

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLI OLGULARIN
Cx26 ve Cx30 GEN MUTASYONLARI AÇISINDAN
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Bio. Neslihan EVİRGEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SOLAK

2006-AFYONKARAHİSAR

1.GİRİŞ

İşitme kaybı kişinin sosyal, eğitim ve zeka gelişimini olumsuz etkileyen ve her 1000 doğumda yaklaşık 1 oranında görülen en yaygın algılama bozukluklarından biridir (1-3). Konjenital işitme kaybı bulunan olguların yaklaşık yarısı genetik nedenli, diğer yarısı ise çevresel faktörler sonucunda oluşmaktadır (4-6).

Genetik işitme kaybı, sendromik ve sendromik olmayan olmak üzere iki şekilde görülür (7). Sendromik olmayan işitme kaybı genetik işitme kaybının %70'ini oluşturmaktadır (2, 8, 9). Sendromik olmayan işitme kaybı % 75-80 otozomal resesif, %20-25 otozomal dominant veya %1-2 X kromozomuna bağlı ve %1 oranında ise mitokondrial kalıtım göstermektedir (4). Sendromik işitme kaybı ise otozomal resesif, otozomal dominant, X kromozomal kalıtım kalıbına uyar ve genetik işitme kaybının %30'undan sorumludur (8). Son araştırmalara göre işitme kaybı ile ilişkilendirilen 300'den fazla sendrom olduğu açıklanmıştır (4, 10).

Bugüne kadar sendromik olmayan işitme kaybına neden olan 53 adet otozomal resesif işitme kaybına neden olan gen lokusu (DFNB), 47 adet otozomal dominant işitme kaybı lokusu (DFNA) ve 5 adet X kromozomuna bağlı işitme kaybına neden olan gen lokusu (DFN) bulunmuştur. Bu lokuslardan 22 adet DFNB geni, 20 adet DFNA geni ve 2 adet ise DFN geni tanımlanmıştır (11). Mitokondrial genomda meydana gelen 7 farklı mutasyonun sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğu açıklanmıştır (11).

Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybının %50' sinden sorumlu olan gen, DFNB1 lokusunda bulunan GJB2 (Gap Junction Beta 2) genidir (10). GJB2 geni 13q12 bölgesinde yer almaktadır. Konneksin 26 (Cx26) proteinini kodladığı için Cx26 geni olarak da adlandırılmaktadır (2, 8, 12). Akdeniz ülkelerinde kalıtsal işitme kaybına neden olan mutasyonların yaklaşık %30-50'sini Cx26 mutasyonları oluşturmaktadır (13). Cx26 geninde 90'dan fazla mutasyon olduğu bildirilmektedir. Bunlar arasında Cx26 geninde bulunan 35delG, 167delT ve 235delC mutasyonları yaygın olarak görülmektedir (14).

Cx26 geni üzerinde tek nükleotit değişimi sonucunda oluşan 35delG mutasyonu özellikle Beyaz Irkta'da yaklaşık %60-70 oranında görülmüştür (4, 7). Yapılan bir çalışmada Türkiye'de bu mutasyonun görülmeye oranı %20,4 ve taşıyıcılık sıklığı ise %1,8 olarak bulunmuştur (13).

Cx26 mutasyonlarından olan 167delT mutasyonu Aşkenazi Yahudilerinde, 235delC mutasyonu ise Kore ve Japon popülasyonlarında yaygın olarak görülmektedir (4, 14, 15).

Cx26 geninden sonra birçok popülasyonda sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen GJB6 (Gap Junction Beta 6) genidir. GJB6 geni 13. kromozomda, GJB2 geninin yaklaşık 35 kb'lık telomerik bölgesinde yer alır (2). Konneksin 30 (Cx30) proteinini kodladığı için Cx30 geni olarak da isimlendirilmektedir. Cx30 geni üzerinde meydana gelen 342 kb'lık büyük bir delesyon olan del(GJB6-D13S1830) mutasyonu İspanya ve Küba'da yaygın olarak bulunmaktadır ve otozomal resesif işitme kaybına neden olmaktadır (7). Cx30 mutasyonlarının otozomal resesif ve otozomal dominant sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (16-19).

Kokleadaki gap junction kanal yapısında yer alan Cx26 ve Cx30 proteinlerini kodlayan genler üzerinde oluşan 35delG, 167delT (Cx26 geninde) ve del(GJB6-D13S1830) (Cx30 geninde) mutasyonlarının proteinlerde meydana getirdiği bozukluğun potasyum iyon döngüsünü engellemesiyle genetik işitme kaybı meydana gelir. Bu veriler ışığında çalışmaya dahil edilen Afyonkarahisar İli Karahisar İşitme Engelliler Okulunda eğitim gören konjenital işitme kaybı tanısı konmuş 47 olgunun; işitme kaybı oluşumu üzerinde etkisi olduğu düşünölen Cx26 ve Cx30 proteinlerini kodlayan genlerde oluşan 35delG, 167delT ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonları açısından PCR-ELİSA tekniği kullanılarak genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

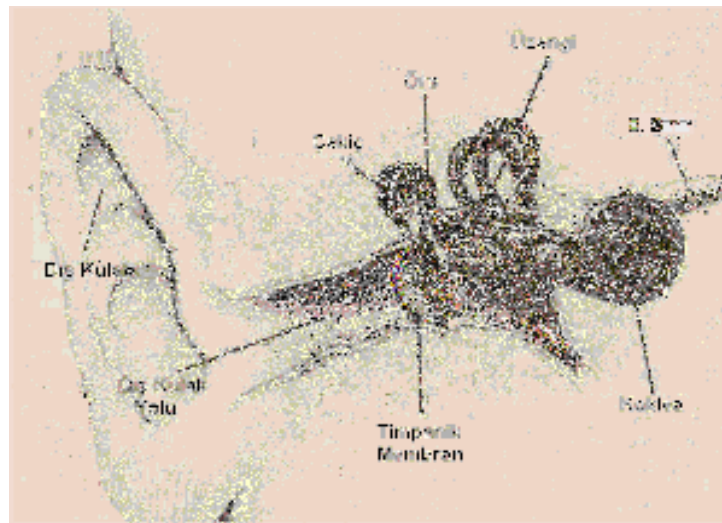
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Sistemi

Kulak, dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç ana kısımda incelenir (Şekil 2.1). Dış kulak; kulak kepçesi ve dış kulak yolu olmak üzere iki kısımdan oluşur ve medial sınırını kulak zarı (timpanik membran) oluşturur. Dış kulak, sesi toplayıp kulak zarına doğru yönlendirmeyi sağlar (20, 21).

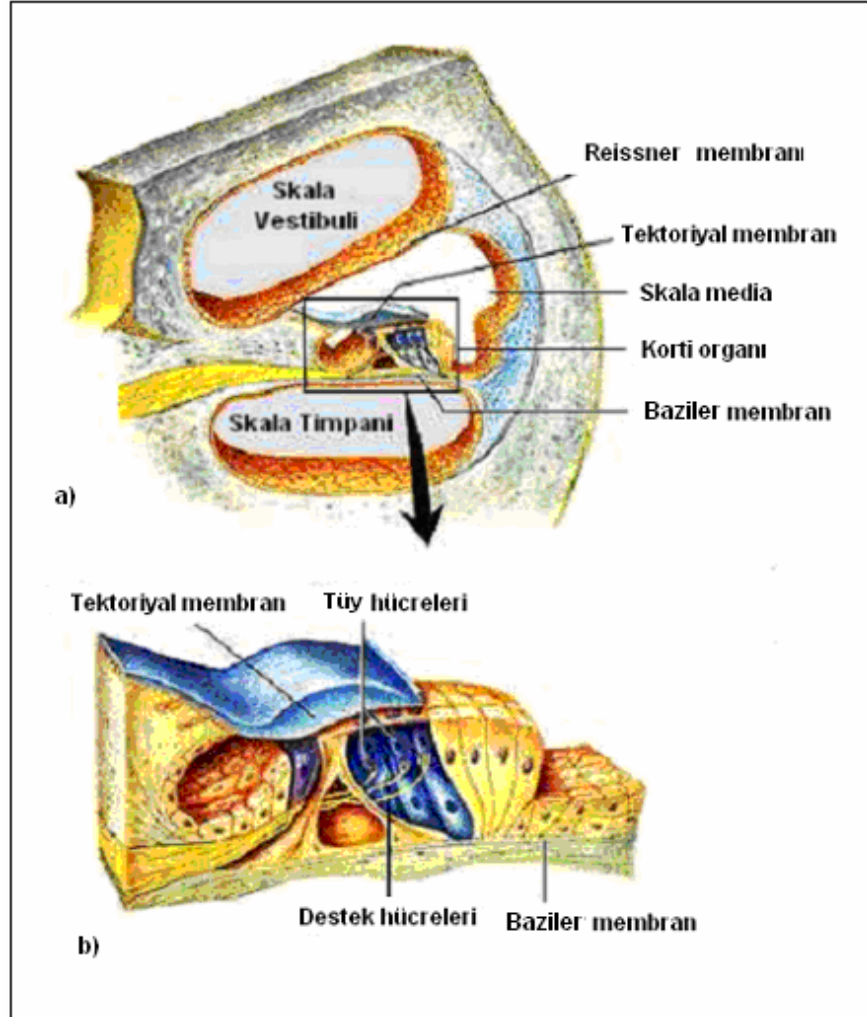
Orta kulak; 1-2 cm³ havayla dolu, kemikçiklerin, korda timpani ve fasyal sinirin, stapes ve tensor timpani kaslarının yer aldığı, timpan zarıyla kemik labirent arasında uzanan bir boşluktur. Ses dalgalarının yarattığı mekanik enerji üç küçük kemikçiğin hareketleri ile orta kulak boyunca taşınmaktadır. Bu kemikçikler malleus, inkus ve stapes olup çekiç, örs ve üzengi olarak da bilinirler. Malleus uzun kolu ile timpanik zara oturmuştur ve diğer ucu ile inkusa bağlıdır. Aynı şekilde inkus da stapesle bağlanmıştır. Stapes ise iç kulakla ilişkideki oval pencereye bağlıdır (22).

İç kulak; işitme ve denge ile ilgili olan reseptörlerin bulunduğu kısımdır. Kemik içine gömülmüş bir membranöz labirenttir. Sistem, koklea ve denge organı olan vestibül ve semisirküler kanallardan oluşmuştur (22, 23).



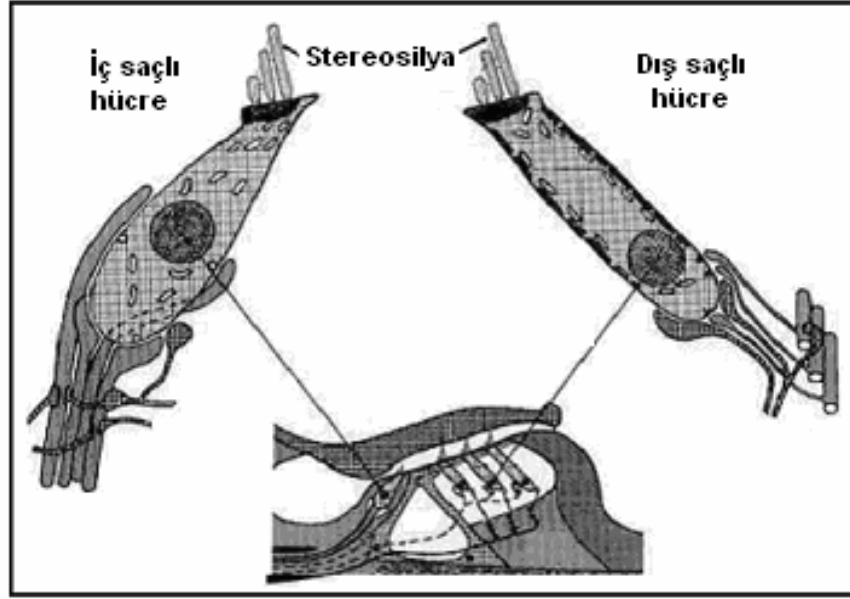
Şekil 2.1. Dış, orta ve iç kulağın görünümü (24)

Koklea salyangoza benzer bir yapı olup, çapları gittikçe küçülen üç kıvrımdan meydana gelmiştir. Kokleanın enine kesitine bakıldığında üstte oval pencereye açılan skala vestibuli ve en altta yuvarlak pencereye açılan skala timpani görülür (Şekil 2.2.a). Skala media ise diğer iki kompartmanı koklea boyunca ayırır. Skala media, skala vestibuliden Reissner membranı ile ayrılır. Skala vestibuli ve skala timpaniyi ise baziler membran ayırır. Skala vestibuli ve skala timpani perilenf, skala media ise endolenf ile dolu olup bu iki sıvı birbiri ile karışmaz (20, 22). Perilenf yüksek sodyum ve düşük potasyum ve az miktarda kalsiyum, endolenf ise yüksek potasyum ile düşük sodyum ve az miktarda kalsiyum derişimine sahiptir (12).



Şekil 2.2. a) Kokleanın kesiti , b) Korti organının yapısı (25)

Skala medianın içinde Korti organı yer alır (Şekil 2.2.b). Korti organı, baziler membranın destek sağladığı saçlı hücre ve destek hücreleriyle bunlara temas eden jelatinöz yapıdaki tektoryal membrandan oluşan spiral bir dokudur. Korti organının üzeri tektoryal membran ile kaplıdır. Korti organında tek sıra halinde sıralanmış ve insanda yaklaşık 3500 tane iç saçlı hücre ve üç sıra halinde sıralanmış insanda yaklaşık 13,400 tane dış saçlı hücre olmak üzere iki tip saçlı hücre bulunmaktadır (Şekil 2.3) (22).



Şekil 2.3. Dış ve iç saçlı hücrenin görüntüsü (26)

Dış saçlı hücreler tabanlarında destek hücreleri ile desteklenmişlerdir. Dış ve iç saçlı hücrelerin her birinde içeriden dışarıya doğru olmak üzere büyükten küçüğe doğru sıralanan üç sıra stereosilya bulunmaktadır. Dış saçlı hücrelerdeki stereosilyalar, tektoryal membran gömülü halde bulunurlar. Tektoryal membrana yakın olan binlerce silya, membranlar arasındaki hareket ilişkisi nedeniyle büküldüğü zaman mekanik bir kuvvet olan ses enerjisi elektrokimyasal uyarı şekline dönüşmekte, daha sonrada bu uyarılar temporal kortekste ses halinde yorumlanmaktadır (20, 22, 23).

2.1.1 İşitme Mekanizması

Kulak kepçesinin topladığı ses enerjisinin, kulağın çeşitli bölümlerinde değişikliklere uğradıktan sonra beyine gönderilip burada ses halinde algılanması olayına işitme denir. İşitme fonksiyonel bakımdan iletim aygıtı ve algı aygıtı olmak üzere iki kısımda incelenir. İletim aygıtı dış kulak ve orta kulak; algı aygıtı iç kulak, işitme siniri ve onun santral bağlantıları ile işitme merkezinden oluşur (27).

İşitme fonksiyonu ses dalgalarının dış kulak yoluna girmesi ile başlar. Dış kulak yolu kanalı ses dalgalarını sıkıştırır ve gergin olan kulak zarına iletir. Ses dalgalarının timpanik zarda oluşturduğu titreşim orta kulaktaki üç hareketli kemiğin titreşimine neden olur. Bu kemiklerden sonuncusu olan stapesin, oval pencere üzerine oturmakta olan tabanı piston şeklinde ileri geri hareket ederek, mekanik hareketi iç kulağın merkezi boşluğu olan skala vestibuladaki perilenfe iletir (28).

Kokleaya giren titreşimler korti organında bir dalgalanmaya ve bu dalgalanma ise tektoryal ve baziler membranda hareketlenmeye neden olur. Tektoryal ve baziler membranın hareketi, iç ve dış saçlı hücrelerdeki stereosilyaların hareket etmesini sağlar. Bu hareket sonucunda endolenf içindeki yüksek konsantrasyondaki potasyum iyonları stereosilyaların uç bağlantılarındaki tanımlanamamış kanallardan saçlı hücrelerin içine girerek, o bölgedeki kalsiyum kanallarının açılmasına ve kalsiyumun hücre içine girmesine neden olur. Hücre içindeki kalsiyum, işitme sinir lifleri üzerine saçlı hücrelerin bazal bölgesinde bulunan sinaptik veziküllerdeki nörotransmitterlerin salgılanmasını sağlar. Böylece mekanoelektriksel ileticiler olan saçlı hücreler, mekanik hareketi elektriksel sinyallere dönüştürürler. Elektriksel sinyaller, koklear sinirler yolu ile beynin işitsel korteksine iletilir (29, 30)

Normal iletimin devam edebilmesi için hücre içine giren potasyum iyonlarının tekrar endolenfe dönmesi gerekmektedir. Hücre içine giren kalsiyum miktarının artmasıyla potasyum geçiş yolları açılır ve potasyum iyonları saçlı hücreleri terk ederek destek hücrelerine geçerler. Daha sonra bu potasyum iyonları

“gap junction” kanalları aracılığıyla destek hücrelerinden stria vaskularise buradan da potasyum kanalları ile aktif olarak tekrar endolenfe pompalanırlar (30-32).

2.2. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri

Genel olarak işitme kaybının sıklığı 1000 canlı doğumda 1 olarak saptanmıştır (2, 14). 3-10 yaşlarındaki çocuklar için bu değer 1000’de 1,1 olarak bulunmuştur (33). Bilateral konjenital işitme kayıplarının insidansı ise 1000’de 1,4 olarak bulunmuştur (34).

İşitme kaybının yaklaşık yarısı genetik nedenlere, diğer yarısı ise çevresel nedenlere bağlıdır (4, 14). Çevresel nedenler arasında erken doğum, hamilelik döneminde kullanılan ilaçlar, doğum öncesi geçirilmiş enfeksiyonlar (örn; kızamıkçık) veya doğum sonrası geçirilmiş enfeksiyonlar (örn; menenjit) bulunmaktadır (5, 35).

Dereköy, Afyon İşitme Engelliler Okulun’da yapılan bir çalışmada Türkiye’deki işitme kayıplarının ana nedenlerinin febril konvülsiyon (%26,9) ve herediter faktörler (%23,8) olduğunu ileri sürmüştür (33).

Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgularda sendromik ve sendromik olmayan olmak üzere iki tip işitme kaybı görülür (14, 35, 36). İşitme kaybı başka bir tıbbi problem ile birlikte görülüyorsa sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır ve genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %30’unu oluşturur. İşitme kaybı ile ilişkilendirilen 300’den fazla sendrom olduğu açıklanmıştır (2, 4, 14)

İşitme kaybına başka hiçbir organ ve laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği durumlarda ise sendromik olmayan işitme kaybı görülür. Genetik nedenli işitme kaybının yaklaşık %70’ i bu gruba girmektedir (14, 37).

Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan genler lokus numaralarına göre kronolojik sıralama yapılarak sınıflandırılır ve bu gen lokusları “DFN”

(DeaFNess) olarak isimlendirilir. Bu üç harften sonra ‘A’ geliyorsa otozomal dominant, ‘B’ geliyorsa otozomal resesif, hiç harf gelmiyorsa bu X’ e bağlı kalıtımı ifade eder (10, 14, 19, 38).

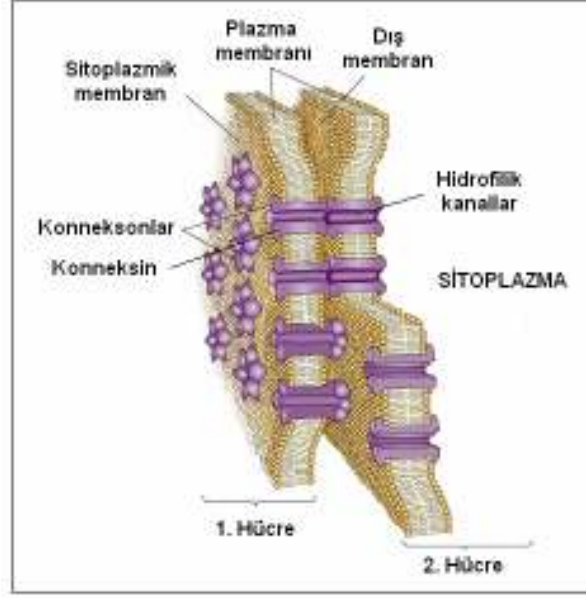
Sendromik olmayan prelingual işitme kaybı %75-80 otozomal resesif (DFNB), %20-25 otozomal dominant (DFNA), %1-1,5 X kromozomal kalıtım kalıbı (DFN) göstermektedir (4, 12, 39, 40). Şimdiye kadar sendromik olmayan işitme kaybına neden olan 53 DFNB lokusu, 47 DFNA lokusu ve 5 DFN lokusu bulunmuştur. Bunlar arasında 22 DFNB geni, 20 DFNA geni, 2 adet ise DFN geni tanımlanmıştır (11).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sendromik olmayan prelingual işitme kaybına neden olan genler arasında, birçok populasyonda yaygın olarak görülen ve DFNB1 lokusunda yer alan Cx26 ve Cx30 genleri bulunmaktadır (41).

2.2.1 Gap Junction Kanalları

Gap junction kanalları hemen hemen birbiriyle temasta olan bütün hücrelerin zarlarında, zarlar arasında 2-4 nm kadar bir açıklık (gap) bırakacak şekilde yer almış yapılardır. Hücreler arasında elektriksel ve kimyasal sinyallerin geçebileceği boşluklar oluştururlar. Gap junction kanallar inorganik iyonların, yaklaşık 1200 Da’dan küçük molekül ağırlıklı moleküllerin ve metabolitlerin hücreler arası iletimini sağlarlar (2, 42, 43).

Gap junction’lar **konnekson (“connexon”)** adı verilen transmembran proteinlerden meydana gelmiştir. Bir konneksion ise 6 adet **konneksin (“connexin”)** adı verilen protein alt birimlerinden oluşmuştur. İki komşu hücrenin zarlarındaki konneksionlar, devamlı bir kanal oluşturacak şekilde karşılıklı olarak dizilirler. Konneksionların disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmaları sonucunda “gap junction” adı verilen kanal yapısı oluşur (2, 5, 44) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Gap junction kanal yapısı (45)

İç kulakla ilgili yapılan çalışmalarda, burada bulunan gap junction kanallarının, işitme uyarılarının mekanik uyarıdan elektriksel uyarıya dönüşümünde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (10, 11, 35).

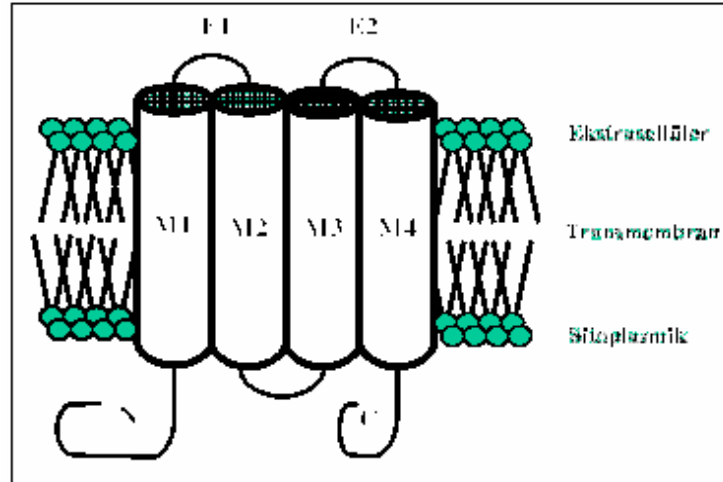
2.2.2 Konneksin (Connexin) Proteinleri

Çok genli geniş bir protein ailesi olan konneksinler, hücreler arası iletişimi sağlayan gap junction kanallarını oluştururlar. Farklı organ veya dokularda yaygın olarak sentezlenen konneksinlerin bugüne kadar insan genomunda 20 farklı çeşidi tanımlanmıştır (2, 5, 38, 46-49).

Konneksin proteinleri moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilirler ve α (alfa), β (beta), γ (gama) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Şimdiye kadar tanımlanmış olan konneksin proteinlerinin molekül ağırlıkları 26 ile 59 kDa arasında değişmektedir (39, 50).

Konneksin proteininin yapısında dört transmembran domain, iki ekstrasellüler domain, bir sitoplazmik ilmek ve sitoplazmik amino ve karboksil uç bulunur. Ekstrasellüler ilmek yapısı bu proteinler arasında yapısal olarak büyük oranda

korunmuş olup, her ilmek yapısında bulunan üç sistein aminoasitinin yeri aynı pozisyonadadır. Bu aminoasitler her bir konneksunun diğerine bağlanıp gap junction kanal yapısını oluşturması için gerekli olan üç boyutlu yapıyı sağlamaya yardımcı olurlar (Şekil 2.5) (8, 44, 51).



Şekil 2.5. Konneksin proteinlerinin ortak yapısı (52)

Memeli kokleasında bazı hücre tiplerinde bulunan Cx26, Cx30 ve Cx31 genlerinde oluşan mutasyonların işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (5, 8, 14, 44).

2.2.3 GJB2 (Cx26) ve GJB6 (Cx30) Genleri

Gap junction kanal yapısının oluşumundan sorumlu olan ve iç kulakta bol miktarda sentezlenen GJB2 geni 13q12 bölgesinde lokalize olup, 2 ekzonu bulunmaktadır. Genin 2. ekzonu 681 nükleotitten meydana gelir ve 226 aminoasitlik Cx26 proteinini sentezlemektedir (Şekil 2.6.) (38, 53).

```

ctccgagggg  agaggcgggg  tgtgggggtgc  ggtaaagg  cgccacggcg  19665088
ggagacaggt  gttgcgcccc  cgcagcgccc  gcgcgctcct  ctccccgact  19665038
CGGAGCCCT  CGGCGGCGCC  CGGCCAGGA  CCCGCTAGG  AGCGCAGGAG  19664988
CCCCAGCGCA  GAGACCCCAA  CGCCGAGACC  CCCGCCCCGG  CCCCGCCGCG  19664938
CTTCCTCCCG  ACGCAGgtga  gcccgccggc  ccggactgc  ccggccagga  19664888
acctggcgcg  gggagggacc  gcgagaccca  gagcgggtgc  ccggccgct  19664838
gggtctcggg  gaaccggggg  gctggaccaa  cacacgctcct  tgggcccggg  19664788
ggcgggggccc  gccttctgga  gcgggcgttt  ctgcggccga  gctccggagc  19664738
tggaatgggg  cggccggggg  agtggacgcg  atggcaccgc  ccggggtgcg  19664688

```

agtggggcgg	ggcgcgcgcg	ggaggggaaa	aaggcgcggg	cgagccgcca	19664638
gcgcgaggtt	tgtggtgtcg	ccgatgtccc	ttcggggtac	tctagcgcag	19664588
ccgcctggct	acttgacca	ctgccaccaa	acgttttaaa	ttcaccgaaa	19664538
gcttagcttc	gaagcaaagc	tccgtttcgc	cggatgaagca	ggaagccttc	19664488
gctgcaggaa	ctgaccttta	cctcctggag	cggcttctgc	agaaaaatcc	19664438
ccgggcagag	atltgggcgg	agtttgccta	gaactaacgc	ggagccaagcc	19664388
gatcccggcc	taccccgggg	ccaagatttc	agtggcttcc	ctttttccta	19664338
aacacttcac	gagggctctgt	ttccgggctg	tgctccccgc	ctagaaggaa	19664288
aatlttttagg	acccttgttc	gcgaagaggt	ggtgtgcggc	tgagaccggc	19664238
gtcctcagga	cggttccatc	agtgcctcga	tcctgccccca	ctggaggagg	19664188
aaggcagccc	gaacagcgc	cacctaacta	acagctgctg	agagctgggt	19664138
tccgtggcca	tgacacctggg	actgccttga	gaagcgtggt	acggccgtgt	19664088
ccccatgtga	ccttagagtc	cctttcgaaa	ctgctgtgca	cagtcggtca	19664038
caatltcaga	cactggtgag	aaggggtggag	gaaccctctg	gggacagcca	19663988
ggcaaggtcg	accacccatc	acctaagggt	ggagaaatlt	aaggggtgaa	19663938
gagtcccttt	tgccctttct	ggatcctggt	gattcaccta	gtgtcttccc	19663888
taaggaactg	aaccaactcc	tccgctggcc	tctggcagcc	ctccaggcgg	19663838
tgccagatgg	cgtgggccc	gtaggaagct	gcatgtaacc	gcccagggtc	19663788
gggaggccag	gagggcagct	cctcctctga	cttgaatatt	gaaaaacaact	19663738
tcgtcctgct	tctgagcccc	tcttaaccca	tgacccccta	gcccattggg	19663688
gagtaaactc	taatlttactc	ctcttctcga	aaaaggatct	ttaaaacagg	19663638
tagcttcaac	tcaagcttta	taaaataaca	atatagggtt	tctcgggaact	19663588
gtatltttct	cagctgatgg	taactggaca	ggtctgtaga	aggggtgatg	19663538
acctgggttt	ggcaggtgga	agagggcaaa	ggataaaccc	ctcctcctgc	19663488
agccccatat	tcttggccag	gtgtattggt	gtaaaccagg	agagagttta	19663438
cttcggggag	tatcctgttt	tccactcagt	gagggccaat	gaagaatgtc	19663388
taattccata	agatgctttt	gttaaaatcg	gaatgltgct	gtcctcgggtg	19663338
gttctgctgt	tgggacggga	ctggcctgag	ctgtgggtgc	tgtagcagga	19663288
caaccagctc	acctaagggc	ctcccagctc	ggattatcaa	tgggtcagtg	19663238
ctgaacgtga	gctaaaatat	tgtlttttcc	aatgatgttg	tctltcccaa	19663188
gctcagtgaa	gctaaatggt	tcacagccct	atgtcaatct	gatgtaactt	19663138
tcgtggccac	ctctctcctg	ttagcctcctg	accaaggtgg	cactggatgg	19663088
tttctgcctg	accttgggtc	cccgtggcag	cgactgtggg	tcatgaaaga	19663038
cattcactac	gagcctgctt	ctggagtcca	tcagaaaacg	ggatgcaact	19662988
tgccataaat	gaggagagga	ggatgctttt	aagaaaaaga	agaaggagga	19662938
ttcactacca	gctctgaagg	gtggaaaaga	gatgattcat	ccggattgtg	19662888
gagaggggtg	aatcttgttt	aggagagcgt	tggttgtggc	aggcagggtg	19662838
taactatgaa	tcagtgaaga	caattcacat	cctgggatga	aaagaaggcc	19662788
atgggctcac	aggagattat	ccactggcct	ctccacatcc	gcttgcagta	19662738
aggagtgtgg	gactctccca	agcttcagcg	ctgaactgca	atgcagtgac	19662688
gtcgttagc	tgggcccagta	accgagggag	ttgaatlttc	tgctatttta	19662638
aaataatgtg	tctlttaaga	aacactttga	aatltaaaacc	acagcccaca	19662588
attataatgc	actgttgag	cacttatcaa	aacagatatg	ctaactgagc	19662538
catcagtgcc	agcctgacag	tgaggccacc	aagccatcca	caaagcctac	19662488
acgaaagtct	gtgctcacag	tggctlttct	ccatgaagag	ggcattccta	19662438
acctcttct	ttcacgtagg	aggaagcaag	gtcctlttgta	aaatlttaac	19662388
tcgggggtg	tcaaatgtaa	acttaaccac	tggtaacaac	aglttactg	19662338
ctacatgcca	cgtctgtgaa	aattcattca	agacattaag	gaaagtggct	19662288
cagcagagag	actagacatc	ttatcctcac	ggttctcctg	tacttggcct	19662238
ctcagccttt	gagcaagggt	ggcccaagct	agtatcggcc	ccagtgttac	19662188
agccaaaact	tgagactgca	aatggatgca	gctgttgaa	gctgagtaac	19662138
ttctgcagag	tcaggaagac	ccaaggaagc	tctgcagagg	atgcaggggt	19662088
acggctcagaa	cccctgagtg	cctlttcagct	aacgaggact	ttatgacact	19662038
ccccagcaca	gcaaatlttt	atgatgtggt	taaagattgg	gtgaattact	19661988
caggtgaaca	agctactltt	tatcagagaa	cacctaaaaa	caggttcaag	19661938
aggglttggg	aactatacat	ttaatcctat	gacaaactaa	gttgggtctg	19661888
tcttcacctg	tttgggtgag	gttgtgtaa	agttgggtgt	tgctcaggaa	19661838
gagatttaag	catgcttgc	taccagact	cagagaagtc	tccctgttct	19661788
gtcctagcta	gtgattcctg	tgttgtgtgc	attcgtcttt	tccag AGCAA	19661738

```

ACCGCCCAGA GTAGAAGATG GATTGGGGCA CGCTGCAGAC GATCCTGGGG 19661688
GGTGTGAACA AACACTCCAC CAGCATTGGA AAGATCTGGC TCACCGTCCT 19661638
CTTCATTTTT CGCATTATGA TCCTCGTTGT GGCTGCAAAG GAGGTGTGGG 19661588
GAGATGAGCA GGCCGACTTT GTCTGCAACA CCCTGCAGCC AGGCTGCAAG 19661538
AACGTGTGCT ACGATCACTA CTTCCCCATC TCCCACATCC GGCTATGGGC 19661488
CCTGCAGCTG ATCTTCGTGT CCACGCCAGC GCTCCTAGTG GCCATGCACG 19661438
TGGCCTACCG GAGACATGAG AAGAAGAGGA AGTTCATCAA GGGGGAGATA 19661388
AAGAGTGAAT TTAAGGACAT CGAGGAGATC AAAAACCAGA AGGTCCGCAT 19661338
CGAAGGCTCC CTGTGGTGGA CCTACACAAG CAGCATCTTC TTCCGGGTCA 19661288
TCTTCGAAGC CGCCTTCATG TACGTCTTCT ATGTCATGTA CGACGGCTTC 19661238
TCCATGCAGC GGCTGGTGA GTGCAACGCC TGGCCTTGTC CCAACTGT 19661188
GCACTGCTTT GTGTCCCGGC CCACGGAGAA GACTGTCTTC ACAGTGTTC 19661138
TGATTGCAGT GTCTGGAATT TGCATCCTGC TGAATGTCAC TGAATTGTGT 19661088
TATTTGCTAA TTAGATATTG TTCTGGGAAG TCAAAAAAGC CAGTTTAAAG 19661038
CATTGCCAG TTGTTAGATT AAGAAATAGA CAGCATGAGA GGGATGAGGC 19660988
AACCCGTGCT CAGCTGTCAA GGCTCAGTCG CtAGCATTTT CCAACACAAA 19660938
GATTCTGACC TTAAATGCAA CCATTTGAAA CCCCTGTAGG CCTCAGGTGA 19660888
AACTCCAGAT GCCACAATGG AGCTCTGCTC CCCTAAAGCC TCAAAACAAA 19660838
GGCCTAATTC TATGCCTGTC TTAATTTTCT TTCACTTAAG TTAGTTCCAC 19660788
TGAGACCCCA GGCTGTTAGG GGTTATTGGT GTAAGGTAAT TTCATATTTT 19660738
AAACAGAGGA TATCGGCATT TGTTTCTTTC TCTGAGGACA AGAGAAAAAA 19660688
GCCAGTTCC ACAGAGGACA CAGAGAAGGT TTGGGTGTCC TCTGGGGTT 19660638
CTTTTTGCCA ACTTTCCCCA CGTTAAAGGT GAACATTGGT TCTTTCATTT 19660588
GCTTTGGAAG TTTTAATCTC TAACAGTGGA CAAAGTTACC AGTGCCTTAA 19660538
ACTCTGTTAC ACTTTTTGGA AGTGAAAAC TGTAGTATG ATAGGTTATT 19660488
TTGATGTAAA GATGTTCTGG ATACCATTAT ATGTTCCCC TGTTTCAGAG 19660438
GCTCAGATTG TAATATGTAA ATGGTATGTC ATTCGCTACT ATGATTTAAT 19660388
TTGAAATATG GTCTTTTGGT TATGAATACT TTGCAGACA GCTGAGAGGC 19660338
TGTCTGTTGT ATTCATTGTG GTCATAGCAC CTAACAACAT GTAGCCTCA 19660288
ATCGAGTGAG ACAGACTAGA AGTTCCTAGT GATGGCTTAT GATAGCAAAT 19660238
GGCCTCATGT CAAATATTTA GATGTAATTT TGTGTAAGAA ATACAGACTG 19660188
GATGTACCAC CAACTACTAC CTGTAATGAC AGGCCTGTCC AACACATCTC 19660138
CCTTTTCCAT GACTGTGGTA GCCAGCATCG GAAAAGAACGC TGATTTAAAG 19660088
AGGTGCTTG GGAATTTTAT TGACACAGTA CCATTTAATG GGGAGGACAA 19660038
AATGGGGCAG GGGAGGGAGA AGTTTCTGTC GTTAAAAACA GATTTGGAAA 19659988
GACTGGACTC TAAAgtCTGT TGATTAAGA TGAGCTTGT CTACTTCAA 19659938
AGTTTGTGTTG CTTACCCCTT CAGCCTCCAA TTTTTTAAGT GAAAATATAg 19659888
CTAATAACAT GTGAAAAGAA TAGAAGCTAA GGTTTAGATA AATATTGAGC 19659838
AGATCTATAG GAAGATTGAA CCTGAATATT GCCATTATGC TTGACATGGT 19659788
TTCCAAAAAA TGGTACTCCA CATAtTTCAG TGAGGGTAAG TATTTTCTG 19659738
TTGTCAAGAA TAGCATTGTA AAAGCATTTT GTAATAATAA AGAATAGCTT 19659688
TAATGATATG CTTGTAAC TAATAATTTT GTAATGTATC AAATACATTT 19659638
AAAACATTA AATATAATCT CTATAATAAt ttaaaatcta atatggTTTT 19659588
aatagaacag caaatTTTaa tttcatctat cactTTTTat ataaatacat 19659538
taatgtTTta tatttcataa caccaatgg

```

Şekil 2.6 Cx26 geninin ekzon ve intron bölgelerini gösteren DNA baz dizisi (54)

Kelsel ve ark. 1997'de Cx26 geni olarak da isimlendirilen GJB2 geninin, DFNB1 lokusunda yer aldığını bulmuşlardır (38). Cx26 geni sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu ilk bulunan genidir. Cx26 geninde meydana gelen mutasyonların sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybının yaklaşık yarısından sorumlu olduğu açıklanmıştır (55).

Cx26 geni ile birlikte iç kulaktaki hücrelerde sentezlenen ve işitme mekanizmasında önemli rol oynayan diğer bir gen GJB6 genidir (5, 16, 41). GJB6 geni Cx30 proteinini kodlamaktadır. 13. kromozomda Cx26 geninin yaklaşık 35 kb'lık telomerik bölgesinde yer almaktadır. Cx30 geni 261 aminoasit ve 3 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.7.) (11, 19, 53).

```

aaggaggaga ggggggttct gaagagagaa caccagggct ctagcctgtc 19703118
acataactgg ggggtgtggag agcgcctcat tgccactgca gtgactaaag 19703068
CTGGGAAGAC GCTGGTCAGT TCACCTGCCC CACTGGTTGT TTTTAAACA 19703018
AATTCTGATA CAGgtaatga tgactttatg ctttttttct tatgtcttct 19702968
cttctgaatt ctgagtgtta ggaaggaaaa gaagtacaga agatctggct 19702918
aaacaatttc tgtatggcga aagaaaaatt ctaacttgta cgccctcttc 19702868
atgcatcttt aattcaattt gaatattcca ggtgctgtga gcagtttgca 19702818
tatattagtt taaatgttaa atgggataaa attgtgggaa agtgatttct 19702768
gacccaagct tcttggctcg tgagggcata accttctaag gccacctgc 19702718
cataggttat gatttctggt ttagttgctt agtgcagtag catagacctg 19702668
gaaccccaga gggcctgctc catttttatt cccaggggtca tttaaatcta 19702618
gttgagctta aatgtttgga aaggacacag gtttgcttga atgaacaaac 19702568
atatattgct aacaagacct agagaaggaa agtttaactt aatggaaatt 19702518
aatttttaac tctttgaatt cttaaattgat gtaagaaaca tacgtaattg 19702468
catgagtttt ccatttttac atctagactc cacagacaga aacgtttcat 19702418
ttttattgag ttaattttga aatatatgaa tccctgacct attgttatca 19702368
tagactgtta ctctatcagg acagttgctg aagttttttg tcaactaaatt 19702318
ctaaatcaa ctatcaggtt gtcccttgga tgacctgaga tttctagaga 19702268
caaaaagaat ctattcttcc tgattgaaga aagagtctga gatttttttt 19702218
aaaccactga tttggggatc aggggtgtag cagtgtctca aactctcccc 19702168
tgtccctttt tgttttgctc aaggagtggg cttgaggcct cagattgggt 19702118
gttactgtta ttttgatagg gaaaggatcc tactaaagag cacctttgat 19702068
tattttgtgt gttcaaagca tagagcatca ggaagctggc aatttctgaa 19702018
cttacctcat aacagttctg ggaatgaaga aaaactacct acaaagtta 19701968
ttcaggggac atattgctgg gggcgggggg ggggggagtt aaaggaatat 19701918
ggcaacagct actatttttc cctcaacagG CGACATCCTC ACTGACCGAG 19701868
CAAAGATTGA CATTTCGTATC ATCACTGTGC ACCATTGGCT TCTAGGCACT 19701818
CCAGTGGGGT AGGAGAAGGA GGTCTGAAAC CCTCGCAGAG GGATCTTGCC 19701768
CTCATTCTTT GGGTCTGAAA CACTGGCAGT CGTTGGAAAC AGGACTCAGg 19701718
tttgcttggt ttgctttgat attgttttcc ttttatctat gcagactccc 19701668
cgactatcca aagctaactt cgaaattggg aggcacatgt tctgttctc 19701618
agatctatca actactccct agatggccag ggcgcatggc tcatgcctgt 19701568
aatcccaaca ctttgggagg ccgaggctga ggtcaggagt tcaagaccag 19701518
cctgaccaag gtggcaaac cctgtcacta ctaaaaaaaa aaaaaaaaaa 19701468
aaaaaaaaaa aaattaacca ggtatggtgg catatgcctg tagtcccagc 19701418
tattcaggag gctgaagcac aagaatcact agaaccgggg aggcatatg 19701368
tgagtgagc tgagattgca ccattgcact ccaccctggg caacagggca 19701318
agactctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa tttttttttt tttttttttt 19701268
tttttgctaa atgacattga aaggggaaca gagctatcta gaaaaatatg 19701218
ctgagggggt acaactctaac tttgggggct ttagttttgg ttctgtcatt 19701168
agtgaatta taatggcata gataaataag ctagtgtgta ttaatttcct 19701118
aagaagtttt aaaacaatca agaaatttca ttagtgtagt caaatgccaa 19701068
tagatctaaa ttatttgaat tgtaaaagga aagaacaacc tatcttcaca 19701018
atgctgtgtg gatcctcaaa agtaaagtcc atggtttact tatttttaga 19700968
gctagatatt tcagactgga gcttttagtat caagaatata gcatgggccc 19700918
ggcgcgggtg ctcagctgtt taatcccagc actttgggag gccaaagggg 19700868
gcggatcatg aggtcaggag atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa 19700818
ccccgtctct actaaaaata caaaaaatta gccgggcttg gtggcaggcg 19700768

```

cctgtagtcc	cagctgctca	gagaggctga	ggcgggagaa	cggcgtgaac	19700718
ccgggaggcg	gagcttgacg	tgagccgaga	tcgtgccacg	gtactccagc	19700668
ttggggcaaca	gagctagact	ccatctcaaa	aaaaacaaaa	aacaaaaaca	19700618
aaaaacaaaa	acaaacaaac	aagaaaaaac	agcatcgagt	tcttcactat	19700568
gattacattt	actacaaaac	cgaacacagt	ttaccttttt	aagttaaata	19700518
gtaatcacat	tcttagaagt	tgaagactgc	agaagctaag	cgtatctatt	19700468
ctttccttaa	aagacagcca	gagaggcatc	agttaaaatg	aacctctctg	19700418
gtttccgaag	aaagagttaa	tatttcactt	tgtattgaaa	aagctcctcc	19700368
cattggctcc	agccctccag	aagcaggaga	ggaaagaggt	actttgttta	19700318
ctacagttgc	aaagggctcc	agtggatgcg	atgattttgg	aaagtaattt	19700268
gaaattagtg	acgacttcac	aaattgaaat	agccttcaaa	tctttctcaa	19700218
ccaagagggg	ttgtgaaaga	ttatgccctg	tggttatgtg	tttttacaag	19700168
ggagaacctg	ggggctgggc	gctttccttg	ccacccccaa	cccacaacat	19700118
ccttcctctg	ggccctctg	cagtctgtcc	accaccctg	tccaccacc	19700068
aaagtcagga	caggagcagt	cagtggagtt	gagtcctcct	taaaacttgc	19700018
tgagtctcct	gcggttactg	ccatcctccc	accgctcctt	gaatgggagc	19699968
gtctcctggg	gcagccaggc	ctggccagta	atggcagcaa	tgtgctggaa	19699918
atgtgggggc	ttgataacct	gcagctgacc	catcaccctg	gcctatctct	19699868
tgacacttgc	gaggggagct	ctcttctccc	tggtctgttg	cctgcagaga	19699818
atgatacgca	cggcagatcc	ccggagctgg	ttggtgagcc	cctcaggtgt	19699768
gacacaacct	ggaaaagaat	ggaaagagcc	actgtctcac	tgtctcagtt	19699718
gggaaacacc	agctcagggg	cactgagcac	ccaggggcag	cccactcagg	19699668
accgggcagg	ttcggagaga	ggacacagct	tctcccttgg	atcacttctg	19699618
ctgttaggaa	taacagggcc	tttgtggctc	ttgcaggagg	acactctgaa	19699568
ccaggagact	gtcctgagtg	accggggagt	tagacacact	tgtattggat	19699518
ttaacctcat	ttttctcagc	aagctcggca	tctcctttac	ttttcttctt	19699468
ttaaaggcat	aggtggattg	ccaattttta	gtaccggtat	cgagaagcgc	19699418
gcattgtgaa	acagattata	ttctgttcag	ttttgctatg	ttgatagaac	19699368
accctcagac	cgtgtggctt	ggggaccagc	aaaaatcaa	agaaatttaa	19699318
aaagctactg	cccttataat	tgtccctggt	tttagaaaaa	aaaaacaggg	19699268
agaagcccaa	agctgcagag	gtcagggacc	ctgcttctag	aaagcgtgga	19699218
ccagtgttcc	tgggggggag	ttgtgacctc	ttgacctttt	ctgtgacttt	19699168
agcctctcag	aatcatocag	gccatgtccc	cctctggctc	cctgatctgt	19699118
ttacttccta	gaaggttggg	ccacagggga	ccacggggtg	ccgttgttca	19699068
ggcaggccac	gggctagaga	accgagagaa	cacagctgtc	tcacctgctg	19699018
gggaggttaa	attctatgga	ctttgaagtg	ttggagaaaa	tgtgaaccat	19698968
tttttgataa	atcaaaactc	tgtctgattg	gcattttggt	gaccaaattt	19698918
caatgggagg	tgtttcttgg	ttaaataaga	aacatcttca	ttttataaat	19698868
aaacaggact	gaccccatag	gtgaacagct	gctgtaaaat	atgtttacac	19698818
atcaagacgt	acaaatttct	tgtcctcac	tggtcacatt	ttgaaatgct	19698768
tttgagatag	aacatcaaca	gttaggaaaa	tgtattatgt	ctttcatctg	19698718
agaataaaaat	taattttaca	aatcatatca	tttaacatga	gctttttaaa	19698668
tggagctgca	tttactgtgg	acattggcca	tctcttttgg	ctgtgaaata	19698618
tgttgtatat	gaaagggagg	cattagtaca	tacactttaa	ttatggaaacg	19698568
ctgggaccag	ggcttccaga	ggagtcccct	gtgcattacc	ccagcagaca	19698518
ctcacacagc	ctctgatgaa	atgcttcaag	ggatgagaaa	acatggtgtg	19698468
aagggtagcc	catttcaatt	ttcttttttt	ttttttttta	agaaaaacct	19698418
ggccttctgt	taatgctgag	tgtcagatcc	agttcttagt	cctagatcca	19698368
cgcaggcatt	gaatcctctg	tttcacattc	cagggtcacc	gccctgtgcc	19698318
tcagcgtctt	cctcaagcta	gtgtttgttc	tgttctctcg	gctgtgaggt	19698268
aacctccagc	ctcttccatc	tgtccacaca	cctgttgatg	cgcccccgag	19698218
ggccaggctc	ttcctgaaac	atggaaagag	cccacccttc	caatgtggggc	19698168
tgccccggga	gcccagcact	ctgttccctt	cacacagcct	gagcctcagt	19698118
ctctttttcg	caaccttgtg	ctgtggcgct	gatgtcccgc	tgataaggat	19698068
gttctctcta	aggaatactg	atattcctga	agtaaaatgc	taggctgcag	19698018
ttattgaagg	aatcatgaaa	atacaacctc	ccaacgatag	cagaggcggc	19697968
aacaaagacc	attgtgattc	caagactcgg	tgccattgcc	gttgtcatag	19697918
ttgctatcac	ggaactctta	acaagaagtt	tagtgacact	gttttagaat	19697868
gttgctgggg	gctcaacaga	aagtccccca	gttcacacat	atacgttttt	19697818

tottatthttta	aaaatcaaga	tattttgcctt	tctccaggaa	ttggggccctt	19697768
ctttttcattc	tgaataataa	tattctgctc	tcctgtggaa	atgcttaaaag	19697718
aattgaacat	agaataacca	tgagatccag	caatcccaca	tctagataacc	19697668
taagagactt	gaaagcaggg	tcttgaaaaa	atagtagtat	accctcactc	19697618
acagtagtgt	tacaacagcc	aaaagctgga	agcaaccag	tgtccattga	19697568
tagatgaatg	ggtaacaaa	atggggagca	tcctacgggt	ggaatagtat	19697518
tcagcctcca	aaataaggaa	atcctgtcac	acgcagcaac	atggatgaac	19697468
ctcgaggaca	ttatgtgag	tgaaataagc	cagttccaga	aagacaagtg	19697418
ccgtggattt	ctacttatat	gaggactgta	gagcagtcaa	aatcatagat	19697368
gcagaaagta	gaatggtggt	tgctaggggc	tggggagggg	ggaatggaga	19697318
attgttgctt	aatattaata	cccaaccaag	ggcaaaaaaa	acaattttctc	19697268
agaaagccaa	cggaaactagg	agtcggactt	ttccaacagg	tctgctgact	19697218
ttctaagtct	acaaaagatg	ttgccttggg	gcacacagta	gcacccact	19697168
ctgaggccaa	ggcactcctg	ggtggggaga	ggctgcctcc	atttacccca	19697118
ctgcttccaa	gagcagccag	cgtaatgcag	aggggcaggt	gtgtgggcca	19697068
gagcgtgagg	tccagggggc	tggcctgaga	aggggaggct	gacaggtgtc	19697018
cctcaccac	tcagggataa	gaaagtctaa	gaccggtgaa	gagaaggact	19696968
ttggtgactc	cctcatgccc	cgacagcctg	taaaaaaaat	gcctgagtga	19696918
attactctgg	ggagaggtct	tttactttct	gaaaattttc	aaagggtcca	19696868
tgatacctcc	ttttatthttt	caaaggagaa	tgctgaccaa	ttctatagtc	19696818
ttctgtggca	gtataggcta	agaaggcagc	tgthttgaatt	atagcaaaag	19696768
tgtccatagc	tgtaaagaag	tcctthttct	ctcgggatag	agaatcagtg	19696718
cattaacagg	gaaggaggca	ctgggtggca	agggcagcag	atcccctcct	19696668
cggctgcccc	tggcgcaaac	aggaccgct	ggggaggcaa	agccaacgtg	19696618
ggcttggtta	tactgcagat	atattggaga	acaatggagc	aatctttata	19696568
aaagattgtg	aatctcttht	agaagaggct	ttctcagtag	ttgacaatat	19696518
tagatttctt	aagaacacat	gagtatggca	gatgatgtta	ttcaagctag	19696468
aattaagtat	aaatatattg	tataaagtaa	gctaataagt	atthttgttht	19696418
ttcccttctt	agtctgttgg	gtaaactaga	atatgtcatt	ccaatgaaag	19696368
ttthttttcc	ccctgaataa	gctatthtaat	gaataaaatc	tactgtggaa	19696318
gctaggtgag	ccctaggaga	aagccaatct	ggtgtaatgg	atcagacagt	19696268
gattaaaagg	gagcttgga	atgaatttgt	ttacctgtgt	tcctggatta	19696218
atgcaaacag	caatctaata	tatgatctga	atthtagttga	atcaagatga	19696168
tcctaaccct	tcttccaaaa	agttgtthct	gaccaaaaac	atgataatth	19696118
ttthtttttc	gagacagagt	ctcgtctgt	caccaggtct	ggggtgcagt	19696068
ggtgcaatct	cggctcactg	caagctccac	ctccctggtt	cacgccattc	19696018
tcctgcctca	gcttcccaag	tagctgggac	tacaggtgcc	cgccaccacg	19695968
ccaggctaath	ttthttttcg	tattgttagt	agagatgggg	ttthaccttg	19695918
ttagccagga	tggctctgat	ctcctgacct	catgatctgc	ccgcctctgc	19695868
ctcccaaagt	gctgggtthc	caggcgtgag	ccaccacacc	tggccaaaca	19695818
tgagaatgct	ttcaggggtg	gcattcctth	tcagaaaacc	tcagactagc	19695768
agggcagggg	gttgaagttg	taaagtatca	cagcctacct	taaaataaag	19695718
ttggettcag	tctgtaatat	caccgtgtca	ctthcccaag	gcctcttcca	19695668
ctaataaacc	tttgcccact	tttgtctgth	tagGGATAAA	CCAGCGCAAT	19695618
GGATTGGGGG	ACGCTGCACA	CTTTCATCGG	GGGTGTCAAC	AAACTCTCCA	19695568
CCAGCATCGG	GAAGGTGTGG	ATCACAGTCA	TCTTTATTTT	CCGAGTCATG	19695518
ATCCTCGTGG	TGGCTGCCCA	GGAAGTGTGG	GGTGACGAGC	AAGAGGACTT	19695468
CGTCTGCAAC	ACACTGCAAC	CGGGATGCAA	AAATGTGTGC	TATGACCACT	19695418
TTTTCCCGGT	GTCCACATC	CGGCTGTGGG	CCCTCCAGCT	GATCTTCGTC	19695368
TCCACCCAG	CGCTGCTGGT	GGCCATGCAT	GTGGCCTACT	ACAGGCACGA	19695318
AACCACTCGC	AAGTTCAGGC	GAGGAGAGAA	GAGGAATGAT	TTCAAAGACA	19695268
TAGAGGACAT	TAAAAAGCAG	AAGGTTCGGA	TAGAGGGGTC	GCTGTGGTGG	19695218
ACGTACACCA	GCAGCATCTT	TTTCCGAATC	ATCTTTGAAG	CAGCCTTTAT	19695168
GTATGTGTTT	TACTTCCTTT	ACAATGGGTA	CCACCTGCCC	TGGGTGTTGA	19695118
AATGTGGGAT	TGACCCCTGC	CCCAACCTTG	TTGACTGCTT	TATTTCTAGG	19695068
CCAACAGAGA	AGACCGTGTT	TACCATTTTT	ATGATTTCTG	CGTCTGTGAT	19695018
TTGCATGCTG	CTTAACGTGG	CAGAGTTGTG	CTACCTGCTG	CTGAAAGTGT	19694968
GTTTTAGGAG	ATCAAAGAGA	GCACAGACGC	AAAAAAATCA	CCCCAATCAT	19694918
GCCCTAAAGG	AGAGTAAGCA	GAATGAAATG	AATGAGCTGA	TTTCAGATAG	19694868


```

TGGTCAAAAT GCAATCACAG GTTTCCCAAG CTAAACATTT CAAGGTAAAA 19694818
TGTAGCTGCG TCATAAGGAG ACTTCTGTCT TCTCCAGAAG GCAATACCAA 19694768
CCTGAAAGTT CCTTCTGTAG CCTGAAGAGT TTGTAAATGA CTTTCATAAT 19694718
AAATAGACAC TTGAGTTAAC TTTTTGTAGG AACTTGTCTC CATTACATAA 19694668
CAACGTAATC AAATATGTGG TCCATCTCTG AAAACAAGAG ACTGCTTGAC 19694618
AAAGGAGCAT TGCAGTCACT TTGACAGGTT CCTTTTAAAGT GGACTCTCTG 19694568
ACAAAGTGGG TACTTTCTGA AAATTTATAT AACTGTTGTT GATAAGGAAC 19694518
ATTTATCCAG GAATTGATAC gTTTATTAGG AAAAGATATT TTTATAGGCT 19694468
TGGATGTTTT TAGTTCTGAC TTTGAATTTA TATAAAGTAT TTTTATAATG 19694418
ACTGGTCTTC CTTACCTGGA AAAACATGCG ATGTTAGTTT TAGAATTACA 19694368
CCACAAGTAT CTAAATTTGG AACTTACAAA GGGTCTATCT TGTAATATAT 19694318
GTTTTGCATT GTCTGTTGGC AAATTTGTGA ACTGTCATGA TACGCTTAG 19694268
TTGGAAAGTG TTCATTGCAC AATATATTTT TACTGCTTTC TGAATGTAGA 19694218
CGGAACAGTG TGGAAGCAGA AGGCTTTTTT AACTCATCCG TTTGCCAATC 19694168
ATTGCAAACA ACTGAAATGT GGATGTGATT GCCTCAATAA AGCTCGTCCC 19694118
CATTGCTTAA GCCTTCacat gccttggtgtt ttctggtgca tctgggcagc 19694068
ttgctgccaa ccctcggtgt atgatgagtg ggttggtgca ttttgctggt 19694018
aaggccacca gttactg

```

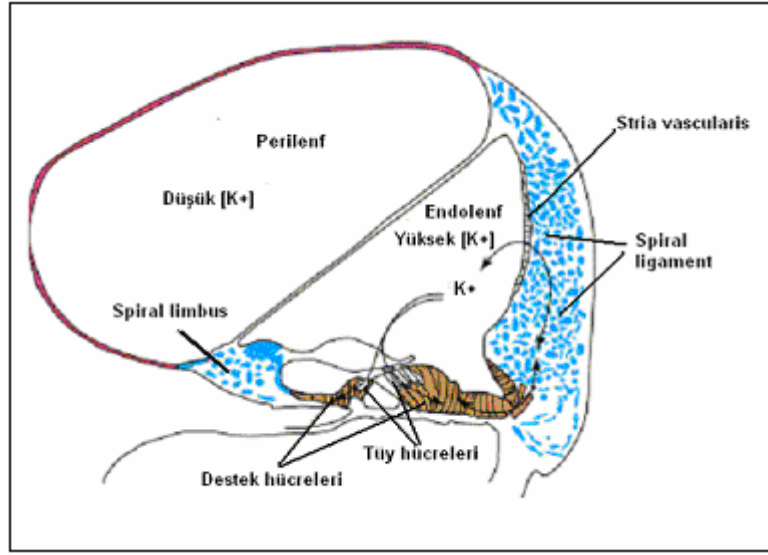
Şekil 2.7 Cx30 geninin ekzon ve intron bölgelerini gösteren DNA baz dizisi (54)

Cx30 geninde, 342 kb'lık büyük bir delesyona neden olan del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun, Cx26 mutasyonlarından sonra otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybına neden olan en önemli mutasyonlardan biri olduğu belirtilmiştir (2, 7, 17, 51, 56).

2.2.4 Cx26 ve Cx30 Proteinleri ve Bu Proteinlerin İşitme Kaybındaki Rollerini

Gap junction kanal yapısını oluşturan Cx26 ve Cx30 proteinlerinin kokleada, stria vaskulariste bazal hücreler arasında, baziler membranda, destek hücreler arasında, limbus ve spiral ligamentteki fibrositler arasında bol miktarda buldukları tespit edilmiştir (2, 4).

İç kulakta sentezlenen ve gap junction kanal yapısını oluşturan Cx26 ve Cx30 proteinleri, iç kulaktaki ses iletimi sırasında endolenfte yoğun olarak bulunan ve saçlı hücrelere geçmiş olan potasyum iyonlarının tekrar endolenfte dönmesinde önemli rol oynarlar (Şekil 2.8) (2, 16, 17, 41, 57).



Şekil 2.8. Koklear gap junction kanallarıyla gerçekleşen potasyum döngüsü (58)

Cx26 ve Cx30 genlerinde meydana gelen mutasyonların, kokleadaki gap junction kanal yapısını bozarak potasyum iyon döngüsünü engellediği ve genetik işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (2, 41).

2.2.5. Cx26 ve Cx30 Gen Mutasyonları

Prelingual dönemde işitme kaybı olan çocuklarda, sendromik olmayan otozomal resesif tipte işitme kaybı yaygın olarak görülmektedir. DFNB1 lokusunda yer alan Cx26 ve Cx30 genlerinde oluşan mutasyonların, sendromik olmayan otozomal resesif işitme kayıpları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (56).

Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybının %50'sinden sorumlu olan gen DFNB1 lokusunda yer alan Cx26 genidir (2, 7, 9). Akdeniz ülkelerinde kalıtsal işitme kaybına neden olan mutasyonların yaklaşık % 30-50'sini Cx26 mutasyonları oluşturmaktadır (14, 59). Bugüne kadar Cx26 geninde görülen doksandan fazla mutasyon olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında yaygın olarak görülenler 35delG, 167delT ve 235delC mutasyonlarıdır (60).

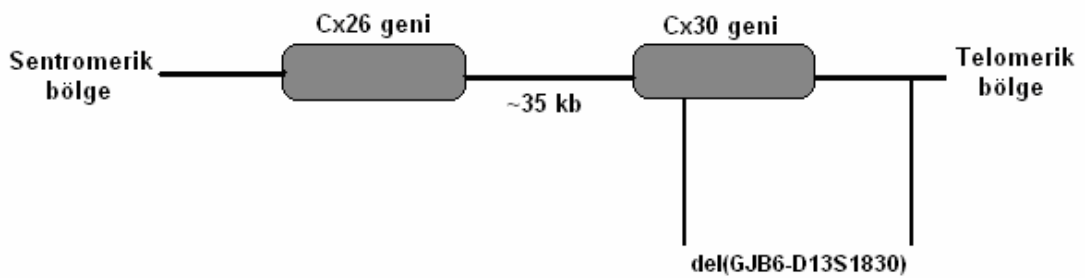
Özellikle tek nükleotit değişimi sonucunda oluşan 35delG mutasyonu birçok ırkta yaklaşık %60-70 oranında görülmüştür (61). Bu mutasyon, Cx26 geninin

2.ekzonunda bulunan arka arkaya dizilmiş 6 guanin bazından 35. nükleotit olan guaninin delesyonu sonucunda oluşan çerçeve kayması tipi mutasyondur (62). Bu mutasyon sonucunda 13. kodonda stop kodon oluşur ve 12 amino asitlik bir protein meydana gelir (48).

35delG mutasyonunun Türkiye’de işitme engelli olgular üzerinde yapılan bir çalışmada görülme oranı, %20,4 ve taşıyıcılık sıklığı ise %1,8 olarak bulunmuştur (13).

Cx26 mutasyonlarından olan 167delT mutasyonu Aşkenazi Yahudilerinde, 235delC mutasyonu ise Kore ve Japon populasyonlarında yaygın olarak görülmektedir (2, 4, 15, 61, 63). 167delT mutasyonu sonucunda Cx26 geninin 2. ekzonundaki 56. kodonda bir çerçeve kayması tip mutasyon oluşur. 81. kodonda bir stop kodon oluşur ve 80 aminoasitlik bir protein meydana gelir (49).

İç kulakta sentezlenen ve sendromik olmayan işitme kaybına neden olan bir diğer gen ise Cx30 genidir. Bu gende oluşan del(GJB6-D13S1830) mutasyonu, Cx30 geninde ilk iki ekzon ve üçüncü ekzondan bir parçayıda içine alan büyük bir delesyona neden olmaktadır (Şekil 2.9) (64).



Şekil 2.9 del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun kromozomal lokalizasyonu (64).

Cx30 geninde oluşan del(GJB6-D13S1830) mutasyonunu İspanya, Fransa, İsrail ve Brezilya’ da yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (65).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada, Afyonkarahisar ili'nde bulunan Karahisar İşitme Engelliler Okulunda 2005-2006 yılları arasında eğitim gören ve konjenital işitme kaybı tanısı konmuş 47 işitme engelli olgu değerlendirmeye alındı. Bebeklik döneminde ateşli hastalık geçirmemiş, işitme kaybı dışında başka şikayetleri olmayan ve konjenital işitme kayıplı olgular çalışmaya dahil edildi. Seçilen olguların %48,9'unun anne ve babası arasında akrabalık bulunurken, %51,1'inin anne ve babası arasında akrabalık bulunmadığı belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen her olgudan pıhtılaşmayı önlemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere kan alındı. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4° C'de saklandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada, Sigma (Almanya) ve Merck marka kimyasallar kullanıldı.

- 5X TBE
- Agaroz
- İsoopropanol
- Etanol
- Etidyum bromür
- Brom fenol blue
- Taq DNA Polimeraz
- Puregene® DNA izolasyon kiti
- Pronto Konneksin kiti

Puregene® DNA izolasyon kit içeriği

- Eritrosit parçalama çözeltisi (RBC lysis solution): Amonyum klorür, etilen diamintetraasetik asit, sodium bicarbonate
- Hücre parçalama çözeltisi (Cell lysis solution): Tris (hidroksimetil)

aminometan, etilendiamintetraasetik asit, sodyum dodesil sülfat

- Protein çöktürme çözeltisi (Protein precipitation solution): Amonyum asetat
- DNA hidrasyon çözeltisi (DNA hydration solution): Tris (hidroksimetil) minometan, etilendiamintetraasetik asit
- RNaz A çözelti

Pronto Konneksin kit içeriği:

- Pronto™ tampon 2
- Çözelti C
- Çözelti D
- ColoRed™ yağı
- Assay çözeltisi
- Yıkama çözeltisi (konsantrasyon 20X)
- HRP birleştirici
- TMB substrat
- Durdurma çözeltisi (1 M H₂SO₄)
- Pronto™ Connexin Screen™ plakalar
- Belirleme (ELISA) plakaları

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka-Model
Santrifüj	Thermo
Buzdolabı	Profilo
Derin Dondurucu	Bosch
Vorteks	Velp
Spektrofotometre	Nano Drop
Termal Cycler	Eppendorf Mastercycler personal
Güç Kaynağı	Apelex PS 503
UV Transillüminatör	UVP
Görüntüleme Kabini	Biolab
Yatay Elektroferez Tankı	Biolab

3.2. YÖNTEMLER

Bu çalışmada, incelemeye alınan 47 olgunun periferik kanından genomik DNA elde edildi. İzole edilen her DNA molekülünün Cx26 geninin 2. ekzonu ve Cx30 geninin 3. ekzonu amplifiye edildi. Amplifiye edilen DNA üzerinde Cx26 geninde 35delG ve 167delT, Cx30 geninde del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarının genotipleme çalışması için basit nükleotit primer uzaması ve ELİSA (Enzim linked immuno sorbent assay) yöntemi kullanıldı. Yöntem teorik olarak 6 basamaktan oluşmaktadır:

1. DNA İzolasyonu: Olguların genomik DNA'sı periferik kan örneklerinden izole edildi.

2. Hedef DNA Amplifikasyonu: Test edilen mutasyonların DNA fragmentleri amplifiye edildi. Amplifiye edilen DNA, primer uzama reaksiyonları için substrat olarak kullanıldı.

3. Amplifikasyon Sonrası Uygulamalar: Amplifiye olmuş DNA örneğine katılmamış serbest nükleotidleri inaktive etmek için PCR ürününe uygulandı. Böylece ortamdaki serbest nükleotidlerin primer uzama reaksiyonuna katılması önlendi.

4. Primer Uzama Reaksiyonu: Basit nükleotid primer uzama assayı 96 kuyucuklu bir termoplatede gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk, beklenen mutasyon bölgesine yakın test edilen DNA'ya hibridize olan 5'-ucu FITC (Fluoresein İzosiyanat) ile işaretlenmiş bir primeri ve test edilen bölgedeki nükleotidi tamamlayan basit biyotinle işaretli nükleotit türünü (mutant veya yabancı tip ile mukayese edilen) içermektedir. Her bir post amplifikasyon uygulanmış örnek mutasyon başına iki kuyucukta test edildi. Her bir çiftin ilk kuyucuğu mutant allelin (mut) varlığı için test edilirken ikinci kuyucuk normal allelin (wt) varlığı için test edildi. Biyotinle işaretli nükleotid test edilen her bir bireyin genotipine bağlı olarak reaksiyon boyunca primere katıldı veya katılmadı.

5. ELISA ile Belirleme: Biotinle işaretli primerlerin belirlenmesi ELISA prosedürü ile gerçekleştirildi. Bu aşamada önce biyotinle işaretli primerler streptavidinle kaplanmış ELISA plağına bağlanır ve DNA fragmentlerinin 5' ucunda yer alan FITC'ye HRP (Horse Radish Peroksidase) enzimi bağlanır. Daha sonra ortama konulan TMB substratın varlığında peroksidaz reaksiyonu meydana gelir.

6. Sonuçların Yorumlanması: Sonuçlar TMB substrat çözeltisinin ilavesini takiben görülebilir hale geldi. Substrat açık renkli kaldı veya maviye dönüştü.

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Gentra Systems firmasının Puregene® DNA izolasyon kiti kullanıldı. Kit prosedürü hücrelerin parçalanması, RNA'nın uzaklaştırılması, proteinlerin çöktürülmesi, DNA'nın toplanması, çöktürülmesi, yıkanması ve hidrasyonu işlemlerini kapsamaktadır.

1. İki adet 1,5 ml'lik eppendorf tüpe hastanın adı-soyadı ve DNA numarası yazıldı.
2. Tüplerden birine 300 µl %100'lük isopropanol konuldu.
3. Diğer tüpe 900 µl eritrosit parçalama çözeltisi konuldu ve 300 µl periferik kan ilave edildi.
4. Karışım pipetajla homojen hale getirildi.
5. Tüp oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
6. Mikrosantrifüj ile 16000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi.
7. Tüpün dibindeki beyaz pellete dokunmadan ve tüpün içinde 10-20 µl supernatant kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı.
8. Beyaz pellet ile sıvının karışması için tüp 15-20 saniye vortekslendi.
9. 1,5 µl RNaz A çözeltisi ilave edildi.
10. Tüp 3-5 saniye vortekslendi ve etüvde 37° C'de 20 dakika inkübe edildi.
11. İnkübasyondan sonra 300 µl hücre parçalama çözeltisi eklenerek pipetajla karıştırıldı.
12. 100 µl protein çöktürme çözeltisi eklendi.
13. Karışım vorteksle (10 saniye) homojen hale getirildi.

14. 16000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. DNA'yı içeren supernatant pipetle 300 µl %100'lük isopropanol üzerine ilave edildi.
16. Tüp yavaşça ters düz edilerek 30-50 kez karıştırıldı ve DNA ipliksi yapıda görülür hale geldi.
17. Tüp 16000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA tüpün dibinde görünür bir çökelti haline geldi.
18. DNA'nın dipten kalkmamasına dikkat ederek supernatant döküldü.
19. Tüp kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek DNA kurutuldu.
20. DNA pelleti üzerine 300 µl %70'lik etanol koyuldu.
21. Tüp ters düz edilerek DNA'nın kalkması sağlandı.
22. 16000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
23. DNA'nın dipten kalkmamasına dikkat ederek etanol dikkatlice döküldü.
24. Tüp kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek DNA kurutuldu.
25. 100 µl DNA hidrasyon çözeltisi eklendi.
26. DNA pelletinin kalkması sağlandı.
27. DNA örnekleri 65° C'de 5 dakika inkübe edildi.
28. İzole edilen DNA aynı gün içinde kullanılacaksa +4°C'de, daha sonra kullanılacaksa -20°C'de saklandı.

3.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Spektrofometrede Ölçümü

İzole edilen DNA'nın miktar tayininde absorsiyon (A; ya da optik dansite, OD) temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır

1 ml sıvıda belli dalga boyundaki (DNA için 260 nm) ışığa 1 cm yol aldırılan madde miktarına 1 OD denir. Çift zincirli DNA molekülleri için, 1optik dansitenin (OD) 50 µg/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırma oranı} \times 50$$

Proteinler de 280 nm’de absorpsiyon özelliği gösterirler. 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran, nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenle 280 nm’de ölçülen bir değerdeki artış, A_{260} / A_{280} oranında düşmeye neden olur. Saflaştırılmış DNA’da A_{260} / A_{280} oranı, yaklaşık 1,75’in üzerinde olmalıdır (66).

Bu işlemler için NanoDrop cihazı ve softwaire’inden yararlanıldı. Hidrasyon solusyonu içinde çözülmüş olan DNA örneğinin 1,5 μl ’si kullanılarak ölçüm yapıldı. Çizelge 3.1’de izole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığı verilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığı

Olgu no	DNA miktarı (ng/ uL)	260/280 nm’de DNA’nın saflık değeri
1.	73,9	1,90
2.	114,2	1,90
3.	126,7	1,92
4.	65,9	1,88
5.	91,9	1,92
6.	79,0	1,89
7.	116,3	1,94
8.	76,7	1,93
9.	78,1	1,88
10.	51,7	1,92
11.	94,7	1,90
12.	51,9	1,92
13.	82,1	1,90
14.	43,1	1,93
15.	95,9	1,86
16.	114,0	1,91
17.	440,5	1,88
18.	143,5	1,81
19.	39,2	1,81
20.	570,6	1,86
21.	537,0	1,83
22.	47,0	1,79
23.	243,3	1,88
24.	71,1	1,76
25.	102,3	1,80
26.	81,5	1,88

Olgu no	DNA miktarı (ng/ uL)	260/280 nm'de DNA'nın saflık değeri
27.	48,3	1,83
28.	77,2	1,88
29.	406,4	1,82
30.	308,5	1,89
31.	72,6	1,86
32.	55,0	1,72
33.	14,3	1,46
34.	69,3	1,63
35.	35,5	1,88
36.	225,1	1,80
37.	108,6	1,80
38.	191,0	1,82
39.	108,5	1,89
40.	28,2	1,75
41.	52,3	1,67
42.	50,6	1,75
43.	19,4	1,65
44.	39,5	1,72
45.	53,2	1,72
46.	43,0	1,73
47.	36,7	1,70

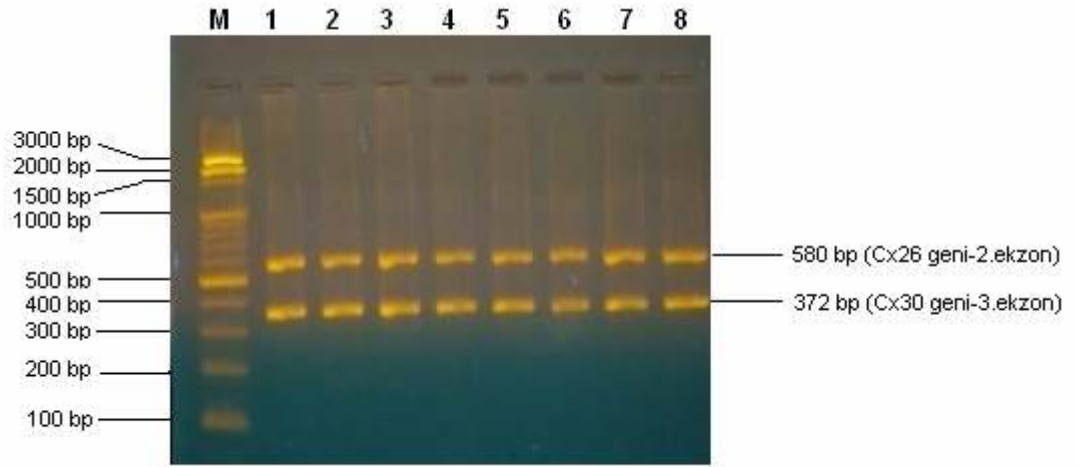
Çizelge 3.1'in devamı

3.2.3. Olguların Cx26 (35delG ve 167delT) ve Cx30 (delGJB6-D13S1830) Mutasyonları Bakımından İncelenmesi

Olguların Cx26 (35delG ve 167delT) ve Cx30 (delGJB6- D13S1830) mutasyonları bakımından incelenmesi için Pronto™ Connexin kiti kullanıldı.

1. 0,5 ml'lik ependorf tüpe 18 µl amplifikasyon karışımı, 5 µl DNA ve 0,2 µl Taq DNA polimeraz koyuldu.
2. Karışım pipetaj ile homojen hale getirildi ve 3–4 saniye santrifüj edildi.
3. Thermal cycler başlangıç 94°C'de 5 dakika; 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye 35 döngü; 72°C'de 5 dakika ve son sıcaklık 18-25°C olmak üzere programlandı ve tüp Thermal cycler'a konuldu.
4. Amplifikasyon sonrası PCR ürünün 5 µl'si % 2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyon olup olmadığı test edildi.

5. %2'lik agaroz jel 50 ml 0.5XTBE içinde 1 g agaroz kaynatılarak hazırlandı ve içine 2,5 µl (0,25 M) Etbr ilave edildi. Jel tanka dökülerek donması beklendi. 2 µl PCR ürünü ve 4 µl bromfenol blue pipetajla karıştırılarak jele yüklendi.
6. Yürütme sonucunda jelde görülen iki bant amplifikasyon olduğunu gösterdi. Bu iki banttan biri Cx26 geninin 2. ekzonuna diğeri Cx30 geninin 3. ekzonuna aittir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Cx26 ve Cx30 genlerine ait PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı

7. 0,5 ml'lik ependorf tüpe 50,5 µl amplifikasyon sonrası uygulama karışımı (Çizelge 3.2) ve 15 µl amplifiye olmuş DNA koyuldu.

Çizelge 3.2. Amplifikasyon sonrası uygulama karışımı

Çözelti	Bir örnek için kullanılacak hacim (µl)
Pronto™ Buffer	47,0
Çözelti C	2,0
Çözelti D	1,5
Toplam	50,5

8. Karışım pipetajla homojen hale getirildi.

9. Thermal cycler başlangıç 94°C’de 15 saniye; 94°C’de 30 saniye, 62°C’de 10 saniye 20 döngü ve son sıcaklık 18- 25°C olmak üzere programlandı ve tüm Thermal cycler’a konuldu.
10. İkinci PCR ürününden Connexin Pronto Plakanın her kuyucuğuna 8’er µl dağıtıldı.
11. Kuyucukların üzerine birer damla renklendirilmiş yağ damlatıldı. İşlem sırasında damlatma şişesinin ucuyla plakaya dokunmamaya ve damlada ya da altta hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
12. Plaka Thermal cycler’a konularak 37°C’de 30 dakika, 95°C’de 10 dakika inkübe edildi.
13. Her bir kuyucuk içine renklendirilmiş yağın altına girilerek 106 µl Assay çözeltisi konuldu ve tekrar çekilerek kuyucuk içindeki ürünün çekilmesi sağlandı. Bu işlem 12 kanallı otomatik mikropipet yardımıyla eş zamanlı olarak yapıldı.
14. Çekilen ürün belirleme plakasına aktarıldı. Aktarma sırasında streptavidin kaplanmış olan plaka tabanına dokunmamaya dikkat edildi. Bu işlem 12 kanallı otomatik mikropipet yardımıyla eş zamanlı olarak yapıldı.
15. Plaka 10 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi.
16. Bu sırada 1,5 ml’lik eppendorf tüpe 11 µl HRP ve 1100 µl Assay solüsyonu konuldu. Karışım vorteksle homojen hale getirildi. Kullanılincaya kadar karanlıkta bekletildi.
17. Karanlıkta 10 dakika inkübe edilen belirleme plakası % 5’lik yıkama çözeltisi (57 ml distile su ile 3 ml 20X Yıkama solüsyonu karıştırılarak hazırlandı) ile 4 kez yıkandı.
18. Plaka fön makinesi yardımıyla kurutuldu.
19. Kuruyan belirleme plakasının her kuyucuğuna HRP + Assay çözeltisinden 100’er µl eklendi. Bu işlem 12 kanallı otomatik mikropipet yardımıyla eş zamanlı olarak yapıldı.
20. Plaka 10 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi.
21. Karanlıkta 10 dakika inkübe edilen belirleme plakası % 5’lik yıkama çözeltisi ile 4 kez yıkandı.
22. Plaka fön makinesi yardımıyla kurutuldu.

23. Kuruyan belirleme plakasının her kuyucuğuna TMB substrat çözeltisinden 100'er µl eklendi. Bu işlem 12 kanallı otomatik mikropipet yardımıyla eş zamanlı olarak yapıldı.
24. Plaka 15 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi.
25. Plakalardaki renk değişimi dikkate alınarak olguların Cx26 ve Cx30 genlerine ait mutasyonlar açısından genotipleri belirlendi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Afyonkarahisar İli'nde bulunan Karahisar İşitme Engelliler Okulunda 2005-2006 yılları arasında eğitim gören, konjenital işitme kayıplı 47 olgudan elde edilen DNA örneğinde Cx26 geni üzerindeki 35delG ve 167delT mutasyonları ile Cx30 geni üzerinde bulunan del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun varlığı incelenmiştir.

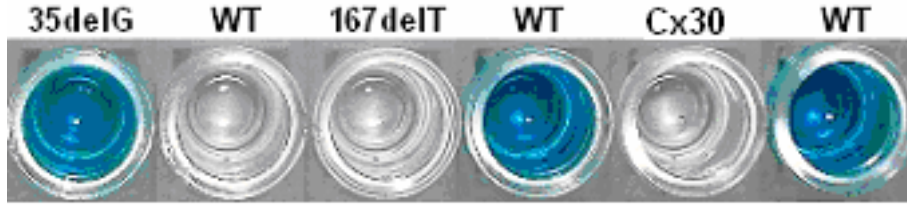
Çalışılan 35delG, 167delT ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarının saptandığı olgulara ait ELİSA test sonuçları Şekil 4.1-4.8'de verilmiştir. Her bir mutasyon mutant tip (mut) ve yabanıl tip (wt) olmak üzere iki kuyucukta analiz edildi. Mavi rengin oluşumu, kuyucukta biotinle işaretli primerlerle hibridize olan olgulara ait DNA'nın streptavidine bağlandığını ve incelenen genotip açısından rengin oluştuğu kuyucukta sonucun pozitif olduğunu gösterdi.

Olgulara ait özellikler ve mutasyonlar Çizelge 4.1'de özetlendi. Bireylerin 28 (%59,6) tanesi erkek, 19 (%40,4) tanesi kız olup yaşları 8 ile 18 arasında değişmektedir. Olguların 23'ünün (%48,9) anne ve babası arasında akrabalık bulunurken, 24'ünün (%51,1) anne ve babası arasında akrabalık bulunmadığı belirlenmiştir.

İncelenen 47 olgudan elde edilen sonuçlara göre 7 (~%14,9) olguda 35delG mutasyonu saptanmıştır. Belirlenen mutasyonların olgulara göre sıklığı Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

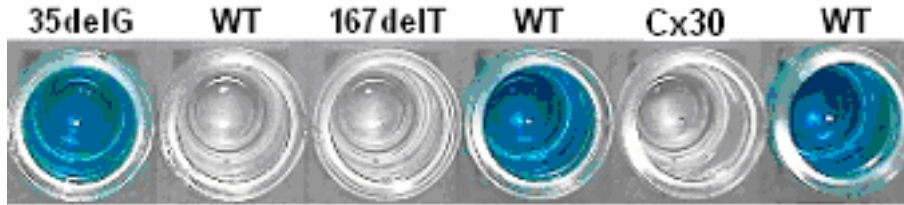
Bu mutasyonların 4 (~%8,5) tanesi homozigot ve 3 (~%6,4) tanesi heterozigot mutant olarak belirlenmiştir. Olguların homozigot, heterozigotluk durumları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

167delT ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarına ise çalışma grubumuzdaki hiçbir olguda bulunamamıştır.



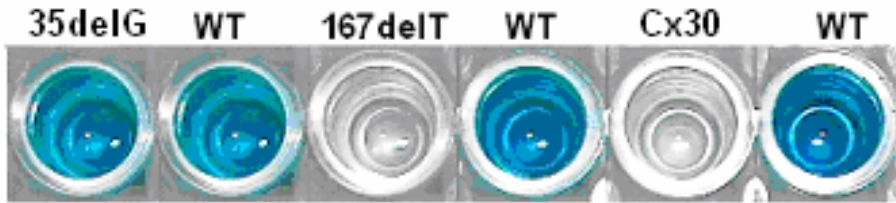
8. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.1 Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 8. olgudaki ELİSA test sonucu



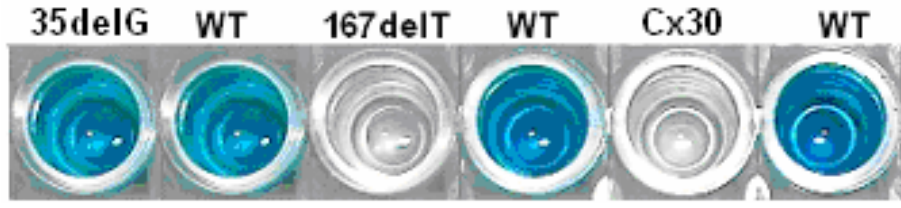
11. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.2. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 11. olgudaki ELİSA test sonucu



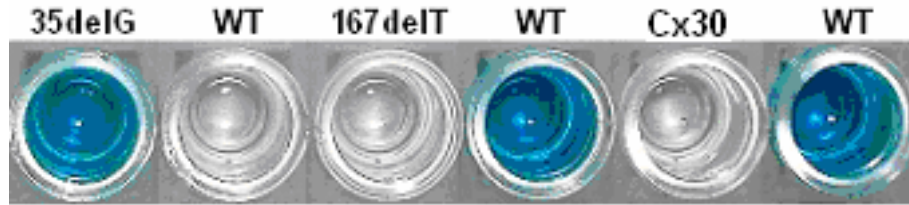
16. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.3. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 16. olgudaki ELİSA test sonucu



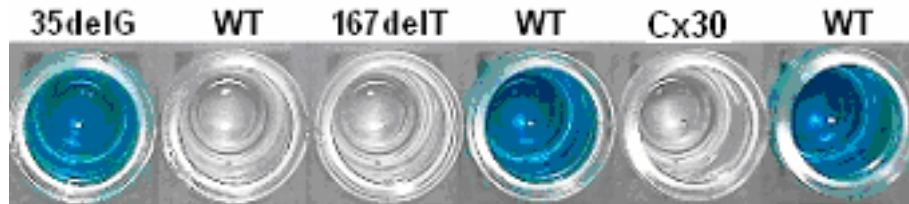
17. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.4. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 17. olgudaki ELİSA test sonucu



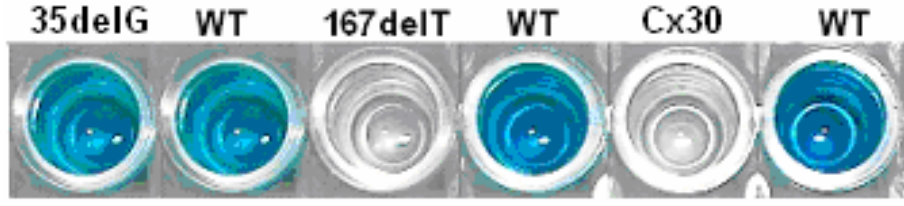
22. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.5. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 22. olgudaki ELİSA test sonucu



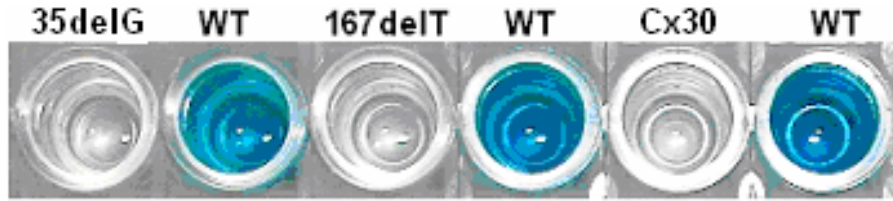
39. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.6. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 39. olgudaki ELİSA test sonucu



44. Olguda Belirlenen Mutasyon: 35delG

Şekil 4.7. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyonun 44. olgudaki ELİSA test Sonucu



Mutasyon Yok

Şekil 4.8. Cx26 ve Cx30 genine ait çalışılan 3 mutasyon için normal bir genotip yapısına sahip bir olgunun ELİSA test sonucu örneği

Çizelge 4.1. Olguların 35delG, 167delT ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarına ait genetik bulgular

Olgu No.	Yaş	Cinsiyet	Doğum Yeri	Anne-Baba Akrabalığı	Genotipleme Sonuçları
1.	9	E	İhsaniye	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
2.	13	K	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
3.	12	E	Şuhut	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
4.	14	E	Banaz	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
5.	10	K	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
6.	8	E	İscehisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
7.	10	K	Şuhut	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
8.	12	E	Uşak	Yok	35delG (homozigot)
9.	11	K	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
10.	18	E	Manisa	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
11.	11	E	Sincanlı	Var	35delG (homozigot)
12.	10	K	Şuhut	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
13.	10	K	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok

Olgu No.	Yaş	Cinsiyet	Doğum Yeri	Anne-Baba Akrabalığı	Genotiplleme Sonuçları
14.	12	K	Dinar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
15.	14	E	Konya	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
16.	10	K	Afyonkarahisar	Yok	35delG (heterozigot)
17.	11	E	Uşak	Yok	35delG (heterozigot)
18.	13	E	Sincanlı	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
19.	11	K	Şuhut	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
20.	10	K	Burdur	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
21.	14	E	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
22.	11	E	Uşak	Yok	35delG (homozigot)
23.	11	E	İhsaniye	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
24.	9	K	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
25.	12	E	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
26.	14	E	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
27.	13	E	Eskişehir	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok

Çizelge 4.1' in devamı

Olgu No.	Yaş	Cinsiyet	Doğum Yeri	Anne-Baba Akrabalığı	Genotiplleme Sonuçları
28.	8	K	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
29.	14	E	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
30.	15	E	Afyonkarahisar	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
31.	9	K	Uşak	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
32.	11	K	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
33.	15	K	Sincanlı	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
34.	17	E	Sandıklı	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
35.	14	E	Afyonkarahisar	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
36.	9	E	Şuhut	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
37.	18	E	Şuhut	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
38.	9	E	Sincanlı	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
39.	11	E	Uşak	Yok	35delG (homozigot)
40.	13	E	Isparta	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
41.	16	K	Şuhut	Var	Çalışılan mutasyonlar yok

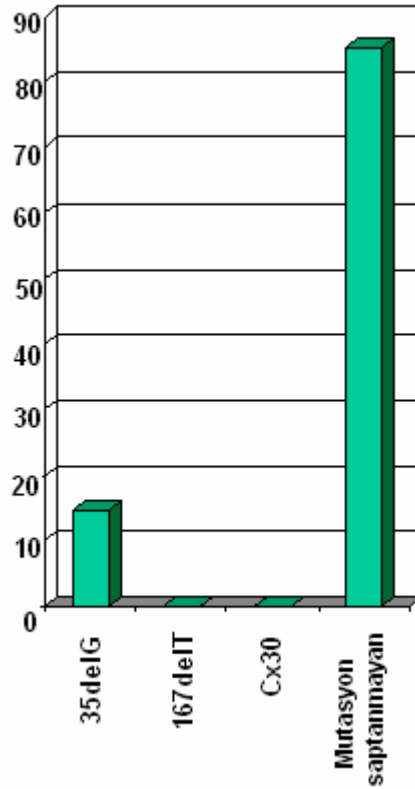
Çizelge 4.1' in devamı

Olgu No.	Yaş	Cinsiyet	Doğum Yeri	Anne-Baba Akrabalığı	Genotipleme Sonuçları
42.	11	E	Uşak	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
43.	17	K	Sincanlı	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
44.	18	E	Afyonkarahisar	Yok	35delG (heterozigot)
45.	16	K	Sultandağ	Yok	Çalışılan mutasyonlar yok
46.	12	E	Kadıköy	Var	Çalışılan mutasyonlar yok
47.	13	K	Sandıklı	Var	Çalışılan mutasyonlar yok

Çizelge 4.1' in devamı

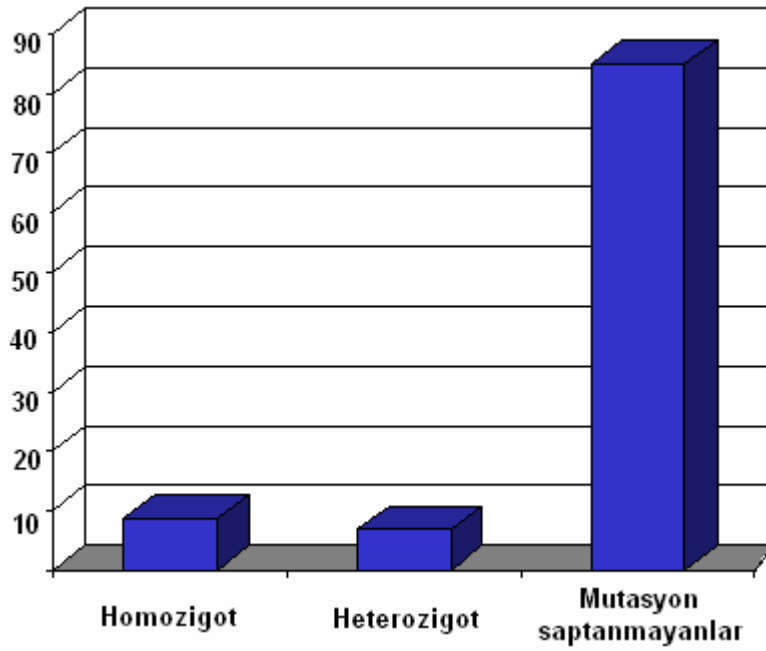
Çizelge 4.2. Belirlenen mutasyonların olgulara göre sıklığı

Mutasyonlar	Olgu Sayısı	%
35delG	7	14,7
167delT	0	0
del(GJB6-D13S1830)	0	0
Mutasyon saptanmayan	40	85,3
TOPLAM	47	100

**Şekil 4.9.** Belirlenen mutasyonların olgulara göre sıklığı (%)

Çizelge 4.3. Olguların homozigot, heterozigot durumlarına göre dağılımı (%)

Mutasyonların homozigot ve heterozigotluk durumu	Olgu Sayısı	%
Bir mutasyon açısından homozigot	4	8,5
Bir mutasyon açısından heterozigot	3	6,7
Mutasyon saptanmayan	40	84,8
TOPLAM	47	100

**Şekil 4.10.** Olguların homozigot ve heterozigot durumlarına göre dağılımı (%)

5. TARTIŞMA

Genel olarak konjenital işitme kaybının sıklığı yaklaşık 1000 canlı doğumda 1 olarak saptanmıştır (67, 68). Bu rakamın yaklaşık yarısı genetik nedenlere, diğer yarısı ise çevresel nedenlere bağlı olarak oluşmaktadır.

Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgularda konjenital işitme kaybına neden olan genlerden en önemlisi Cx26 genidir (69-71). Konjenital işitme kayıplarının %60-70'inden Cx26 mutasyonlarının sorumlu olduğu bildirilmiştir (67). Cx26 mutasyonları arasında en sık görüleni 35delG mutasyonudur (72-74).

Konjenital işitme kaybına neden olan diğer önemli bir gen ise Cx30 genidir. Cx30 geninde oluşan 342 kb'lık büyük bir delesyon olan del(GJB6-D13S1830) mutasyonu bazı toplumlarda özellikle İspanya'da yaygın olarak görülmektedir (2, 7, 17, 57).

Çalışma grubunu oluşturan olguların %48,9'unun anne ve babası arasında akraba evliliği olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1). Edinilen bilgiler doğrultusunda konjenital işitme kaybı bulunan 47 olguda Cx26 geni üzerinde oluşan iki mutasyon (35delG ve 167delT) ve Cx30 geni üzerinde oluşan 342 kb'lık büyük bir delesyon olan del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun genotipleme çalışması PCR-ELİSA tekniği kullanılarak yapıldı. Çalışma sonucunda, konjenital işitme kayıplı 47 olguda %14,9 oranında 35delG mutasyonu bulundu.

Akdeniz çevresi, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli otozomal resesif konjenital işitme kayıplı olguların yaklaşık yarısı, Cx26 genindeki bir mutasyona bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar bu gen içinde doksandan fazla mutasyon bildirilmesine rağmen, yalnızca bir mutasyon (35delG) birçok popülasyonda yaklaşık %60-70 oranında saptanmaktadır (13, 14).

Tekin ve ark.'nın (2003) işitme kayıplı olgular üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 35delG mutasyonu için Türkiye'deki bazı illerde saptanan sonuçlar %5 ile

%53 arasında değişmektedir. (Ankara'da %53, Uşak'ta %36, Denizli'de %32, Kütahya'da %30, Samsun'da %14, Çorum'da ve Tokat'ta %9, Yozgat'ta %7, Amasya'da %5). Afyonkarahisar da ise, 78 işitme kayıplı olgunun 15'inde (%19) 35delG mutasyonu bulunmuştur (75). Bizim çalışmamızda yapılan genotipleme sonucunda 47 işitme kayıplı olgunun 7'sinde (%14,9) 35delG mutasyonu saptanmıştır. Yine bu çalışmaya göre 35delG mutasyonunun Türkiye'de bölgeler arasında farklı bir dağılım sergilediği gösterilmiştir.

Kalay ve ark. (2005) Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada, 93 prelingual işitme kayıplı olgunun 20'sinde (%21,5) homozigot, 4'ünde heterozigot (%4,3) 35delG mutasyonu saptanmıştır (40). Bizim çalışma grubumuzu oluşturan 47 işitme kayıplı olgunun 4'ünde homozigot (%8,5), 3'ünde heterozigot (%6,4) 35delG mutasyonu bulunmuştur.

Aşkenazi Yahudilerinde Cx26 mutasyonlarından olan 167delT mutasyonunun % 84 oranında görüldüğü açıklanmıştır (76). Bu mutasyonun Aşkenazi Yahudilerinde ki taşıyıcılık sıklığı ise %2 ile 4 olduğu bildirilmiştir (77, 78).

Tekin ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada 167delT mutasyonu, Türk toplumundan alınan geniş bir örnek grubunda hiç bulunmazken (13), 2003 yılında yine Türk toplumunda yaptıkları diğer bir çalışmada 1 allelde (%0,3) bu mutasyon görülmüştür. Nitekim bizim çalışmamızda da bu mutasyona hiç rastlanmamıştır (74).

Otozomal resesif işitme kaybına neden olan ve birçok populasyonda Cx26 mutasyonlarından sonra en sık görülen mutasyon, Cx30 geninde oluşan del(GJB6-D13S1830) mutasyonudur (53, 79). 342 kb'lık büyük bir delesyon olan bu mutasyon özellikle İspanya'da yoğun olarak görülmektedir. İspanya dışında Fransa ve İsrail'de Cx26 mutasyonları ile birlikte heterozigot mutant olarak %16 ile 20,9 oranında görüldüğü ve sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğu açıklanmıştır (16).

İspanya’da yapılan bir çalışmada 33 işitme kayıplı olgunun 22’sinde Cx26 geni mutasyonlarıyla birlikte del(GJB6-D13S1830) mutasyonu heterozigot mutant olarak görülürken, sadece 1 olguda del(GJB6-D13S1830) mutasyonuna rastlanmıştır (16). Bizim çalışmamızda ise Cx30 geninde oluşan del(GJB6-D13S1830) mutasyonuna hiç rastlanmamıştır.

Türkiye’de Kalay ve ark. (2005) 93 prelingual işitme kayıplı olguda, Uyguner ve ark. (2003) 60 işitme kayıplı olguda ve Tekin ve ark. (2003) ise 256 işitme kayıplı olguda yaptıkları çalışmalarda, del(GJB6-D13S1830) mutasyonuna bizim çalışmamızda olduğu gibi rastlanmamıştır (40, 77, 80).

Frei ve ark. (2004) Doğu Avusturya’da ve Gazzaz ve ark. (2005) Morocco’da yaptıkları çalışmalarda del(GJB6-D13S1830) mutasyonuna bizim çalışmamızda olduğu gibi rastlanmamıştır (7, 16).

Erbe ve ark. (2004) Amerika’da işitme engelliler okulunda bulunan 68 olgu üzerinde yaptıkları çalışmada, %39,8 oranında Cx26 mutasyonları bulunmuştur. Bunların içinde 35delG mutasyonunun allel frekansını %6,3 oranında saptamışlardır. 68 olgudan 2’sinde del(GJB6-D13S1830) heterozigot mutant olarak bulunmuştur (2).

Çalışmamızda literatürde tanımlanmış mutasyonlardan bazı toplumlarda en sık görülen 3 mutasyonun genotipleme çalışması yapılmış olup, literatürlerle uyumlu olarak en sık görülen Cx26 mutasyonunun 35delG olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda diğer 2 mutasyona (167delT ve del(GJB6-D13S1830)) hiç rastlanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, konjenital işitme kaybına neden olan ve en sık görülen 3 mutasyonun (35delG, 167delT, del(GJB6-D13S1830)) genotipleme çalışması yapılmakla birlikte, Cx26 ve Cx30 genlerinin diğer bütün mutasyonları taranmamıştır. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçları bize, çalışma grubumuzdaki işitme kayıplı olgularda Cx26 genine ait diğer mutasyonların veya farklı gen mutasyonlarının bulunabileceğini düşündürmektedir. Böylece daha ileri moleküler

teknikler kullanılarak, konjenital işitme kaybı ile ilgili farklı gen mutasyonlarının taraması yapılabilir.

6. SONUÇLAR

- Afyonkarahisar İşitme Engelliler Okulunda 2005-2006 yılları arasında eğitim gören yatılı ve gündüzlü öğrenciler arasından, öğrenci dosyaları incelenerek sendromik olmayan konjenital işitme kayıplı 47 olgu belirlendi.
- Konjenital işitme kayıplı 47 olguda, Cx26 geni üzerindeki 35delG ve 167delT, Cx30 geni üzerinde ise del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarının genotipleme çalışması yapıldı. Konjenital işitme kayıplı 47 olgunun 7'sinde (%14,9) 35delG mutasyonu görülmekle birlikte analiz edilen diğer 2 mutasyona (167delT ve del(GJB6-D13S1830)) yapılan diğer çalışmalara paralel olarak çalışmamızda hiç rastlanmamıştır.
- Sonuç olarak, 35delG mutasyonu çalışma grubumuzdaki konjenital işitme kayıplı bireylerde en sık görülen mutasyon olarak belirlendi.
- Bu çalışma ile konjenital işitme kayıplı bireylerde görülen 35delG, 167delT ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarının genotipleme çalışması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Laboratuvar'ında rutin olarak yapılır duruma gelmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Mohamed Wael M. Mustafa, (2004) Prevalence of the connexin 26 mutation 35delG in non-syndromic hearing loss in Egypt. The Internet Journal Of Otorhinolaryngology, **3**, 1.
2. Erbe B. C., Harris C. K., Runge –Samuelson L. C., Flanary A. V., Wackym A. P., (2004) Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. Laryngoscope, **114**:607-611.
3. Shankar M. R., Girirajan S., Dagan O., Shankar H. M. R., Jalvi R., Rangasayee R., Avraham B. K., Anand A., (2003) Contribution of connexin 26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. J. Med. Genet. **40**.
4. Keennesson A., Braun N. V. K., Boyle C., (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A Huge review. Genet Med. **4**(4) 258-274.
5. Marziano K. N., Casalotti o. S., Portelli E. A., Bekker L. D., Forge A., (2003) Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. Hum. Mol. Genet. 805-812.
6. Akyıldız N., (2002) Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi, 2.Cilt, Ankara, Bilimsel Tıp Kitabevi.
7. Gazzaz B., Weil D., Rais L., Akhyat O., Azeddoug H., Nadifi S., (2005) Autosomal recessive and sporadic deafness in Morocco: High frequency of the 35delG GJB2 mutation and absence of the 342-kb GJB6 variant. Hearing Research, **210**, 80-84.

8. Lefebvre P. P., Van De Water T. R., (2000) Connexins hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Research Reviews* **32**, 159-162.
9. Alvarez A., Castillo del I., Pera A., Villimar M., Moreno-Pelayo M. A., Rivera T., Solanellas J., Moreno F., (1999) Uniparental disomy of chromosome 13q causing homozygosity for the 35delG mutation in the gene encoding connexin 26 (GJB2) results in prelingual hearing impairment in two unrelated Spanish patients.
10. Tekin M., Arnos S. K., Pandya A., (2001) Advances in hereditary deafness. *Lancet*; **358**: 1082-90.
11. <http://webhost.ua.ac.be/hhh>, Hereditary hearing loss homepage (2006).
12. Petit C., (2006) From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trens in Moleculer Medicine* **12**, 2.
13. Tekin M., Cin Ş., (2002) İşitme kaybının genetik özellikleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **55**, 3, 211-216.
14. Kalay E., Caylan R., Karagüzel A., (2004) Non-Sendromik işitme kayıpları genetiğindeki gelişmeler. *Otoscope*, **4**, 130-138.
15. Şimşek M., Al-Wardy N., Al-Khabory M., (2001) A polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) test to detect the common mutation (35delG) in the connexin 26. *Squ Journal For Scientific Research: Medical Sciences*, **1**, 9-12.
16. Frei K., Ramsebner R., Lucas T., Baumgartner W. D., Schoefer C., Wachtler J. F., Kirschhofer K., (2004) Screening for monogenetic del(GJB6-

D13S1830) and digenic del(GJB6-D13S1830)/GJB2 patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. *Hearing Research* **196**, 115-118.

17. Common A. E. J., Bitner-Glindzicz M., O'Toole A. E., Barnes R. M., Jenkins L., Forge A., Kelsell D. P., (2005) Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated wiht the deletion mutation del(GJB6-D13S1830). *Clinical and Experimental Dermatology*, **30**, 668-693.
18. Propst J. E., Stockley L. T., Gordon K. A., Harrison R. V., Papsin B. C., (2005) Ethnicity and mutations in GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) in a multi-cultural Canadian paediatric cohlear ımpant program. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* .
19. Bolz H., Schade G., Ehmer S., Kothe C., Hess M., Gal A., (2004) 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*, 42-46.
20. Akyıldız N., (1998) *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi*, 1.Cilt, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi.
21. Dere F., (1996) *Anatomi*, 4. Baskı, Adana, Genel Dağıtım, 417-439.
22. DüNDAR A., DEREKÖY F. S., (2003) *Kulağa Giriş*, 1. Baskı, Afyon, Afyon Kocatepe Üniversitesi.
23. Aktümsek A., (2001) *Anatomi ve Fizyoloji*, 1. Baskı, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 143-151.
24. Williems P. J., (2000) Genetic cause of hearing loss. *The New England Journal of Medicine*, **342**(15): 1101-1109.

25. Shier (eds), (1996) Hole's Human Anatomy and Physiology, 7th edition, Higher Education Group.
26. http://medizin.fu-berlin.de/.../ear2_anatomy_d.htm (2006).
27. Karasalihoğlu A. (ed), (2003) KBB Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi, 3.Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi.
28. Kaleli Ç., (2002) KBB'nin Sırları, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
29. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, (1999) Tıbbi Fizyoloji, 19. Baskı, Ankara, Barış Kitabevi, 181-195.
30. Holt J. R., Corey D. P., (1999) Ion channel defects in hereditary hearing loss. *Neuron*, **22**, 217-219.
31. Friedman T., Battey J., Kachar B., Riazuddin S., Noben-Trauth K., Griffith A., Wilcox E., (2000) Modifier genes of hereditary hearing loss. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**: 487-493.
32. Steel K. P., Kros C. J., (2001) A genetic approach to understanding auditory function. *Nature genetics*, **27**, 143-149.
33. Dereköy F. S., (2000) Etiology of deafness in Afyon school for the deaf in Turkey. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, **55**, 125-131.
34. Mason J. A., Herrmann K. R., (1998) Universal infant hearing screening by automated auditory brainstem response measurement. *Pediatrics*, **101**, 221-228.

35. Grundfast K. M., Atwood J. L., Ghuong D., (1999) Genetic and Molecular Biology of Deafness. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **32**, 6, 1067-1087.
36. Özkarakaş H., Aydın Ö., Akdeniz Ö., Kansu L., (1997) Otozomal dominant sensorinöral işitme kaybı. 24. Ulusal Otorinolarenoloji Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, Cilt 2, 773-775.
37. Rehm H. L., Williamson R. E., Kenna M. A., Corey D. P., Korf B. R., (2001) Understanding the genetics of deafness. Harvard medical school center for hereditary deafness, 1-15.
<http://hearing.harvard.edu>
38. Mukherjee M., Phadke S. R., Mittal B., (2003) Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Indian Journal of Genetics*, 40-50.
39. Hone S. W., Smith R. J. H., (2002) Medical evaluation of pediatric hearing loss, laboratory, radiographic and genetic testing. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **35**, 751-764.
40. Kalay E., Çaylan R., Kremer H., Brouwer A. P. M., Karagüzel A., (2005) GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hearing Research*, **203**, 88-93.
41. Nance W. E., Kearsy M. J., (2004) Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution. *Am. J. Hum. Genet.* **74**: 1081-1087.
42. Güneş H. V., (2003) Moleküler Hücre Biyolojisi. Kaan Kitabevi, 1.Baskı, 129-130.
43. Leshinsky-Silver E., Berman Z., Vinkler C., Yannov-Sharav M., Lev D., (2005) A novel mutations missense mutation in the connexin 26 gene

associated with autosomal recessive sensorineural deafness. *Hearing Research* **202**, 258-261.

44. Melchionda S., Bicego M., Marciano E., Franze A., Morgutti M., Bartone G., Zelante L., Carella M., Andrea P., (2005) Functional characterization of novel Cx26 (T55N) mutation associated ton on-syndromic hearing loss. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **337**, 799-805.
45. www.mun.ca/.../BIOL2060/BIOL2060-17/cb17.html (2006)
46. Stains J. P., Civitelli R., (2005) Gap junctions in skeletal development and function. *Biochimica et Biophysica Acta*.
47. Andrea D. P., Veronesi V., Bicego M., Melchionda S., Zelante L., Iorio D. E., Bruzzone R., Gasparini P., (2002) Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **296**, 685-691.
48. Bruzzone R., Veronesi V., Gomes D., Bicego M., Duval N., Marlin S., Petit C., D' Andrea P., White T. W., (2003) Loss-of-function and residual channel activity of connexin 26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Letters* **533**, 79-88.
49. Krutovskikh V., Yamasaki H., (2000) Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutation Research*, **462**, 197-207.
50. Common J. E. A., Di W-L., Davies D., Kelsell D. P., (2005) Futher evidence for heterozygote advantage of GJB2 deafness mutations: a link with cell survival. *J. Med. Genet.* **41**; 573-575.
51. Hamelmann C., Amedofu G. K., Albrecht K., Muntau B., Gelhaus A., Brobby W. G., Horstmann R. D., (2001) Pattern of connexin 26 (GJB2)

mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Mutation in Brief*, **428**.

52. <http://herkules.oulu.fi/.../htm/i1002636.html> (2006).

53. Mahasneh A. A., Al-Asseer M. H., (2005) Screening of GJB6 gene for the 342-kb deletion in patients from Jordan with non-syndromic hearing loss. *Int. J. Hum. Genet.*, **5**(4): 253-257.

54. <http://life2.tau.ac.il/GeneDis> (2006).

55. Balci B., Genceker F. O., Aksoy S., Sennaroğlu G., Kalay E., Sennaroğlu L., Dinçer P., (2005) Identification of an ancestral haplotype of the 35delG mutation in the GJB2 (connexin 26) gene responsible for autosomal recessive non-syndromic hearing loss in families from the Eastern Black Sea Region in Turkey. *Turk J. Pediatr.*, **47**(3): 213-221.

56. Gershoni-Baruch R., Mandelman M., Navot N., Cohen D., Eran A., (2004) A novel genetic screening test for hereditary hearing loss. *Hum. Genet.*

57. Söhl G., Odermatt B., Maxeiner S., Degen J., Willecke K., (2004) New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Research Reviews* **47**, 245-259.

58. Rabionet R., Lopez-Bigas N., Arbones M. L., Estivill X., (2002) Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *TRENDS in Molecular Medicine*, **8**(5): 205-212.

59. Castillo F. J., Rodriguez-Ballesteros M., Alvarez A., Hutchin T., et al., (2005) A novel deletion involving the connexin 30 gene, del(GJB6-D13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects

with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J. Med. Genet*, **42**: 588-594.

- 60.** Sugata A., Fukushima K., Sugata K., Fukuda S., Kimura N., Gündüz M., Ksai N., Usami S., Smith R. J. H., Nishizaki K., (2002) High- throughput screening for GJB2 mutations- its clinical application to genetic testing in prelingual deafness screening for GJB2 mutations. *Auris, Nasus, Larynx* **29**, 231-239.
- 61.** Riga M., Psarommatis I., Lyra Ch., Douniadakis D., Tsakanikos M., Neou P., Apostolopoulos N., (2005) Etiological diagnosis of bilateral, sensorineural hearing impairment in a pediatric Greek population. *International Pediatric Otorhinolaryngology* **69**, 449-455.
- 62.** Uyguner O., Ulubil- Emiroğlu M., Hafız G., Ghanbari A., Başerer N., Yüksel-Apak M., Wolnik B., (2002) Cx26 geninde 35delG mutasyon analizinin non-sendromik kalıtsal sağırılıkta tanı testi olarak kullanılması. *İst. Tıp. Fak. Mecmuası* **65**: 2.
- 63.** Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., Osipova L., Claustres M., Roux A-F., (2005) First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Medical Genetics* **6**: 12.
- 64.** Riazalhosseini Y., Nishimura C., Kahrizi K., Shafeghati Y., Daneshi A., Jogataie M. T., Mohseni M., Mahdieh N., Javan K. M., Smith R. J. H., Najmabadi H., (2005) Delta (GJB6-D13S1830) is not a common cause of nonsyndromic hearing loss in the Iranian population. *Arch Iranian Med*, **8**(2), 104-108.

65. Medica I., Rudolf G., Balaban M., Peterlin B., (2005) C.35delG/GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations in Croats with prelingual non-syndromic hearing impairment. *BMC Ear, Nose and Throat Disorders*, **5**:11.
66. Temizkan G., Arda N. (eds), (2004) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 67-68.
67. Frei K., Szuhai K., Lucas T., Weipoltshammer K., Schofer C., Rabsebner R., Baumgartner W., Raap A. K., Bittner R., Wachtler F. J., Kirschhofer K., (2002) Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *European Journal of Human Genetics* **10**, 427-432.
68. Apaydın F., Pfister M., Vitale E., Leal S., İber M., Kandoğan T., Bilgen V., Zenner H. P., (1997) Nonsendromik resesif işitme kaybına DFNB9 lokusu saptanması. 24. Ulusal Otorinolarenoloji Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, Cilt 2, 75-77.
69. Bayazıt Y. A., Cable B. B., Çataloluk O. O., Kara C., Chamberlin P., Smith R. J., Kanlikama M., Ozer E., Çakmak E. A., Mumbuc S., Arslan A., (2003) GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **67**(12): 1331-1335.
70. Barış I., Köksal V., Etlik O., (2004) A combined allele-specific PCR and RFLP assay to detect the 35delG mutation in the Connexin 26 gene. *Genet Test.*, **8**(4): 384-386.
71. Barış I., Köksal V., (2003) Multiplex detection of common mutations in the Connexin-26 gene. *Genet Test.*, **7**(1): 63-65.
72. Mercier G., Bathelier C., Lucotte G., (2005) Connexin 26 mutation 35delG: Prevalence of carriers varies in various regions in France. *International Journal of Pediatric Otolaryngology*.

73. Barış I., Kiliç M. O., Tolun A., (2001) Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clinic Genetic*, **60**(6): 452-455.
74. Aksoy S., Dinçer P., Sennaroğlu L., (1999) Nonsendromik işitme kayıplarında odyolojik ve impedansmetrik bulgular. 25. Ulusal Türk Otorinolarenkoloji ve Baş ve Boyun Cerrahisi Kongresi, İzmir, Cilt 2, 669-672.
75. Tekin M., Duman T., Boğoçoğlu G., Incesulu A., Çomak E., İlhan İ., Akar N., (2003) Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Human Mutation*. **608**:1-7.
76. Snoeckx R. L., Huygen P. L. M., Feldman D., Marlin S., et al (2005) GJB2 mutations and degree of hearing loss: A multicenter study. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 945-957.
77. Dong J., Katz D. R., Eng C. M., Kornreich R., Desnick R. J., (2001) Nonradioactive detection of the common connexin 26 167delT and 35delG mutations and frequencies among Ashkenazi Jews. *Molecular Genetics and Metabolism*, **73**, 160-163.
78. Lerer I., Sagi M., Ben-Neriah Z., Wang T., Levi H., Abeliovich D., (2001) A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Mutation in Brief*, **458**.
79. Taitelbaum-Swead R., Brownstein Z., Muchnik C., Kishon-Rabin L., Kronenberg J., Megirov L., Frydman M., Hildesheimer M., Avraham K. B., (2006) Connexin-Associated Deafness and Speech Perception Outcome of Cochlear Implantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, **132**, 495-500.

- 80.** Uyguner O., Emiroğlu M., Uzumcu A., Hafız G., Ghanbari A., Basarer N., Yüksel-Apak M., Wollnik B., (2003) Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.*, **64**(1): 65-69.