

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KONJENİTAL İŞİTME KAYBI OLAN HASTALARDA GJB2 GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Turan TUFAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

ADANA-2013

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KONJENİTAL İŞİTME KAYBI OLAN HASTALARDA GJB2 GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Turan TUFAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

**Bu tez çalışması TF2013YL5 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu
tarafından desteklenmiştir**

ADANA-2013

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Konjenital İşitme Kaybı Olan Hastalarda GJB2 Gen Mutasyonlarının Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

Çukurova Üniversitesi

Başkan

Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP

Çukurova Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK

Çukurova Üniversitesi

Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'a ve Doktora öğrencileri Gamze CÖMERTPAY ve M. Ali ERKOÇ'a özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TF2013YL5 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İşitme Kaybı	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. İşitme Kaybı Tipleri	3
2.1.3. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji	4
2.1.4. Tanı	5
2.1.5. İşitme Kaybı'nın Şiddeti ve Evrelerinin Sınıflandırılması	7
2.1.6. Tedavi	10
2.1.7. Epidemiyoloji	11
2.2 KONJENİTAL İŞİTME KAYBININ SEBEPLERİ	13
2.2.1 Genetik Faktörler	14
2.2.1.1. Otozomal Resesif Genler	14
2.2.1.1.1. SLC26A4	14
2.2.1.1.2. MYO15A	15
2.2.1.1.3. OTOF	15
2.2.1.1.4. CDH23	15
2.2.1.1.5. TMC1	16
2.2.1.2. Otozomal Dominant Genler	16
2.2.1.2.1. KCNQ4	16

2.2.1.2.2. COCH	17
2.2.1.2.3. TECTA	17
2.2.1.2.4. WFS1	18
2.2.1.3. X'e Bağlı Kalıtım Gösteren Gen	19
2.2.1.3.1. POU3F4	19
2.2.1.4. Mitokondriyal Kalıtım Gösteren Genler	19
2.2.2. Genetik Dışı Faktörler	20
2.3. KONNEKSİNLER	20
2.3.1. GJB2	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Araç ve Gereçler	25
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	25
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	26
3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması	26
3.2.1. Hasta Rızası	27
3.3. Yöntem	27
3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi	27
3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	28
3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	29
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yönteminin Uygulanması	29
3.3.4.1 GJB2 Geni Tüm Bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması	30
3.3.5. PZR Reaksiyon Ürününün Temizlenmesi Yöntemi	31
3.3.5.1. GJB2 Genin Sekans Reaksiyonunun Hazırlanması	32
3.3.5.2. GJB2 Geni Sekans Ürünlerinin Pürifikasyonu ve Plate Kuyularına	33
Yükleme İşlemleri	
4. BULGULAR	35
4.1. Moleküler Genetik Analizler	35
4.1.1. Birinci Ailenin GJB2 Geni PZR ve Sekans Analizleri	35
4.1.2. İkinci Ailenin GJB2 Geni PZR ve Sekans Analizleri	39

5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Bireyin duyabildiği ses aralıklarına göre işitme kaybı dereceleri	8
Çizelge 2.2	WHO'ya göre 1995 yılında dünya nüfusunun %2,2'sinde işitme kaybı gözlenmiştir.	11
Çizelge 3.1	GJB2 geni tüm bölgelerinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	31
Çizelge 3.2	GJB2 geni tüm bölgelerinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	31
Çizelge 3.3	PZR ürünlerinin temizlenme reaksiyonu için hazırlanan karışım	32
Çizelge 3.4	PZR ürünlerinin temizlenme reaksiyon döngüleri	32
Çizelge 3.5	Sekans reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları	33
Çizelge 3.6	Sekans reaksiyonu için hazırlanmış uygun ısı döngüleri	33
Çizelge 4.1	Konjenital işitme kayıplı bireylerde ve kontrollerde belirlenen genotipler	36
Çizelge 4.2	Birinci ailede keşfedilen mutasyonlar ve tipleri	37
Çizelge 4.3	İkinci ailede tespit edilen mutasyonlar ve polimorfizmler	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Konneksin, konneksin ve hücreler arası kanallar	21
Şekil 4.1.	Birinci Ailenin Pedigrisi	35
Şekil 4.2.	V27 ve E114 aminoasit bölgelerinin GJB2 genindeki nükleotid dizilimi	37
Şekil 4.3.	V27I heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi	38
Şekil 4.4.	E114G heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi	38
Şekil 4.5.	V27 ve E114 aminoasit bölgelerinin hücredeki yerleri	39
Şekil 4.6.	İkinci ailenin pedigrisi	40
Şekil 4.7	K224 bölgesinin nükleotid dizilimi	41
Şekil 4.8	K224Q heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi	41
Şekil 4.9	363G>A polimorfizimli bireyin sekans analizi	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABR	İşitsel Beyinsapı Cevabı
BM	Bazal Membran
°C	Santigrat
Ca	Kalsiyum
CDH23	Cadherin-Related 23
CMV	Sitomegaloviral Enfeksiyon
Cx	Konneksin
Cx26	Konneksin26
Da	Dalton
dB	Desibel
DEOAE	Bozulmuş Yanıt Otoakustik Emisyon
DFN	Sağırılık
DFNA	Otozomal Dominant Sağırılık
DFNB	Otozomal Resesif Sağırılık
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
g	Gram
GJB2	Gap junction beta 2
GJIC	Hücreler Arası Gap Junctional İletim
GPCRs	G-protein Reseptörleri
Hz	Hertz
IC	Hücreler arası
IP₃	İnositol Trifosfat
ITIK	İletim tipi işitme kaybı
kb	Kilobaz

KCNQ4	Potasyum Voltaj Kapılı Kanal
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
L	Litre
Li	Spiral Limbus
mg	Miligram
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre Civa
ml	Mililitre
msn	Milisaniye
MYO15A	Miyozin 15A
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
OAE	Otoakustik Emisyon
OTOF	Otoferlin
POU3F4	POU Sınıf 3 Homeobox 4
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SFOAE	Uyarı Frekansı Otoakustik Emisyon
SL	Spiral Ligament
SLC26A4	Solute Taşıyıcı Ailesi 26
sn	Saniye
SNIK	Sensörinöral işitme kaybı
stV	Stria Vascularis
TE	Tris EDTA
TEOAE	Geçici otoakustik emisyon
TMC1	Transmembran kanal protein benzeri 1
TM1	Transmembran Bölgesi
tRNA	Taşıyıcı RNA
WFS1	Wolframin

Wt	Wild Tip
μl	Mikrolitre

ÖZET

Konjenital İşitme Kaybı Olan Hastalarda GJB2 Gen Mutasyonlarının Araştırılması

İşitme kaybı bireyin konuşma, ifade etme, algılama ve sosyal hayatın gelişiminde ciddi aksaklıklara neden olabilen en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Yaklaşık 1000 doğumda 1 gözlenip bu vakaların %50'sinde genetik diğer %50'sinde ise çevresel faktörler etkili olmaktadır. GJB2 (Konneksin26, Cx26) geninde meydana gelen mutasyonlar sendromik olmayan, otozomal resesif geçiş gösteren işitme kaybı bulunan vakaların yaklaşık %70'inde gözlenmiştir.

Vaka rapor çalışmamıza Adana ilinin Kozan ilçesinde yaşayan ve konjenital işitme kaybı gözlenen 2 farklı aile dahil edildi. İşitme kaybı olan bireylerin yanı sıra herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm söz konusu olduğunda hastalığa ne kadar etkisi olduğunu daha net anlayabilmek için işitme kaybı gözlenmeyen kardeşler ve ebeveynler de kontrol olarak ele alındı. 1. ailemizde 5 hasta ve 2 kontrol, 2. ailemizde ise 4 hasta ve 5 kontrol olmak üzere toplam 16 birey araştırıldı. Toplanan kanlardan tuzla çöktürme yöntemi ile DNA'lar izole edilip ve PZR yöntemi kullanılarak GJB2 geninin tüm bölgeleri çoğaltılıp, sekanslama yöntemi ile tüm nükleotid dizisi belirlenerek mutasyonlar ve polimorfizmler tespit edildi.

Çalışmamız sonuçlarına göre bulduğumuz mutasyonların ve polimorfizmlerin bazılarının işitme kaybı şiddetine bazılarının ise hastalığın oluşumuna dolaylı yoldan etki ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: GJB2, işitme kaybı, mutasyon, polimorfizm, PZR

ABSTRACT

Researching of GJB2 Gene Mutations in Patients with Congenital Hearing Loss

Hearing loss is one of the most common sense defects, leading to serious disruptions in developing of communication, expression, perception and social life of person. Hearing loss affects about 1 in 1000 newborns and a genetic basis is assumed in at least 50% of the cases. Environmental effects are responsibility for other 50 percent. Mutations in GJB2 gene have been seen at 70% of the cases with hearing loss which are non-syndromic and autosomal recessive.

Two different family living in Kozan district of Adana city and having hearing loss, were included to our case study report. As well individuals with hearing loss, their brothers and parents, not having hearing loss, were involved as control to understand better the effects of mutations and polymorphisms when they are discovered. The first family involve 5 patient and 2 control and second family involve 4 patient and 5 control. 16 individuals were researched. DNAs were isolated from blood donors by salt precipitation method and all regions of GJB2 gene were amplified. All mutations and polymorphisms were found by determining all nucleotide sequence.

Results of our study showed that some of mutations and polymorphisms found affect to the severity of hearing loss as direct, some affect occurrence of illness as indirect.

Keywords: GJB2, hearing loss, mutations, PCR, polymorphism

1. GİRİŞ

İşitme kaybı bireyin konuşma, ifade etme, algılama ve sosyal hayatın gelişiminde ciddi aksaklıklara neden olabilen en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Yaklaşık 1000 doğumda 1 gözlenip bu vakaların %50'sinde genetik diğer %50'sinde ise çevresel faktörler etkili olmaktadır. Çevresel faktörlere; erken doğum, doğum sırasında anoksi ve kafatasının sarsıntıya maruz kalması sonucu iç kulakta meydana gelen kanamalar, hamilelik sırasında alınan ilaçlar, doğum öncesi ve sonrası geçirilen enfeksiyonlar örnek verilebilir. Farklı 100 gende meydana gelen bozukluklar otozomal resesif sağırılık (DFNB, Deafness B), otozomal dominant (DFNA), X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösteren işitme kaybına neden olabilir ve bu da duyuşsal bozukluğun genetik heterojenite gösterdiğini ortaya koyar¹.

İşitme kaybı bozuklukları; sebebine göre genetik veya genetik olmayan, başlama yaşına göre prelingual veya postlingual, fenotipe göre sendromik veya non-sendromik, tipine göre sensörinöral, miks veya iletici tip ve şiddetine göre ise normal, çok hafif, hafif, orta derece, orta şiddetli, şiddetli ve ağır şiddetli işitme kaybı olarak sınıflandırılmaktadır².

Konjenital (doğuştan) prelingual işitme kaybı vakalarının yaklaşık %70'inde herhangi bir patolojik bulgu gözlenmezken (non-sendromik), %30'unda işitme kaybıyla birlikte patolojik bulgular da (sendromik) gözlenmektedir. Sendromik olmayan işitme kaybı vakaların %75-80'i otozomal resesif, %15-20'si otozomal dominant, %1-1,5'u X'e bağlı, %1'i ise mitokondriyal kalıtım göstermektedir. İşitme kaybına sebep olabilecek genler belirlenmiş olup bunların bir çoğu nadiren sendromik olmayan otozomal resesif geçiş gösteren işitme kaybına neden olmaktadır, GJB2 (gap junction beta 2) geninde meydana gelen mutasyonlar sendromik olmayan, otozomal resesif geçiş gösteren işitme kaybı bulunan vakaların yaklaşık %70'inde gözlenmiştir. GJB2 geni 13q11-q12 bölgesinde lokalize olmuş olup 2 ekzondan oluşmaktadır. Konneksin26 proteinini kodladığı için Konneksin26 (Cx26) olarak da adlandırılmaktadır. Ses iletimi sırasında endolenfte bol miktarda bulunan ve saçlı hücrelere geçmiş olan potasyum iyonlarının geri dönüşümünde önemli bir role sahiptir^{2,3}.

Bu çalışmanın amacı, Çukurova bölgesinde konjenital işitme kaybı bulunan hastalardan izole edilen DNA'ların (deoksiribo nükleik asit), GJB2 geninin gerekli

primerler kullanılarak PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması ve dizileme yöntemi kullanılarak bireylerin sahip oldukları mutasyonların ve polimorfizmlerin belirlenip işitme kaybı ile ilişkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Kaybı

2.1.1. Tanım

İşitme dış ortamda bulunan ses dalgalarının dış kulak ve orta kulak yolu ile iç kulağa aktarılması sonucu oluşan elektriksel potansiyellerin akustik sinir aracılığı ile işitme korteksine taşınması ile sağlanır. İşitme kaybı; dış, orta ve iç kulakta meydana gelen patolojiler sonucunda seslerin algılanamamasıdır. İşitme kaybı konuşma ve anlama becerileri bozukluklarını da beraberinde getirdiği için kişinin sosyal, eğitim ve zeka gelişimini olumsuz etkilemektedir⁴.

Konjenital işitme kaybına yol açan sebeplerin yarısı genetik diğer yarısı ise çevresel faktörlerdir. Genetik işitme kaybı sendromik veya non-sendromik olmak üzere iki şekilde fenotipte kendini gösterir. Eğer işitme kaybıyla birlikte başka patolojik bulgularda gözleniyorsa sendromik, gözlenmiyorsa sendromik olmayan işitme kaybı olarak adlandırılmaktadır⁵.

Ülkemizde konjenital işitme kaybı insidansı 1/1000 kadardır. İşitme kaybının neden olduğu gelişimsel ve toplumsal problemlerin önüne geçilmesi; bu hastaların sağlık personelleri tarafından doğru yönlendirilmesi, doğru zamanda tanı konulması ve tedavi edilmesi ile mümkündür. İşitme kaybının erken tanısını, uygun amplifikasyon ve özel eğitim programları izlediğinde çocuğun normal okullara devam etmesi sağlanabilir. Belirli bir şiddete ulaşmış işitme bozukluğu için işitme cihazları kullanılmaktadır. Çok ileri derecede işitme kayıplı bireylerde ise koklear implant uygulaması işitme kaybı tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur⁴.

2.1.2. İşitme Kaybı Tipleri

İşitme kayıpları konjenital veya akkiz olarak gelişebilir. Ayrıca patolojinin yerine göre, iletim, sensörinöral ve karışık tipi işitme kayıpları olarak sınıflandırılabilir⁴.

a) İletim Tipi İşitme Kaybı (İTİK)

Dış kulakta kulak kiri birikmesi, orta kulak iltihabı, kulak zarının delinmesi veya orta kulakta sıvı birikmesi gibi dış ve orta kulakta meydana gelen problemler sonucunda ses dalgalarının iç kulağa geçişinin engellenmesi ile meydana gelmektedir. İTİK'ları genetik geçişli olabileceği gibi çoğunluğu eksternal otit, serümen, akut ve kronik otitler, kolesteatom, travma, tümörler ve sistemik hastalıklar gibi akkiz sebeplere bağlı oluşur. Çocuklarda meydana gelen en yaygın bozukluk östaki borusunun malformasyonudur. Özellikle kış aylarında çocukların %30'u bu malformasyondan sıkıntı çekmektedir. Şiddetli soğuklardan meydana gelen bu problem orta kulakta sıvı birikmesini veya orta kulak iltihabı gibi daha ciddi hastalıkları beraberinde getirebilir. Bu durum aşağı yukarı 40 dB kadar seslerin algılanmasını engellemektedir^{4,6,7}.

b) Sensörinöral İşitme Kaybı (SNIK)

Hasar görmüş veya yok olmuş saç hücrelerinin bulunduğu kokleanın malformasyonu sonucu meydana gelmektedir. Kohlea, 8.sinir, beyin sapı veya korteks düzeyindeki bir patolojiye bağlı olarak gelişir. Aşırı gürültüye maruz kalma, sigara gibi kimyasal hasarlar, çevresel ajanlar, ilaçlar, yaşla birlikte uzun süre yıpranma ve aşınmalar veya genetik sebeplerden dolayı saç hücreleri hasara uğramaktadır. Sensörinöral işitme kaybı toplam işitme kayıplarının %90'ından sorumludur. Çocuklardaki SNIK'ların %50 kadarı genetik nedenlere bağlıdır. Genetik sebeplerle oluşan SNIK'larının %30'u kadarı da bir sendromun parçasıdır. Genetik olmayan SNIK'ları prenatal, natal veya postnatal oluşan patolojilere sekonder gelişir. Genetik olmayan sebeplere; enfeksiyonlar, ototoksik ilaç kullanımı, gürültüye maruz kalma, prematüre doğumlar örnek verilebilir. Yetişkinlerde ki SNIK'lar; genetik, nörolojik nedenler, vasküler hastalıklar, hematolojik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları, tümörler, endokrin hastalıkları, travma, yaşa bağlı ve bir çok sebepten ötürü meydana gelebilmektedir^{4,6,7}.

c) Karışık İşitme Kaybı:

İletici ve sensörinöral işitme kaybının bir kombinasyonudur. Pür ton odyometride hastanın 250 ile 8000 arasındaki sesleri duyma eşikleri bir grafi ile ortaya koyulur. Hava ve kemik yolları ayrı ayrı değerlendirilir. Normalde hava ve kemik yolları çakışır. ITİK olan kişilerde kemik yolu normal sınırlarda iken hava yolu düşer. SNIK olanlarda ise hem hava hem kemik yolu aynı oranda düşer. Karışık işitme kaybında ise hem hava hem kemik yolu etkilenmiştir ancak hava yolu eşikleri kemik yolu eşiklerine göre daha fazla düşmektedir⁴. İşitme cihazı bu vakalarda yardımcı olabilir⁸.

2.1.3. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji

İşitme kaybı fenotipe göre sendromik olan ve sendromik olmayan işitme kaybı diye sınıflandırılmaktadır. İşitme bozukluğunun yanı sıra kişide başka patolojik bulgular gözleniyorsa sendromik, gözlenmiyorsa sendromik olmayan işitme kaybı olarak adlandırılmaktadır. Duymada ki bozukluk tek bir kulakta olabileceği gibi iki kulakta da meydana gelebilir. Genel olarak 90dB'den daha yukarısını duyamayan bireylere sağır tanısı konmaktadır. Kemik ve membranöz kokleanın, örtülü zar ve korti organının gelişiminde ki başarısızlık, orta kulak ve kemikçik arasında ki iletim mekanizmasında ve dış kulak yolunda aksaklık, korti organı ve örtülü zarda, orta kulak kemikçiklerinde, dış kanalda gelişimin kesintiye uğraması, koklea veya scala medya kanalında, örtü oluşturan membran dahil endorganda, sprial ganglion ve bazal çekirdekleri de dahil olmak üzere sinir elemanlarında meydana gelen dejenerasyon sonucu konjenital işitme kayıpları oluşabilmektedir. İşitme mekanizmasında meydana gelen bunlar gibi benzer aksaklıklar dışında başka herhangi bir patolojik bulgu söz konusu değilse sendromik olmayan işitme kaybı olarak isimlendirilir⁹.

İşitme mekanizması dışında başka bir yerde patolojik bulgular söz konusu ise sendromik olan işitme kaybı olarak adlandırılır. Konjenital işitme kaybının yaklaşık 400 çeşidinde işitme defekti dışında başka patolojik bulgularda yer almaktadır. Bu bulguların çoğunda işitme mekanizmasında meydana gelen aksaklıkların yanı sıra böbrek (Alport Sendromu), pigment (Waardenburg Sendromu), göz (Usher Sendromu), iskelet-kas sistemi

(STL) ve kardiyovasküler sistem (Jervell ve Lange-Nielsen) anormallikleri de gözlenmektedir^{6,10}.

Bugüne kadar tanımlanan lokusların bazılarının hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına yol açtıkları belirlenmiştir. Bilinen 9 sendromdan (Alport, Usher, Waardenburg, Jervell ve Lenge-Nielsen, BOR, Norrie, Tracher Collins, Stickler, Pendred) özellikle 2 tanesi, allelik varyantların hem sendromik hem de non-sendromik işitme kaybına yol açması nedeni ile önemlidir^{6,10}.

a) Pendred sendromu; otozomal resesif geçiş göstermektedir. Tiroid anomalileri bu sendromlu kişiler arasında büyük varyasyonlar göstermekte olup görülen en önemli bozukluklar iç kulak yapısında ki malformasyonlar ve sağırliktır^{6,10}.

b) Usher sendromunda ise sensörinöral işitme kaybının yanı sıra ilerleyici tip görme kaybı (Retinitis Pigmentosa) ile karakterize olup otozomal resesif geçiş göstermektedir^{6,10}.

2.1.4. Tanı

Yenidoğanlarda işitme kaybı erken evrede tanısı konulup tedavi edilmediğinde, konuşma ve dil gelişiminde bozukluklar meydana gelmektedir. İşitme kaybı olan bebeklere 6 aydan önce müdahale edilmesi halinde ortalama 3 yaşlarına gelindiğinde ekspresif dil testlerinde normal sınırlarda sonuç alındığı gözlenmiştir. İşitme engeli erken dönemde teşhis edilemediğinde ise bireyin sosyal ve kongnitif yeteneklerinde ve toplumla bütünleşmede engeller ortaya çıkabilmektedir. İşitme kaybı tanısında en çok kullanılan OAE (otoakustik emisyon) ve ABR (işitsel beyinsapı cevabı) işitme tarama testleri noninvaziv, nesnel ve fizyolojik ölçümlerdir¹¹.

Tarama testi olarak kullanım otoakustik emisyonların en sık kullanıldığı alandır. Otoakustik emisyonlar normal iç kulak fonksiyonu olan kişilerde işitme sırasında belirlenen duyarlı yanıtlardır. Kokleadan başlarlar ve koklear yapıdaki aktif dış saçsı hücre hareketinden kaynaklanan enerji kaçağı olarak yorumlanırlar. OAE, kokleadan orta kulağa oradan da dış kulak kanalına giderler ve orada hassas minyatür mikrofonlar kullanılarak belirlenebilirler. Spontan ve uyarılmış olarak iki tip emisyon vardır. Normal

işitmeye sahip insanların %60-70'inde spontan emisyonlar bulunur. Spontan emisyonların işitme taramasında kullanımı yoktur. Uyarılmış emisyonların üç çeşiti vardır. Geçici (transient-TEOAE), bozulmuş yanıt (distortion product-DEOAE) ve uyarı frekansı (stimulus frequency-SFOAE). Transient ve distortion product emisyonları uyarılmaya kolaydır ve işitme taraması gibi pek çok klinik kullanımı mevcuttur. Otoakustik emisyonlar kısa akustik uyarılara karşı, başlangıcından 4-15 milisaniye sonra başlayan, yineleyici kararlı yanıtlardır. TEOAE, otoakustik emisyonların non-invaziv bir biçimde kokleanın bütünlüğünü kontrol etmesini sağlar. Bebeklerde ve yenidoğanlarda TEOAE tarama düzeyi 30 dB'de tutularak tarama testi olarak kullanılabilir. Kaydı ve yorumlanması kolay olan TEOAE, yenidoğan taramasında en yaygın kullanılan testtir. İç kulak fonksiyonu normal ve işitsel santral sinir sisteminde bozukluk olan çocuklarda TEOAE'ler normal ölçülebilmektedir. Bu nedenle nöral işitme bozukluğundan kuşkulanılan hastalarda TEOAE tek başına yetersiz kalabilir, bu durumlarda hem TEOAE, hem de ABR testleri yapılmalıdır. TEOAE testinin kullanımı, özellikle orta kulak hastalığı olanlarda emisyonların azalmış olması ve işitme eşiğini belirlemedeki yetersizlik nedeniyle sınırlıdır. TEOAE yanıtı 30 dB'den daha fazla işitme kaybı olanlarda ölçülemez ve hasta testten kalır. TEOAE ucuzluğu, fazla süre gerektirmemesi, non invazifliği ve pasif kooperasyonla yapılabilmesi bakımından tarama yönünden üstün gözükmektedir. DPOAE, TEOAE kadar geniş çalışmalara sahip değilse de, DPOAE günümüzde TEOAE ye göre daha popüler olma yolundadır. Bunun nedeni ise 8000Hz e kadar uzanan frekans genişliğidir^{11,13}.

Otoakustik emisyonların saptanamadığı bu durumlarda, işitme kaybından kuşkulanılmalı ve ABR, timpanometre, odyometrik ve davranışsal testlerle işitme kaybının derecesi ve özelliği değerlendirilmelidir. OAE'yi esas alan yenidoğan işitme taramasının uygulanması gürültülü çevrede, ilk 24 saatte kulak yolunu tıkayan verniks ve diğer debris varlığında zorlaşır. İşitmesi normal olan bebekler bu etmenlerden dolayı işitme kaybı varmış gibi testten kalabilirler. OAE tarama testi yaklaşık olarak 4-8 dakika gerektirir^{11,13}.

İşitsel beyin sapı yanıtı testi bebeklerde işitme değerlendirmesinde 1974'den beri kullanılmaktadır. İşitsel sinir ve beyin sapı tarafından oluşturulan elektriksel aktivitenin

kafa cildi üzerine yerleştirilen elektrot ile kaydedilmesi, bu tarama testinin eksenini oluşturur. Yenidoğanda yapılan testler içinde altın standart olarak kabul görmektedir. Buna karşın, halen kayıta bazı güçlükler bulunmaktadır. Kemik iletili ABR, ek olarak işitme kaybının tipiyle ilgili bilgi verir, ancak geleneksel olarak kullanılmamaktadır. Kısıtlamalara karşın ABR klinikte yararlı bir testtir. Deneyimli odiyolog gerektirir ve uyuma koşulu vardır. ABR testi kompleks yapıda, zaman isteyen ve risk etmeni olan yenidoğanların taranmasında kullanmaya uygun bir testtir. ABR noninvaziv bir testtir. Çocuk sakin ya da uykuda olmalı ve yeterli akım düzeyi sağlanmalıdır. Akustik uyarı yoğun (80-90 dB) ya da hafif (0-20 dB) olabilir. ABR dalga formları saçlı deriye yerleştirilen üç adet elektrot ile bilgisayara kaydedilir. Dalga formlarının şekli, latansı ve yoğunluğu normale karşılaştırılarak “geçme” ya da “kalma” biçiminde sonuç verilir. Dalgalarda gecikme ya da yokluk durumunda nörolojik ya da koklear defekten kuşulanılır. ABR testi yaklaşık 4-15 dakika süre gerektirir. ABR ile taranan bebeklerin yaklaşık %4’ü ileri odiyolojik değerlendirme gerektirir^{11,13,14}. Sonuç olarak işitme kaybının erken saptanması önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından pilot uygulama olarak belirli hastanelerde uygulanmaya başlanan yenidoğan işitme taramalarının tüm ülke çapında yaygınlaştırılmasının gerekli olduğu görülmektedir¹¹.

2.1.5. İşitme Kaybı’nın Şiddeti ve Evrelerinin Sınıflandırılması

Bebeklerin dil yeteneği, lisans becerilerini kazanabilmesi, çevreyle uyum ve iletişimi, zeka, sosyal ve duygusal gelişimi açısından işitme duyularının doğuştan itibaren normal sınırlarda olması gerekir¹⁵. İşitme kayıplı çocuklarda normal mental ve sosyal gelişimin sağlanabilmesi için erken tanı, tedavi ve rehabilitasyonun hayati önemi vardır. Bu nedenle ülkemizde tüm yenidoğanlara otoakustik emisyon ile işitme taraması yapılmaktadır⁴.

Odyoloji bilimi; işitme sisteminin değerlendirilmesi, işitme kaybı tanısının konulması, işitme kaybında uygun rehabilitasyon yaklaşımlarının belirlenmesi ve uygulanması, işitme kaybında gerek görülmesi durumunda amplifikasyon (işitme cihazı,

implantlar) uygunlaması ve uyumun sağlanması alanında çalışan, günümüzde yaygınlaşan nesnel test yaklaşımları ile işitme sistemini daha ayrıntılı olarak inceleme şansına sahip bir bilim dalıdır. Periferik işitmenin öznel olarak değerlendirilmesi amacı ile kullanılan ve saf ses çıkarabilen ses jeneratörlerine odyometre adı verilmektedir. Odyometreler aracılığı ile yapılan işitme testlerinde, yaygın olarak 125 Hertz (Hz) ile 8000 Hertz (Hz) arasındaki frekanslarda işitme ölçümleri yapılır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan odyometrelerde, 125 Hz ile 18000 Hz arasındaki değerlendirmeler yapılabilir¹⁶.

İşitme kaybının neden olduğu gelişimsel ve toplumsal sorunların önlenmesi, erken yaşta fark edilen işitme sorununun, sağlık çalışanları aracılığıyla doğru yönlendirilmesi ve uygun zamanda tanı konulması ve tedavi edilmesiyle olasıdır. İşitme kaybına erken dönemde tanı konulması ve tedavisinin planlanması, çocuğun ileri dönemde karşılaşılabileceği dil, konuşma bozuklukları, gelişimsel ve toplumsal sorunların önlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bu nedenle yenidoğan bebeklere uygulanan işitme tarama testleri sonucunda ortaya çıkan değerler bireyin işitme kaybı var mı, varsa hangi evrede ve şiddette olduğunu ortaya koyar^{15,16}.

Çizelge 2.1. Bireyin duyabildiği ses aralıklarına göre işitme kaybı dereceleri¹⁶

Saf Ses Ortalaması (dB)	İşitme Kaybı Dereceleri
0-15 dB	Normal İşitme
16-25 dB	Çok Hafif Derecede İşitme Kaybı
26-40 dB	Hafif Derecede İşitme Kaybı
41-55 dB	Orta Derecede İşitme Kaybı
56-70 dB	Orta – İleri Derecede İşitme Kaybı
71-90 dB	İleri Derecede İşitme Kaybı
91 dB ve üzeri	Çok İleri Derecede İşitme Kaybı

İşitme kaybı şiddetine göre 1. evre (çok hafif derecede işitme kaybı), 2.evre (hafif derecede işitme kaybı), 3.evre (orta derecede işitme kaybı), 4.evre (orta-ileri derecede

işitme kaybı), 5.evre (ileri derecede işitme kaybı) ve 6.evre (çok ileri derecede işitme kaybı) olmak üzere 6 evreye ayrılmaktadır^{16,17}.

Evre I: Çok Hafif Derecede İşitme Kaybı (**16-25 dB**)– Herhangi bir işitme testi yapılmadıkça zor fark edilir. Mesafeli ve fısıltılı konuşmayı anlamada sorun vardır.

Evre II: Hafif Derecede İşitme Kaybı (**26-40 dB**) –30 dB’lik işitme kaybı olan bir çocuk konuşma seslerinin %25-40’ını anlayamaz. 35-40 dB’lik işitme kaybı olan çocuk, özellikle seslerin zayıf ya da konuşmacının görüş hizasında olmadığı durumlarda, konuşmaların yarısını kaçıır. Bu bireyler, dinleme gerektiren durumlarda daha çok efor harcamakta ve daha çabuk yorulmaktadırlar. İşitme araçlarından yararlanabilirler.

Evre III: Orta Derecede İşitme Kaybı (**41-55 dB**) –50 dB’lik işitme kaybı olan çocuk, işitme aleti olmadan, konuşmaların yaklaşık %80’ini anlayamaz. Çocuk kendi sesini duyarak kontrol edemediği için, sesin kalitesi ve kişinin konuşması bozulmuştur. Dil gelişimi ve anlama yetersizdir. Dudaktan anlama öğretisi geliştirilmelidir.

Evre IV: Orta – İleri Derecede İşitme Kaybı (**56-70 dB**)– 55 dB’lik işitme kaybı olan çocuk, konuşmaların %80-100’ünü anlayamaz. İşitilmesi için konuşurken bağırlması gerekir. Gürültülü sesleri duyabilir. Büyük olasılıkla konuşma özrü görülür. Bireysel işitme aracı kullanılması ve işitme eğitimi gereklidir. Dil gelişiminde ve anlamada gecikme, kısıtlı kelime hazinesi vardır. Konuşmanın anlaşılabilirliğinde ve ses kalitesinde azalma görülür. Bireyde kendine güvenin azalmasına ve dışlanma hissine neden olabilir.

Evre V: İleri Derecede İşitme Kaybı (**71-90 dB**)– İşitme cihazı olmadan sadece şiddetli sesleri duyabilir. Uygun işitme cihazı ile çevresel sesleri ve konuşma seslerini fark edebilir. İşitme kaybı bir yaşından önce olmuş ise, dil ve konuşma kendiliğinden gelişmez veya ileri derecede gecikir. Belirgin öğrenme güçlüğü, kısıtlı kelime hazinesi vardır. Özel eğitime havale edilmesi gerekir. Bireysel işitme cihazı kullanmalıdır.

Evre VI: Çok İleri Derecede İşitme Kaybı (**91 dB ve üzeri**)– Sesten çok titreşimleri fark ederler. İletişimde işitmeden çok görmeyi kullanırlar. Sesleri fark etmeleri işitme kaybının konfigürasyonuna ve kullanılan işitme cihazına bağlıdır. Dil ve konuşma kendiliğinden gelişmez. Özel eğitime havale edilmelilerdir.

2.1.6. Tedavi

İşitme kaybında tedavi; öğrenmeyi, ilişkilerde iletişimi, aile ilişkilerinde samimiyet ve sıcaklığı, iletişim kolaylığını, duygusal istikrarı, günlük yaşam üzerinde kontrol duygusunu, zihinsel algıyı, fiziksel sağlığı ve toplumsal katılımı güçlendirmeyi hedeflemektedir. İşitme kaybına sahip olan bireylerde uygulanan iyileştirme yöntemleri arasında; işitme cihazları, koklear implant ve eğitim başrol oynamaktadır⁸.

a) İşitme Cihazı: Seslerin daha yüksek duyulmasını sağlar. İşitme aygıtları işitme kaybını ortadan kaldırmaya veya olumsuz etkisini azaltmaya yönelik çeşitli tıbbi/cerrahi yaklaşımların sonuç vermediği durumlarda kullanılır. Kişinin boyutuna, yaşına ve işitme kaybının derecesine göre farklılık gösterebilir. İşitme aygıtlarının temel kullanım amaçları, işitme kayıplı hastanın, günlük konuşma seslerini ve çevre seslerini duyarak dil gelişimini tamamlaması, konuşulanları anlaması ve kendini konuşarak ifade edebilmesidir. Çoğunlukla sensorinöral işitme kaybında veya cerrahi/tıbbi olarak tedavi edilemeyen iletim tipi işitme kaybında sıklıkla kullanılan işitme aygıtları, işitmeyi en üst düzeye çıkarmaya çalışan yüksek teknoloji ürünleridir. İşitme aygıtının yanı sıra gerekli durumlarda yardımcı aygıtlar (FM sistem, titreşim uyarımlı vibrotaktik cihaz vb.) kullanılmaktadır^{16,18}.

b) Koklear İmplant: İşitme cihazlarından fayda göremeyen ağır işitme kayıplı hastalar için bir tedavi yöntemidir. Konjenital işitme kayıplarının tarama testleri ile ortaya konulması koklear implantasyon adaylarının ilk 6 ayda amplifikasyon sağlanarak koklear implanta hazırlanması açısından önemlidir. Bu elektronik aletler kulağın arka tarafına yerleştirilir ve elektrodlar iç kulağa doğru giririlir. Konuşma işlemcisi olarak adlandırılan dış parça, dış ortamdaki sesleri analiz ederek özel elektriksel dalgalara dönüştürür ve bu dalgaları kokleada bulunan elektrodlara gönderir ve buradan akustik sinir fibrillerinin uyarılmasını sağlayarak işitme duyusunun oluşmasına neden olur^{4,16,18}.

c) Eğitim: İşitme kaybının derecesi ne olursa olsun, çocuk işitme eğitimi almalıdır. İşitme eğitimi amplifikasyondan hemen sonra başlamalıdır. İşitme eğitiminin planlanması ve uygulanmasında bireysel eğitime ağırlık verilmelidir. Bireysel eğitimin yanı sıra ailelerin programlara katılımı sağlanmalı ve aile eğitim programları hazırlanmalıdır. İşitme kayıplı çocuğun, kendisine ve ailesine yönelik psikolojik danışmanlık ve rehberlik verilmelidir^{4,16}.

Günümüzde koklear implant ile işitme kayıplı hastaların topluma kazandırılmasında büyük bir ilerleme sağlanmış olmakla birlikte işitme kayıplarının halen tam bir tedavisi yoktur. 2011 yılında Pandit erken başlangıçlı progresif işitme kayıplarında, insan olfaktör mukoza kaynaklı erişkin kök hücrelerin işitme fonksiyonunun korunmasında yardımcı olduğunu göstermiştir. Hücre transplantasyonu ve rejeneratif tıbbın gelişmesi tıbbın birçok alanında olduğu gibi işitme kayıplarında da birçok yeni tedavi modalitelerine öncülük edecektir^{4,19}.

2.1.7. Epidemiyoloji

İşitme kaybı bireyin konuşma, ifade etme, algılama ve sosyal hayatın gelişiminde ciddi aksaklıklara neden olabilen en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Yaklaşık 1000 doğumda bir gözlenip, bu vakaların yarısında genetik diğer yarısında çevresel faktörler rol oynamaktadır. Konjenital işitme kaybı vakalarının yaklaşık %70'inde herhangi bir patolojik bulgu gözlenmezken (non-sendromik), %30'unda işitme kaybıyla birlikte patolojik bulgular (sendromik) gözlenmektedir. Non-sendromik işitme kaybı olguların %75-80'i otozomal resesif, %15-20'si otozomal dominant, %1-1,5'u X'e bağlı, %1'i ise mitokondriyal kalıtım göstermektedir^{1,3}.

İşitme kaybı prevalansı, morbiditesi ve ekonomik yükü; ülkeler ve aynı sınırlar içindeki farklı gruplar arasında farklılık göstermektedir. 1995 yılında dünya genelinde toplam nüfusun (5 milyar 479 milyon) yaklaşık %2,2'sinde (125 milyon) işitme kaybı vakaları gözlenmiştir. Bu oran kıtalar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir²⁰.

Çizelge 2.2. WHO'ya göre 1995 yılında dünya nüfusunun %2,2'sinde işitme kaybı gözlenmiştir²¹.

Kıta	Populasyon Yüzdesi (%)	İşitme kaybına sahip vaka sayısı
Afrika	12	14.400.000
Amerika	15	18.000.000
Asya	52	62.400.000
Avrupa	17	20.400.000
Okyanusya	4	4.800.000

Toplam: 120.000.000

2013 Şubat ayından itibaren dünya genelinde 360 milyondan fazla bireyde işitme kaybı rahatsızlığı görülmektedir. İşitme kaybının görülme oranı kadınlara nazaran erkeklerde daha çoktur. Amerikada 65 yaş ve üstü erkeklerde kulak çınlamasının görülme oranı yaklaşık %12,3 iken kadınlarda bu oran yaklaşık %14'tür. Amerikalı yetişkinlerin ortalama %17'sinde işitme kaybı vakası rapor edilmiştir. Yaş ile işitme kaybı arasında doğru orantı bulunmaktadır. 45-64 yaşları arasında Amerikalı yetişkinlerin %18'i, 65-74 yaşları arasında Amerikalı yetişkinlerin %30'u, 75 yaş ve üzeri Amerikalı yetişkinlerin ise %47'si işitme kaybına sahiptir. Amerikada yaklaşık 1000 doğumda 2 veya 3 çocuk sağır ya da şiddetli işitme kaybı ile doğmaktadır. Bu sağır çocukların 10'da 9'unun annesi ve babası sağlıklı işitmektedir. Amerikada 20 ile 69 yaşları arasında işitme kaybına sahip bireylerin %15'inden yüksek ses düzeyi ortamlar etikili olmaktadır. İşitme kaybına sahip bireylerin sadece %20'si işitme cihazı kullanmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 188.000 kişi koklear implanttan yararlanmaktadır. Aşağı yukarı Amerikada her yıl 4000 ani sağırılık vakası gözlenmektedir. Bu hastaların 10'da 9'unda tek kulakta sağırılık meydana gelmektedir. Ani sağırılığın sadece %10-15'inin nedeni bilinebilmektedir²¹.

Sağır hastaların ve şiddetli işitme kaybına sahip hastaların %3-6'sı Usher sendromuna sahiptir. Amerika gibi gelişen ülkelerde her 100.000 doğumda 4 bebek Usher sendromlu doğmaktadır. İşitme kaybıyla birlikte gözükebilen 400 sendrom tanımlanmıştır. Usher sendromu, Pendred sendromu ve Jervell ve Lange-Nielsen sendromları en yaygın olanlarıdır. Konjenital işitme kaybına sebep olan diğer önemli faktör ise çevresel faktörlerdir. En yaygın çevresel faktör; konjenital sitomegaloviral enfeksiyondur. (CMV). Tüm doğumlara göre prevalansı %0.64'tür. Özellikle 3 haftalık bebeklerden CMV'nin teşhisi oldukça zordur²².

İşitme kaybının bu kadar sık görülmesinden dolayı bu hastalığa harcanan ekonomik giderde bir o kadar fazladır. Avrupada her yıl yaklaşık harcanan para 213 milyar eurodur. Buda her yıl bir Avrupalı yetişkininin işitme kaybı masrafları için harcadığı para 473 euroya denk gelmektedir. Avrupalıların 71 milyonda fazlası 25dB'den fazla işitme kaybı rahatsızlığı çekmektedir. Raporlara göre işitme kaybı şiddetine göre de harcanan para bir hayli değişkenlik göstermektedir. Hafif işitme kaybına sahip tek bir birey için harcanan para 2.200 € iken şiddetli işitme kaybına sahip tek bir birey için harcanan para ise yaklaşık

11.000 € olmaktadır. Bazı ülkelerde yıllık işitme kaybı vakalarına harcanan paralar ise şu şekildedir; Almanya 30.200.000.000 €, Fransa 22.400.000.000 €, İspanya 16.300.000.000 €, Hollanda ise 6.000.000.000 €'dur²³. Bu harcamaların içerisinde işitme cihazları ve koklear implantta önemli bir yere sahiptir. 2005'te Avustralyada bu ikisine harcanan yıllık miktar yaklaşık 376,7 milyon dolar olduğu belirtilmiştir⁷.

Diğer bir yandan işitme kaybına sahip bireyler ekonomik ve sosyal açıdan büyük sıkıntı çekmektedirler. 2007'de Dünya Bankasına göre; Hindistanda işsizlik oranı işitme kaybı gibi hastalıklara sahip olan bireylerin sayısından çok daha fazladır. Son datalar gösterdi ki; işitme kaybına sahip olan bireylerin oranı işsizlerin oranından daha fazla hala geldi. Buda şunu gösteriyor ki; işitme kaybı olan kişilerin çoğunun işi olmamaktadır. Buda onları toplumdan ve sosyal hayattan bir hayli uzaklaştırmaktadır²⁴.

2.2 KONJENİTAL İŞİTME KAYBININ SEBEPLERİ

2.2.1 Genetik Faktörler

İşitme bozukluğu en az 1000 doğumda 1 meydana gelen en yaygın duyuşal rahatsızlıktır. Sebebine göre genetik veya genetik olmayan olarak iki gruba ayrılmaktadır²². Sağırlığa sebep olan genlerin sayısının 50-100 arasında değiştigi düşünölmektedir. Bu da duyuşal bozukluğın genetik heterojenite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Genetik kökenli işitme bozuklukları, tek bir gendeki mutasyonun (monojenik) veya farklı genlerdeki mutasyonların kombinasyonları ile birlikte çevresel faktörlerin ortak sonucu olarak da gerçekleşebilmektedir. 1994 yılına kadar sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olan yalnızca 3 genin lokusu insan genomu üzerinde haritalanmıştır. Günümüzde bağlantı analizleriyle farklı kromozomlarda non-sendromik işitme kaybına neden olan birçok gen haritalanmıştır. Sağırlığın sendromik olmayan formu için otozomal resesif lokuslar DFNB, otozomal dominant lokuslar DFNA ve X'e bağlı lokuslar DFN olarak gösterilmektedir³.

Konjenital işitme kaybı; otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı ve mitokondrial kalıtım göstermektedir. Konuşma gelişiminden önce (prelingual) ortaya çıkan monojenik işitme kayıplarının kalıtım kalıplarına bakıldığında, hastaların %75'inde otozomal resesif, %20'sinde otozomal dominant, %5'inde X'e bağlı ve %1'inden daha

azında mitokondrial kalıtım gözlenmiştir. Otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına yol açan, frekansı en yüksek olan genler şunlardır; GJB2, SLC26A4 (Solute Carrier Family 26), MYO15A (Miyozin 15A), OTOF (Otoferlin), CDH23 (Cadherin-Related 23) ve TMC1 (Transmembran kanal protein benzeri 1)'dir. Otozomal dominant non-sendromik işitme kaybına yol açan, frekansı en yüksek olan genler; WFS1 (Wolframin), KCNQ4 (Potasyum voltaj kapılı kanal, KQT benzeri alt aile, üye 4), COCH (Cochlin) ve GJB2'dir. X'e bağlı kalıtıma; POU3F4 (POU sınıf 3 homeobox 4) geni, mitokondrial kalıtıma ise; MT-RNR1 ve MT-TS1 genleri sebep olmaktadır^{3,22}.

2.2.1.1. Otozomal Resesif Genler

2.2.1.1.1. SLC26A4 (Solute Carrier Family 26)

Pendred sendromu ve nonsendromik sağırılık, 7q22.3'de lokalize DFNB4 bölgesindeki SLC26A geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan allelik hastalıklardır. Bu gendeki mutasyonlar hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına sebep olmaktadır. DFNB4 ailelerinin etkilenmiş bireylerinde yapılan ayrıntılı klinik muayenelerinde, bu lokusun sadece nonsendromik işitme kaybına neden olmadığı anlaşılmıştır. Fakat PDS geninde mutasyon bulunan bazı ailelerde işitme kaybının nonsendromik olduğu herhangi bir tiroid anomalisinin bulunmadığı da gösterilmiştir. Pendred sendromu sensörinöral işitme kaybı, iç kulak malformasyonları ve guatr ile birlikte seyreden kalıtsal işitme kayıplarının %10'unda görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Pendred sendromunun en belirgin klinik bulgusu konjenital işitme kaybına eşlik eden guatrdır. Bu hastalarda tiroid bozukluklarını, bozulmuş iyot taşınımı açıklarken, hatalı koklea gelişimi ve işitme bozukluğunu da klor transportundaki eksiklik açıklamaktadır. Bozulmuş klor transportu kokleada anormal sıvı akışına neden olabilmekte, bu da vestibuler sıvı kanallarının genişlemesine ve işitme kaybına yol açabilmektedir. Bu gen pendrin diye bilinen anyon taşıyıcısı kodlar. 780 aminoasitten oluşan bir membran proteindir. Hücre içi ve dışı arasında rekabete dayalı klor-iyot taşıyıcılığı yapmaktadır^{3,6,10,22}.

2.2.1.1.2. MYO15A (Myosin XVA)

Bu gen sıra dışı bir miyozin kodlamaktadır. Bu gen 66 exondan oluşmuş olup, 7p11.2'de lokalize olmuştur. MYO15A geninde meydana gelen mutasyonlar otozomal resesif, konjenital ağır işitme kaybına yol açmaktadır. MYO15A proteini ile yapılan çalışmalar sonucunda proteinin iç ve dış silyalı hücrelerde ve hipofiz bezinin salgı yapan granüllerinin bulunduğu bölgede eksprese edildiği saptanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalar sonucunda kokleadaki saç hücreleride aktin organizasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ses iletim işleminde bu motor proteinlerin fonksiyonları tam olarak anlaşılmasına rağmen, işitme sisteminde temel fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Sıra dışı miyozinlerin işitme kaybından sorumlu olduğunun tespiti, sağır farelerden elde edilen çalışmalar sayesinde yapılabilmektedir. 600 Pakistanlı akrabalarda linkaj analizi ile 28 mutasyon tanımlanmıştır^{6,10,22}.

2.2.1.1.3. OTOF (Otoferlin)

Otoferlin proteinini kodlayan OTOF geni, otozomal resesif işitme kaybına yol açtığı bilinmektedir. 48 ekzondan oluşan OTOF geni 2p23.1 'de lokalize olmuştur. OTOF geni kohlea, vestibul ve beyinde yüksek seviyede eksprese olurken, kalp, plasenta, akciğer, pankreas, iskelet kası ve böbrekte daha az eksprese olmaktadır. Bu genin kodladığı proteinin sitozolik olduğu, hücre membranına karboksi terminaliyle tutunduğu, sinaptik vezikül trafiğinin olduğu, iç silyalı hücrelerde eksprese edildiği ve bu yüzden beyne iletilen sinyal yollarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. OTOF mutasyonları büyük oranda işitsel nöropatiye ve işitme kaybına sebep olmaktadır. Bu gende tanımlanmış Q829X kurucu mutasyonunun, İspanyol popülasyonunda oldukça yaygın prelingual işitme kaybından sorumlu olduğu gösterilmiştir^{6,22,25}.

2.2.1.1.4. CDH23 (Cadherin-Related 23)

CDH23 kaderin gen ailesinin bir üyesidir. Bu gen 10. kromozomun DFNB12 lokusunda q21-q22 bölgesinde bulunmakta ve Ca⁺⁺ (kalsiyum)'a bağlı hücre-hücre tutunma glikoproteinini kodlamaktadır. Bu protein; transmembranı tek geçişli, hücre dışı bölgesinde 27 tekrar içermekte ve 3353 amino asitten oluşmaktadır. Kaderinler geniş bir

transmembran protein ailesini kapsamaktadır ve hücre-hücre adezyonunda, hücre sıralanmasında ve hücre göçünde kritik rol oynamaktadırlar. CDH23'deki mutasyonlar, aynı zamanda işitme kaybıyla birlikte retinitis pigmentosa bulgusunun eşlik ettiği Usher sendromu tip 1d'ye neden olmaktadır. Bu gende 35 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 8 delesyon, 3 insersiyon ve 11 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır. DFNB12 ailelerinde missense mutasyonlar tanımlanmışken, Usher sendromlu hastalarda nonsense, delesyonlar ve çerçeve kayması mutasyonları gözlenmiştir^{26,27}.

2.2.1.1.5. TMC1 (Transmembrane Channel – Like Protein 1)

Hem otozomal resesif hem de otozomal dominant işitme kaybına neden olan bu gen 9q13-21 bölgesinde lokalize olmuştur. Kodladığı protein çok geçişli bir transmembran proteindir. Proteinin görevi bilinmemesine rağmen iç kulakta bulunmasından yola çıkılarak araştırmacılar TMC1 proteinin ses dalgalarını sinir impulslarına çevirdiğini düşünmektedirler. TMC1'in kohleanın ve vesitubular end organının saç hücrelerinde eksprese olduğu ve kohleanın saçlı hücrelerinin normal fonksiyonu için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Bütün raporlarda TMC'de ki mutasyonların prelingual şiddetli işitme kaybına yol açtığı belirtilmiştir. Fare modelleri üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmalar sonucunda ise bu proteinin doğum sonrası silyalı hücrelerin gelişimi ve korunmasında gerekli olduğu anlaşılmıştır^{6,22,28,29}.

2.2.1.2. Otozomal Dominant Genler

2.2.1.2.1. KCNQ4 (Potassium Voltage-Gated Channel, KQT-Like Subfamily, Member 4)

Bu gen voltaj-kapılı potasyum kanal gen ailesinin bir üyesidir ve ilk kez Endonezyalı bir ailede yapılan çalışmalar sonucunda, 1p34'te lokalize DFNA2 bölgesinde haritalanmıştır. Bu gen ailesi KCNQ1 ve KCNE1 genlerini de içerir. Bu üç gen tarafından kodlanan potasyum kanalları kohleada potasyum homeostasisini sağlar. KCNQ4 gen ürünü, tüy hücrelerinin bazolateral yüzeyinde potasyum kanal oluşturur ve potasyum iyonlarının tüy hücrelerinden destek hücrelere doğru akışına izin verir. Daha sonra potasyum iyonlar

destek hücreler arasındaki konneksin kanalları üzerinden stria vaskularis'e geri gönderilir. Burada KCNQ1 ve KCNE1 gen ürünleri tarafından oluşturulan potasyum kanallardan endolimfe tekrar salgılanırlar böylece potasyum homeostasisi sağlanmış olur. KCNQ4 geninde ki mutasyonlar postlingual, ilerleyen tip otozomal dominant işitme kaybına sebep olur. Şimdiye kadar 12 mutasyon raporlanmış olup bunların 10 tanesi missense, 2 tanesi ise delesyon mutasyonlarıdır. Normal kanal alt birimleriyle etkileşime giren mutant proteinlerden dolayı missense mutasyonların dominant-negatif bir etkiye sahip olduğu ve genç yaşta işitme kaybına sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Delesyonların ise geç yaşların başlarında, yüksek frekansta bireyi etkilediği ifade edilmiştir^{3,10,22}.

2.2.1.2.2. COCH (Cochlin)

11 ekzondan oluşan ve 550 aminoasitlik Koklin adında bir protein kodlayan COCH geni 14q11.2-13 DNFA9 bölgesinde lokalize olmuş olup, otozomal dominant işitme kaybı ilişkisi olduğu rapor edilmiştir. Sekansı türler arasında büyük ölçüde korunmuştur. Bu gen ürünün kohlea ve vestibuler sistemde oldukça bol bulunduğu belirtilmiştir. Bu gende meydana mutasyonlar; otozomal dominant, postlingual, non-sendromik ve ilerleyici tip işitme kaybına sebep olmaktadır. Etkilenen bireylerde benzersiz temporal kemik histopatolojik bulguları gözlenmektedir. Dengesizlik gibi vestibuler semptomlar ve yaşlı hastalarda Korti organının dejenerasyonu gözlenebilir. 7 missense mutasyon rapor edilmiştir. Bunlardan 6 mutasyon proteinin LCCL-domaininde meydana gelmiş ve vestibuler bozukluğa sebep olan, geç ortaya çıkan ve ilerleyici işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. vWFA2 domaininde meydana gelen diğer mutasyon ise erken ortaya çıkan, vestibüler disfonksiyon ve anormal oküler motor yanıtları gözlenen işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. P51S; Belçika ve Almanya popülasyonda geç ortaya çıkan işitme kaybında gözlenen en yaygın mutasyondur^{27,30}.

2.2.1.2.3. TECTA (Tectorin Alpha)

Bu gen 11. kromozomunun q22-q24 bölgesinde lokalizedir. Gen 23 ekzon içermektedir²⁷. TECTA, koklea için spesifik bir protein olan alfa-tektorin'i kodlar. Alfa-tektorin, tektoriyal membranın kollajen olmayan glikoprotein bileşenlerinin en büyüğüdür.

Tektoriyal membranın toplam protein içeriğinin yaklaşık %50'sini alfa ve beta tektörin proteinleri oluşturur^{3,10}. Tektoriyal membran, mekanoelektriksel iletinin korti organı tarafından gerçekleştirilebilmesi için hayati önem taşır. Ses uyarıları sırasında tektorial membran korti organına ters yönde hareket ederek stereosilyiaların uçlarını büker. Böylece elektriksel uyarı başlatılır. Tektörin mutasyonları, tektorial membranın sesin iletilmesindeki aracılık fonksiyonunu bozar³. TECTA genindeki mutasyonlar otozomal dominant prelingual non-sendromik işitme kaybına sahip olan farklı ailelerde (DFNA8 ve DFNA12) rapor edilmiştir. Bu lokuslardaki mutasyonlar hem stabil prelingual işitme kaybına hem de ilerleyici tip işitme kaybına yol açabilmektedir. Diğer mutasyon otozomal resesif prelingual sendromik olmayan işitme kaybına sahip bir Lübnanlı ailede (DFNB21) bulunmuştur.(p3) Bu gende 9 missense, 2 delesyon, 1 kırılma bölgesi ve 1 insersiyon mutasyonu tespit edilmiştir²⁶.

2.2.1.2.4. WFS1 (Wolframin)

4p16.1'de DFNA6,14 ve 38 lokuluslarında lokalize olan WFS1 geni, hücrelerdeki kalsiyum miktarını düzenleyen wolframin adında bir glikoprotein kodlamaktadır. Doğru kalsiyum dengesi; hücresel fonksiyonlarda, hücreler arasındaki etkileşimde, kasların kasılmasında ve protein işlenmesinde önemlidir. Wolframin proteini; pankreas, karaciğer, kalp, akciğer, beyin ve böbrek gibi çeşitli dokularda bulunmaktadır. Wolframin protein katlanmasına ve kalsiyumun döngüsünde endoplazmik retikulumun işlevine yardım etmektedir³¹. WFS1'de ki mutasyonlar hem otozomal dominant sensörinöral işitme kaybına hem de Wolfram sendromuna yol açmaktadır. WFS1 sebepli işitme kaybı yüksek frekanslardan değil de sadece düşük frekanslardan etkilendiği için çok karakteristiktir. Yaşla birlikte yüksek frekansları duymada bozukluk meydana gelir. WFS1'de ki dominant mutasyonlar çoğu zaman C-terminal domaininde gözlenmiştir. İspanya populasyonunda 424-425ins16 ve İtalya populasyonunda ise 1362_1377del16 spesifik WFS1 mutasyonlarıdır. Genel olarak; inaktivasyon mutasyonları Wolfram sendromuna, C-terminal bölgesinde ki missense mutasyonlar ise işitme kaybına neden olmaktadır²².

2.2.1.3. X'e Bağlı Kalıtım Gösteren Gen

2.2.1.3.1. POU3F4 (POU class 3 homeobox 4)

Xq21 kromozomu üzerinde bulunan POU3F4 genindeki mutasyonlar sendromik olmayan X'e bağlı ilerleyici tip işitme kaybına (DFN3) neden olmaktadır. POU3F4, transkripsiyon faktörü kodlayan POU gen ailesinin bir üyesidir. İç ve orta kulağın mezenşimasında eksprese olup, kemiklerin olgunlaşmasında görev alır. POU3F4'ün hedef alınarak inaktive edilmesi ile oluşturulan mutant farelerde kemiksi labirentlerin ve orta kulak kemiklerinin anormal gelişimi gösterilmiştir³. DFN3; Mondini displazi, kohlear hipoplazi, üzengi kemiği fiksasyonu ve vestibuler disfonksiyonu ile ilişkili karışık, iletici ve sensörinöral işitme kaybı olabilir. Şimdiye kadar 20 farklı mutasyon tanımlanmış olup bunların 19 tanesi Kafkas ırkındadır. Bu mutasyonlar; DNA bağlanma bölgelerinde missense ve regülatör bölgelerde delesyon olarak gözlenmektedir. İşitme kaybı eğer X'e bağlı kalıtım gösteriyorsa muhtemelen bu gendeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır^{22,27}.

2.2.1.4. Mitokondriyal Kalıtım Gösteren Genler

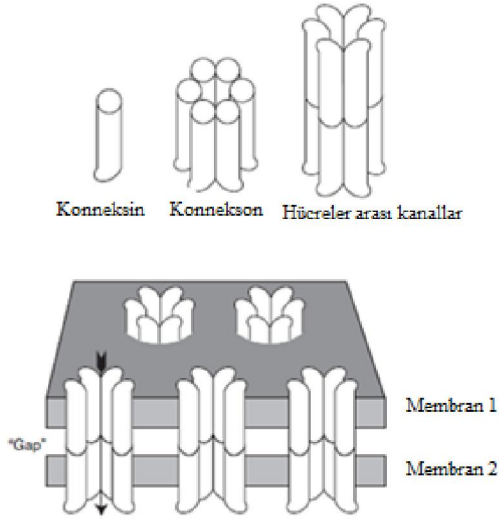
Küçük boyutuna rağmen mitokondriyal genomdaki mutasyonlar nöropati, miyopati, kardiomyopati, retinal dejenerasyon, diabetes mellitus ve işitme kaybı gibi çok çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. İki mitokondriyal genin (MT-RNR1 ve MT-TS1) mutasyonu yalnızca sağlıkla sonuçlanabilmektedir. İlk olarak 1992'de Arap-İsrail ailelerinde yapılan çalışmalarda 12S rRNA geninde meydana gelen homoplazmik A1555G mutasyonun sağlıkla ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bu mutasyonu taşıyan bireylerin bebeklik dönemlerinde ağır şiddetli işitme kaybı gözlenmektedir. Bu mutasyon Asya ve İspanya populasyonlarında sıklıkla ortaya çıkmıştır. Bir diğer işitme kaybına neden olan mitokondriyal geni ise tRNA^{Ser(UCN)} (MT-TS1)'dir. Bu gende işitme kaybı ile ilişkili 4 nokta mutasyonu keşfedilmiştir. A7445G mutasyonu İskoç ailesinde, a7472insC mutasyonu Alman ailede, son olarak T7510C ve T7511C mutasyonları tanımlanmıştır. Bu 2 gendeki mutasyonların neden böyle bir sonuç doğurduğu çok anlaşılmasa da aminoglikozide maruz kalma sonucu saç hücrelerinde hasar meydana geldiği düşünülmektedir^{3,23,27,30}.

2.2.2. Genetik Dışı Faktörler

Konjenital işitme kayıplarının yarısı genetik diğer yarısı genetik dışı faktörlere bağlı olarak gelişmektedir. En yaygın genetik olmayan faktör; konjenital sitomegaloviral enfeksiyonu olarak belirtilmiştir ve prevalansı yaklaşık %0.64'tür²². Diğer non-genetik faktörler işitme kaybı tiplerine göre farklılık gösterebilmektedir. Sensörinöral işitme kaybına yol açan başlıca non-genetik faktörler; yüksek sese maruz kalma, barotravma, kafa travması, cerrahi komplikasyonları, ototoksik ilaç kullanımı, kabakulak gibi virüs enfeksiyonları ve otoimmün nedenlere bağlı olabilir. İletim tipi işitme kaybına yol açan genetik olmayan başlıca faktörler ise; enfeksiyonlar, osteom, ekzositoz, akut, seröz ve kronik otitis media, iyatrojenik, travmalar, tümörler (adenom, lösemi vs.), metabolik ve sistemik hastalıklardır. Ayrıca yaşla birlikte işitme bozukluklarının görülme sıklığı oldukça artmaktadır^{4,8,16,18}.

2.3. KONNEKSİNLER (Gap Junction)

Gap junctionlar (GJB) komşu hücreler arasında kanallar oluştururlar. Bu kanalların çekirdek proteinleri konneksinlerdir. Bu nedenden dolayı GJB'ler konneksin olarak da adlandırılmaktadır. Gap junctionların yapısı ve komşu hücreler arasında ki iletişim ilk olarak yaklaşık 55 yıl önce elektron mikroskopu çalışmalarında gözlenmiştir³². GJB'ler komşu hücreler arasında iyonların ve küçük moleküllerin doğrudan difüzyonunu sağlamaktadır. Gap junctionların fizyolojik işlevleri; sinaptik iletim, hormon-reseptör sinyalizasyonu ve hücre adezyonu gibi intraselüler sinyallere bağlıdır. Bu proseslerin hepsi iyon kanalları, G-protein reseptörleri (GPCRs) veya reseptör tirozin kinaz gibi membran protein araçlıdır. Bu hücreler arası kanallar; 2 hemikanal konneksonların uç uca eklenmesiyle oluşur. Bir konnekson; integral membran proteini olan konneksinlerin birleşerek 6'lı yapı (Şekil 2.3) oluşturmasıyla meydana gelir³⁶.



Şekil 2.1. Konneksin, konneksion ve hücreler arası kanallar³⁶

Komşu hücrelerin düşük dirençli yollar boyunca iyon paylaşım becerileri, nöronlar, kalp ve düz kas gibi uyarılabilen hücreler için çok önemlidir. Gap junctionlar ilk olarak komşu hücreler arasında ki elektrik iletim özelliklerinden dolayı, kalp kasında ve sinirlerde keşfedilmiştir. Bu bağlamda, gap junction ile bağlanmış hücreler hem sinaptik iletim hızında artışa hem de senkronize hücrelerin elektriksel ve mekaniksel olarak koordine olmasına sebep olur. Elektriksel olarak uyarılabilen hücelere ek olarak solid dokuların hemen hemen bütün hücreleri gap junctionlar ile birleşik haldedirler. GJIC'in (hücreler arası gap-junctional iletim) ana işlevi; hücre gruplarında metabolik ihtiyaçları paylaşmak ve böylece besin veya sinyal moleküllerinin mekânsal geçişlerini tampon etmektir³³. Dezmozomlar, tight junctionlar, adherens junctionlar ve gap junctionlar elektron mikroskopunda morfolojik görüntülerine göre tanımlanabilirler. Kanıtlar gösteriyorki hücreler arası bağlantılar gen transkripsiyonunu ve büyüme kontrolünü düzenleyen sinyalleri başlatırlar. Gap junction kanallarının por büyüklüğü yaklaşık 1000 Da'dan az moleküllerin geçişine izin verir. Gap junction iletişimi; nöronlarda ve kalpte aksiyon potansiyellerinin hızlı iletimini, nükleotid ve glukoz gibi besin ve metabolitlerin difüzyonu, apoptozun, gen transkripsiyonun ve büyüme kontrolünün indüklenmesinde görev alan Ca

(kalsiyum), inositol trifostat (IP₃) ve siklik nükleotid gibi ikinci mesajcıl sinyallerin difüzyonu gibi birçok proseste yer almaktadırlar³⁴.

Gap junctionlar ineksin, panneksin ve konneksin olmak üzere 3 alt aileye ayrılmaktadır³⁸. İlk keşfedilen gap junction; konneksindir. 1980'lerde ilk konneksin geni izole edildi. Konneksin gen ailesinin insanda yaklaşık 21 üyesi bulunmaktadır³⁵. Bir tek hücre tipinde tek bir konneksin eksprese olabilirken birden çok farklı konneksinlerde eksprese olabilir³⁶. Konneksinlerin alfa, beta ve gama olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır³⁷. Ayrıca molekül kütlelerine göre isimlendirilirler. Örnek olarak; Cx30'un molekül kütlesi, 30.366 Da'dır. Yalnız molekül kütlesi tek kanal iletkenliğini belirlemez. Örneğin; Cx40 formunun iletkenliği Cx43'e göre daha fazladır³⁸. Konneksinlerin her biri korunmuş sistein artığı 4 transmembran alfa helix ve 2 ekstra selüler looplardan oluşması beklenir. Bu sisteinler looplar arasında disülfid bağlarını oluştururlar. Bunlar da gap junctionun işlevsel formasyonun oluşması için gereklidir³⁶. Birçok çalışmada konneksinlerin hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve gelişim kontrolünde rol oynadığı belirtilmiştir. Onların malformasyonu sonucu sağırılık, nörolojik ve cilt rahatsızlıkları gibi durumlar ortaya çıkmaktadır³⁵. Konneksinler farklılaşan iskelet kası, eritrosit ve olgun sperm hücreleri dışında bütün dokularda ifade edilmektedir. Konneksin izoformlarının sinir hücrelerinde sıklıkla eksprese olduğu gösterilmiştir. Nöronlardaki temel konneksinler; Cx36, Cx30 ve Cx45'tir. Cx32 ve Cx43 karaciğerde, Cx26 ve Cx30'un iç kulakta, Cx43, Cx46 ve Cx50'nin lens elyaf hücrelerinde, Cx43, Cx40 ve Cx45'in ise kalp gelişiminde rol aldığı rapor edilmiştir³⁵⁻³⁸.

2.3.1. GJB2 (Connexin 26)

İşitme kaybı yaklaşık 1000 doğumda 1 gözlenen en yaygın duyuşsal bozukluktur. Vakaların %50'sinden genetik faktörler sorumludur. Kalıtsal olguların yaklaşık olarak %80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %1'i X'e bağlı ve %1'inden daha az mitokondrial kalıtım göstermektedir. İşitme kaybı oldukça genetik heterojenite gösteren bir rahatsızlık olmasına rağmen konjenital otozomal resesif kalıtım gösteren vakaların yaklaşık %50'sinden GJB2 (Cx26)' de meydana gelen mutasyonlar sorumludur. GJB2'nin otozomal resesif işitme kaybına neden olduğu ilk kez 1994'te otozomal resesif prelingual işitme

kaybı bulunan iki Tunuslu ailede yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmış olup işitme kaybına neden olan ilk gen olarak literatüre geçmiştir³⁹⁻⁴¹.

Konneksinler oligomerleşip plazma membranında bulunan hexameric hemikanallar olarak bilinen konneksionları oluştururlar. Konneksionlarda bir araya gelerek gap junction kanallarını oluştururlar. Bu kanallar 1,200Da kütesine kadar, iyonların ve küçük metabolitlerin geçişine izin verir³⁹. GJB2 geni konneksin26 proteinini kodladığı için bu isimle de adlandırılmaktadır. Konneksin 26 (GJB2) geni iki ekzona sahiptir. Kodlama bölgesi olmayan ekzon 1 ve kodlama bölgesi olan ekzon 2 ile 3'- UTR bölgesi bulunmaktadır. Toplam 5513 bazdan oluşmuştur ve 226 aminoasitlik protein kodlar. GJB2 ekspresyonu farklı doku ve hücrelerde gösterilmiştir. GJB2 (konneksin 26, Cx26) geni kohleada stria vascularis (stV), bazal membran (BM), spiral limbus (Li) ve spiral ligament (SL) bölgelerinde ifade edilmektedir¹⁰. 13q11-12 bölgesinde lokalize olmuş olan Cx26'nın tümör dokularında down regüle olduğu böylece Cx26'nın tümör süpresör geni olarak değerlendirildiği ve Cx26'nın hücre bölünmesinin S ve G2 fazında senkronize hücrelerde upregüle olduğu belirtilmektedir. Rat kohleasının immünohistokimyasal boyamasında Cx26 proteinin ifade olduğu kohlear hücrelerinin 2 grup olduğu gösterilmiştir. 1. grup hücrelerde; spiral limbusun interdental hücreleri, iç sulkus hücreleri, korti organı destek hücreleri ve dış sulkus hücreleri yer almaktadır. Bunların hepsi duyuşal olmayan epiteliyal hücreleridir. 2. Grup hücrelerde ise spiral limbusun fibrositleri, stria vaskularisin bazal ve ara hücreleri ve skala vestibüleri saran mezenkimal hücreler yer almaktadır. Bunların hepsi ise bağ dokusu hücreleridir⁴². Kanıtlar gösteriyor ki iletim işleminde sırasında Cx26 endolenfatik potasyum iyonlarının geri dönüşümüne aracılık etmektedir. Ayrıca ikincil mesajcıl IP₃ (inositol trifosfat)'ün hücreler arası iletişimde gerekli olduğu ve epidermiste keratinositlerin büyümesinde ve farklılaşmasında da önemli rol oynadığı belirtilmiştir³⁹.

13q11-12 bölgesinde lokalize olan Cx26 genindeki mutasyonların hem otozomal resesif hem de otozomal dominant kalıtım gösteren işitme kaybına neden olduğu bilinmesiyle birlikte otozomal resesif vakaların yaklaşık %80'ninden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Şimdiye kadar literatür çalışmalarına göre GJB2 geninde işitme kaybı ile ilişkili 220 farklı mutasyon tespit edilmiştir²². GJB2 genindeki sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybına yol açtığı bilinen en yaygın mutasyon 35delG'dir. Bu mutasyon

kodon 10'da 6 guanin nükleotid dizisinden 5.guaninin delesyonudur. Çerçeve kaymasına yol açar ve kodon 12'deki glisin amino asitini valine dönüştürür. Böylece 13. kodonda bir stop kodonu oluşturur ve premature protein oluşmasına neden olur²⁷. Kafkas ırkında ve Akdeniz populasyonunda gözlenen en yaygın mutasyondur. Afrikada; R143W mutasyonu, Almanya-Polonya Yahudilerinde; 167delT mutasyonu, Asyalılarda; 235delC mutasyonu, Hindistan da ise en sık gözlenen mutasyon W24X mutasyonudur⁴³. Bunların yanı sıra bu gendeki birkaç spesifik mutasyon otozomal dominant kalıtım gösteren işitme kaybına neden olmaktadır. Bunlar; M34T, W44C, R75W, D66H ve G59A mutasyonlarıdır¹⁰.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Eritrosit Lizis
- Fizyolojik Tampon
- TE-9 Tampon
- SDS
- Proteinaz-K (QIAGEN)
- Sodyum Klorür (NaCl)
- Etil Alkol
- Tris-EDTA
- 1X TBE Solüsyonu
- Etidiyum Bromür
- PCR Mix.
- GJB2 Sekans Primerleri
- G/C Enhancing Buffer
- Taq Polimeraz Enzimi
- Distile Su
- ExoSAP-IT
- Dye Terminator Mix.
- Sequencing Buffer
- M-13 Primer (Forward-Reverse)
- Sephadex

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Su banyoları (Grant)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Terazi (Shimadzu 321-33557)
- pH metre (Inolab)
- UV jel görüntüleme sistemi (UVItec)
- Otomatik pipetler (Gilbson, Biohit, Socorex)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Etüv (Dedeoğlu)
- Elektroforez güç kaynağı (EC3000-90)
- Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
- PZR cihazı (Bioer Xp Thermal Cycler)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Deepfreez (Siemens, Bosch)
- Otoklav (Trans)
- 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Plate-Septa 96-Well (Applied Biosystems)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.

3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grupları Çukurova bölgesinde Kozan İlçesinde yaşayan 2 ailede konjenital işitme kaybına sahip olan bireylerden kontrol grupları ise hasta kişilerin yaşayan çekirdek aile bireylerinden oluşturuldu. 1. ailede hasta kişiler TH1 (hasta1), TH2 (hasta2) gibi hasta sayısı kadar yazılarak kodlandırıldı. Kontrol grupları ise benzer olarak TK1, TK2 gibi kodlandırıldı. 2. ailede hasta bireyler ise 1. aile için yapılan kodlamalar gibi GH1, GH2

gibi, kontrol grubu GK1 (Kontrol 1), GK2 olarak kodlandırıldı. Bu çalışmada 1. ailede 4 hasta 5 kontrol gurubu, 2. ailede ise 5 hasta, 2 kontrol grubu olmak üzere toplam 16 birey birbiri ile kan bağı olan bireyler moleküler biyolojik açıdan değerlendirildi. Bu kişilerden EDTA'lı tüplere kan alındı. Tüpler alt üst edilerek kanların pıhtılaşması önledi. Kan örnekleri DNA elde etmek üzere kullanıldı.

3.2.1. Hasta Rızası

Çalışmada yer alan tüm hasta ve kontrol grubunun çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış DNA Çalışması Onam Formları doldurularak sağlandı (Ek-3).

3.3. Yöntem

3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi

Bu çalışmada periferik kandan DNA elde etmek için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği “salting out” (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı⁸⁴.

1. 1,5 ml'lik ependorf tüpü içerisine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, eritrosit lizis (Ek-1.1) solüsyonundan da 700 µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk. oda ısısında bekletildi. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
2. Elde edilen pellet üzerine 700µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözdürüldü. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
3. Pellet üzerine 1000 µl (1 ml) fizyolojik tampon (Ek-1.2) eklenerek çözdürüldü. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
4. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (Ek-1.3) tamponu ilave edilerek çözdürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS (Ek-1.4) ile 20 µl Proteinaz-K (Ek-1.5) ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı. 65°C'de 1-2 saat benmaride tutuldu. 20 dk aralıklarla tüp alt üst edildi.

5. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl 6M NaCl (Ek-1.6) ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalandı ve 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatant tekrar 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatantın üzerine 900 µl %100'lük etil alkol eklendi. Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi formunda görülebilmektedir.
8. Ependorf tüpü 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
9. Tüpün dibine yapışan DNA'yı kaldırmak için 1000 µl %70'lik etil alkol (Ek-1.7) eklendi. 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
10. Süpernatant döküldükten sonra tüp ters çevrilip DNA'nın tüpe yapışması için 15 dk beklendi.
11. DNA'nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) (Ek-1.8) konuldu.
12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C benmaride, 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.
13. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi. Uzun süreli saklamalar için ise -20 °C ye alındı.

3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

PZR sonrasında elde edilen ürünlerin varlığını kontrol etmek için kolay ve hızlı hazırlanması sebebi ile agaroz jellerden yararlanıldı. Genellikle %2 ve %3 oranında agaroz jel kullanıldı.

1. Çalışmaya başlamadan önce jel kabı iyice temizlenip kurutulduktan sonra jel dökme kalıbına yerleştirildi. Bu kalıp, düz bir yüzeye kondu. Kuyuların oluşturulması için kullanılan taraklar düzgünce yerlerine yerleştirildi.
2. Jel dökme kabının boyutları ile jelin kalınlığı dikkate alınarak hesaplama yapıldı. 8 X 9cm boyutundaki jel kabına % 2 konsantrasyonunda jel dökmek için erlenmayerde 1 g agaroz tartılıp, 50 ml 1X TBE solüsyonu (Ek-2.1) eklendi. Mikrodalga fırında agaroz

iyice eriyene kadar ısıtıldı.

3. Jelin içine 3 µl stok EtBr (Etidiyum bromür) (Ek-2.2) solüsyonundan ilave edildi. Kuvvetli mutajen ve toksik olan Etidiyum bromür içeren çözeltilerle çalışırken her zaman eldiven kullanıldı.
4. Agaroz çözeltisi, sıcaklığı 45-50 °C'ye (el yakmayacak sıcaklığa) gelinceye kadar soğutuldu.
5. Ilık agaroz çözeltisi hava kabarcığı oluşturulmadan dikkatlice jel dökme kabına döküldü.
6. Jel, oda sıcaklığında yaklaşık 30-45 dakikada polimerize olması beklenildi.
7. Jel elektroforez tankına alındı, tankın içerisine üzerini örtecek kadar 1 X TBE tamponu ilave edildi. Taraklar dikkatlice çekilerek yükleme yapmak için kuyucuklar hazır hale getirildi.

3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Kontrol edilmek istenen DNA örnekleri jel yükleme tamponu (Loading dye) (Ek-2.3) ile birlikte yüklendi.

Jel yükleme (veya DNA yükleme) tamponu; örneğin yoğunluğunu artırarak DNA'nın kuyucuğun içine düzgün olarak aktarılmasını sağlar. Örneği renklendirerek kuyulara yüklenme işlemini basit hale getirir. Elektriksel alanda örneklerin göç hareketinin takip edilmesi sırasında kolaylık sağlar.

- Jelin sağındaki veya solundaki ilk kuyuya moleküler ağırlığı bilinen marker DNA'dan 5µl yüklendi.
- Mikropipet ile 5 µl PZR ürünü ile 1 µl Bromfenolmavisi içeren 6X yükleme tamponu karıştırıldı. Toplamı 6 µl olan karışım kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 60 dakika elektrik akımı altında yürütüldü.
- Jel UVİdoc cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel görüntüleri diskete kaydedildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yönteminin Uygulanması

PZR yöntemi, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen

herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ve hızlı in-vitro DNA sentez yöntemidir.

PZR reaksiyonunun hazırlanmasında temel olarak sırasıyla şu aşamalar takip edildi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20°C 'tan alınıp çözdürüldü.
- 200 μl 'lik PZR tüpleri üzerlerine örnek numarası yazılarak hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- PZR miks hazırlamak için 200 μl 'lik PZR tüpüne daha önce hesaplanan miktarlarda PCR mix, GJB2 sekans primerleri, G/C Enhancing Buffer ve Taq polimeraz eklendi.
- Tüp önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Numaralandırılmış her bir PZR tüpüne önceden hesap edilen miktarlarda su ve numarasına ait DNA eklendi.
- Daha sonra PZR miks tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- Böylece tüplerin her birine tüm PZR bileşenleri eklenmiş oldu.
- Tüpler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

3.3.4.1 GJB2 Geni Tüm Bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması

Çalışmamızda *GJB2* geninin tüm bölgelerini (Ekzon1, Ekzon2 (2A ve 2B)) çoğaltmak için GML kitinde hazır halde gelen primerler seçildi. GML GJB2 kit protokolünde yer alan uygun amplifikasyon koşulları PZR reaksiyonları için kullanıldı. (Çizelge 3.1)

PZR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılan malzemelerin tümünün yer aldığı GJB2 kiti ticari olarak satın alındı ve kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

Çizelge 3.1. GJB2 geni tüm bölgelerinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon karışımı	Kullanılan miktar
GML PCR Mix	7.5 µl
GJB2 Primer Mix	1 µl
Taq polimeraz enzimi	0,2 µl
G/C Enhancing Buffer	3 µl
Distile Su	2 µl
Genomik DNA	1,5 µl
Toplam Hacim	15,20 µl

Çizelge 3.2. GJB2 geni tüm bölgelerinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Aktivasyon	96.0°C	5dk
2. Amplifikasyon (40 Döngü)	94.0°C	30 sn
	59.0°C	45 sn
	72.0°C	45 sn
5. Uzama	72.0°C	10 dk
6. Bekleme	4.0°C	Süresiz

Örneklerin amplifikasyonu ve elde edilen bantların kontrolü önceden anlatıldığı gibi (3.3.3), örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.5. PZR Reaksiyon Ürününün Temizlenmesi Yöntemi

Agaroz jel elektroforeziyle amplifikasyon kontrolü yapıldı, amplifikasyon görülen PZR ürünü (5 µl) 200 µl'lik mikrosantrijüj tüpüne aktarıldı. Temizleme işlemi için kullanılan ExoSAP-IT sıvısından 2 µl alınıp PZR ürünlerinin aktarıldığı tüplere ilave edildi.

Hazırlanan karışım önce vortekslendi, sonra kısa bir santrifüj işlemi ile GML GJB2 kit prosedüründe yer alan temizleme reaksiyonu için hazır hale getirildi.

Çizelge 3.3. PZR ürünlerinin temizlenme reaksiyonu için hazırlanan karışım

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (μl)
Amplifiye Ürün (PZR ürünü)	5.0 μ l
ExoSAP-IT	2.0 μ l
Toplam Hacim	7.0 μ l

Çizelge 3.4. PZR ürünlerinin temizleme reaksiyon döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1.Enzim İnkübasyon	37.0 °C	30 dk
2.Enzim İnaktivasyonu	80.0 °C	15 dk
3.Bekleme	4.0 °C	Süresiz

Temizleme reaksiyonunun sonlandırılması ile birlikte Sekans reaksiyonunun hazırlanma aşamalarına geçildi.

3.3.5.1 GJB2 Genin Sekans Reaksiyonunun Hazırlanması

PZR ürününün temizlenmesi aşamasından sonra sekans reaksiyonu için kullanılmak üzere malzemeler ve miktarları GML kiti protokülüne göre hazır hale getirildi. Tüm bölgelerin dizileri hem reverse hem de forward olmak üzere ayrı tüplerde PZR işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. Sekans reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Miktarı
Dye Terminator Mix	2.0 µl
Sequencing Buffer	2.0 µl
Sequencing Primer (Forward veya Reverse)	2.0 µl
Distile Su	2.0 µl

200 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne hazırlanan 8 µl'lik karışım içerisine 2 µl ExoSap ürününden ilave edildi. Kısa bir vorteksten sonra 30 saniye 1600g'de santrifüj edildi. Daha sonra GML GJB2 kit protokolünde yer alan uygun sekans reaksiyon koşulları için kullanıldı.

Çizelge 3.6. Sekans reaksiyonu için hazırlanmış uygun ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1.Aktivasyon	96.0 °C	1 dk
2.25 Döngü	96.0 °C	10 sn
	50.0 °C	5 sn
	60.0 °C	4 dk
3.Bekleme	4.0 °C	Süresiz

Sekans reaksiyonu bittikten sonra sekans ürünlerinin pürifikasyon işlemine geçildi.

3.3.5.2 GJB2 Geni Sekans Ürünlerinin Pürifikasyonu ve Plate Kuyularına Yükleme İşlemleri

700 µl sephadex (14 ml için 1gr. Sephadex) 2 µl'lik kolon tüpe aktarıldı ve 4600 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Aşağıda kalan kısım boşaltıldı ve üstte kolonumuz hazır hale geldi. Daha sonra 10 µl sekans ürünü kolona deşmeyecek şekilde kolonun üzerine bırakıldı ve 4600 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu sefer alttaki alttaki sıvı (yaklaşık 10 µl) 96'lık reaksiyon plate kuyularına aktarıldı. 10 µl'den az sıvıların üzerine eksik olan

miktar kadar saf su ilave edildi. Kuyulara aktarma işlemi bittikten sonra plate septa ile kapatıldı ve yürütülmesi için genetic analyzer cihazına yüklendi. İşlem bittikten sonra GJB2 geninin çoğaltılan tüm bölgeleri mutasyon ve polimorfizm açısından incelendi.

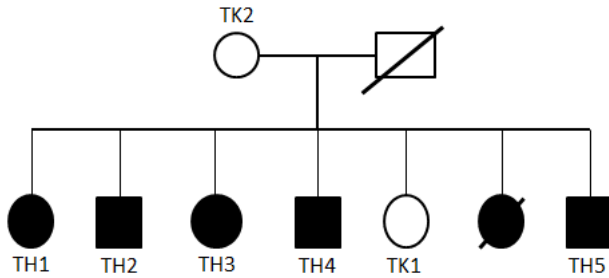
4. BULGULAR

Vaka rapor çalışmamıza Adana ilinin Kozan ilçesinde yaşayan ve konjenital işitme kaybı gözlenen 2 farklı aile dahil edildi. İşitme kaybı olan bireylerin yanı sıra herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm söz konusu olduğunda hastalığa ne kadar etkisi olduğunu daha net anlayabilmek için işitme kaybı gözlenmeyen kardeşleri ve ebeveynleri de kontrol olarak ele alındı. 1. ailemizde 5 hasta ve 2 kontrol, 2. ailemizde ise 4 hasta ve 5 kontrol olmak üzere toplam 16 birey araştırıldı. Toplanan kanlardan tuzla çöktürme yöntemi ile elde edilen DNA'lar PZR yöntemi kullanılarak GJB2 geninin tüm bölgeleri çoğaltılıp, sekanslama yöntemi ile tüm nükleotid dizisi belirlenerek mutasyonlar ve polimorfizmler tespit edildi.

4.1. Moleküler Genetik Analizler

4.1.1. Birinci Ailenin GJB2 Geni PZR ve Sekans Analizleri

GJB2 geninin tüm nükleotid dizisi PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR ile tüm bölgelerin çoğaldığı teyit edildikten sonra sekans yöntemi uygulandı. Ailenin pedigrisi aşağıda gösterildiği gibi 7 çocuktan 1 tanesi normal diğer 6'sında ise konjenital işitme kaybı bulunmaktadır. Ebeveynlerde herhangi bir işitme kaybı gözlenmediğinden dolayı bu bozukluğun otozomal resesif kalıtım gösterdiği görülmektedir. Bu 6 bireyin 5'i hala hayattadır. Anne ve normal olan çocuk kontrol olarak çalışmada yer almıştır.



Şekil 4.1. Birinci Ailenin Pedigrisi

2 kontrol 5 hasta olmak üzere toplam 7 bireyin sekans sonuçlarına göre polimorfizmler ve mutasyonlar tespit edilmiştir. Gözlenen genotipler Çizelge 4.1’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.1. Konjenital işitme kayıplı bireylerde ve kontrollerde belirlenen genotipler

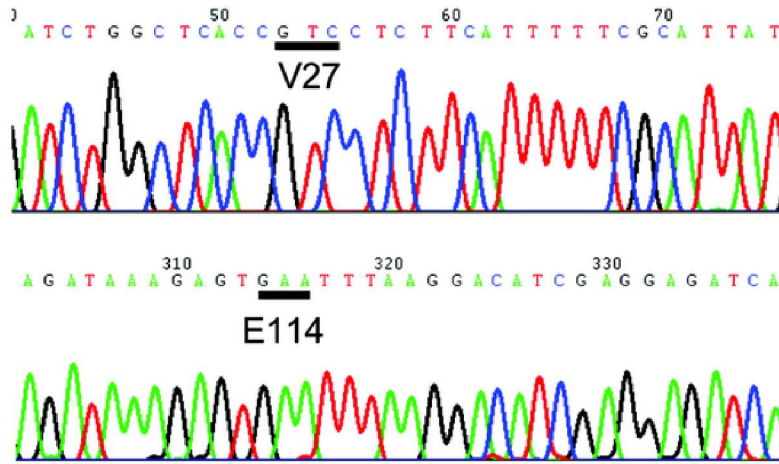
Hasta ve Kontrol Numaraları	Genotip
TH1	V27I + E114G / normal
TH2	V27I + E114G / normal
TH3	normal / normal
TH4	V27I / normal
TK1	V27I / normal
TH5	V27I + E114G / normal
TK2	V27I + E114G / normal

Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi 4 bireyde V27I + E114G bileşik heterozigotluk, 2 bireyde V27I heterozigot mutasyonu ve 3 bireyde 4159 T>C polimorfizmi görülmüştür. V27I heterozigot mutasyonda sadece bir allelde izolösin aminoasidinin valin aminoaside dönüştüğü görülmüştür. E114G heterozigot mutasyonunda ise glutamik aminoasit glisin aminoasidine dönüşmüştür. Tespit ettiğimiz değişimlerin nükleotid varyasyonu, bulunduğu protein bölgesi ve mutasyon tipleri Çizelge 4.2’de gösterildiği şekildedir.

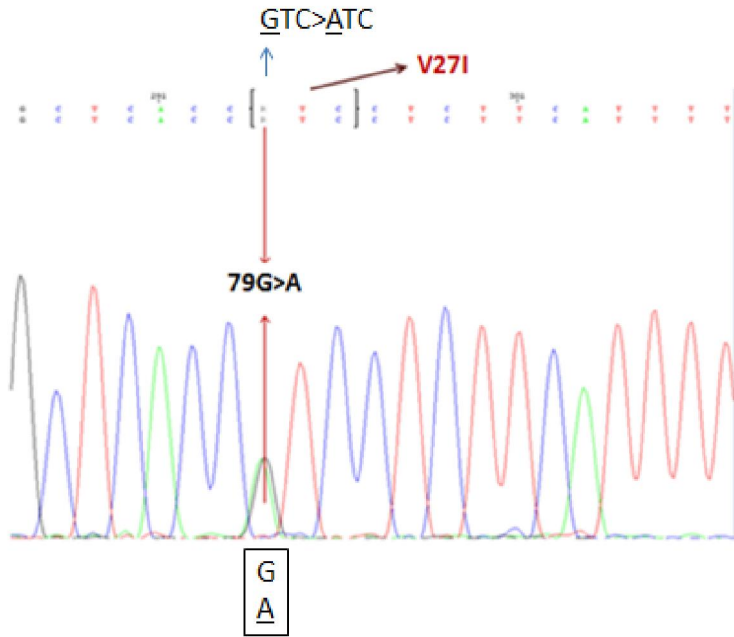
Çizelge 4.2. Keşfedilen mutasyonlar ve tipleri

Mutasyon	Nükleotid Varyasyonu	Protein Bölgesi	Aminoasit Değişimi	Mutasyon Tipi
V27I	79 G>A	TM1 (Transmembran protein bölgesi)	Valin>İzolösin	Missense
E114G	341 A>G	IC (Hücreler arası)	Glütamik Asit>Glisin	Missense

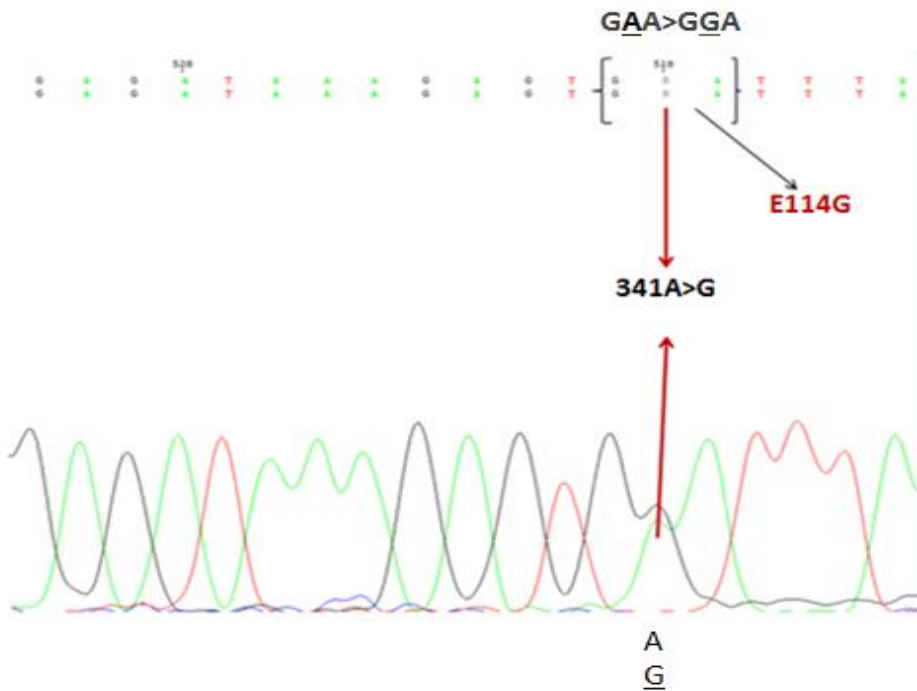
Bulduğumuz mutasyonların nükleotid dizilimi ve bulunduğu bölgeler Şekil 4.2’de gösterildiği gibidir.



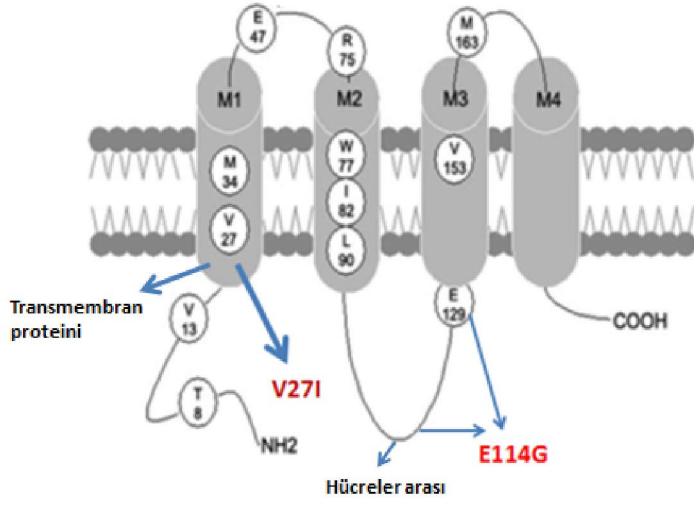
Şekil 4.2. V27 ve E114 aminoasit bölgelerinin GJB2 genindeki nükleotid dizilimi



Şekil 4.3. V27I (79 G>A) heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi



Şekil 4.4. E114G heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi

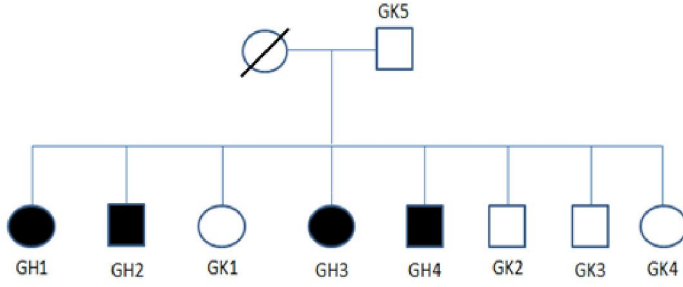


Şekil 4.5. V27 ve E114 aminoasit bölgelerinin hücredeki yerleri⁴⁹

Şekil 4.5’de görüleceği gibi bizim birinci ailemizde saptanan V27I mutasyonu transmembran bölgesinde, E114G ise hücreler arası bölgede bulunmaktadır⁴⁸.

4.1.2. İkinci Ailenin GJB2 Geni PZR ve Sekans Analizleri

GJB2 geninin tüm nükleotid dizisi PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR ile tüm bölgelerin çoğaldığı teyit edildikten sonra sekans yöntemi uygulandı. Ailenin pedigrisi aşağıda gösterildiği gibi 8 çocuktan 4 tanesinde konjenital işitme kaybı gözlenirken diğer 4 birey tamamen normaldirler. Çocukların yanı sıra da kontrol grubuna babaları da eklenmiştir. Şekil 4.6’da gösterildiği gibi toplam 9 bireyden 4’ü hasta 5’i normaldir.



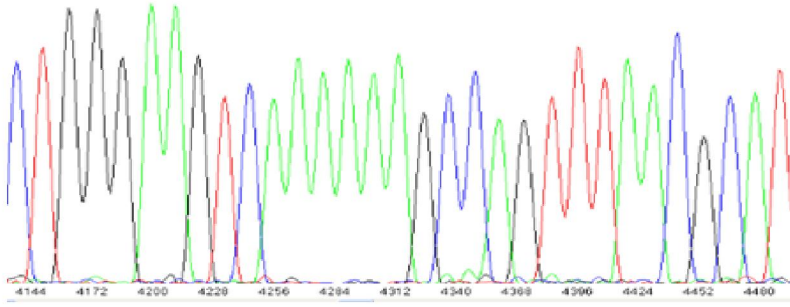
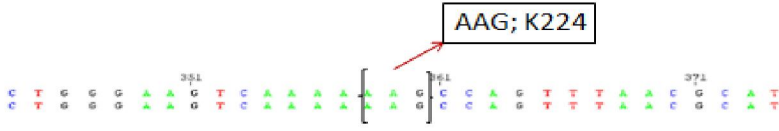
Şekil 4.6. İkinci Ailenin Pedigrisi

5 kontrol 4 hasta olmak üzere 9 bireyin sekans sonuçlarına göre polimorfizmler ve mutasyonlar tespit edilmiştir. Bulunan tüm değişimler Çizelge 4.3'te gösterildiği gibidir.

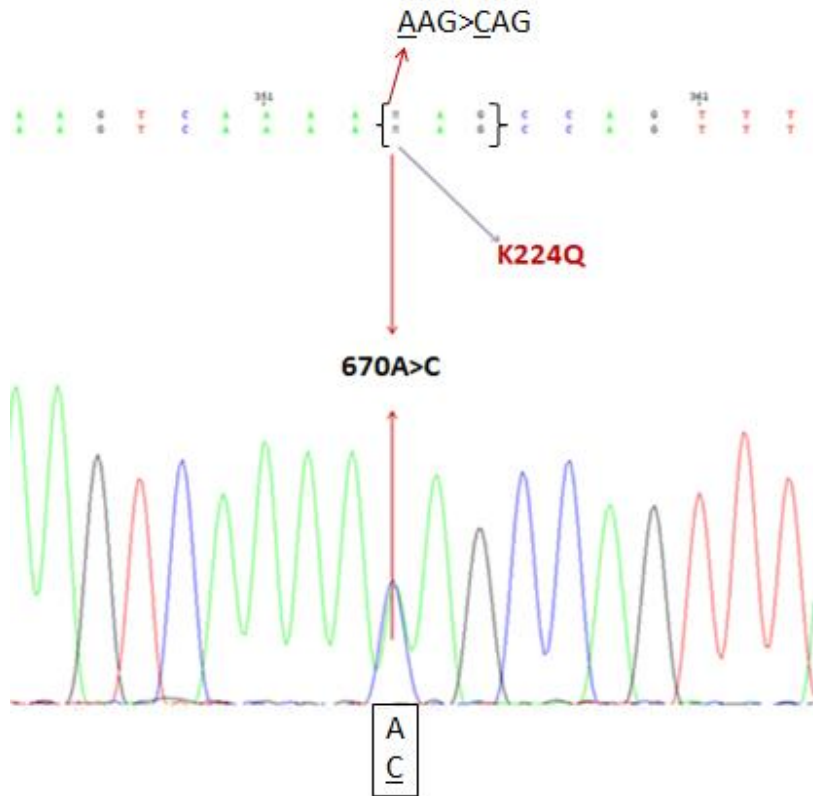
Çizelge 4.3. İkinci ailede tespit edilen mutasyonlar ve polimorfizmler

Hasta ve Kontrol Numaraları	Mutasyonlar	Polimorfizmler
GH1	K224Q	-
GH2	-	4159 T>C
GH3	-	363 G>A, 327 G>A
GH4	-	535 G>A
GK1	K224Q	327 G>A
GK2	K224Q	327 G>A, 363 G>T
GK3	K224Q	327 G>A
GK4	-	363 G>A
GK5	-	363 G>A

Çizelge 4.3'de gösterildiği gibi hem kontrol hem de hasta bireylerde mutasyon olarak sadece 1 allelde lizin aminoasidinin glutamin aminoasidine dönüştüğü K225Q missense mutasyonu gözlenmiştir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi her iki allelde adenin bazı olması gerekirken bir allelde adenin diğer allelde ise sitozin bazı bulunmaktadır.

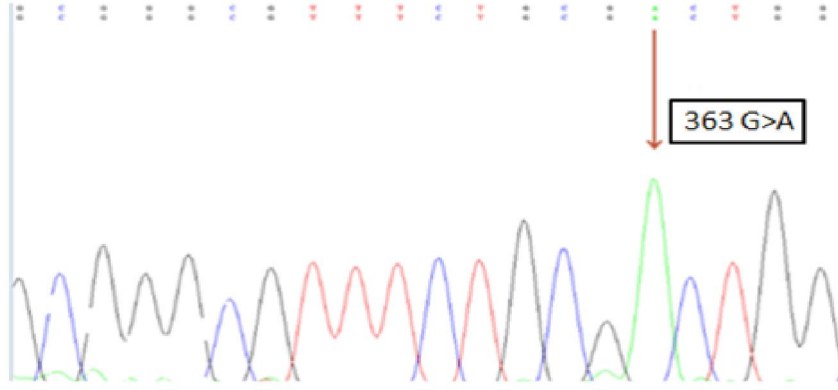


Şekil 4.7. K224 bölgesinin nükleotid dizilimi



Şekil 4.8. K224Q heterozigot mutasyonlu bireyin nükleotid dizilimi

K224Q heterozigot mutasyonunun yanı sıra 4 bireyde 327G>A, 3 bireyde 363G>A, 1 bireyde 363G>T, 1 bireyde 535G>A homozigot polimorfizmleri ve 1 bireyde 4159T>C heterozigot polimorfizmi gözlenmiştir.



Şekil 4.9. 363G>A polimorfizimli bireyin sekans analizi

5. TARTIŞMA

GJB2 geninde meydana gelen mutasyonların sendromik, non-sendromik, doğuştan ve doğuştan olmayan işitme kayıplarına neden olduğu bilinmektedir. Çoğu zaman bu gende ki mutasyonların direk olarak işitme kaybına neden olduğu bazen ise dolaylı yoldan hastalığın ortaya çıkmasında katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Gap junctionlar ilk olarak komşu hücreler arasında ki elektrik iletim özelliklerinden dolayı, kalp kasında ve sinirlerde keşfedilmiştir. Bu bağlamda, gap junction ile bağlanmış hücreler hem sinaptik iletim hızında artışa hem de senkronize hücrelerin elektriksel ve mekaniksel olarak koordine olmasına sebep olur. Elektriksel olarak uyarılabilen hücelere ek olarak solid dokuların hemen hemen bütün hücreleri gap junctionlar ile birleşik haldedirler. Hücreler arası gap-junctional iletim (GJIC)'in ana işlevi; hücre gruplarında metabolik ihtiyaçları paylaşmak ve böylece besin veya sinyal moleküllerinin mekânsal geçişlerini tampon etmektir³³. Gap junction iletişimi; nöronlarda ve kalpte aksiyon potansiyellerinin hızlı iletimini, nükleotit ve glikoz gibi besin ve metabolitlerin difüzyonu, apoptozun, gen transkripsiyonun ve büyüme kontrolünün indüklenmesinde görev alan kalsiyum, inositol trifostat ve siklik nükleotit gibi ikinci mesajcıl sinyallerin difüzyonu gibi birçok proseste yer almaktadırlar³⁴.

İşitme kaybı; yaklaşık 1000 doğumda 1 gözlenen en yaygın duyuşsal bozukluktur. Vakaların %50'sinden genetik faktörler sorumludur. Kalıtsal olguların yaklaşık olarak %80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %1'i X'e bağılı ve %1'inden daha az mitokondrial kalıtım göstermektedir. İşitme kaybı oldukça genetik heterojenite gösteren bir rahatsızlık olmasına rağmen konjenital otozomal resesif kalıtım gösteren vakaların yaklaşık %50'sinden GJB2'de meydana gelen mutasyonlar sorumludur. GJB2'nin otozomal resesif işitme kaybına neden olduğu ilk kez 1994'te otozomal resesif prelingual işitme kaybı bulunan iki Tunuslu ailede yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmış olup işitme kaybına neden olan ilk gen olarak literatüre geçmiştir³⁹⁻⁴¹.

GJB2 ekspresyonu farklı doku ve hücrelerde gösterilmiştir. GJB2 geni kohleada stria vascularis, bazal membran, spiral limbus ve spiral ligament bölgelerinde ifade edilmektedir¹⁰. Onüçüncü kromozomun q11-12 bölgesinde lokalize olmuş olan Cx26'nın tümör dokularında düşük seviyede regüle olduğu böylece GJB2'nin tümör süpresör geni

olarak değerlendirildiği ve hücre bölünmesinin S ve G₂ fazında senkronize hücrelerde fazla regüle olduğu belirtilmektedir. Rat kohleasının immünohistokimyasal boyamasında Cx26 proteinin ifade olduğu kohlear hücrelerinin 2 grup olduğu gösterilmiştir. Birinci grup hücrelerde; spiral limbusun interdental hücreleri, iç sulkus hücreleri, korti organı destek hücreleri ve dış sulkus hücreleri yer almaktadır. Bunların hepsi duyuşal olmayan epiteliyal hücreleridir. İkinci grup hücrelerde ise spiral limbusun fibrositleri, stria vaskularisin bazal ve ara hücreleri ve skala vestibüleri saran mezenkimal hücreler yer almaktadır. Bunların hepsi ise bağ dokusu hücreleridir⁴². Daha önceki yapılan çalışmalara göre sinyal iletimi sırasında Cx26 proteini endolenfatik potasyum iyonlarının geri dönüşümüne aracılık etmektedir. Ayrıca ikincil mesajcıl inositol trifosfat'ın hücreler arası iletişimde gerekli olduğu ve epidermiste keratinositlerin büyümesinde ve farklılaşmasında da önemli rol oynadığı belirtilmiştir³⁹.

İki aileyi kapsayan çalışmamızda konjenital işitme kaybı gözlenen hastaların yanı sıra bu hastaların aile içi bireyleri kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Otozomal resesif kalıtım gösteren birinci ailemizde saptanan V27I ve E114G heterozigot mutasyonlarının ayrı ayrı ya da bileşik heterozigotluk olarak konjenital işitme kaybı hastalarında gözlendiği birçok çalışma ile literatüre geçmiştir. V27I heterozigot mutasyonunda iki allelden biri normal iken diğer allelede valin aminoasidinin yerine izolösin aminoasidi oluşmaktadır. E114G heterozigot mutasyonunda ise yine tek bir allel de glutamik aminoasidinin yerine glisin aminoasidi oluşmaktadır. İşitme kaybı vakaları ile yapılan çalışmalarda GJB2 geninde meydana gelen mutasyonların çoğu zaman hastalığa doğrudan etki ettiği belirtilmiştir. Direk olarak etkili olmadığı zamanlarda ise dolaylı yoldan hastalığın şiddetine ve ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu bizim çalışmamızda olduğu gibi birçok çalışmada gösterilmiştir. Yine bizim çalışmamıza paralel olarak çalışmaların çoğunda ortak bulgular yer almasına rağmen bazı çalışmalar ile de ters düşmektedir.

Kelley ve arkadaşları çalışma grubu olarak otozomal resesif non-sendromik işitme kaybı olan 58 Amerikalıyı ve bunların normal duyan ebeveynlerini seçmişlerdir. Bizim çalışmamızda saptadığımız V27I yanlış anlamlı (missense) mutasyonunun bu çalışmada ki görülme sıklığı %4 olarak saptanmıştır. Heterozigot bir değişim gözlendiği için hastalıkla

birebir ilişkisi düşünülmemektedir⁴². Bizim çalışmamızda birinci ailemizde de otozomal resesif kalıtım gözleendiğinden dolayı ve saptadığımız V271I heterozigot mutasyonun hem kontrol gruplarında hem de hasta bireylerde gözlenmesi nedeniyle hastalıkla doğrudan ilişkisi olmadığı ama dolaylı olarak işitme kaybı şiddetine etki ettiğini düşünmekteyiz. Fischer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bileşik heterozigotluğun yani V271 + E114G mutasyonlarının aynı anda gözlenmesinin hastalıkla ilişkisi olduğu söylenmiştir⁴⁹. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre bu değişimlerin doğrudan olmasa da hastalığa dolaylı yoldan etki ettiği muhtemeldir. V271 mutasyonu transmembran protein bölgesinde yer almaktadır ve bu nedenle daha önce yapılan işlevsel mutasyon analiz çalışmasında V271 mutasyonunun hastalıkla direk ilişkisinden ziyade transmembran protein bölgesinde yer almasından dolayı hastalığın meydana gelmesinde ve şiddeti üzerinde etkili olduğu saptanmıştır^{48, 49}.

Bazazzadegan ve arkadaşlarının içlerinde Türklerin de yer aldığı farklı etnik gruplarının bulunduğu İran populasyonunda GJB2 genindeki mutasyonların sendromik olmayan işitme kaybı ile direk ilişkili olup olmadığını üzerine yapılan çalışma sonucuna göre; V271 heterozigot mutasyonunun İran populasyonunda görülme oranı %26, E114G mutasyonunun oranı ise %7'dir. Ayrıca bu iki mutasyon (V271 + E114G) bizim birinci ailemizde olduğu gibi birlikte de görülmüştür ve frekansı da %0,9'dur. Bu çalışmada V271 ve E114G mutasyonlarının hastalıkla direk olarak bir ilişkisi olmadığı düşünölmektedir⁴⁴.

Seeman ve arkadaşlarının GJB2 geninde ki mutasyonların frekanslarını belirleyebilmek için çalışma grubu olarak prelingual sağırılığı olan 156 Çek hasta seçilmiştir. Bizim iki aileyi kapsayan çalışmamızda saptadığımız mutasyonlar (V271 + E114G, K224Q) Japon ve Çek populasyonları üzerinde yapılan bu çalışmalarda gözlenmemiştir⁴⁶. Buda bizlere işitme kaybı vakalarında etnik köken farklılığının ve coğrafi konumun dolayısıyla epigenetiğın hastalığın oluşmasında ve şiddetinde katkıda bulunduğunun göstergesidir.

Dalamon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; bizim çalışmamızda gözlenen V271 heterozigot mutasyonu bu hastalarda homozigot olarak gözlenmiş olup frekansı %5'tir. Ayrıca bizim çalışmamızda gözlenen V271 + E114G bileşik heterozigotluğa benzer olarak Arjantin populasyonun yer aldığı bu çalışmada V271 + R75W bileşik heterozigotluğun

hastalıkla direk olarak ilişkisi olduğu belirtilmiş olup frekansı yine %5'tir⁴⁷. Buda bizlere V27I bölgesi transmembran protein bölgesinde yer aldığı için diğer bölgelerle etkileşiminin yüksek olduğu ve bileşik heterozigotluk durumlarında hastalığın meydana gelmesinde ve hastalık şiddetinde etkili olabileceği düşündürmektedir.

Schrijver ve arkadaşının çalışmasında V27I + E114G bileşik heterozigotluğunun aynı kromozomda olduğunda hastalık sebebi olduğu aynı kromozomda olmadığı ise direk olarak hastalıkla ilişkisi olmadığını bulmuşlardır⁴⁵. Bizim yaptığımız çalışmaya göre bu bileşik heterozigotluğun aynı kromozomda olup olmadığı hastalığın oluşumunda etkili olmadığı ama dolaylı yoldan etki gösterebileceği gösterilmiştir. Samanich ve arkadaşlarının 2006 yılında 109 sendromik olmayan çocuklar üzerinde yaptığı çalışmada V27I polimorfizmin saptanan polimorfizmler arasında frekansının (%27) en yüksek olduğu bulunmuştur⁵⁰.

V27I heterozigot mutasyonun direk olarak hastalığa sebep olmadığı ama transmembran protein bölgesinde yer aldığı için bazı epigenetik mekanizmalar doğrultusunda hastalığa katkıda bulunulabileceği belirtilmiştir⁴⁹. Diğer yandan V27I + E114G bileşik heterozigotluğun bazı makalelerde direk olarak hastalık sebebi olabileceği bazı makalelerde ise direk olarak olmasa da katkıda bulunduğu söylenmiştir. Bizim vaka rapor çalışmamızda ise V27I'nin ve V27I+E114G'nin direk olarak hastalık sebebi olmadığı ama neredeyse tüm aile bireylerinde gözlendiği için bir şekilde hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda neredeyse yapılan tüm çalışmalarda V27I ve E114G heterozigot mutasyonların hafif işitme kayıplarına nazaran ağır şiddetli ve sağır olan hastalarda daha sık gözlenmiştir^{44,47-49}. Buda bizlere hastalığın oluşmasında GJB2 genine bir başka geninde dahil olduğu ve birinci ailemizde bulduğumuz mutasyonların daha çok hastalığın şiddetine etki ettiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamıza dahil edilen otozomal resesif kalıtım gösteren ikinci ailemizde ise birinci ailemizden farklı mutasyonlar ve polimorfizmler gözlenmiştir. Bunlar; K224Q yanlış anlamlı mutasyonunun (missens) yanı sıra 363G>A, 327G>A, 363G>T, 4159T>C ve 535G>A polimorfizmleridir. İkinci ailemizde 3 kontrol 1 hasta olmak üzere 4 kişide gözlenen K224Q heterozigot mutasyonu Samanich ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da bulunmuştur ve frekansı %6'dır. K224Q değişiminin polimorfizm olduğu ve hastalıkla bir

ilişkinin bulunmadığı belirtilmiştir⁵⁰. Yine Jidong ve arkadaşlarının işitme bozukluğu olan 209 birey üzerinde yaptığı çalışmada bizimle ortak olarak V27I ve K224Q polimorfizmlerini bulmuşlardır⁵⁰. K224Q mutasyonunun ve polimorfizmin yapılan onlarca çalışmadan sadece bir kaçında tespit edilmiştir ve K224Q değişiminin direk olarak hastalığa sebebiyet vermediği belki dolaylı yollardan katkıda bulunabileceği söylenmektedir^{49,50}. İlâveten, az gözlenmesinin nedeni sadece belirli toplumlara özgü olabileceği de düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda bu yönde sonuç vermektedir. Bu sonuçlara göre ikinci ailemizin hasta bireylerinde GJB2 geninde herhangi bir hastalık sebebi mutasyonun bulunmadığı ve GJB2 genine başka gendeki mutasyonların eşlik ettiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vaka rapor çalışmamıza Adana ilinin Kozan ilçesinde yaşayan ve aile bireylerinde konjenital işitme kaybı gözlenen 2 farklı aile dahil edildi. Çalışmamıza toplam 9'u hasta 7'si kontrol olmak üzere 16 birey incelenmeye alınmış ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Birinci ailemizin pedigrisine baktığımızda konjenital işitme kaybının otozomal resesif kalıtım gösterdiği ve bulunan heterozigot mutasyonların (V27I ve E114G) ve polimorfizmlerin hastalıkla birebir ilişkisi olduğu düşünülmese de dolaylı yoldan hastalığın oluşumuna ve şiddetine etki ettiği muhtemeldir.

2. İkinci ailemizin pedigrisine baktığımızda ise orada da otozomal resesif bir kalıtım gözlendiği ve bulunan mutasyonun (K224Q) ve polimorfizmlerin hastalığın oluşumunda direk olarak etkili olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda GJB2 geninin hem otozomal resesif hem de otozomal dominant kalıtım gösteren işitme kayıplarında genellikle etkili olduğu ve bu oranın %70'lere kadar vardığı görülmektedir. Aynı zamanda GJB2 genine bir çok farklı genin de katıldığı ve bu nedenden dolayı da işitme kaybının poligenik olduğu bilinmektedir. Bizim vaka rapor çalışmamıza göre de bulunan mutasyonların ve polimorfizmlerin hastalığın şiddetine etki ettiği düşünülmektedir. Hasta bireylerin hasta olmayan kardeşleri ve ebeveynlerini de çalışmamıza dahil ederek daha önce hastalık sebebi olarak literatüre geçmiş mutasyonların direk olarak hastalığın oluşmasında etkin rol oynamadığını tespit etmiş olup literatüre katkı sağlamış bulunmaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. **Bolz H, Schade G, Ehmer S, Kothe C, Hess M, Gal A.** Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of GJB2 and the 342-kb deletion involving GJB6. *Hearing Research*. **2004**; 42-46.
2. **Piatto VB, Bertollo EMG, Sartorato EL, Maniglia JV.** Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hearing Research*. **2004**; 87-93.
3. **Çalapoğlu NS.** Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği. *S.D.Ü Tıp Fak. Derg.* **2006**; 13(2)/37-46.
4. **Yiğit Ö, Karaaltın AB.** İşitme kayıpları. *Klinik Gelişim*. **2012**; 25:66-72.
5. **Evirgen N.** Konjenital işitme kayıplı olguların Cx26 ve Cx30 Gen mutasyonları açısından genotiplendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, **2006**.
6. **Nal N.** Türkiyede işitme kaybı segregasyonu gösteren ailelerde moleküler genetik çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya, **2005**.
7. **Hear.** The economic impact and cost of hearing loss in Australia. *Access Economics*. **2006**; 11-24.
8. **World Health Organization.** Better Hearing. World Health Organization. Geneva, **2005**; 12-16.
9. **Ormerod FC.** The Pathology of Congenital Deafness. International Congress on Modern Educational Treatment of Deafness. London-England, **15-23 1958**: 919-925.
10. **Bıyıklı TA.** Molecular pathology of non-syndromic hearing loss in Turkey. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.
11. **Aydemir C, Zinciroğlu A.** Yenidoğan Bebeklerde İşitme Tarama Testleri. *Sted.* **2004**; 13:11-418.
12. <http://kbb.uludag.edu.tr/otoakustikemiyon.htm>. **Erişim Tarihi: 12.09.2013**
13. **Probst R, Brenda L, Martin KG.** A review of otoacoustic emissions. *J. Acoust. Soc. Am.* **1991**; 89(5): 2027-67.

14. **Watkin PM.** Neonatal screening for hearing impairment. *Semin Neonatol.* **2001**; 6:50.
15. **Kayıran SM, Genç E, Erdil A, Gürakan AB.** Amerikan hastahanesi yenidoğan işitme taraması sonuçları. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi.* **2009**; 44:135-7.
16. **Sağlık Hizmetlerinde Okul Sağlığı Kitabı.** T.C Sağlık Bakanlığı. **2008.** 978-975-590-236-4.
17. **Mathers C, Smith A, Concha M.** Global burden of hearing loss in the year 2000. *Global Burden of Disease.* **2000.**
18. **Health Link.** Hearing loss after treatment for childhood cancer. **2008.**1-7.
19. **Pandit SR, Sullivan JM, Egger V, Borecki AA, Oleskevich S.** Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *Stem Cells.* **2011**; 29:670-677.
20. **Mencher GT.** Challenge of Epidemiological Research in the Developing World: Overview. *Audiology.* **2000**; 39:178-183.
21. <http://www.nidcd.nih.gov/health/statistics/Pages/quick.aspx>. **Erişim Tarihi: 10.09.2013**
22. **Hilgert N, Smith RJH, Camp GV.** Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res.* **2009**; 681(2-3):189–196.
23. <http://www.hear-it.org/Untreated-hearing-loss-costs-Europe-213-billion-euros-per-year>. **Erişim Tarihi: 20.08.2013**
24. **World Health Organization.** Promoting ear and hearing care through CBR. World Health Organization. Geneva, **2012.**
25. **Doğuer Ç.** Sendromik Olmayan Türk İşitme Kayıplı Olgularda Otoferling (OTOF) Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Yüksek lisans tezi, Ankara, **2008.**
26. **Wilson SM, Householder DB, Coppola V, Tessarollo L, Fritsch B, Lee EC, Goss D, Carlson GA, Copeland NG, Jenkins NA.** Mutations in Cdh23 Cause Nonsyndromic Hearing Loss in waltzer Mice. *Genomics.* **2001**; 74, 228–233
27. **Petit C, Levilliers J, Hardelin JP.** Molecular Genetics of Hearing Loss. *Annu. Rev. Genet.* **2001**; 35:589-646.

28. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T, Ghosh M, Menon PS, Deshmukh D, Oddoux C, Ostrer H, Khan S, Riazuddin S, Deininger PL, Hampton LL, Sullivan SL, Battey JF Jr, Keats BJ, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet.* **2002**; 30(3):277-84.
29. Kitajiri SI, McNamara R, Makishima T, Husnain T, Zafar AU, Kittles RA, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S, Griffith AJ. Identifies, frequencies and origins of TMC1 mutations causing DFNB7/B11 deafness in Pakistan. *Clin Genet.* **2007**; 72(6):546-50.
30. Schrijver I. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. *Journal of Molecular Diagnostic.* **2004**; 6(4):275-84.
31. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/WFS1>. Erişim Tarihi: 20.07.2013.
32. Cruciani V, Mikalsen SO. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biology of the Cell.* **2002**; 94:433–443.
33. Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2009**; 1(1).
34. Giepmans BNG. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular Research.* **2004**; 62:233-245.
35. Abascal F, Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes.* **2013**; 1828: 4-14.
36. Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**; 68:1115-1129.
37. Zoidl G, Dermietzel R. Gap junctions in inherited human disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* **2010**; 460:451-466.
38. Rackauskas M, Neverauskas V, Arvydas VS. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina.* **2010**; 46(1):1-12.
39. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Malesinska MM, Pollak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P, Ambrosetti U, Szyrwinska EN, Bal J, Wiszniewski W, Janecke AR, Heis DN, Seeman P, Bendova O, Kenna AM, Frangulov A, Rehm HR, Tekin M, Incesulu A, Dahl HHM, Sart D, Jenkins L, Lucas D, Glindzicz MB, Avraham KB, Brownstein Z, Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Maldergem LV, Hilbert P, Roux A, Mondain M, Hoefsloot LH,

- Cremers CWRJ, Tuija L, Heikki L, Parving A, Gronskov K, Schrijver I, Roberson J, Gualandi F, Martini A, Granade GL, Ruiz NP, Correia C, Fialho G, Cryns K, Hilgert N, Heyning PV, Nishimura CJ, Smith RJH, Camp GV.** GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**; 77:945-957.
- 40. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatsiz N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadi T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K, Nielsen KB, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB.** Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* **2002**; 101-108.
- 41. Joseph AY, Rasool TJ.** High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala, India. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* **2009**; 73, 437-443.
- 42. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ.** Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**; 62:792-799.
- 43. 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**; pp 369-378
- 44. Bazazzadegan N, Nikzat N, Fattahi Z, Nishimura C, Meyer N, Sahraian S, Jamali P, Babanejad M, Kashef A, Yazdan H, Sabbagh Kermani F, Taghdiri M, Azadeh B, Mojahedi F, Khoshaeen A, Habibi H, Reyhanifar F, Nouri N, Smith RJ, Kahrizi K, Najmabadi H.** The spectrum of GJB2 mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss-A twelve year study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* **2012**; 1164-1174.
- 45. Schrijver I, Chen N.** Allelic discrimination of cis-trans relationships by digital polymerase chain reaction: GJB2 (p.V27I/p.E114G) and CFTR (p.R117H/5T) *Genet Med.* **2011**; 13(12):1025-31.
- 46. Seeman P, Malikova M, Raskova D, Bendova O, Groh D, Kubalkova M, Sakmaryova I, Seemanova E, Kabelka Z.** Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet.* **2004**; 66: 152-157.
- 47. Dalamon V, Beheran A, Diamante F, Pallares N, Diamante V, Aelgoyhen AB.** Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hearing Research.* **2005**; 43-49

- 48. Palmada M, Schmalisch K, Bohmer C, Schug N, Pfister M, Lang F,a and Blinb N.** Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment. *Neurobiology of Disease*.**2006**; 112-118
- 49. Fischer TC, Samanich J, Morrow EB, Rodd JC, Shanske A, Parikh SR.** Genetic evaluation of American minority pediatric cochlear implant recipients. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. **2009**; 73, 195-203
- 50. Shan J, Rodd JC, Castellanos R, Babcock M, Shanske A, Parikh SR, Morrow EB, Samanich J.** GJB2 mutation spectrum in 209 hearing impaired individuals of predominantly Caribbean Hispanic and African descent. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. **2010**; 74, 611-618.

EKLER

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning” esas alınmıştır. Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantr stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüşümlerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1= Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1= Stoktan alınması gereken miktar (V)

M2= Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2= Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)

EK-1. DNA Elde Edilmesinde Kullanılan Solüsyonları

1.1 Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon için;

0,32 M Sükroz	109,563 gr
10 mM Tris-HCl (pH=7,5)	1,211 gr
5mM MgCl ₂	1,015 gr
%1 Triton X 100	10 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlanır. pH = 7,5 olacak şekilde ayarlanır. Triton X, solüsyona otoklavlandıktan sonra ilave edilir.

1.2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon için;

0,075 M NaCl	4,383 gr
0,025 M EDTA	9,305 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlanır

1.3. TE-9 (pH=9)

1 Litre Solüsyon için;

500 mM Tris baz	60,5 gr
20 mM EDTA	7,44 gr
10 mM NaCl	0,58 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlanır.

1.4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar saf su ilave edilip iyice çözdürülür. Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar saf su ilave edilip iyice çözdürülür. Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.6. 6 M NaCl

1 litre için; 321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar bidistile su ilave edilip iyice çözdürülüp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.7. % 70 Etil Alkol

100 ml için; 70 ml etil alkol (saf) ve 30 ml bidistile su ilave edilir.

1.8. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlanır. pH = 8 olarak ayarlanır.

EK-2. Agaroz Jel Solüsyonları

2.1. 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Az miktardaki bidistile su içinde çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlanır.

1 Litre 5X TBE stok solüsyonu için;

500 ml 10X TBE stok solüsyonu ve 500 ml bidistile su karıştırılır.

1 Litre 1X TBE solüsyonu için;

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu ve 900 ml bidistile su karıştırılır.

2.2. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid, 10 ml bidistile su içinde çözünüp ışık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edilir.

2.3. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr süzkroz

0,25 gr bromfenol mavisi,

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözülür. Ependorf tüplere paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edilir.

EK-3 Hasta Rıza Formu

DNA ÇALIŞMASI ONAM FORMU KONJENİTAL İŞİTME KAYBI OLAN HASTALARDAN GJB2 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN danışmanlığında, Yüksek Lisans Öğrencisi Turan TUFAN tarafından yüksek lisans tez çalışması olarak sürdürülecek olan çalışmamızda Çukurova bölgesinde Kozan ilçesinde yaşayan 2 ailedeki soyağacı bilinen ve konjenital işitme kaybı olan bireylerin kanlarından izole edilen DNA'lardan, GJB2 geninin tüm bölgeleri dizilinerek bireylerin sahip oldukları mutasyonlar ve polimorfizmler belirlenecek, bu değişikliklerin işitme kaybı ile ilişkisinin olup olmadığı incelenecektir.

Çalışmamız çerçevesinde ailesel geçiş gösterdiği bilinen bu gen için kadın ve erkek bireylerden kan örneği alınarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında değerlendirmeye alınacaktır. Sonuçlar sadece bilimsel amaçlı kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır. Parasal bir ödeme yapmanızı gerektirmeyen ve size bir ödeme yapılmasının söz konusu olmadığı çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Araştırmayı katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden 3ml kan örneği alacağız.

Bu çalışmayla ilgili ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır. Aşağıda isimleri ve telefon numaraları bulunan araştırmacılar tarafından gerekli bilgilendirmeler yapılacaktır.

Bio. Turan Tufan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı: (0322) 338 60 60 /3498

**YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLARI OKUDUM, KANIMDAN GENETİK
İNCELEME YAPILMASINI KABUL EDİYORUM.**

Hasta veya hukuksal olarak sorumlu kişi	şahit Kişi	Kanı alan kişi
Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:
İmza:	İmza:	İmza:
Tarih:	Hastaya Yakınlığı:	

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2005 yılında Adana Şehit Temel Cingöz Lisesi'nden mezun oldu ve Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2010 yılında lisans eğitimini tamamladı ve 2011 yılında Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı. Yüksek lisans esnasında Erasmus Değişim Programı ile 3 aylığına Macaristanda Hayvan Biyoteknoloji Enstitüsüne araştırmacı ziyaretçi olarak gitti.