molekülleri ile kaplıdır. DNA molekülleri sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde chip yüzeyindeki test alanlarına elektronik olarak gönderilirken ulaştıkları test alanlarına sabitlenebilmeleri için 5' uçlarında bulunan biotin molekülünden yararlanırlar. Ürünün biotinle işaretlenmesi, kullanılan primerlerden birinin biotinli olarak kullanılması ile sağlanır. Böylece DNA'ya bağlı biotin molekülü streptavidin ile özgül ve güçlü bir bağ kurar.^{78, 80}

Tanımlanmak istenen SNP nin yaklaşık olarak çoğaltılacak PZR ürününün (200-400 bç) ortalarına gelmesi istenir. Test alanlarına stabil bir şekilde bağlanan PZR ürünlerinin analizi mutant ve yabanil tip problemlerle hibridizasyona tabi tutularak yapılır.

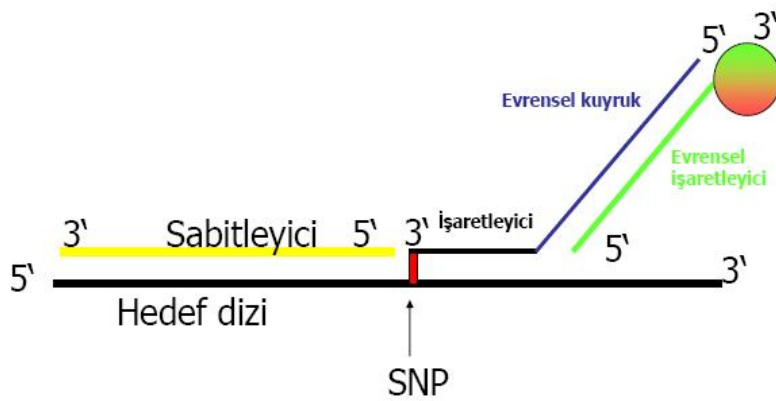
1.7.4.1. Mutant - yabancı tip işaretleyici

SNP analizlerinde işaretleyici (raportör) prob ile tanımlanmak istenen SNP, 5' ucunda taşıyan bir yabancı tip bir de mutant tip yaklaşık 10-12 baz çiftlik oligonukleikası tasarlanır.

Hedef dizi ile alakası olmayan ve uygulanan bütün testler için kullanılan bu floresan işaretli raportörlerin özgül diziyeye bağlanabilmesini sağlayabilmek için mutant-yabancı tip prob dizisinin 5' ucuna evrensel raportörün dizisi de bir kuyruk olarak takılır. Böylece hibridizasyon sırasında floresan işaretli universal raportörler özgül diziyeye ait problemlere bağlanabilir.⁸⁰

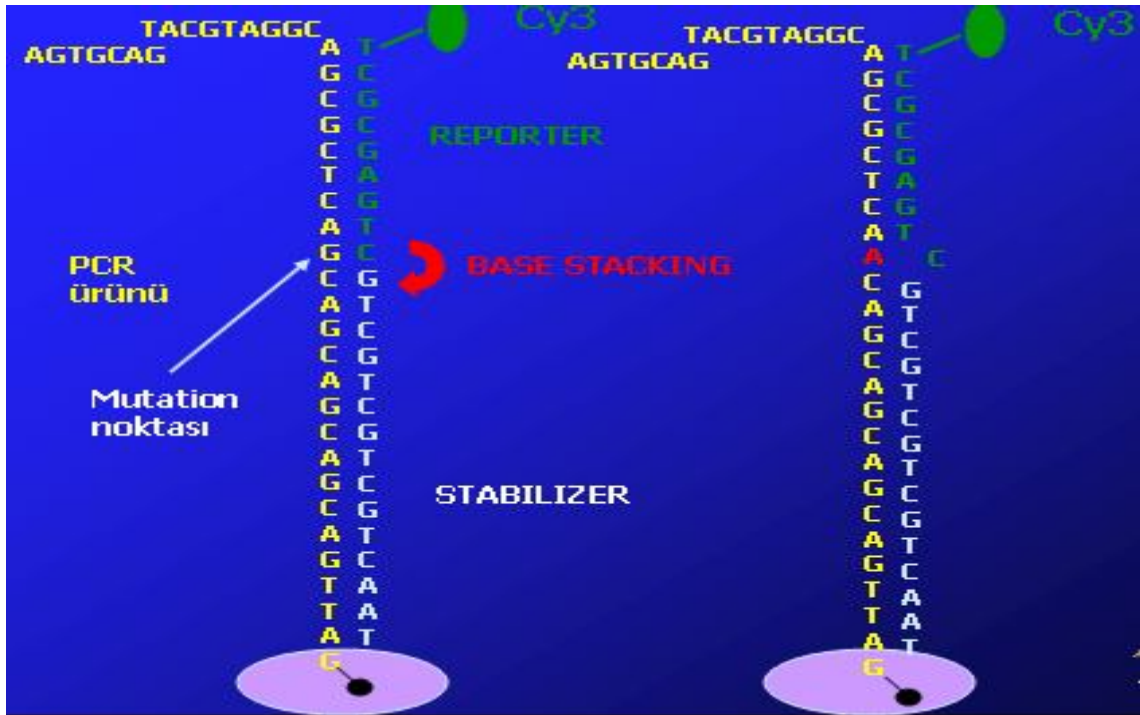
1.7.4.2. Stabilizer (Sabitleyici)

Nanogen sisteminde tek nükleotid değişimlerinin yabancı tip veya mutant problemlerin hibridizasyonu ile teşhisine kesinlik kazandırmak için bağımsız DNA molekülleri arasında baz etkileşimleri enerjisinden faydalanmaktadır. Diziyeye özgül raportör probun 5' ucunun hemen bitiminden başlayan 25-35 nükleotidlik stabilizör olarak tabir edilen bir ikinci oligo hibridizasyon aşamasına eşlik eder. Hibridizasyon sırasında stabilizör ve diziyeye özgül prob dibdibe PZR ürününe bağlanır⁸⁰ (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Hibridizasyon sırasında stabilizör ve diziyeye özgül probun hedef bölgeye bağlanması

Dibdibe yerleşen stabilizör 5' ucundaki baz ile raportörün 3' ucundaki baz arasında oluşan (base stacking) enerjisi hibridizasyonun kuvvetini artıran bir etken olarak belirir. Şöyle ki, chip hibridizasyon sonrası özgül olmayan bağlanmalardan arındırılmak üzere yıkamalara ve artan sıcaklığa maruz bırakılır (bu yıkama ve ısı protokolü her bir SNP testi için optimize edilmiştir). Yabancı tip probun mutant allele, mutant probun ise yabancı allele bağlanması aralarındaki fark yalnızca bir bazdan ibaret olduğu için mümkündür. Nanochip sisteminde uygulanan ısı ve yıkama işlemlerine ek olarak stabilizörün yarattığı base-stacking enerjisi özgül olmayan bağların saf dışı edilmesinde etkinlik kazanır.⁸⁰



Şekil 1.15. PZR ürününe stabilizör (sabitleyici) ve işaretleyici (reporter)'nin base stacking enerjisi ile bağlanması

Nanochip sisteminde uygulanan ısı ve yıkama işlemlerine ek olarak stabilizörün yarattığı base stacking enerjisi özgül olmayan bağlanmaların saf dışı edilmesinde etkinlik kazanır. Farklı baz çiftleri arasında farklı düzeyde base stacking enerjisi mevcuttur. Dolayısıyla SNP analizlerinde meydana gelebilecek yanlış eşleşmelerde test alanındaki DNA ya bağlanmayan tek baz, stabilizör ile raportör oligo arasındaki etkileşimi değiştirecek bu da yıkama ve ısı uygulamaları sırasında sözkonusu yanlış eşleşmiş problemlerin uzaklaştırılmasını iyice kolaylaştıracaktır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. İncelenen Örneklerin Toplanması

Bu çalışma 2007-2010 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Kulak Burun Boğaz Anabilim dallarında gerçekleştirildi. Çalışmaya katılan hastalara, yapılacak işlemler hakkında bilgi verilerek çalışmaya katılım onayları alınmıştır.

Tez çalışmasında materyal olarak kullanılan işitme kayıplı hasta bireyler iki gruba ayrıldı. Birinci grubu, KBB polikliniğine başvuran 35 proband oluşturmaktadır. Bu hastaların aileleri de çalışmaya dahil edildi. İkinci grubu, 6-16 yaş arasında dağılım gösteren, Erzurum Dedekorkut İşitme Engelliler İlköğretim Okulunda eğitim gören 21 proband seçildi, hastaların işitme kaybı olan kardeşleri de çalışmaya dahil edildi. Çalışma toplam 56 proband ile yapıldı. Her iki grubun da aile hikâyeleri alındı, hastalar veya aileleri, ailenin kökeni, hastalıktan etkilenen başka bireylerin olup olmadığı, ailedeki akraba evlilikleri ve diğer kalıtsal hastalıkları taşıyıp taşımadıkları açısından sorgulandı. İşitme kaybının otozomal resesif geçiş gösterdiği düşünülen aileler çalışmaya alındı. Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesine gelen bu hastaların klinik bulguları Kulak-Burun-Boğaz bölümünde detaylı incelendi. İşitme engelliler okulundan gelen bireylerin klinik bulguları ise okuldaki dosyalarında olan bilgiler kadarıyla bilinmektedir.

Bu çalışma iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Hastaların tümü ilk olarak Nanogen mikrodizin analiz sistemi ile daha sonra otomatik dizi analiz yöntemi ile araştırıldı.

2.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyon işlemi proteinlerin parçalanması ve denaturasyonu, proteinden DNA'nın ayrımı, DNA'nın çöktürülmesini içerir. Tam kan kullanıldığı için eritrosit lizisi gereklidir. PCR inhibisyonuna neden olan Heme proteininin ortamdan kaldırılması sağlanır. Lisat kullanılarak hücre çekirdeğinin parçalanması, DNA'nın hücresel proteinlerden ayrılması sağlanır. Birkaç DNA izolasyon protokolü vardır. Örneğin;

organik solvent ekstraksiyonu: fenol/kloroform/izoamylalcohol, tuzla çöktürme prosedürü, hipotonik lysis, deterjan temelli lysis (DTAB-CTAB), metal iyonlarının şelate edilmesi, afinite kromotografisi, immunomagnetik ayırım sayılabilmektedir. Bu çalışma da tuzla çöktürme yöntemi ile DNA eldesi sağlayan Gentra DNA izolasyonu (Gentra, D-5500) kullanıldı.

Bu tez çalışmasında genomik DNA izolasyonu 168 bireyden EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 2-3 ml kan örneklerine aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulanarak yapıldı.

2.2.1. Hücrelerin parçalanması

1. 900 µl RBC Lysis Solution içeren 2 ml'lik Eppendorf tüpüne 300 µl kan eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sırasında 10 kez yavaşça alt-üst edildi.
2. 13.000-16.000 g de 20 saniye santrifüj (Heraeus, Biofuge) edildi. 10-20 µl rezidüel sıvı kalacak şekilde ve beyaz pellete dokunmadan, süpernatant pipetle uzaklaştırıldı.
3. Beyaz pellet kalan sıvının içinde resüspanse olacak şekilde tüp 10 saniye hızlıca ve beyaz hücre pelleti kayboluncaya kadar vortexlendi (Vortex Genie).
4. Resüspanse hücrelere 300 µl Cell Lysis Solution eklenip pipetaj yapıldı.

2.2.2. Proteinlerin çöktürülmesi

1. Bu solüsyona 100 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklendi.
2. Tüp 20 saniye hızlıca vortex yapıldı.
3. 13.000-16.000 g 'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

2.2.3. DNA'nın çöktürülmesi

1. 300µl %100 izopropanol (Merck, UN 1219) içeren 1,5 ml'lik Eppendorf tüpüne DNA'yı içeren süpernatant eklendi. Örnek 50 kez alt-üst edilerek iyice karıştırıldı.
2. 13.000-16.000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda DNA beyaz küçük bir pellet olarak görüldü.
3. Süpernatant dökülür ve tüp kurutma kağıdına bastırıldı. Tüpe 300 µl %70 Etanol eklendi ve tüp birkaç kez alt-üst edilerek DNA pelletinin yıkanması sağlandı.
4. 13.000-16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir. Etanol dikkatlice döküldü. Pelletin kaybedilmemesine dikkat edildi.
5. Tüp ters çevrilerek 5 saniye kadar kurutma kağıdına tutuldu.
6. 100 µl DNA Hidrasyon Solüsyonu eklendi. 5 saniye vortekslendi.
7. 5 dakika 65 °C'de inkübe edildi. 5 saniye vortekslendi ve santrifüjde spin edildi.
8. Elde edilen DNA örneklerinin optik dansite ölçümleri spektrofotometre ile yapıldıktan sonra konsantrasyonları 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılıp -20 °C de muhafaza edildi.

2.3. Mikrodizin Analiz Çalışması

2.3.1. Mikrodizin çalışmasında kullanılan stok çözelitler ve hazırlanışları

50mM L-Histidin: L-Histidine'den (Sigma, H-6034) 3,88 g tartıldı ve d.H₂O (Dr.Zeydanlı, DZWTR-05) ile 500 mL'ye tamamlandı. 2-8°C'de saklandı. En fazla bir hafta süre ile kullanıldı. Kondaktivitesi <100µS/cm ölçüldü her kullanımda oda ısısına gelen solüsyonun kondaktivitesi mutlaka ölçüldü.

100Mm L-Histidin: L-Histidine'den 0,776 g tartıldı ve d.H₂O ile 50 mL'ye tamamlandı 1.5 ml'lik steril eppendorflara 1 ml 'lik aliquatlar hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Kondaktivite <100-200µS/cm arasında ölçüldü. -20°C'de 2 ay süre ile kullanıldı.

0,3M NaOH: 50 veya 100 ml'lik 1 M'lık NaOH stoku hazırlandı. d.H₂O ile dilusyon yapılarak 0.3M 'lık NaOH karışım elde edildi. 1.5 ml'lik ependorflara 1 ml 'lık alikuatlar hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Aliquatlar -20°C'de 2 ay süre ile kullanıldı.

1M Sodium phosphate, monobazik stok: 68,99 g Sodium phosphate (Merck, A821274 709) , monobasic ve d.H₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

1M Sodium phosphate, dibazik stok: 70,93 g Sodium phosphate (Merck,F1395686 538) dibasic ve d.H₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

1M Sodium phosphate, pH 7,4 stok: 400 mL 1 M Sodium phosphate, dibazik+100mL Sodium phosphate, monobazik 10 dakika karıştırıldı. pH düşürmek için monobazik, pH yükseltmek için ise dibazik kullanıldı. Oda ısısında saklandı.

1M Sodium phosphate, pH 7 stok: 350 mL 1 M Sodium phosphate, dibazik + 150mL Sodium phosphate, monobazik 10dakika karıştırıldı. pH düşürmek için monobazik, pH yükseltmek için ise dibazik kullanıldı. Oda ısısında saklandı.

Low salt buffer: 25 mL 1 M Sodium phosphate, pH 7 ile 475 mL d.H₂O karıştırıldı. Oda ısısında saklandı.

High salt buffer: 25 mL 1 M Sodium phosphate, pH 7,4 ile 14,58 g Sodium chloride (Carlo Erba, 368257) karıştırıldı ve d.H₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

2.3.2. Mikrodizin analiz yöntemi ile mutasyon analizi

DNA mikrodizin analiz (Nanogen Advanced Diagnostics, 903-NMW-1000) yöntemi; PZR, PZR örneklerinin saflaştırması, örneklerin cihaza yüklenmesi, okutulması ve analiz aşamalarını içerir. Bu yöntem ile 35delG, 167delT, 235delC, delE120, W24X, M34T, L90P, R184P, Q124X, IVS1+1 G>A, A1555G değişimleri araştırıldı.

2.3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Polymerase Chain Reaction, PZR) ve gen bölgelerinin çoğaltılması

Bu çalışmada 56 proband ve yakınlarının (168 bireyin) kan örneklerinden izole edilen genomik DNA’lardan connexin 26 genin ilk ekzonundaki 5’ UTR bölgesi, connexin 26 geninin exon 2 bölgesi ve mitokondrial 12S rRNA bölgeleri çoğaltıldı.

2.3.2.1.1. Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 5’ UTR (promoter bölge), 12S rRNA bölgesinin çalışılması

Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 5’ UTR (promoter bölge), 12S rRNA bölgesinin çalışılmasında Nanogen Advanced Diagnostic firmasının sağladığı “*Genetic Deafness Detection*” kiti (Nanogen Advanced Diagnostics, NGN02P2) kullanılmıştır. Çalışılacak her bir geni amplifiye edebilmek için polimorfik bölgeyi de içine alacak şekilde uygun primer setleri kullanıldı. Connexin 26 geni ve connexin 26 + 5’UTR 12S rRNA bölgesi iki ayrı parça şeklinde amplifiye edildi. Bundan dolayı her iki parçaya özgü forward (ileri) ve revers (geri) primer setleri kullanılarak PZR yapıldı. Connexin 26 ekzon 2, ve mitokondrial 12S rRNA bölgesini çoğaltan forward primer ile connexin 26 geninin promoter bölgesini çoğaltmaya yardımcı olacak revers primer biyotin ile modifiye edilmiş olarak kullanıldı (Tablo 2.1).

TGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCCCTGTGTTGTGTGCAT
TCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGG
TGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATC
CTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC'TGCAGCCAG
GCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGAT
CTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAG
TTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCG
AAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCC'TTCATGTA
CGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCC
AACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCCGGCCACCGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGT
CTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTC

Şekil 2.1. Connexin 26 ikinci ekzon primer oturma bölgeleri (altı çizili ve renkli harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi. GenBank accession No. NM_004004

GGGTTTCGCGGACCCGGGAAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCGCGCGGCGCGCGCCCTC
CGTAACTTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTAAAGGCGCCACGGCGGGAGA
 CAGGTGTTGCGGCCCCGAGCGCCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGCGCCCCGGCC
 CAGGACCCGCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCGCCCCGGCCCCG
 CCGCGCTTCTCCCGACGCAGGTGAGCCCCCGGCCCCGGACTGCCCCGCCAGGAACCTGGCGCGGGGAG
 GGACCGCGAGACCCAGAGCGGTTGCCCCGGCCGCGTGGGTCTCGGGGAACCGGGGGGCTGGACCAACACAC
GTCCTTGGGCGGGGGCGGGGGCCGCTTCTGGAGCGGGCGTTTCTGCGGCCGAGCTCCGGAGCTGGAAT

Şekil 2.2. Connexin 26 promoter bölge primer oturma bölgeleri (altı çizili ve renkli harf) Yeşil renk ile gösterilen alanlar GC ve TATA kutuları, mavi altı çizili alan transkripsiyon başlama bölgesi. Sarı gösterilen alan IVS1+1 G>A mutasyonunu göstermektedir. GenBank Accession No. NM_004004

GAAACTTAAGGGTCTGAAGGTGGATTAGCAGTAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGA
 AGCGCGTACACACCGCCCGTCACCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCA
 TTTATATAGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACTTGGACGAACCAGAGTGTA

Şekil 2.3. Mitokondrial genomda A1555G için primer oturma bölgeleri. (altı çizili ve renkli harf). GenBank Accession No. NC_012920

Tablo 2.1. Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 5' UTR (promoter bölge), 12S rRNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan forward (ileri) ve revers (geri) primer dizileri. Biotin ile modifiye edilmiş diziler kalın yazı tipi ile yazıldı.

Primer adı	Primer Dizileri
CX F bio	Bio- TCG TCT TTT CCA GAG CAA ACC
CX R	TCA GCA GGA TGC AAA TTC CAG
Promoter F	CCC TCC GTA ACT TTC CCA GT
Promoter R bio	Bio- AAG GAC GTG TGT TGG TCC AG
MIT F bio	Bio- GGT CGA AGG TGG ATT TAG CA
MIT R	GCA CTT TCC AGT ACA CTT ACC A

PZR'nin hazırlanışı: Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde Tablo 2.2'deki bileşenler sırasıyla 0.2 µl steril tüplere (Axigene) eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan PZR karışımına Taq DNA polimeraz en son eklendi. Connexin 26 promoter ve mitokondrial DNA 12S rRNA bölgesi çoklu PZR reaksiyonu ile çalışılacağından

aynı tüp içerisinde karışım hazırlandı. Bu PZR için 2.5 µl dimethyl sulfoxide (Amresco, 0231) kullanıldı (Tablo 2.3). Karışım iyice homojenize edildi. PZR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (Applied Biosystem PE Thermal Cycler) yapıldı (Tablo 2.4).

Tablo 2.2. Connexin 26 geni için 50 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Connexin 26 Geni	Miktar
PZR içeriği	[µl]
dH ₂ O	30.7
10 x PZR Tampon	5
MgCl ₂ [25 mM]	4
dNTP Mix [herbir baz için 10 mM]	1
Primer Mix Connexin Gen (CX)	4
[herbir primer için 5 mM]	
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.3
DNA (50 ng/µl)	5
Toplam	50

Tablo 2.3. Connexin 26 promoter bölge ve 12S rRNA bölgesi için 50 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Connexin promoter ve 12S rRNA	Miktar
PZR içeriği	[µl]
dH ₂ O	27.2
10 x PZR Tampon	5
MgCl ₂ [25 mM]	4
dNTP Mix [herbir baz için 10 mM]	1
Primer Mix Connexin promoter	4
[herbir primer için 5 mM]	
Primer Mix A1555G	1
[herbir primer için 5 mM]	
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.3
DMSO	2.5
DNA (50 ng/µl)	5
Toplam	50

PZR şartları:**Tablo 2.4.** Connexin 26 ekzon 2, connexin 26 promoter bölge ve 12S rRNA da bulunan A1555G mutasyonun tespiti için kullanılan PZR ısı değişkenleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	15 dk	1
2	95 °C	1dk 15 sn	2
	72 °C	4dk 15 sn	
	94 °C	1 dk 15 sn	
3	70 °C	3 dk 15 sn	2
	72 °C	1 dk 15 sn	
	94 °C	1 dk 15 sn	
4	68 °C	3 dk 15 sn	2
	72 °C	1 dk 15 sn	
	94 °C	1 dk 15 sn	
5	66 °C	3 dk 15 sn	2
	72 °C	1 dk 15 sn	
	94 °C	1 dk 15 sn	
6	64 °C	3 dk 15 sn	2
	72 °C	1 dk 15 sn	
	94 °C	1 dk 15 sn	
7	62 °C	3 dk 15 sn	35
	72 °C	1 dk 15 sn	
8	72 °C	10 dk	1
9	4 °C	∞	

Agaroz jelin hazırlanışı: PZR ürünün boyutuna göre %2.5' luk jel için 1.25 g agaroz (Sigma, A5093-5006) tartılarak 200 ml'lik erlen içerisine eklendi. Üzerine son hacim 50 ml olacak şekilde 1X TBE (Dr. Zeydanlı, 090557) tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında (Beko, Md 1500) kaynatılarak çözüldü. Üç µl ethidium bromide ilave edilerek karıştırıldı.

Hazırlanan jel, mini jel yatağı içerisine döküldü ve içine yükleme kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak örnek yüklenmesi için elektroforez tankına (Protrans, 001) yerleştirildi.

PZR ürünlerinin Agaroz jele yüklenmesi: Tankayerleştirilen jelin üzerine 1X TBE tamponu ilave edildi. PZR ürününden 5µl, yükleme boyasından (Amresco, E190) 1µl alınarak ayrı bir yerde karıştırıldı. Karışım jelde oluşturulan kuyulara sırasıyla yüklendi. Jele yüklenen PZR ürünleri 80 V sabit gerilim ve 30 mA akım(Biometra, PP3000) koşullarında 100 bp DNA belirteci ile birlikte yürütüldü.

2.3.2.2. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünleri primer ve tuzlardan arındırılmak üzere Millipore saflaştırma tabağı (Millipore, MANU03010) kullanılarak vakum cihazı (Millipore, MAVM0960R) yardımı ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemine başlanmadan önce saflaştırma için kullanılacak saflaştırma tabağı (pürifikasyon plate) ile sistemin basınç kontrolü yapıldı. Saflaştırma işleminde kullanılacak dH₂O'nun iletkenliğinin 15 µS/cm den az olması beklenir. dH₂O (Sigma, W-4502)'nun iletkenliği iletken ölçer ile ölçüldü. Saflaştırma işlemi birkaç aşamadan oluşmaktadır.

1. PZR sonrası elde edilen ürünler d.H₂O ile 100µl'ye tamamlandı.
2. Pürifikasyon plate kuyucuklarına 100µl'ye tamamlanan ürünler eklendi.
3. Basınç açıldığında ilk birkaç saniye plate üzerine baskı uygulandı. Basınç 8-10 mbar arasında olacak şekilde purifikasyon işlemine başlandı.
4. Filtreler kurumaya başlamadan hemen önce 100µl d.H₂O pipetlendi.
5. Yukarıdaki işlem bir kez daha tekrarlandı.
6. Son olarak kurumanın hemen öncesinde 60-65µl d.H₂O pipetlendi.
7. Yatay çalkalayıcı (Biosan, PSU-ZT) da 15dakika karıştırıldı.

8. Çalkalayıcı da karışan PZR ürünü 10-15 kez hızlıca pipetaj yapılarak kuyucuklardan tüplere alındı.

9. PZR ürünleri (5 µl) saflaştırmadan sonra %2'lik jelde kontrol edildi. Kaliteli bant görülen ürünlerle çalışmaya devam edildi.

2.3.2.3. Örneklerin cihaza yüklenmesi

1. Yükleyici (Loader), seçilmiş alanlar da elektrik akımı oluşmasını sağlayarak biotinlenmiş nükleik asit dizilerinin streptavidinle kaplı nanochip üzerine bağlanmasını sağlar. Bunun için Loader Protocols'dan "new" seçilir ve yeni bir Loader Map oluşturuldu. Submap tipi olarak capture seçildi ve bir yada iki alana histidin yerleştirildi. Target/amplicon submapı seçildi sırasıyla çalışılacak ürünler yerleştirildi. 0.3 N NaOH'ın kullanılacağı passive submapı seçildikten sonra herhangi bir yerleştirme yapılmadı.

2. Örneklerin çalışılacağı plate (NUNC, 442587)'in, 1 kuyucuğuna 50 mM Histidin, 1 kuyucuğuna 0.3 M NaOH (denatürasyon); 1 kuyucuğuna da sırasıyla tuzlardan arındırılmış PZR ürünleri (30 µl PZR ürünü+30 µl 100 mM'lık L-Histidin), tuzlardan arındırılmış DNA Kontrolleri, wild/mutant kontrol içeren heterozigot karışım I ve II'den 60 µl pipetlendi. A1555G mutant ve wild kontrol, chip (Nanogen Advanced Diagnostics, 903-800240) üzerinde ayrı alanlara yüklendi. Kontroller Tablo 2.5'e göre hazırlandı.

Tablo 2.5. Chipe yüklenen kontrol örneklerinin bileşenleri ve miktarları

Heterozigot karışımı I		Heterozigot karışım II		A1555G mutant		A1555G wild	
Kontrol	(µL)	Kontrol	(µL)	Kontrol	(µL)	Kontrol	(µL)
167delT	2	35 delG	2	A1555G	12	A1555G	12
M34T	2	IVS 1+1G>A	2	dH ₂ O	18	dH ₂ O	18
L90P	2	R184P	2	100 mM histidin	30	100 mM histidin	30
235delC	2	dH ₂ O	24				
dH ₂ O	22	100 mM histidin	30				
100 mM histidin	30						

3. 96'lık plate ve chip cihazın yükleyici kısmına yerleştirilerek yükleme başlatıldı.

2.3.2.4. Örneklerin Nanogen moleküler biyoloji çalışma istasyonu ile hibridizasyon ve okutmasının yapılması

Reader'ın çalışma öncesi en az 45 dakika ısınması beklendi. Reader'a High ve Low salt buffer yerleştirildi ve yıkama (prime) yaptırıldı. Chip +4°C'den çıkarıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Chip yüzeyi High salt buffer ile üç kez yıkandı ve son olarak ta chip yüzeyinde High salt buffer bırakıldı ve 10-15dakika bekletildi. Chip yüzeyine bağlanmış olan amplikonlara spesifik olarak bağlanacak oligonukleotid karışımı (wild, mutant, stabilizer, universal) Tablo 2.6'daki gibi hazırlanarak chip yüzeyine yayılması sağlandı.

Tablo 2.6. Hibridizasyon aşamasında kullanılacak wild, mutant, stabilizer, universal(Ur) oligonukleotidlerin miktarları

Mutasyon	Wild tip oligo nukleotid	Mutant tip oligo nukleotid	Stabilizer	Ur01	Ur02	Ur05	Ur06	HSB	Toplam
35 delG	1.2	1	1	1.5	1.25	-	-	94	100
IVS1+1 G>A	1.2	1	1	1.25	1.5	-	-	94	100
A1555G	1	1	1	1.25	1.25	-	-	94.5	100
R184P	1	1	1	1.25	1.25	-	-	94.5	100
L90P	1	1.4	1	1.25	1.75	-	-	93.6	100
M34T	1	1.2	1	1.25	1.5	-	-	94.3	100
167 delT	1	1.2	1	1.25	1.5	-	-	94	100
235 delC	1	1.2	1	1.25	1.5	-	-	94	100
W24X	1	1	1	-	-	1	1	95	100
delE120	1	1	-	-	-	1	1	96	100
Q124X	1	1	1	-	-	1	1	95	100

Okutma sırasında kullanılan mutant, wild, stabilizör oligo dizileri EK1’de verilmiştir. Oligonukleotid karışımı chipin üzerinde 3 dakika bekletildi ve cihaza yerleştirilerek okutuldu. Her oligonukleotid karışımı için hazırlanmış okuma protokolü Tablo 2.7’ye göre yapıldı. *Hibridizasyon ve okutmalar Tablo 2.7’deki sıraya dikkat edilerek yapıldı.*

Tablo 2.7. Her bir mutasyona doğru analiz yapılabilmesi için gerekli okutma sırası

1. 35 delG
2. 167 delT
3. IVS1+1 G>A
4. W24X
5. A1555G
6. M34T
7. L90P
8. 235 delC
9. R184P
10. delE120
11. Q124X

Her bir okutma protokolü mikrodizin cihazında Tablo 2.8-9-10-11’de gösterildiği gibi hazırlanarak her bir mutasyon için ayrı ayrı uygulandı.

Tablo 2.8. 35delG, 167delT, IVS 1+1 G>A okutma protokolü

İşlem sırası	35delG	167delT	IVS1+1 G>A	İşlem adı	İşlem
	Aşama	Aşama	Aşama		
1	General	General	General	General	Sıcaklığın yükseltilmesi 60s bekleme
3	56 °C	56 °C	56 °C	Environment	
4	60 s	60 s	60 s	Wait	
5	43 °C	51 °C	51 °C	Environment	Sıcaklığın düşürülmesi 60s bekleme
6	60 s	60 s	60 s	Wait	
7 X5	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fluidics	Yüksek tuz tamponu(HSB) ile 5 kez kartujun yıkanması Okumadan önce sıcaklığın düşürülmesi Kırmızı ve yeşil sinyallerin toplanması
12	24 °C	24 °C	24 °C	Environment	
13	Scan 35delG	Scan 167 delT	Scan IVS1+1G>A	Fluorescence	

Tablo 2.9. W24X, L90P, delE120, Q124X okutma protokolü

İşlem sırası	W24X	L90P	delE120	Q124X	İşlem adı	İşlem
	Aşama	Aşama	Aşama	Aşama		
1	General	General	General	General	General	Sıcaklığın yükseltilmesi 60s bekleme
3	56 °C	56 °C	56 °C	56 °C	Environment	
4	60 s	60 s	60 s	60 s	Wait	
5	45 °C	41 °C	41 °C	41 °C	Environment	Sıcaklığın düşürülmesi 60s bekleme
6	60 s	60 s	60 s	60 s	Wait	
7X5	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fluidics	Yüksek tuz tamponu(HSB) ile 5 kez kartujun yıkanması Okumadan önce sıcaklığın düşürülmesi Kırmızı ve yeşil sinyallerin toplanması
8	24 °C	24 °C	24 °C	24 °C	Environment	
9	Scan W24X	Scan L90P	Scan delE120	Scan delE120	Fluorescence	

Tablo 2.10. M34T, R184P, A1555G okutma protokolü

İşlem sırası	M34T	R184P	A1555G	İşlem adı	İşlem
	Aşama	Aşama	Aşama		
1	General	General	General	General	
3	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Fill B (HSB)	Environment	Sıcaklığın yükseltilmesi
4	41 °C	41 °C	41 °C	Wait	60s bekleme
5		30 s		Environment	Sıcaklığın düşürülmesi
6 X4	Fill C (LSB)	Fill C (LSB)	Fill C (LSB)	Fluidics	Düşük tuz tamponu(LSB) ile 4 kez kartujun yıkanması
7	24 °C	24 °C	24 °C	Environment	Okumadan önce sıcaklığın düşürülmesi
8	Scan delE120	Scan L90P	Scan delE120	Fluorescence	Kırmızı ve yeşil sinyallerin toplanması

Tablo 2.11. 235delC okutma protokolü

235 del C			
İşlem sırası	Aşama	İşlem adı	İşlem
1	General	General	
2	56 °C	Environment	Sıcaklığın yükseltilmesi
3	60 s	Wait	60s bekleme
4	44 °C	Environment	Sıcaklığın düşürülmesi
5X8	Fill C (LSB)	Fluidics	Düşük tuz tamponu(LSB) ile 8 kez kartujun yıkanması
6	24 °C	Environment	Okumadan önce sıcaklığın düşürülmesi
7	Scan 235 delC	Fluorescence	Kırmızı ve yeşil sinyallerin toplanması

Her bir okutma protokolünden sonra oligonukleotidleri ortamdan uzaklaştırmak için chip temizleme protokolü Tablo 2.12'ye göre uygulandı.

Tablo 2.12. Herbir çalışma sonunda uygulanan chip temizleme protokolü

İşlem sırası	Aşama	İşlem adı	İşlem
1	General	General	
2	56 °C	Environment	Sıcaklığın yükseltilmesi
3X4	Fill C (LSB)	Fluidics	Düşük tuz tamponu(LSB) ile 4 kez kartujun yıkanması
6	Fill (HSB)	Fluidics	Yüksek tuz tamponu(LSB) ile kartujun yıkanması
7	24 °C	Environment	Okumadan önce sıcaklığın düşürülmesi
8	Scan	Fluorescence	Kırmızı ve yeşil sinyallerin toplanması

Tüm örneklerin cihazda okutulması tamamlandıktan sonra “Analysis Tools” yardımı ile verilerin analizi yapıldı.

2.3.2.5. Okuma sonuçlarının değerlendirilmesi

Veri analiz programında örneklerden alınan sinyaller değerlendirilirken öncelikle bir örnekten alınan kırmızı ve/veya yeşil sinyallerin en az 50 düzeyinde olup olmadığı kontrol edilmiştir. Sinyallerden en az biri bu düzeyi aşmıyorsa söz konusu örnek değerlendirmeye alınmamıştır. Veri analizin değerlendirilmesinde iki türlü sinyal bulunmaktadır. Bunlar geri plan kırmızı/yeşil sinyaller ve özgül kırmızı/yeşil sinyallerdir. Geri plan sinyalleri; chipe yüklenen histidin üzerinden alınan özgül olmayan yeşil ve kırmızı sinyallerdir. Geri plan sinyalleri ile örneklerden alınan özgül sinyallerden biri arasında, özgül sinyallerin sağlıklı sınırdaki değerlendirilebilmesi için, 5'e 1 veya daha fazla oranda bir fark bulunması gerekmektedir. Geri plan kırmızı veya yeşil sinyallerinden en az birine göre özgül sinyalleri 5'e 1 veya üzeri oranı tutturamayan örnekler değerlendirilmeye alınmamıştır. Bu oran istatistiksel olarak hesaplanmış standart sapma değerinin 3 katı kullanılarak ve kesin doğruluk arz eden sonuçlar elde etmek üzere belirlenmiştir. Doğru belirlemelerin yapılabilmesi için heterozigot kontrollerde, hem kırmızı hem de yeşil kanalların 5:1 kriterini geçmiş olması gerekmektedir. Homozigot örneklerde ise kırmızı veya yeşil kanalın bu oranı

yakalaması esastır. Özgül sinyaller; örneklerden alınan özgül yeşil ve kırmızı sinyallerdir. Bu sinyallerin birbirine olan oranı ile örneğin genotipi belirlenmiştir. 1:1 – 1:2 arasındaki oranlarda örnek heterozigottur. 1:5 ve üzerindeki oranlarda yüksek olan sinyal kırmızı ise mutant, yeşil ise yabanıl tiptir. 1:2'den fazla ve 1:5'den az ise genotipleme yapılamaz.⁸⁰

2.4. DNA Dizi Analiz Çalışması

2.4.1. DNA Dizi analizi ve hazırlık aşamaları

Mikrodizin analiz sonucu mutasyon bulunamayan ve heterozigot örnekler için DNA dizi analizi yapılmıştır. Connexin 26 exon 2 bölgesi bu nedenle mikrodizin analizinde kullanılan primerlerden farklı primerler kullanılarak çoğaltıldı.

TCAGAGAACACCTAAAAACACGTTCAAGAGGGTTTGGGAACATACATTTAAT CCTATGACAACTAAGT
TGGTTCTGTCTTTACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCA
 TGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATTCTGTGTGTGTGTCAT
 TCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATG GATTGGGGCCAGCTGCAGACGATCCTGGGGGG
 TGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGATTATGATC
 CTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAG
 GCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGAT
 CTTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAG
 TTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCG
 AAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTA
 CGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCC
 AACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGT
 CTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTC
 AAAAAAGCCAGTTTAA CGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGAT GAGGCAA
CCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACC

Şekil 2.4 Dizi analizi için kullanılan 943 bp lik connexin 26 Exon 2 bölgesi ve primer oturma bölgeleri.

Tablo 2.13. Dizi analizi için kullanılan forward (ileri) ve revers (geri) primer dizileri

Primer adı	Primer Dizileri
CX F	CCT ATG ACA AAC TAA GTT GGT TC
CX R	GAC AGC TGA GCA CGG GTT GCC TC

2.4.1.1. PZR'ın hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde Tablo 2.14' deki bileşenler sırasıyla 0.2 µl steril tüplere eklendi. Kullanılan master mix (Promega, M7502) nukleazlardan arındırılmış dH₂O, 50 U/ml *Taq* DNA polimeraz ve enzimin tamponu, 400 µM dNTP ve 3 mM MgCl₂ içermektedir. Ayrıca GC bölgelerinin sebep olduğu ikincil yapıların azalmasını sağlayan sıvı betaine 5 M (Sigma, B 0300-5 VL) kullanıldı. Karışım iyice homojenize edildi. PZR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (Applied biosystem PE Thermal cycler) yapıldı (Tablo 2.15).

Tablo 2.14. Connexin 26 geni için 30 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Connexin 26	Miktar
PZR içeriği	[µl]
Master mix	14
Betaine (0.67 M)	4
Primer Mix Connexin Gen [herbir primer için 5mM]	3
DNA (50 ng/µl)	3
dH ₂ O	6
Toplam	30

2.4.1.2. PZR şartları

Tablo 2.15. Connexin 26 ekzon 2 PZR ısı değişkenleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	5 dk	1
	94 °C	45 sn	
2	58 °C (0.1 °C↓)	45 sn	40
	72 °C	1dk 30 sn	
3	72 °C	10 dk	1

PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 5 µl yüklenerek elektoroforez işleminden sonra görüntülendi.

2.4.1.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Connexin 26 geni ilk PZR işlemi ile çoğaltıldıktan sonra PZR ürünleri tuz ve dNTP lerin uzaklaştırılması için Agencourt® AMPure® (Beckman Coulter, APN 000130) pürifikasyon kiti kullanılarak temizlendi. Dizi analizi yapılacak ürünlerin temiz olması reaksiyon sonunda oluşacak arka plandaki bantların önlenmesinde önemlidir.

1. 30 µl PZR ürünü, 84 µl manyetik boncuklar içeren solüsyonla homojenize olana kadar pipet ile plakada karıştırıldı. Bu işlem sırasında 100 bç'den uzun olan PZR ürünleri manyetik boncuklara bağlandı. 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra magnetin üzerine yerleştirilerek 10 dk bekletildi. DNA'yı bağlayan boncuklar kuyucukların etrafında halka oluşturarak bulanık olmayan temiz bir görüntü oluşturdu. Manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı.

2. Plaka magnetin dışına alındıktan sonra 200 µl %70'lik ethanol (Merck, 32221) ilave edildi ve tekrar magnetin üzerine yerleştirilerek 30 saniye bekletildi. Boncuklar yapışınca ethanol ortamdan uzaklaştırıldı ve bu işlem bir kere daha tekrarlandı. Süpernatant pipetle uzaklaştırılarak örnekler 20 dakika kurumaya bırakıldı.

3. Örnekler kuruduktan sonra 40 µl ddH₂O ile sulandırılarak homojenize bir görüntü oluşana kadar pipet ile karıştırıldı.

Pürifikasyon sonrası temizlenen örnekler DNA dizi analizinde kullanılacak uygun miktarların belirlenmesi için %2'lik agaroz jel de kontrol edildi.

2.4.2. DNA Dizi analiz reaksiyonu

DNA dizi reaksiyonu daha önce elde edilen PZR ürünlerinin floresan işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesine dayanır. Bu amaçla ürünler “cycle sequencing” denilen yeni bir PZR döngüsüne sokulur. Cycle sequencing işleminde PZR ürünleri kalıp DNA işlevini görür. DNA polimeraz varlığında tek bir primer yardımı ile floresan işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire girer ve reaksiyon normal PZR döngüsü gibi devam eder. Aradaki fark primerin uzaması sırasında işaretli ddNTP' lerin bağlanması ile zincirin sonlanmasıdır. Reaksiyon sonucunda oluşan renkli DNA fragmentleri, kapiller tüp içine doldurulan polimerde ayrıştırılır. Yürüme sonucunda ortaya çıkan renkli pikler, lazer okuyucu tarafından saptanarak analiz programına aktarılır.

Bu çalışmada toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde Tablo 2.16'daki bileşenler sırasıyla 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklara konuldu. Dizi analizi için ilk PZR'da kullanılan forward primer ve DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, PN 608120) kullanıldı. Karışım iyice homojenize edildi. PZR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (Applied biosystem PE Thermal cyclers) yapıldı (Tablo 2.17).

Tablo 2.16. Connexin 26 Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılması için 20 µl'lik PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Connexin 26	Miktar
PZR içeriği	[µl]
DTCS Quick st.mix	10
Primer (Forward)	0.7
[primer için 5mM]	
dH ₂ O	6.3
PZR ürünü	3
Toplam	20

2.4.2.1. PZR şartları

Tablo 2.17. Connexin 26 Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılmasında kullanılan PZR ısı değişkenleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	2 dk	1
	96 °C	20 sn	
2	54 °C	20 sn	30
	60 °C	4 dk	
3	72 °C	10 dk	1

Bu işlem tamamlandıktan sonra ürünler tekrar bir temizleme işleminden geçirildi.

2.4.2.2. Dizi analizi yapılacak PZR ürünlerinin saflaştırılması

Elde edilen PZR ürünleri tekrar manyetik boncuk yardımı (Agencourt Clean SEQ) ile saflaştırıldı.

1. PZR ürünlerinin üzerine reaksiyonun durdurulması için 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) eklendi.

2. Karışım 96'lık temiz PZR tüplerine aktarıldı. Manyetik boncuk içeren 25 µl Agencourt Clean SEQ (Beckman Coulter, APN 000121)' den herbir kuyucuğa eklendi ve homojenize olana kadar karıştırıldı.

3. Üzerine 110 µl %73 lük izopropanol (Merck, UN 1219) eklendi. Pipetaj yapıldı. 15 dakika oda ısısında bekletildi. DNA'ların manyetik boncuklara yapışması sağlandı.

4. Örnekler magnete yerleştirildi. 5 dakika bekletildi. Boncuklara yapışan DNA'lar mıknatısın etkisiyle tüpün çeperine yapışır. Manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı.

5. 200 µl %73 lük izopropanol eklenip 3 dk bekletildi. Süpernatant atıldı.

6. Tekrar 200 µl %73 lük izopropanol eklenip 5 dk etüvde bekletilerek izopropanolun tamamen uzaklaşması sağlandı.

7. Herbir örneğin üzerine 40 µl Hidi formamid eklendi ve 10 dk bekletildi. Böylece hem DNA'lar manyetik boncuklardan ayrılır hem de DNA zincirlerinin birbirinden ayrı tutulması sağlanmış olur. Manyetik boncuklar tüpün çeperine yapışır. 35 µl DNA tüpten alınarak sekans cihazında kullanılmak üzere üretilmiş temiz 96'lık plakaya aktarıldı. Her bir örneğin üzerine 1 damla mineral oil damlatıldı. Plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi.

GJB2 geninin ekzon 2 nükleotid dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik dizi analiz cihazı CEQ8000 (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı.

2.4.3. Kromatogramların değerlendirilmesi

DNA dizi değişimleri, *GJB2* geninin referans dizisi ile karşılaştırılarak tanımlandı. <http://genome.ucsc.edu> internet adresinden (Genbank Accession Number

NM_004004) “*Homo sapiens* connexin 26 (*GJB2*) mRNA, complete CDS (CoDing Sequence)” kullanıldı. *GJB2* nukleotidlerinin numaralandırılması, exon 2’deki başlama kodonu olan ATG’nin adenin bazına 1 verilerek başlandı. CEQ8000 dizi analiz cihazından elde edilen ham veriler CEQ8000 Genetic Analysis System adlı genotipleme yazılım programına aktararak karşılaştırma (alignment) yapıldı. Heterozigot ve homozigot baz mutasyonları, delesyon ve insersiyonlar da bu program aracılığı ile analiz edildi. DNA dizindeki yeni değişim <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html> adresinde yer alan talimatlar çerçevesinde yapıldı. Aminoasid sekans değişimleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/> internet adresi kullanılarak tespit edildi.

Mikrodizin analizi ile sonuç alınan birkaç örneğe dizi analizi yapılarak önceki sonuçları doğrulandı.

3. BULGULAR

3.1. Mikrodizin Sonuçları

Bu araştırma sendromik olmayan işitme kaybına sahip 56 proband ile yapılmıştır. Çalışma grubu ailesel (probanddan başka en az bir etkilenmiş olgunun bulunduğu) olgularla oluşturulmuştur.

3.1.1. *Connexin 26 İkinci Ekzonun çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması*

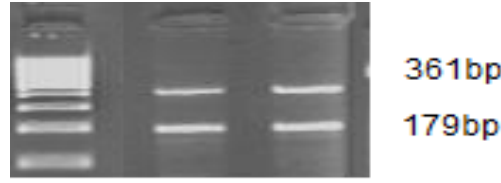
İkinci Ekzon dan 651 bp'lik alan çoğaltıldı. Öncelikle 56 proband ve aile bireylerinden (toplam 168 bireyden) oluşan olgu grubuna ait DNA örneklerine PZR işlemi uygulandı. Bütün örneklerde PZR ürününün oluştuğu saptandı. Şekil 3.1'de ekzon 2 PZR ürünlerinin %2,5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.1 Connexin 26 Ekzon 2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntü

3.1.2. *Connexin 26 promoter bölge (5' UTR) ve 12S rRNA bölgesinin çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması*

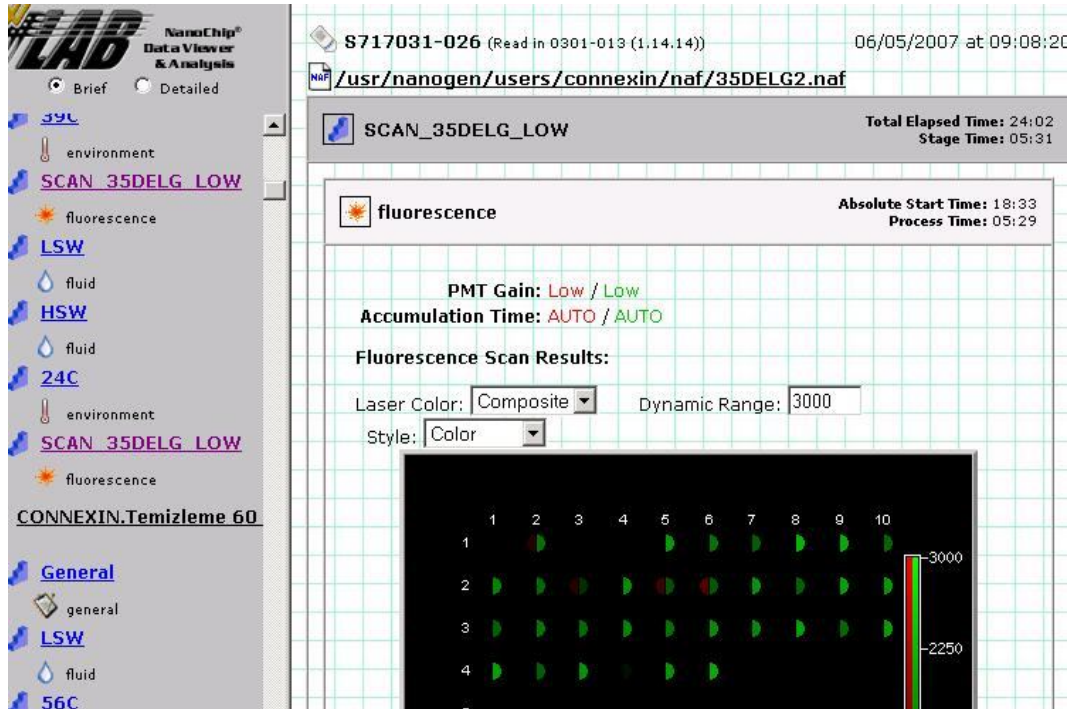
İki set primer kullanılarak, Connexin 26 promoter bölge (5' UTR) ve 12S rRNA bölgesi çoklu PZR yapılarak çoğaltılmıştır. 361 bp ve 179 bp lik ürünler elde edilmiştir. Şekil 3.2' de PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü görülmektedir.



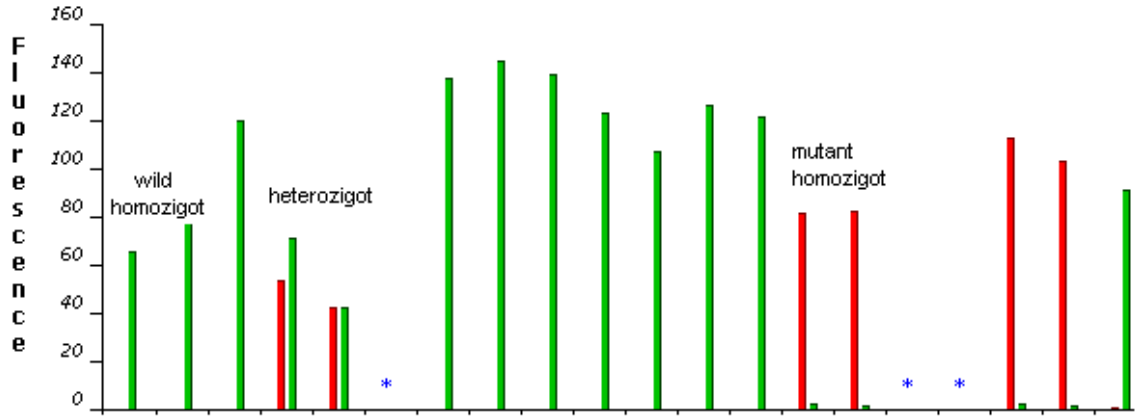
Şekil 3.2. Connexin 26 promotor bölge (5'UTR) ve 12S rRNA bölgesi PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

3.2. Mikrodizin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İşlenmemiş okuma sonuçları, yabanıl tip allel için yeşil ve mutant tip allel için kırmızı renkte sayısal değerler halinde görüntülenir. Data analiz programına heterozigot olduğu daha önceden saptanmış olan bir heterozigot kontrol, normalizör olarak tanıtılır. Heterozigot örnekte yabanıl tip ve mutant tip allel dozu birbirine eşit olduğundan, program bu kontrol örneğinin kırmızı ve yeşil sinyal değerini birbirine eşitler, değerlendirilecek diğer örneklerle aynı işlemi uygular ve sonuçları hem diyagram hem de yazılı olarak verir. Şekil 3.3-4-5' de 35delG'ye ait analiz öncesi ve sonrası görüntü verilmektedir.



Şekil 3.3. Mutasyon okutması yapıldığında chipe yüklenen örneklerden elde edilen analiz edilmemiş görüntü. (örnek: 35 delG)



Şekil 3.4. Nanogen mikrodizin cihazında çalışılmış wild, heterozigot, mutant örneklerin analiz grafiği.(örnek: 35 delG)

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
08.13	0	110	1	Inf	wild/wild
08.14	0	130	1	Inf	wild/wild
08.15	0	125	1	Inf	wild/wild
08.16	84	3	1	28 :: 1	mut/mut
08.17	85	2	1	42.5 :: 1	mut/mut
08.18	N/A	N/A	0	N/A	N/A
08.19	N/A	N/A	0	N/A	N/A
08.20	116	3	1	38.67 :: 1	mut/mut
08.21	106	2	1	53 :: 1	mut/mut
08.22	1	94	1	1 :: 94	wild/wild
08.23	0	121	1	Inf	wild/wild
08.24	0	134	1	Inf	wild/wild
08.25	78	5	1	15.6 :: 1	mut/mut
08.26	11	261	1	1 :: 23.73	wild/wild
08.27	325	33	1	9.85 :: 1	mut/mut
08.28	241	19	1	12.68 :: 1	mut/mut
08.29	20	643	1	1 :: 32.15	wild/wild
08.30	6	313	1	1 :: 52.17	wild/wild
08.31	23	1316	1	1 :: 57.22	wild/wild
08.32	6	482	1	1 :: 80.33	wild/wild
08.33	369	48	1	7.69 :: 1	mut/mut
08.34	13	543	1	1 :: 41.77	wild/wild
08.35	10	664	1	1 :: 66.4	wild/wild
08.36	16	1076	1	1 :: 67.25	wild/wild
08.37	9	543	1	1 :: 60.33	wild/wild
08.38	9	625	1	1 :: 69.44	wild/wild
07.98	11	657	1	1 :: 59.73	wild/wild

Şekil 3.5. Nanogen mikrodizin analiz yöntemi ile çalışılmış connexin 26 genindeki bir mutasyonunun floresan sinyal oranları, analiz sonucunda belirlenen genotip (örnek: 35delG)

3.2.1. Connexin 26 exon 2 mikrodizin analiz sonuçları

Probandların mikrodizin analiz değerlendirme sonuçları Tablo 3.1’ de ayrıntılı olarak verilmiştir. Buna göre en sık 35delG olmak üzere 4 farklı nükleotid değişimi saptandı. Mikrodizin yöntemiyle herhangi bir mutasyon saptanamayan probandlar için DNA dizi analiz yöntemine başvuruldu.

Tablo 3.1. Cx26 geninin ikinci ekzonun da mikrodizin analiz verilerine göre mutasyon saptanan olgular

Hasta kodu	Değişim adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi	Türü
7006	p.[W24X]+[W24X]	G71A	24. kodon Trp-Stop	TM1	Mutasyon
7010	p.[delE120]+ [delE120]	360delGAG	119-120del Glu	IC2	Mutasyon
7051	p.[R184P]+ [wt]	G551C	184. kodon Arg-Pro	EC2	Mutasyon
7061	c.[35delG]+[wt]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
7083	p.[delE120]+ [delE120]	360delGAG	119-120del Glu	IC2	Mutasyon
8006	c.[35delG]+[delE120]	35delG/ 360delGAG	Frameshift / 119-120del Glu	IC1-IC2	Mutasyon
8016	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
8020	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
8025	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
8027	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
8028	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
8033	c.[35delG]+[35delG]	35delG	Frameshift	IC1	Mutasyon

Tablo 3.2. Mutasyon saptanan olgularda aile mikrodizin analizi verileri (A: anne, B: baba, K: Kardeş, A.O:amca oğlu)

Aile	Olgu no	Mutasyon	Fenotip (işitme kaybı)	Akrabalık
3	7006	p.[W24X]+[W24X]	var	Var
	7007K	p.[W24X]+[wt]	yok	
	7008K	[wt]+[wt]	yok	
5	7010	p.[delE120]+ [delE120]	var	Var
	7011A	p.[delE120]+ [wt]	yok	
	7012B	p.[delE120]+ [wt]	yok	
17	7051	p.[R184P]+ [wt]	var	Yok
	7052K	p.[R184P]+[wt]	var	
	7053K	[wt]+[wt]	var	
	7054B	p.[R184P]+[wt]	yok	
	7055A	[wt]+[wt]	yok	
19	7061	c.[35delG]+[wt]	var	Var
	7059A	c.[35delG]+[wt]	yok	
	7060B	[wt]+[wt]	yok	
	7062K	c.[35delG]+[wt]	var	
25	7083	p.[delE120]+ [delE120]	var	Var
	7084K	p.[delE120]+ [delE120]	var	
	7085K	p.[delE120]+ [delE120]	var	
	7086A	p.[delE120]+[wt]	yok	
	7087B	p.[delE120]+[wt]	yok	
30	8006	c.[35delG]+[delE120]	var	Yok
	8007K	c.[35delG]+[delE120]	var	
31	8016	c.[35delG]+[35delG]	var	Var
	8017A.O	c.[35delG]+[35delG]	var	
	8018K	c.[35delG]+[wt]	var	
32	8025	c.[35delG]+[35delG]	var	Var
	kardeş	-	var	
	8034 A.O	[wt]+[wt]	var	
33	8027	c.[35delG]+[35delG]	var	Yok
	Anne	-	var	
	Baba	-	var	
	Kardeş	-	yok	
34	8020	c.[35delG]+[35delG]	var	Var
	8021K	c.[35delG]+[35delG]	var	
35	8028	c.[35delG]+[35delG]	var	Var
	Kardeş	-	var	
36	0833	c.[35delG]+[35delG]	var	Var

3.2.2. *GJB2 5'UTR Promoter bölge IVS1+1G>A mutasyonu mikrodizin analiz sonuçları*

56 probandın ve ailelerindeki diğer kişilerin *GJB2* 5'UTR promoter bölgesini içeren PZR ürünlerinin analizi sonucu hiçbir olguda *IVS1+1G>A* mutasyonu saptanmadı.

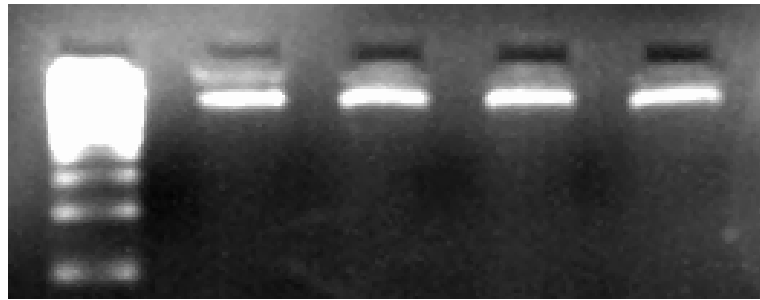
3.2.3. *Mitokondrial DNA 12S rRNA A1555G mutasyonu mikrodizin analiz sonuçları*

56 probandın ve ailelerindeki diğer kişilerin *12S rRNA* bölgesini içeren PZR ürünlerinin analizi sonucu hiçbir olguda A1555G mutasyonu saptanmadı.

3.3. DNA Dizi Analizi

3.3.1. *Connexin 26 ikinci ekzonun çoğaltılması ve PZR Ürününün Saptanması*

Connexin 26 geninden 943 bp'lık alan çoğaltıldı. 46 proband ve aile bireylerinden oluşan olgu grubuna ait DNA örneklerine PZR işlemi uygulandı. Bütün örneklerde PZR ürününün oluştuğu saptandı. Şekil 3.6'da ekzon 2 PZR ürünlerinin %2,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.6. Connexin 26 Ekzon2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

3.1.2. *Connexin 26 ikinci ekzonunun DNA dizi analizi sonuçları*

Bu grupta bulunan her bir olgu için öncelikle tek yönlü DNA dizi analizi ve değerlendirilmesi yapıldı. İlk değerlendirme sonuçlarına göre, herhangi bir nükleotid

değişimi görülen bireylerin diğer zincirden DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda gözlenen değişimler Tablo 3.3’de verilmiştir.

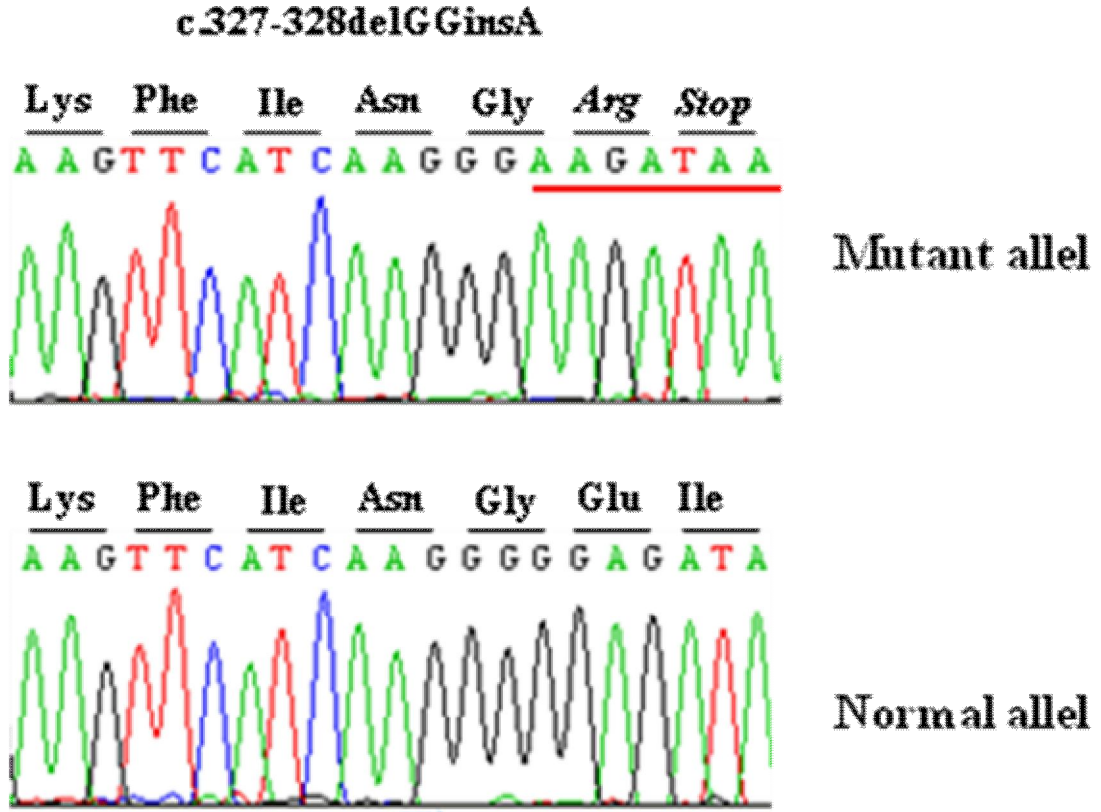
Tablo 3.3. Cx26 geninin ikinci ekzonun da DNA dizi analiz verilerine göre mutasyon ve polimorfizm saptanan olgular

No	Hasta kodu	Değişim adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi	Türü
1	7018	c.[327-328delGGinsA]+[327-328delGGinsA]	E110RfsX2	Frameshift/110.kodon Glu-Arg	IC2	Mutasyon
2	8043	c.[35delG]+[327-328delGGinsA]	35delG/E110RfsX2	Frameshift/110.kodon Glu-Arg	IC2	Mutasyon
3	8035	p.[G79A]+[wt]	V27I	27.kodon Val-Ile	TM1	SNP
4	8036	p.[G457A]+[wt]	V153I	153.kodonVal-Ile	TM3	SNP
5	7045	p.[G457A]+[wt]	V153I	153.kodonVal-Ile	TM3	SNP

Tablo 3.4. Mutasyon saptanan olgular ve aile DNA dizi analizi verileri (A: anne, B: baba,K: Kardeş)

No	Hasta kodu	Değişim adı	Fenotip (işitme kaybı)	Akrabalık
1	7018	c.[327-328delGGinsA]+[327-328delGGinsA]	Var	Var
	7019K	c.[327-328delGGinsA]+[327-328delGGinsA]	Var	
	7098A	c.[327-328delGGinsA]+ [wt]	Yok	
	7099B	c.[327-328delGGinsA]+ [wt]	Yok	
2	8043	c.[35delG]+[327-328delGGinsA]	Var	Yok
	8042B	c.[327-328delGGinsA]+ [327-328delGGinsA]	Var	

Daha önce literatürde bulunmayan, bu çalışmada tespit edilen mutasyonun (wild ve homozigot) kromatogram görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir. Diğer olguların kromatogram görüntüleri EK-2’de verilmiştir.



Şekil 3.7. İşitme kayıplı olgularda c.327-328delGGinsA mutasyonu ve aynı bölgenin sağlıklı olgulardaki kromatogram görüntüsü

3.4. Probandlarda saptanan mutasyonlar ve işitme kaybı sonuçları

56 probandın mutasyon analizi sonuçları ve 46'sının işitme test sonuçları Tablo 3.5'de gösterilmiştir. 10 probandın işitme testi sonuçları alınamamıştır.

Tablo 3.5. Probandlarda (56 olgu) saptanan mutasyonların olgu grubu içindeki yüzdeleri, allelik frekanları ve sağ ve sol kulak işitme kaybı seviyeleri, yüzdeleri *(4:çok ileri, 3:ileri, 2:orta derece, 1:hafif)

Genotip			Fenotip (işitme kaybı seviyesi) (*)							
Mutasyon adı	Hasta sayısı (%)	Allelik frekans (%)	4/4*	4/3*	4/2*	3/3*	3/2*	2/2*	2/1*	1/1*
c.[35delG]+[35delG]	6 (10.7)	10.7	1	1	1	2				
c. [35delG]+.[327-328delGGinsA]	1 (1.8)	0.9	1							
c.[35delG]+p.[delE120]	1 (1.8)	0.9		1						
c.[35delG]+[wt]	1 (1.8)	0.9	1							
p.[delE120]+[delE120]	2 (3.6)	3.6		1				1		
p.[W24X]+[W24X]	1 (1.8)	1.8				1				
p.[R184P]+[wt]	1 (1.8)	0.9					1			
c.[327-328delGGinsA]+[327-328delGGinsA]	1 (1.8)	1.8	1							
Polimorfizm adı										
p.[V27I]+[wt]	1 (1.8)	0.9							1	
p.[V153I]+[wt]	2 (3.6)	1.8				1				
[wt]+[wt]	39		7		1	13		9		2
Toplam(%)	56		11(24)	3(6.5)	2(4.3)	17(37)	1(2.2)	10(21.7)	1(2.2)	2(4.3)

3.5. Olgu grubunda akrabalık ve seçici eşleşme sonuçları

Otozomal resesif kalıtım gösteren ailelerde 35delG mutasyonuna sahip probandlar ve akraba evliliği öyküleri Tablo 3.6' da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Olguların öyküleri (A;anne, B;Baba, Ç;Çocuk, A.O;Amcaoğlu, AH;Ateşli hastalık , İK; işitme kaybı).

Aile	Olgu no	Mutasyon	Fenotip (işitme kaybı)	Akrabalık	İK öyküsü
19	7061	c.[35delG]+[wt]	var	1.derece	
	7059A	c.[35delG]+[wt]	yok		
	7060B	[wt]+[wt]	yok		
	7062K	c.[35delG]+[wt]	var		
30	8006	c.[35delG]+[delE120]	var	yok	
	8007K	c.[35delG]+[delE120]	var		
31	8016	c.[35delG]+[35delG]	var	var	Ebeveynlerin ailelerinde İK
	8017A.O	c.[35delG]+[35delG]	var		
	8018K	c.[35delG]+[wt]	var		
32	8025	c.[35delG]+[35delG]	var	1.derece	Kardeşinde İK, ebeveynlerin ailelerinde İK
	8034A.O	[wt]+[wt]	var		
33	8027	c.[35delG]+[35delG]	var	yok	Ebeveynlerin her ikisinde İK
34	8020	c.[35delG]+[35delG]	var	1.derece	Baba tarafında İK
	8019K	c.[35delG]+[35delG]	var		
	8021K	c.[35delG]+[35delG]	var		
35	8028	c.[35delG]+[35delG]	var	1.derece	Kardeşinde İK Anne tarafında İK
36	8033	c.[35delG]+[35delG]	var	1.derece	
37	8043	c.[35delG]+[327-328delGGinsA]	var	1.derece	Anne ve baba tarafında İK

56 probandin akrabalık ve seçici eşleşme sonuçları Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Akrabalık ve seçici eşleşmenin olgu gurubu içindeki yüzdeleri

	Toplam	Akrabalık		Seçici eşleşme	
		Var (%)	Yok (%)	Var (%)	Yok (%)
<i>GJB2</i> +/+	12	8 (67)	4 (33)	3 (25)	9 (75)
<i>GJB2</i> +/-	2	1 (50)	1 (50)	-	2 (100)
<i>GJB</i> -/-	42	30 (71)	12 (29)	-	42 (100)
Toplam	56	39 (70)	17 (30)	3 (5)	53 (95)

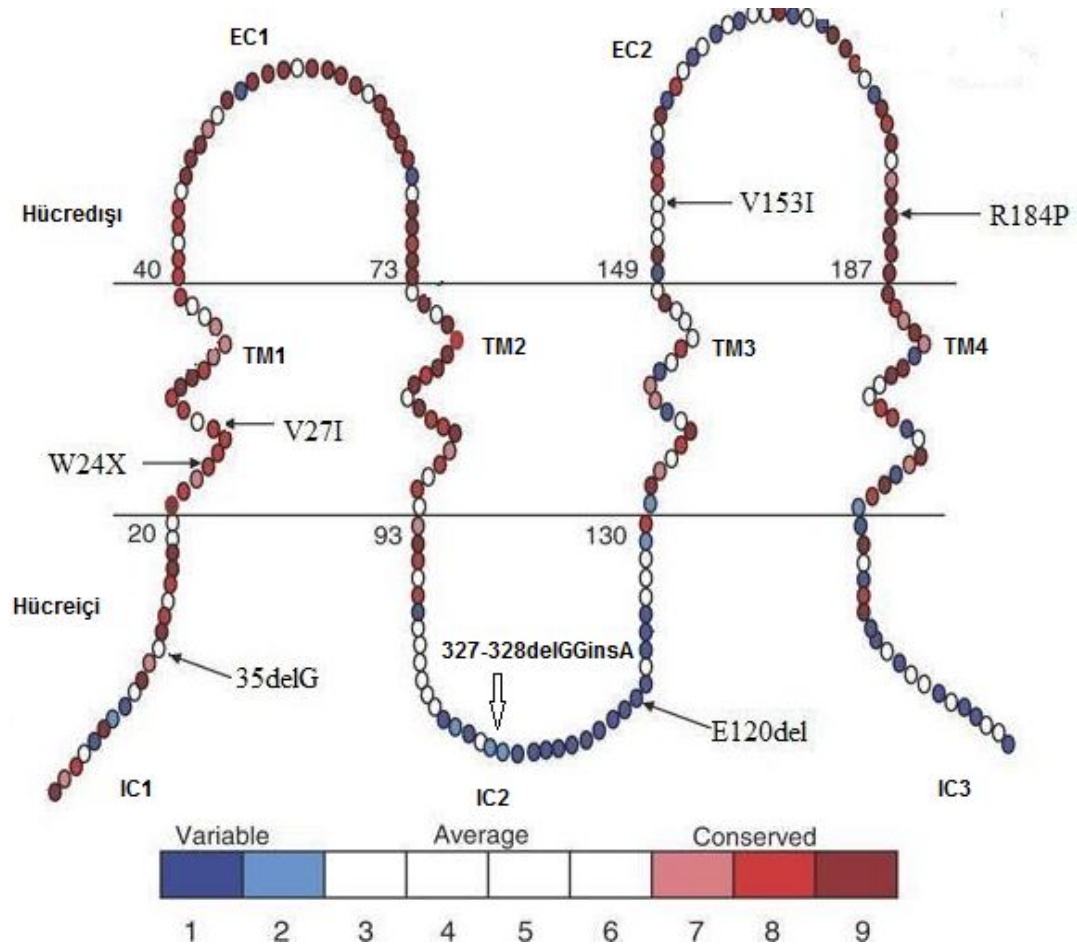
3.6. Türkiye'de *GJB2*'nin coğrafik dağılımı ve bu çalışma sonuçları

Türkiye'de *GJB2*'nin coğrafik dağılımı⁸¹ ve bu çalışma sonuçları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Türkiye'de *GJB2*'nin coğrafik dağılımı (akrabalık ve seçimli eş seçimi dışında)

Coğrafik bölgeler	Proband sayısı	<i>GJB2</i> +/+	Homozigot 35delG
Batı Anadolu	44	16 (%35)	15 (%33)
Orta anadolu	26	10 (%38)	7 (%27)
Doğu Anadolu	20	1 (%5)	1 (%5)
Bu çalışma	56	12 (%21.4)	6 (%10.7)

3.7. Çalışma sonucunda bulunan mutasyonların Cx26 üzerindeki yerleşimi



Şekil 3.7.: Çalışma sonucunda Connexin 26 proteinin de bulunan tüm değişimlerin protein üzerindeki konumları

3.8. Ülkemizde *GJB2* geni ile ilgili çalışmalarda saptanan mutasyon ve polimorfizmlerin bu çalışma ile karşılaştırılması

Ülkemizde *GJB2* geni ile ilgili çalışmalarda saptanan mutasyon ve polimorfizmlerin bu çalışma ile karşılaştırılması^{82,83,84,85,86,87} Tablo 3.9. da verilmiştir.

Tablo 3.9. Ülkemizde *GJB2* geni ile ilgili çalışmalarda saptanan mutasyon ve polimorfizmlerin bu çalışma ile karşılaştırılması. Kalın altı çizgili değişimler polimorfizm, kalın yazılmış değişimler bu çalışmada saptanan mutasyonlardır. (*: Çalışılmadı)

Referans →	82	83	84	85	86	87	Bu çalışma	Toplam oran	Bu çalışma oranı
Mutasyonun Adı									
c[35delG]+[35delG]	1/14	22/151	5/95	56/371	20/93	13/60	6/56	14.8	10.7
c[35delG]+[wt]	-	4/151	2/95	18/371	2/60	1/56	3.2	1.8	
c[35delG]+[IVS1+1G>A]	-	-	1/95	-	-	-	-	0.1	
c[35delG]+[167delT]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+[236_239delTGCAinsAGATCCG]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[W24X]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[T55N]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[R143W]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[P184R]	-	-	-	-	1/93	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[P184P]	-	2/151	-	-	-	-	-	0.2	
c[35delG]+[310del14]	-	-	-	1/371	1/93	--	-	0.2	
c[35delG]+p.[P173S]	-	-	-	-	1/93	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[L205V]	-	1/151	-	-	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[Q80K]	-	-	-	-	1/93	-	-	0.1	
c[35delG]+[328delG]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+[327-328delGGinsA]	-	-	-	-	-	-	1/56	0.1	1.8
c[35delG]+[333-334delAA]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+[299delAT]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+p.[Y155X]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c[35delG]+[delE120]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
p.[W24X]+p.[W24X]	-	-	-	-	3/93	-	1/56	0.5	1.8
p.[W24X]+[wt]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
p.[V27I]+[E114G]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.2	
p.[V27I]+[V27I]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.3	
p.[V27I]+[wt]	-	-	-	8/371	-	-	1/56	1.1	1.8
p.[M34V]+[wt]	-	1/151	-	-	-	-	-	0.1	
p.[G71A]+[G71A]	-	-	-	-	--	1/60	-	0.1	
p.[G71A]+[wt]	-	-	-	-	-	1/60	-	0.1	
p.[L90P]+[L90P]	-	1/151	-	-	-	-	-	0.1	
c.[299-300delAT]+[299-300delAT]	1/14	-	-	-	-	-	-	0.1	
p.[310del14]+[310del14]	-	-	-	-	1/93	-	-	0.1	
c[327-328delGGinsA]+[327-328delGGinsA]	-	-	-	-	-	-	1/56	0.1	1.8
p.[R184P]+[R184P]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
p.[R184P]+[wt]	-	-	2/95	-	-	1/60	1/56	0.5	1.8
p.[A239G]+[A239G]	-	-	-	-	-	1/60	-	0.1	
c.[delE120]+[delE120]	-	3/151	2/95	-	1/93	1/60	2/56	1.1	3.6
p.[V153I]+[wt]	1/14	1/151	-	-	-	1/60	2/56	0.6	3.6
c.[511insAACG]+[511insAACG]	-	-	-	1/371	-	-	-	0.1	
c.[IVS1+1G>A]+[IVS1+1G>A]	*	*	1/95	*	*	*	0/56	0.6	0.0

Ülkemizde IVS1+1G>A çalışma sonuçlarının bu çalışma ile karşılaştırılması^{88,19,84}
Tablo 3.10’ da verilmiştir.

Tablo 3.10. Ülkemizde IVS1+1G>A çalışma sonuçlarının bu çalışma ile karşılaştırılması

Mutasyon adı	Çalışılan kişi sayısı	Pozitif olgu	Oranı (%)	Referans
IVS1+1G>A	295	8	2.7	88
	63	2	3.1	19
	95	3	3.1	84
	56	0	0.0	Bu çalışma

Ülkemizde A1555G çalışma sonuçlarının bu çalışma sonuçları ile karşılaştırılması^{89,84}
Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11. Ülkemizde A1555G çalışma sonuçlarının bu çalışma sonuçları ile karşılaştırılması

Mutasyon adı	Çalışılan kişi sayısı	Pozitif olgu	Oranı (%)	Referans
A1555G	168	3	1.8	89
	95	0	0.0	84
	56	0	0.0	Bu çalışma

4. TARTIŞMA

İşitme kayıpları popülasyonda sık rastlanan, sendromik veya non-sendromik seyreden hastalıklardır. Dünyada 70 milyondan fazla işitme kaybından etkilenen birey olduğu düşünülmektedir. Pre-lingual veya konjenital işitme kaybı ise en sık rastlanan duyusal yitim olup, her 1000 yeni doğanda 1 gözlenebilmektedir⁹⁰.

Bebeklerin dil yeteneği, lisan becerilerini kazanabilmesi, çevreyle uyum ve iletişimi, zeka, sosyal ve duygusal gelişimi açısından işitme duyularının doğuştan itibaren normal sınırlarda olması gereklidir. Bu nedenle sağlıklı yenidoğanlarda en yaygın doğuştan anomaliler arasında gözlenen doğuştan işitme kayıpları ve nedenlerinin erken dönemde saptanması çok önemlidir.

Türkiye de sağırliğin etyolojisi üzerine en geniş kapsamlı çalışmalardan biri 840 sağır öğrencinin pedigrî analizlerinin yapıldığı çalışmadır. Bu çalışmada sağırliğin %51 oranında genetik kökenli olduğu %15 sonradan kazanılmış %34 probandda ise sağırlik nedeninin bilinmediği rapor edilmiştir.⁹¹ Gelişmiş ülkelerde genetik kökenli işitme kayıplarının %70–80 otozomal resesif, %10–20 oranında ise otozomal dominant kalıtıldığı bildirilmiştir. Kalıtsal işitme kayıplarının yaklaşık olarak % 30'u diğer organ ve yapı sistemlerini de etkileyen sendromik olgulardır. Tekin ve ark.⁴⁰'larının 3638 sağır çocuk üzerinde yaptığı bir çalışmada Türkiye'de genetik sebeplerin %76.8 oranında rol oynadığı non-sendromik olgularda ise kalıtsal işitme kayıplarının yaklaşık %93.4'ü otozomal resesif, %6.6 dominant kalıtıldığını belirtmişlerdir. Bu fark, popülasyonda oluşan yeni mutasyonların fenotipe yansıyan etkilerine akrabalığın uzun süreli etkide bulunması açısından iyi bir örnek oluşturmaktadır.

Çalışma grubumuzda yer alan olguların bir kısmının toplandığı Erzurum Dedekorkut İşitme Engelliler okulunda, Uslu ve ark.⁹² 2003 yılında 110 öğrenci üzerinde yaptıkları çalışmaya göre işitme kayıplarının, %46.4 postnatal enfeksiyonlar ve travmalar, %37.3 oranında genetik nedenler ve %9.1 oranında prenatal ve/veya perinatal nedenler olduğu görülmüştür. Postnatal nedenler arasında en çok, tanımlanamayan ateşli hastalık (%33.7) ve menenjit (%10.9) bulunmuştur. Genetik nedenler, pedigrî analizlerine dayanılarak incelendiğinde otozomal resesif sağırlik %80.5, otozomal dominant sağırlik %14.5, X'bağılı geçiş %2.5 ve maternal kalıtsal

mitokondrial sağırlıklar %2.5 oranında tespit edilmiştir. Çalışmada sendromik sağırlıklara rastlanmamıştır.

Bu veriler dikkate alınarak kendi çalışmamızda olgu grubunun özellikleri belirlenirken iki önemli nokta, non-sendromik ve sensörinöral işitme kaybı, ön planda tutuldu ve bu kıstaslara uyan bireyler çalışmamıza dahil edildi. Hastalığın genetik nedenlere dayandırılması için her aileden alınan ayrıntılı soygeçmiş, ailede birden fazla sağır birey olması kalıtsal işitme kaybını destekleyici sonuçlar alınmasını sağladı.

Non sendromik otozomal resesif işitme kaybına yol açan yaklaşık 114 bölge tanımlanmıştır.⁴⁸ Sendromik olmayan işitme kayıplarının en sık genetik nedeni DFNB1 lokusunda bulunan *GJB2* (connexin 26) genindeki homozigot veya birlesik heterozigot mutasyonlardır. *GJB2* deki mutasyonlar non-sendromik resesif sağırlığın en yaygın sebebi olmakla birlikte mutasyonlar sporadik durumların da en önemli sebebidir.¹¹

Bazı *GJB2* mutasyonları bazı populasyonlarda yüksek prevalans gösterirler. Örneğin; 35delG Avrupa’da⁹³, 167delT Aşkenazi Yahudilerinde⁹⁴, 235delC Doğu Asya toplumlarında⁹⁵ W24X Çingenelerde⁹⁶ ve R143W Afrika’da yüksek oranda görülmektedir.⁹⁷ Çalışmamız ve diğer bölgesel çalışmalar toplumumuzdaki mutasyon prevalansını yansıtmaya yardımcı olacağını düşünüyoruz.

İşitme kaybı olan kişilerde *GJB2* geninin moleküler analizi 2 ekzondan oluşan küçük bir genin araştırılması ile sağlanır. Bu yüzden diagnostik testlerde genin analizi kolaydır. Bu ekzondan sadece biri protein kodlar. Bu protein Connexin 26 (Cx26) dır. Cx26 proteini connexon yapısına diğer connexinler ile birlikte girerek “gap junction” yapılarını oluşturmaktadır. Son bulgular göstermiştir ki connexinler birçok yerde ifade edilmelerine rağmen tek ve spesifik fonksiyonlara sahiptir. Her bir connexin izoformu farklı doku dağılımına sahip olup ekprese edildikleri çeşitli hücrelerin birçok farklı spesifik ihtiyaçlarını sağlamada gereklidirler.

Anormal Cx26 ekspresyonuna yol açan yaklaşık 150 den fazla *GJB2* mutasyonu, polimorfik değişim ve hastalık ile ilişkisi henüz belirlenemeyen değişiklikler bildirilmiştir. Bu bölgedeki mutasyonları truncate ve nontruncate olmak üzere ikiye ayırabiliriz. Homozigotlarda truncate mutasyonlar Cx26’nın tamamen ekspresyon kaybına yol açarken heterozigotlarda bazen ekspresyonun normal olmasına yada çoğunlukla azalmasına neden olur. Truncate mutasyonlar nonsense (stop) mutasyonlar,

splice-site, insersiyon ve delesyonların sebep olduğu frameshift mutasyonlardır. Nontruncate mutasyonlar okuma çerçevesini değiştirmeyen insersiyon ve delesyonlar, oluşan proteinlerin hücre içi trafiğini ve post translasyonel işlenmesini değiştirmeyen anormal aminoasid değişimlerini içeren missense mutasyonları içermektedir.

GJB2'deki mutasyonlar araştırılırken, işitme kayıplı bireylerde fenotip farklılıkları dikkate alınmadı. *GJB2*'deki mutasyonlar ve işitme kaybı arasındaki ilişki çok iyi anlaşılmasına rağmen genotip ile fenotip arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Temporal kemik CT taramasında anormallik ve vestibuler anormallikler ile ilişki bulunamamıştır. *GJB2*'deki mutasyonlardan kaynaklanan sağırılık sık sık ileri veya çok ileridir, aileler içinde bile işitme kaybının ağırlığında önemli varyasyonlar görülebilir. Sağırılık genellikle stabildir ama ilerleme gösterdiği de rapor edilmiştir. Çoğunlukla prelingual görülür fakat her zaman konjenital değildir, işitme doğumda olabilir, yaşamın ilk birkaç ayı süresince hızlı ilerleme göstererek işitme kaybı yaşanır. *GJB2* geninde mutasyon taşıyan bazı bebekler yeni doğan işitme testini geçse de çocukluk süresince sağırılık ilerleyebilir.^{5,98,99}

GJB2 geninin çalışılmaya değer görülmesinde en önemli noktalar, korti organında gen ifadesinin yaygın görülmesi ve non-sendromik olgular arasında en sık mutasyon bulunan gen bölgesi olmasıdır.

İşitme kaybına katkıda bulunması açısından *GJB2*'nin kodlama yapmayan bölgelerindeki değişimler önem arz etmektedir. İşitme engelliler arasında *GJB2* geninin intron bölgesinde bulunan IVS1+1G>A (-3172G>A) mutasyonu *GJB2* mutasyonlarını heterozigot taşıyan kişilerde işitme kaybına yol açmaktadır. Tekin ve ark.¹⁰⁰'larının yaptığı çalışmada *GJB2* geninin kodlayan ekzonunda yalnızca heterozigot mutasyon bulunan olguların yarısında IVS1+1G>A mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur. Çalışmamızda *GJB2* çalışılan olguların tümünde intron bölgesindeki bu mutasyonun çalışılması hedeflendi ve heterozigot olan bireyler de işitme kaybına katkıda bulunup bulunmadığı araştırıldı.

Non sendromik sağırılığın bilinmeyen sebebini teşhis etmede işitme kayıplı bireylerde ekstra kromozomal mutasyonlarda araştırılmaktadır. MtDNA da 12S rRNA geninde mutasyon taşıyan bebekler yeni doğan işitme testini geçebilirler ama aminoglikozid türevi antibiyotik kullanımı çocukluk süresince sağırılığa neden olmaktadır. Bizde çalışmamızda tüm probandlarda 12S rRNA bölgesindeki A1555G

mutasyonunu çalışarak, toplumumuzda mitokondrial mutasyonların işitme kayıplarındaki rolüne ilişkin veri elde etmeye çalıştık.

GJB2 ikinci ekzon bölgesinde çeşitli populasyonlarda sıklıkla saptanmış 11 farklı mutasyon (35delG, 167delT, 235delC, delE120, W24X, M34T, L90P, R184P, Q124X), promoter bölge (IVS 1+1 G>A) ve mtDNA 12S rRNA (A1555G) bölgesindeki mutasyonlar mikrodizin analiz yöntemi ile araştırıldı. *GJB2* ekzon2 bölgesinde mutasyon bulunamayan veya heterozigot mutasyon bulunan olgularda DNA dizi analizi yöntemine başvuruldu. Bu bölgede yer alan tüm değişimler gözlemlenebildi.

Sonuç olarak sağırlığa neden olan 5 farklı mutasyon (35delG, delE120, 327-328delGGinsA, W24X, R184P) ve iki polimorfizm (V27I, V153I) bulundu.

35delG mutasyonu: Homozigot 35delG en sık mutasyon olarak görülmüştür (56 probandin 6'sında). Bu mutasyonun bizim ve diğer çalışmalarda yüksek bulunmasının sebepleri, mutasyonun Orta Doğu'dan köken aldığı ve popülasyon gleriyle Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmüştür.⁴⁹ Beyaz ırkta 35delG mutasyonunun, bir 'hot spot' bölge olabileceği düşünülmüştür. İkinci ekzonun 30-35. nükleotidleri arasında altı G tekrarı olması, DNA polimeraz alfa için bir hata noktası olabileceğini ve bununda mutasyonel hot spotlara neden olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak SNP belirteçleri kullanılarak yapılan diğer araştırmalar göstermiştir ki; 35delG bir 'hot spot' mutasyondan çok 'founder effect' ile populasyonda frekansı artmış bir mutasyondur. İşitme kayıplı bireylerin birbirleri ile seçimli olarak birleşmesi, gen havuzunda bu patolojik allellerin artmasına, toplumlardaki mutasyon sıklıklarının genetik kuralları bağlı kalmaksızın yüksek çıkmasına neden olmaktadır.⁵¹ Ayrıca kistik fibrozisde görüldüğü gibi heterozigot avantaj gösterdiği düşünülmektedir.¹⁰¹ Bu mutasyon kodon 12 de bulunan glisin aminoasidinin valine dönüşmesine neden olarak erken bir stop kodon oluşmasına neden olmaktadır. Mutasyon bazen 30delG olarak da isimlendirilmektedir. Bu mutasyon için homozigot olan kişilerin klinik fenotipleri orta derecede işitme kaybından çok ileri derece işitme kaybına kadar değişebilmektedir. Bizim alışmamızda 35delG mutasyonunu homozigot yada heterozigot taşıyan bireylerin %88'i çok ileri derecede işitme kaybı göstermektedir. Aynı aile içerisinde 35delG'yi heterozigot taşıyan işitme kayıplı olan kardeşler arasında işitme derecesinde farklılık görülmüştür. Bu kardeşlerden biri çok ileri derece işitme kaybına sahipken

diğeri orta derecede işitme kaybına sahiptir. Buna neden olarak genetik modifiye edici faktörler ve çevrenin rolü olduğu düşünülmektedir.

Anormal Cx26 ekspresyonuna 35delG mutasyonun katkısının araştırıldığı 1998-2008 yıllarını kapsayan meta analiz çalışmasında 23187 birey (rastgele seçilmiş kontrol) üzerinde 35delG'nin taşıyıcı frekansı araştırılmış en yüksek Avrupa (%1.89) da en düşük Doğu Asya (%0.125) populasyonlarında gözlenmiştir.¹⁰² 17 avrupa ülkesinde yapılan diğer bir çalışmada 35delG'nin ortalama taşıyıcı frekansı 1.96(1/51) bulunmuştur. Kuzey Avrupa'ya doğru gidildikçe bu oranın %2.86 olduğu görülmüştür.⁵⁰ 35delG'nin taşıyıcı frekansı Yunanistan (%3.5), Güney İtalya (%4.0), Fransa (%3.4) gibi Akdeniz populasyonlarında daha da yüksektir.¹⁰³ Avrasya bölgesinde 2308 sağlıklı bireyi içeren 18 etnik populasyon ile yapılan çalışmada Türkçe konuşan Kazak (%0.8), Uygur (%0.9), Yakut (%0.4) toplumlarında 35delG frekansı düşük bulunmuştur. Özbek ve Altay toplumlarında ise bu mutasyona hiç rastlanmamıştır. Yine Başkır (%0.3) ve Tatar (%1) larda 35delG düşük oranda görülmüştür.¹⁰⁴ Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar, 35delG'nin popülasyondan rastgele seçilmiş bireylerdeki taşınma sıklığının % 1.3 ila %1.8 aralığında olduğunu ortaya koymuştur.¹⁰⁰ Non sendromik işitme kayıplarında 35delG mutasyonunun Türkiye'de en yaygın patojenik allel olduğu gösterilmiştir.^{86, 87, 100}

Bizim çalışmamızda en sık olarak saptanan 35delG heterozigot ve homozigot mutasyonların tüm olgular arasındaki oranı %14.3, allelik frekansı %13.4 (112 allel için) olarak bulundu (Probandlar; 19, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37). Ülkemizde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada saptanan oranın, 35delG mutasyonunu taşıyan bireyler için uyumlu olduğu gözlemlendi. Cx26 için mutasyon çalışmalarında en sık rastlanan mutasyon 35delG olup, Kalay ve ark.⁸⁶ tüm olgular içindeki oranı %17.5, Tekin ve ark. %21.7 bulmuştur.^{105, 106}

Tekin ve Arıcı⁴⁰ Türk populasyonunda sağlıklı bireyler arasında 35delG'nin heterozigotluk frekansını %1.78 bulmuştur. Rastgele evliliklerde homozigotların frekansı 0.00007921, birinci dereceden kuzen evliliklerinde 0.00063051 olarak bulunmuştur. Bu yüzden 35delG için homozigot olma riski akraba olan ailelerin çocuklarında birinci dereceden akraba olmayanlara göre 7.96 kat daha yüksektir. 35delG mutasyonu açısından Türkiye'nin homojen bir yapı göstermediğini, Türkiye'nin batısı ile doğusu arasında önemli derecede fark olduğunu, akraba evlilik

oranı yüksek olmasına rağmen 35delG homozigot frekansının doğuda daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda 56 probandda 35delG için homozigot frekansı %10.7 bulunmuştur. Ayrıca *GJB2*'de homozigot yada birleşik heterozigot mutasyon taşıyan probandlarda yaklaşık %16 oranında akraba evliliği hikayesi olduğu görülmektedir.

delE120 mutasyonu: 120. kodonda sitoplazmik alanda iki korunmamış bölgedeki glutamik asidin (358_360delGAG) delesyonu sonucu oluşur. İlk olarak Avrupa toplumlarında rapor edilmiştir.⁹⁸ Mutant delE120 defektif aktivite gösterse de çoğunlukla membran da bulunur çok az miktarda sitoplazmada bulunduğu gözlenmiştir.

107

Çalışmamızda (5, 25 ve 30. probandlarda) delE120 mutasyonu belirlenmiştir. 5 nolu probandın anne babası delE120 mutasyonunun taşıyıcısı durumdayken, orta derecede işitme kaybı (sol 40 dbL, sağ 50 dbL) görülen çocuk bu mutasyonu homozigot taşımaktadır. Ayrıca ailede akraba evliliği öyküsü bulunmaktadır. 25 nolu probanda aynı şekilde anne baba taşıyıcı, üç çocuğunda delE120 mutasyonunu homozigot taşıdıkları belirlenmiştir. Bir çocuktaki işitme testine göre sağ 85dbL sol kulak ise 100 dbL işitme kaybı tespit edilmiştir. Anne baba akraba evliliği yapmıştır. İleri derecede işitme kaybı olan 30 nolu probandın bu mutasyonu 35delG ile birleşik heterozigot taşıdığı belirlenmiştir. Kardeşinde de benzer durum tespit edilmiştir. Kardeşinde işitme kaybı (Sol 75 dbL sağ 100 dbL) olarak tespit edilmiştir. Ailede akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır.

Bu çalışmada mutasyonun hastalarda heterozigot ve homozigot taşınma oranı %5.4 bulunmuştur. Bölgede 35delG den sonra en sık rastlanan ikinci mutasyondur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda, bu mutasyon açısından hem homozigot bireylerin hemde sağlıklı kişiler içerisinde taşıyıcıların yüksek oranda olduğu görülmüştür.^{83,85} Diğer ülkelerdeki çalışmalarda bu mutasyon birleşik heterozigot olarak bildirilmiş, sadece Almanya da yapılan bir çalışmada homozigot mutasyon taşıyan bir kişi rapor edilmiştir. Bu kişinin de etnik orjini bildirilmemiştir. Bu mutasyonun diğer popülasyonlarda taşıyıcı frekansının belirlenmesi, kişilerin aynı orjinden köken alıp almadığını anlama açısından önem taşımaktadır. Gen havuzunun oluşumunda atasal faktörlerin “founder effect” izleri görülebilir.⁸⁵

W24X mutasyonu: W24X mutasyonun da 24.aminoasitte erken bir stop kodon oluşur ve protein hücre içinde yerleşim gösterir.¹⁰⁷

W24X mutasyonu ilk olarak Pakistanlı iki ailede tanımlandı.⁴ Slovak ve İspanyol çingelerinde ve Hint populasyonunda en yaygın (%2.4) connexin 26 mutasyonudur.¹⁰⁸ Uyguner tarafından Türk populasyonunda tanımlanmıştır⁸⁷. Kalay ve ark.⁸⁶ W24X'in Türk populasyonda sık rastlanan ikinci mutasyon olduğunu, *GJB2* mutasyonlarının %10'undan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada bir olguda (3. proband) saptanan homozigot W24X mutasyonu, heterozigot mutasyon taşıyıcısı anne-baba tarafından üç çocuğundan sadece probanda aktarılmış, bir çocuğun ise bu mutasyonu heterozigot taşıdığı mikrodizin analizi ile belirlenmiştir. Ailede sadece proband ileri derecede işitme kayıplı olup, anne-baba akraba evliliği yapmıştır.

R184P mutasyonu: İlk kez Denoyelle ve ark.⁹³ tarafından Avusturalyalı bir ailede delE118 ile birleşik heterozigot olarak tanımlanan bu mutasyon, 551. nükleotidde guanin yerine sitozin gelmesi sonucu 184.kodonda korunmuş bölgedeki arjininin proline dönüşmesi sonucu oluşur. R184P mutasyonu connexon-connexon etkileşiminde ikinci ekstrasellüler alanda bulunmaktadır. Connexonların bir araya gelmesini etkileyerek hızlı yıkımlarına neden olur. Daha önce dünyada %0.74 ve Türkiye de yapılan çalışmalarda R184P mutasyonu %0.2, bu çalışmada ise allel frekansı %0.9 oranında bulunmuştur.^{81, 109}

Çalışmamızda bir olguda (17.proband) heterozigot saptadığımız R184P değişimi, mutasyonu heterozigot olarak taşıyan, işitme kaybı olmadığını bildiğimiz baba tarafından iki çocuğuna da aktarılmıştır. Anne de işitme kaybı bulunmamaktadır fakat ailesinde işitme kaybı olan bireyler bulunmaktadır. Anne ve baba arasında akrabalık bulunmamaktadır. Proband ileri derece işitme kaybı gösterirken diğer iki kardeşin birinde sol kulakda ileri derecede sağ kulakta orta derecede işitme kaybı tespit edilmiştir. Diğer kardeşin ise orta derece işitme kaybına sahip olduğu görülmüştür.

Literatürde Tanımlı Olmayan DNA dizi analizi ile tespit edilen yeni Değişimler

327-328delGGinsA (p.E110RfsX2) mutasyonu: c.327delGGinsA değişimini daha önceden bildiren bir çalışma bulunmamaktadır.⁴⁸ Ancak Tekin ve ark.⁸⁵ 2005 yılında 371 proband üzerinde yaptıkları çalışmada iki kardeşte 35delG ile birlikte 328. nükleotidde guanin nükleotidinin delesyonunu bildirmişlerdir. Anne ve baba bu mutasyonların heterozigot taşıyıcısı bulunmuştur. 327delG, 324-328. nükleotidler arasında tekrar eden 5 guanin tekrarının olduğu bölgede, 327. nükleotiddeki guanin nükleotidin delesyonu sonucu 109. kodonda çerçeve kaymasına neden olmuştur. Bu şekilde tekrarlayan diziler DNA mutasyonlarının sıklıkla görüldüğü noktalardır (hot spots). Ayrıca 328. nükleotidde guanin yerine adenin gelmesi sonucu 110. kodonda korunmamış bölgedeki glutamikasit arjinine dönüşmüştür. Bu değişim (p.E110RfsX2) connexin 26 proteinin sitoplazmik alanında yer almaktadır.

327-328delGGinsA (p.E110RfsX2) mutasyonunun allel frekansı %2.7 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada değişim 37. ve 28. probandlarda görülmektedir. İşitme kaybının ileri olarak belirlendiği bir probandda, birinci derecede akraba evliliği yapan anne ve baba bu mutasyonu heterozigot taşıırken çocukların her ikisinde homozigot olarak bulunmuştur. Çok ileri işitme kaybı olan bir probanda ise 35delG ile birlikte birleşik heterozigot olarak bulunmaktadır. Bu probandın babasında 327-328delGGinsA homozigot bulunmuştur.

Connexin 26'nın ekzon 2 bölgesinde saptanan polimorfizmlerin değerlendirilmesi

V27I polimorfizmi: 79. nükleotidde guanin yerine adenin gelmesi ile birinci transmembran bölgede 27. kodondaki valinin izolösine dönüşmesi sonucu oluşur. İlk kez 96 kontrol ile yapılan çalışmada tek bir hastada belirlenmiştir.⁸⁵ Avrupa toplumlarında sıklığı %'1'in altında bulunmuştur.¹⁰⁹ Bizim bulgularımızdaki allel frekansı da %'1'in altındadır. V27I Asya toplumlarında V37I dan sonra yaygın ikinci polimorfizmdir. Çinliler üzerinde yapılan bir çalışmada 100 kişiden oluşan kontrol grubunda 8 kişi de (%8) bu polimorfizme rastlanmıştır.¹¹⁰ Asya toplumlarındaki bu yüksek oranın "founder effect" nedeni ile olabileceği düşünülmektedir.

V153I polimorfizmi: 171. nonpolar alanin aminoasidi ile polar özellik taşıyan threonin ikinci ekstrasellüler alanda yer değiştirmektedir. Bazı çalışmalarda mutasyon bazılarında ise polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Örneğin DHPLC tekniği ile yapılan bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi bir hastada heterozigot mutasyon tespit edilmiştir. Hastada cochlear sinirde apilazi, internal işitme kanalında daralma gibi radyolojik bulgular ile ilişki gösteren çok ileri işitme kaybı bildirilmiştir. Bu değişimin hem dominant hem de resesif etki gösterdiği düşünülmektedir.¹¹¹ Tüm Avrupa ülkelerini (16 ülke) kapsayan 1531 olgudan oluşan çalışmada allelik frekans 3062 allelede %0.16(5 allele) olarak bildirilmiştir.¹⁰⁹ Ülkemizde 14 aile yapılan bir çalışmada sadece 2 hastada bulunmuş ve polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.⁸² Bizim çalışmamızda V153I 56 probandin ikisinde heterozigot olarak bulunmuş, allel frekansı 1.8 belirlenmiştir.

GJB2 geninde tanımlanan dizi değişimlerinin çoğu genin ikinci ekzonunda birkaçı da genin kodlanmayan bölgesinde saptanmıştır. Genin kodlanmayan bölgesinde saptanan iki mutasyon donor splay bölgesi resesif mutasyonlarıdır. Kodlanmayan bölge değişimlerinin geri kalanı ekzon1'in yukarı bölgesinde, ekzon 1'de, intronda, ekzon 2'nin 5'UTR yada 3'UTR bölgesinde saptanmıştır. Bu çalışmada kodlamaya yapmayan bölgede yer alan IVS1+1G>A değişimine hiçbir olguda rastlanmamıştır.

Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kayıplı 56 probanddan oluşan çalışma grubumuzda her iki allelinde *GJB2* mutasyonu saptanan proband sayısı 12 dir. Literatürde *GJB2* genindeki mutasyonları sendromik işitme kayıplı vakaların yarısından fazlasından sorumlu olduğu gösterilsede, bu çalışmada her iki allelinde *GJB2* mutasyonu taşıyan birey % 21.4, bir allelinde mutasyon taşıma oranı %3.6 bulunmuştur. Çalışmaya katılan hasta grubunun büyük bir bölümünün sağırılık ile ilgili patolojileri saptanamamıştır. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, Türk toplumunda *GJB2* geni dışındaki genlerin sağırılık üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

İşitme Kaybının Fenotipe Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada yer alan işitme kayıplı bireyler işitme kaybı aralıklarına göre sınıflandırıldıklarında olguların yaklaşık %40'nın çok ileri derecede, %35'nin ise ileri derecede duyu yitimi gösterdikleri görüldü. 35delG homozigot ve farklı bir mutasyon için birleşik heterozigot olan probandlar 35delG'den farklı iki mutasyon için heterozigot

olan probandlardan daha yüksek işitme kaybına sahip oldukları görülmektedir. 35delG homozigot mutasyon taşıyan probandların iki kulak arasında bile işitme kayıplarının farklı olduğu görülmektedir. Bu probandların kardeşleri arasında aynı mutasyonu taşımalarına rağmen farklılık görülmektedir. Buna neden olarak birden fazla modifiye edici genin işitme üzerine etkisinin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada saptanan 327-328delGGinsA mutasyonlu olgularda, çok ileri derecede işitme kaybı görülmektedir.

12S rRNA Bölgesindeki A1555G Mutasyonunun Değerlendirilmesi

Yaklaşık 10 yıldır açıklığa kavuşmuş olan maternal kalıtmalı işitme kaybının önemi mitokondrial genomdaki mutasyonlar nedeniyle. Mitokondrial bir mutasyon olan A1555G mutasyonunun aminoglikozid antibiyotiklere maruziyete bağlı işitme kaybı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu mutasyon 12S rRNA geninde oluşmakta ve işitme kayıplarında en sık görülen mitokondrial mutasyon olarak bilinmektedir.

Amerika da her yıl yaklaşık 4 milyon kişi aminoglikozid türevi antibiyotik kullanmakta, bu antibiyotikler ile tedavi gören hastaların %2-5'inde işitme kaybı olduğu bilinmektedir. Çinde ise bu antibiyotiklerin kullanımı daha da yaygındır. Bütün sağırın %22'sinin bu tür antibiyotikleri kullandıkları için işitme kaybına uğradığı belirtilmiştir.⁶¹

A1555G İspanya ve bazı Asya populasyonlarında da %2.4 sıklıkla görülen yaygın mutasyon olarak rapor edilmiştir. A1555G mutasyonun insidansı Japonlarda %33, üç Çinli grupta %13, %10.4, %5, birkaç beyaz ırk üzerinde yapılan çalışmada ise %0.3-%2.5 arasında bulunmuştur.^{63, 71, 112, 113}

Türkiye'de Tekin ve ark.⁸⁹'larının yaptıkları çalışmada 35delG negatif olan 168 probandda A1555G mutasyonu araştırılmış ve prevalansı %1.8 olarak bulunmuştur.

Yapmış olduğumuz araştırma sonucunda 9 hastanın çocukluk döneminde antibiyotik tedavisi aldığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda olguların hiç birinde bu mutasyona rastlanmamıştır.

Diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında ülkemizde aminoglikozid tedavisi başlanmadan önce ailede bu mutasyon ile ilişkili bir öykünün

olup olmadığı sorgulanmalıdır. Aminoglikozitlere bağlı işitme kaybına neden olan bu mutasyonun Türkiye’de varlığı bu tür antibiyotiklerin kullanımının daha dikkatli yapılmasını gerektirmektedir.

Kullanılan Yöntemin Değerlendirilmesi

Literatürde *GJB2* gen bölgesinde bulunan nükleotid değişimlerini saptamak için, restriksiyon enzimlerinin kullanımı (RFLP), allele spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (ASPCR), tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP), heterodupleks analizi, DHPLC, ELISA ve DNA dizi analiz gibi birçok strateji kullanılmıştır. Bu metodlardan SSCP ve heterodupleks analizi kullanılan en popüler metodlar arasındadır. Bu çalışmada kullanılan mikrodizin analiz metodu heterodupleks metodlardan biridir. Toplumda sıkça rastlanan değişimlerin kısa sürede belirlenmesine imkan vermektedir. Ancak işitme kayıplı bireylerde az rastlanan veya daha önce hiç rastlanılmamış mutasyonların belirlenmesinde kullanılması gereken altın standard metod DNA dizi analiz yöntemidir. *GJB2* gen bölgesinin tek ekzondan oluşması ve küçük bir alanı içermesi DNA dizi analizinin düşük bir maliyet ile ve kısa sürede yapılmasına imkan vermektedir.

SONUÇLAR

Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kayıplı 56 probanddan oluşan çalışma grubumuzda her iki allelinde *GJB2* mutasyonu saptanan proband sayısı 12 dir. Toplumumuzda sağırılık ile ilişkili olarak her iki allelinde *GJB2* gen mutasyonu taşıyanların oranı %21.4, tek allelinde mutasyon taşıyanların oranı %3.6 bulunmuştur. Araştırmada elde edilen veriler bölgemizde sendromik olmayan işitme kayıplarında *GJB2* mutasyonlarının önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. Bu sonuçlar gözönüne alınarak laboratuvarımızda *GJB2* mutasyon taraması DNA dizi analizi yöntemi ile rutin olarak yapılmaya başlanmıştır.

Özellikle 35delG (%10.7) mutasyonunun sık görüldüğü bu popülasyonda sendromik işitme kaybı olgularında yapılacak genetik analizler için en iyi strateji, ilk olarak *GJB2* genindeki 35delG mutasyonunun taranmasıdır. 35delG mutasyonunun saptanamadığı hastalarda *GJB2* geni, DNA dizi analizi yapılarak diğer mutasyonlar açısından analiz edilmelidir.

Elde edilen sonuçlar kodlayan ve kodlamayan ekzonları taradıktan sonra, *GJB2* geni heterozigot kalan işitme engellilerde işitme kaybının başka bir nedenle oluştuğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada *GJB2* geninin sadece ekzon 2 bölgesi DNA dizi analizi ile taranmıştır. Kodlama yapılmayan bölgede ise en yaygın görülen değişim (IVS1+1G>A) tespit edilmeye çalışılmıştır. Bölgemizde bu mutasyona rastlanmamıştır. İşitme kaybına neden olan diğer bölgelerin de ayrıntılı biçimde incelenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kullanılan mikrodizin analiz metodu ile mtDNA da bulunan A1555G mutasyonuna bölgemizde rastlanmamıştır. Aminoglikozitlere bağlı işitme kaybına neden olan bu mutasyonun Türkiye’de varlığı diğer çalışmalarda gösterilse de çalışılan işitme kayıplı hastalarda ve ailelerde bu mutasyona rastlanılmamıştır. Bu bölgedeki diğer değişimlerin işitme kaybına neden olabileceği bu yüzden DNA dizi analizi ile daha ayrıntılı analiz edilmesi gerekmektedir.

Milli Eğitim Bakanlığının 2009-2010 yılı kayıtlarına göre işitme engellilere eğitim veren 66 okulda toplam 6420 öğrenci eğitim görmektedir. Okullarda yapılan bu çalışmaların sonuçları Sağlık Bakanlığı ile paylaşılabilir. İşitme engelli çocuklar ve aileleri hastalığın genetik sonuçları hakkında bilgilendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, et al. Phenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:517-24.
2. Morton CC, Nance WE. Current concepts: Newborn hearing screening - A silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354:2151-64.
3. Lingala HB, Penagaluru PR. Role of connexin 26 (GJB2) & mitochondrial small ribosomal RNA (mt 12S rRNA) genes in sporadic & aminoglycoside-induced non syndromic hearing impairment. *Indian J Med Res* 2009; 130:369-78.
4. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997 387:80-3.
5. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 2002;63:73-94.
6. Guyton, AC, Hall, JE. *Tıbbi Fizyoloji*, (Çeviri Editörü: Çavuşoğlu H) İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi, 2001;602-611
7. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, (Çeviri Editörü: Demir R) İstanbul Palme Yayıncılık, 2006;250-263
8. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet* 2009;43:411-37.
9. Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000;342:1101-9.
10. Spicer SS, Schulte BA. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 1996;100:80-100.
11. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 2001;35:589-646.
12. Willems PJ. Mechanism of disease: Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000;342:1101-9.
13. Groves AK. The challenge of hair cell regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235:434-46.
14. Abreu Alves FR, Quintanilha Ribeiro Fde A. Diagnosis routine and approach in genetic sensorineural hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007;73:412-7.

15. Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *J Mol Diagn* 2004;6:275-84.
16. Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med* 2006;12:57-64.
17. Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:341-402.
18. Liu XZ, Pandya A, Angeli S, et al. Audiological features of GJB2 (connexin 26) deafness. *Ear and Hearing* 2005 ;26:361-9.
19. Hismi BO, Yilmaz ST, Incesulu A, Tekin M. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: Variability is present for all genotypes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1687-94.
20. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med* 2007;9:393-408.
21. Tümer S. Kalıtsal ve Non-sendromik işitme kaybı olgularının aday lokuslardaki mutasyonel analizi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2007.
22. Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet* 2002;11:1229-40.
23. Martini A, Calzolari F, Sensi A. Genetic syndromes involving hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;1:S2-12.
24. Silan F, Demirci L, Egeli A, et al. Syndromic etiology in children at schools for the deaf in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004;68:1399-406.
25. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003;9:109-19.
26. Gregory MC. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy: unraveling the tangled strands of type IV collagen. *Kidney Int* 2004;65:1109-10.
27. Kochhar A, Fischer SM, Kimberling WJ, et al. Branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;43:1671-8.
28. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997;17:411-22.
29. Lee JR, White TW. Connexin-26 mutations in deafness and skin disease. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e35.

30. Tuncbilek E. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr* 2001;43:277-9.
31. Martinez AD, Acuna R, Figueroa V, et al. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxid Redox Signal* 2009;1:309-22.
32. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* 2006;397:1-14.
33. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238:1-27.
34. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84:381-8.
35. Thonissen E, Rabionet R, Arbones ML, et al. Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet* 2002;111:190-7.
36. Nickel R, Forge A. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16:452-7.
37. Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res* 2000;462:197-207.
38. Forge A, Becker D, Casalotti S, et al. Gap junctions in the inner ear: Comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J Comp Neurol* 2003;467:207-29.
39. Valiunas V, Polosina YY, Miller H, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 2005;568:459-68.
40. Tekin M, Arici ZS. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet A* 2007;143:1583-91.
41. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, et al. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:163-6.
42. Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, et al. Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol* 2006;209:177-86.
43. Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, et al. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P-3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol* 2005;7:63.

44. Gerido DA, White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim Biophys Acta* 2004;1662:159-70.
45. Guilford P, Benarab S, Blanchard S, et al. A Non-Syndromic Form of Neurosensory, Recessive Deafness Maps to the Pericentromeric Region of Chromosome-13q. *Nat Genet* 1994;6:24-8.
46. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006;69:371-92.
47. Tu ZJ, Kiang DT. Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:169-81.
48. Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, et al. Connexins and deafness, (Çevrimiçi) <http://davinci.crg.es>, 18.09.2010 .
49. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001;8:515-8.
50. Lucotte G, Mercier G. Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test* 2001;5:149-52.
51. Nance WE, Liu XZ, Pandya A. Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness. *Lancet* 2000;356:500-1.
52. Mahdieh N, Rabbani B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: A meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol* 2009;48:363-70.
53. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. Wiley-Liss, 1999.
54. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature*. 1981;290:457-65.
55. Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial Ribosomal-Rna Mutation Associated with Both Antibiotic-Induced and Non-Syndromic Deafness. *Nat Genet* 1993;4:289-94.
56. Estivill X, Govea N, Barcelo A, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet*. 1998;62:27-35.
57. Sinnathuray AR, Raut V, Awa A, et al. A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2003;24:418-26.
58. Xing GQ, Chen ZB, Cao X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell Res* 2007;17:227-39.

59. Guan MX, FischelGhodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 1996;5:963-71.
60. Lortholary O, Tod M, Cohen Y, et al. Aminoglycosides. *Med Clin North Am* 1995;79:761-87.
61. Guan MX. Mitochondrial DNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*. 2010; Basım aşamasında
62. Davies J, Davis BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem*. 1968;243:3312-6.
63. Usami SI, Abe S, Shinkawa H, et al. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: Special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord* 1998;31:423-35.
64. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr* 2003;162:154-8.
65. Guan MX. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Mitochondrial Pathogenesis: From Genes and Apoptosis to Aging and Disease* 2004;1011:259-71.
66. Finnila S, Majamaa K. Lack of a modulative factor in locus 8p23 in a Finnish family with nonsyndromic sensorineural hearing loss associated with the 1555A>G mitochondrial DNA mutation. *Eur J Hum Genet* 2003;11:652-8.
67. Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1927-37.
68. Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, et al. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA^{Ser}(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:219-26.
69. Malik SG, Pieter N, Sudoyo H, et al. Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia. *J Hum Genet* 2003;48:480-3.

70. Hutchin TP, Thompson KR, Parker M, et al. Prevalence of mitochondrial DNA mutations in childhood/congenital onset non-syndromal sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 2001;38:229-31.
71. Gallo-Teran J, Morales-Angulo C, del Castillo I, et al. Incidence of A1555G mutations in the mitochondrial DNA and 35delG in the GJB2 gene (connexin-26) in families with late onset non-syndromic sensorineural hearing loss from Cantabria. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002 ;53:563-71.
72. Jacobs HT, Hutchin TP, Kappi T, et al. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet* 2005;13:26-33.
73. Dzhemilova LU, Posukh OL, Tazetdinov AM, et al. Analysis of mitochondrial 12S rRNA and tRNA (Ser(UCN)) genes in patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss from various regions of Russia. *Russ J Genet* 2009;45:861-9.
74. Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Louhichi N, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser(UCN)} genes in Tunisian patients with nonsyndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1251-8.
75. Kokotas H, Grigoriadou M, Korres GS, et al. The A1555G mitochondrial DNA mutation in Greek patients with non-syndromic, sensorineural hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:755-7.
76. Edman CF, Raymond DE, Wu DJ, et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4907-14.
77. Santacroce R, Ratti A, Caroli F, et al. Analysis of clinically relevant single-nucleotide polymorphisms by use of microelectronic array technology. *Clin Chem* 2002;48:2124-30.
78. Keen-Kim D, Grody WW, Richards CS. Microelectronic array system for molecular diagnostic genotyping: Nanogen NanoChip 400 and molecular biology workstation. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:287-94.
79. Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, et al. Single-nucleotide polymorphism and mutation identification by the nanogen microelectronic chip technology. *Methods Mol Med* 2005;114:93-106.
80. Nanochip Standard SNP Research Application Note: Amplicon-down format with thermal discrimination. San Diego,CA: Nanogen,Inc.2002.

81. Tekin M, Arici ZS. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: Population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet A* 2007;143:1583-91.
82. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, et al. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67:1331-5.
83. Yilmaz A, Menevse S, Bayazit Y, et al. Two novel missense mutations in the connexin 26 gene in Turkish patients with nonsyndromic hearing loss. *Biochem Genet* 2010;48:248-56.
84. Baysal E, Bayazit YA, Ceylaner S, et al. GJB2 and mitochondrial A1555G gene mutations in nonsyndromic profound hearing loss and carrier frequencies in healthy individuals. *J Genet* 2008;87:53-7.
85. Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clinical Genetics* 2005;67:31-7.
86. Kalay E, Caylan R, Kremer H, et al. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res* 2005; 203:88-93.
87. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003;64:65-9.
88. Sirmaci A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G > A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J Genet* 2006;85:213-6.
89. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr* 2003;62:154-8.
90. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, et al. Genetic Epidemiologic Studies of Early-Onset Deafness in the United-States School-Age Population. *Am J Med Genet* 1993;46:486-91.
91. Ozturk O, Silan F, Oghan F, et al. Evaluation of deaf children in a large series in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;69:367-73.
92. Uslu C, Tatar A, Öztaş S. Erzurum bölge işitme engelliler okulundaki öğrencilerin klinik ve genetik açıdan incelenmesi (Ön Çalışma). *Otoscope* 2003;4:72-7.

93. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Gene*. 1997;6:2173-7.
94. Lerer I, Sagi M, Malamud E, et al. Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet* 2000;95:53-6.
95. Yan D, Park HJ, Ouyang XM, et al. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet* 2003;114:44-50.
96. RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, et al. Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genet* 2003;40:e68.
97. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 2001;18:84-5.
98. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999;353:1298-303.
99. Green GE, Smith RJ, Bent JP, et al. Genetic testing to identify deaf newborns. *JAMA* 2000;284:1245.
100. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat* 2003;21:552-3.
101. Common JEA, Di WL, Davies D, Kelsell DP. Further evidence for heterozygote advantage of GJB2 deafness mutations: a link with cell survival. *J Med Genet* 2004;41:573-5.
102. Mahdiah N, Rabbani B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol* 2009;48:363-70.
103. Lucotte G. High prevalences of carriers of the 35delG mutation of connexin 26 in the Mediterranean area. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71:741-6.
104. Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, et al. Carrier frequency of GJB2 gene mutations c.35delG, c.235delC and c.167delT among the populations of Eurasia. *J Hum Genet* 2010;55:749-54.

105. Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet* 2001;108:385-9.
106. Tekin M, Akar N, Cin S, et al. Pandya A. Frequency of Connexin 26 (GJB2) mutation carriers in the Turkish population. *Am J Hum Genet* 2000;67:240.
107. Mani RS, Ganapathy A, Jalvi R, et al. Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss. *Eur J Hum Genet* 2009;17:502-9.
108. Alvarez A, Del Castilo I, Villamar M, et al. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 2005; 137: 255-258.
109. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldman D, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 945-957.
110. Xiao ZA, Xie D.H. GJB2 (Cx26) gene mutations in Chinese patients with congenital sensorineural deafness and a report of one novel mutation. *Chin Med J (Engl)* 2004;117: 1797-1801.
111. Lin D, Goldstein JA, Mhatre AN, et al. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2). *Hum Mutat* 2000;18: 42-51.
112. Bindu LH, and Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol* 2008; 47: 702-707.
113. Li Z, Li RH, Chen JF, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* 2005;117: 9-15.

EK1:Mirodizin çalışmasında kullanılan mutant, wild, stabilizor oligo dizileri

Oligo adı	Oligo türü	Oligo dizileri (5' -> 3')
35 delG	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG TCA CAC CCC CCA
35 delG	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA TTC ACA CCC CCA
35 delG	S	GGA TCG TCT GCA GCG TGC CCC AAT
IVS1+1 G>A	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG AAC CCG ACG CAG G
IVS1+1 G>A	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA AAT CCC GAC GCA GA
IVS1+1 G>A	S	TGA GCC CGC CGG CCC CGG ACT
A1555G	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG AAT TAC GAC TTG T
A1555G	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA AAT ACG ACT TGC
A1555G	S	CTC CTC TAT ATA AAT GCG TAG GGG TT
R184P	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG TCC GTG GGC C
R184P	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA TCC GTG GGC G
R184P	S	GGG ACA CAA AGC AGT CCA CAG T
L90P	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG AAT GCA TGG CCA CTA
L90P	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA AAG CAT GGC CAC TG
L90 P	S	GGA GCG CTG GGC TGG ACA
M34T	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG TTA ACG AGG ATC A
M34T	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA TTA CGA GGA TCG
M34T	S	TAA TGC GAA AAA TGA AGA GGA CGG TGA G
167delT	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG AGC CTG GCT GCA
167delT	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA CAG CCT GGC TGC
167delT	S	GGG TGT TGC AGA CAA AGT CGG CCT
235 delC	W	CTG AGT CCG AAC ATT GAG ACA GCT GCA GGG
235 delC	M	GCA GTA TAT CGC TTG ACA ATC AGC TGC AGG
235delC	S	CCC ATA GCC GGA TGT GGG AGA TG

EK 2: Probandlara ait saptanan değişimlerin kromotogramlardaki görünümü

Hasta kodu	Değişimin adı	
0718	Normal dizi 327-328delGGinsA Homozigot	T TCA T C A A GGGGG AG A T A A A G A G T G A A T T T A A G G A
0719K	Normal dizi 327-328delGGinsA Homozigot	TT CA T C A A GGGGG AG A T A A A G A G T G A A T T T A A G G
0799B	Normal dizi 327-328delGGinsA Heterozigot	A GGGGGAG A T A A A G A G T G A A T T T A A G G C A T C
0798A	Normal dizi 327-328delgGinsA Heterozigot	A TCAA GGGGG A GATA A AGAGTG AATT T A A G G A CAT CG AGG

