

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

NON-SENDROMİK
NÖROSENSÖRİYAL TİP İŞİTME KAYBI OLAN
HASTALARDA GJB2, GJB3 VE GJB6 GENLERİNİN
MLPA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Dr.Güney BADEMCİ

Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2008

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

NON-SENDROMİK
NÖROSENSÖRİYAL TIP İŞİTME KAYBI OLAN
HASTALARDA GJB2, GJB3 VE GJB6 GENLERİNİN
MLPA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Dr.Güney BADEMCİ

Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Doç.Dr.M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU

ESKİŞEHİR
2008

T.C.
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Güney BADEMCİ' ye ait "Non – Sendromik Nörosensöriyal Tıp İşitme Kaybı Olan Hastalarda *GJB2*, *GJB3* ve *GJB6* Genlerinin *MLPA* Yöntemi ile İncelenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih : 28.08.2008

Jüri Başkanı Prof.Dr. Sevilhan ARTAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

İmza

Üye: Doç.Dr.Mustafa TEKİN
Ankara Üniv. Tıp Fak. Pediatrik Moleküler
Genetik Bilim Dalı

İmza

Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun
..../..../..... Tarih ve/..... Sayılı Kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Özkan ALATAŞ

Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Sevilhan ARTAN'a, Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK'a, Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e, Anabilim Dalımızda birlikte çalıştığım meslektaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma; ayrıca tezimde olgularımın temininde bana yardım eden Anadolu Üniversitesi İşitme Engelli Çocuklar Eğitim ve Araştırma Merkezinde öğretim görevlisi olan Yrd.Doç.Dr. Zerrin TURAN'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Bademci, G. Non-sendromik nörosensöriyal tip işitme kaybı olan hastalarda GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerinin MLPA yöntemi ile incelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2008. İşitme kaybı önemli algılama bozukluklarından biridir. Konjenital işitme kaybı yaklaşık her 1000 çocukta 1 görülür ve bunun yaklaşık yarısının genetik etyolojisi mevcuttur. GJB2 geni işitme kaybının genetik temelinde etkin olan en önemli genlerden biridir. MLPA yöntemi delesyon, amplifikasyon ve nokta mutasyonları tek reaksiyonla inceleyebilen bir yöntemdir. Salsa MLPA P163 B1 prob kiti kullanılarak GJB2, GJB3 ve GJB6 genleri incelenmiştir. Çalışmamızda orta, ileri ve çok ileri düzey non-sendromik nörosensöriyal tip işitme kaybı olan 90 olgu MLPA yöntemi ile incelenmiştir. GJB2 genindeki 35delG mutasyonu 90 olgunun 22 (%24.4) sinde homozigot, 6 sında (%6.6) heterozigot olarak saptanmıştır. GJB3 ve GJB6 genlerinde mutasyon saptanmamıştır. GJB2 geni için saptamış olduğumuz mutasyon oranları literatür ile uyumlu bulunmuştur. İşitme kaybının ailesel olması ve işitme kaybının düzeyinin ileri derece olması 35delG mutasyon görülme oranını arttıran etmenler olmuştur. Çalışmamızda MLPA yöntemi non-sendromik nörosensöriyal tip işitme kaybı olan bireylerde başarı ile uygulanmıştır. Populasyonumuzda sık görülen mutasyonların da MLPA prob dizaynı yapılarak yöntemin uygulanması ile daha iyi sonuçlar elde edilebilecektir.

Anahtar kelimeler: İşitme kaybı, Konneksin, MLPA

Destekleyen kurum: TÜBİTAK

Proje numarası: 107S129

ABSTRACT

Bademci G. Studying GJB2, GJB3 and GJB6 genes in patients with non-syndromic neurosensorial type hearing loss by MLPA technique. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical genetics, Eskişehir,2008. Hearing loss is an important problem about sensation. Congenital hearing loss is observed in 1 of 1000 children and half of this has a genetic etiology. GJB2 gene is one of the most important genes taking part in genetic basis of hearing loss. MLPA technique has the power to analyze deletions, amplifications and point mutations in a single assay. GJB2, GJB3 and GJB6 genes were analyzed using Salsa MLPA P163 B1 probe set. In our study, 90 cases with moderate, severe and profound level non-syndromic neurosensorial type hearing loss were examined with MLPA technique. 35delG mutation in GJB2 gene was observed in 22 of 90 (24.4%) cases as homozygous and 6 of 90 (6.6%) as heterozygous. Mutation was not observed in GJB3 and GJB6. Mutation frequency of GJB2 in our study is comparable with the literature. Familial hearing loss and advanced hearing loss are the factors that increasing the frequency of 35delG mutation. In our study, MLPA technique was applied to non-syndromic neurosensorial type hearing loss cases successfully. Better results may be obtained by applying the technique with designing MLPA probes for frequent mutations in our population.

Key words: Hearing loss, Connexin, MLPA

Supported by: The scientific and Technological Research Council of TURKEY

Project number: 107S129

İÇİNDEKİLER	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 İşitme Duyusu ve Ses	2
2.2 Kulağın Yapısı	2
2.2.1 Dış Kulak	2
2.2.2 Orta Kulak	3
2.2.3 İç Kulak	4
2.3 İşitme Fizyolojisi	5
2.4 İşitme Kaybı ve Sınıflaması	6
2.4.1 Sendromik İşitme Kaybı	8
2.4.2 Non-Sendromik İşitme Kaybı	11
2.5 MLPA Yöntemi	20
2.5.1. Salsa MLPA P163 B1 (lot:0208) Prob Kitinin Özellikleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3. 1. GEREÇLER	25
3. 1. 1. Kullanılan Gereçler	25
3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	25
3. 2. YÖNTEMLER	26
3. 2.1. Materyal Seçimi	26
3.2.2 QIAamp DNA Mini Kiti Kullanarak DNA İzolasyonu	26
3.2.3. MagNa Pure Ekstraksiyon Robotu İle DNA İzolasyonu	27
3.2.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	28

4. BULGULAR	32
4. 1. Çalışmamıza Katılmış Olan Olguların Özellikleri	32
4.2. Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları	33
4.2.1 DNA Ekstraksiyonu	33
4.2.2 MLPA Analizi	34
5. TARTIŞMA	45
5.1 Manuel ve Robotik DNA Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen DNA Örneklerinin MLPA Analizinin Karşılaştırılması	45
5.2 GJB2, GJB3 ve GJB6 Genlerindeki Mutasyonların Literatür ile Tartışılması	45
5.2.1 35delG Mutasyonlarının Literatür ile Tartışılması	46
5.2.2 GJB2(IVS1+1 G>A, 313del14 mutasyonları), GJB3 ve GJB6 Genlerindeki Mutasyonların Literatür ile Tartışılması.	49
5.3 MLPA Yönteminin NSSNİK Olan Bireylerde Kullanılabilirliği, Avantaj ve Dezavantajları	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
CMV	Sitomegalovirüs
dB	Desibel
DFN	X'e bağılı İşitme Kaybı Lokusu
DFNA	Otozomal Dominant İşitme Kaybı Lokusu
DFNB	Otozomal Resesif İşitme Kaybı Lokusu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Hz	Hertz
kD	Kilo Dalton
kb	Kilo Baz
μ l	Mikrolitre
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Prop Amplification
ng	Nanogram
NSSNİK	Non-sendromik Sensörinöral İşitme Kaybı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPATD	Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri
TPAD	Test Piki Alan Değeri
WS	Waardenburg Sendromu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kulağın anatomisi	3
Şekil 2.2 Korti organının yapısı	4
Şekil 2.3 Konneksinlerin yapısı	13
Şekil 2.4 GJB2 ve GJB3 genlerinin iç kulakta ifade edildiği bölgeler	16
Şekil 2.5 MLPA Reaksiyonunun işleyişi	22
Şekil 4.1 Manuel ekstraksiyon ile elde edilen DNA nın jel görüntüsü	33
Şekil 4.2 Robotik sistem ile elde edilen DNA nın jel görüntüsü	34
Şekil 4.3 Örnek analiz görüntüsü	35
Şekil 4.4 Normal bir olguya ait pik görüntüleri	36
Şekil 4.5 35delG heterozigot mutasyonun pik görüntüsü	38
Şekil 4.6 35delG homozigot mutasyonun pik görüntüsü	40

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2.1 Otozomal resesif NSSNİK na neden olan genler	11
Tablo 2.2 Genlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması	12
Tablo 2.3 Salsa MLPA P163 B1 prob kitinin özellikleri	24
Tablo 4.1 Olguların işitme kaybı düzeyine göre sınıflandırılması	32
Tablo 4.2 Ailesel otozomal resesif NSSNİK olan bireylerin oranı	33
Tablo 4.3 Normal bir olguya ait doz oranı analiz görüntüsü	37
Tablo 4.4 35delG heterozigot mutasyonu olan bir olgunun analiz görüntüsü	39
Tablo 4.5 35delG homozigot mutasyonu olan bir olgunun analiz görüntüsü	41
Tablo 4.6 Mutasyon saptanan genler, olgu sayısı ve oranları	42
Tablo 4.7 Normal kontrol ile karşılaştırmalı MLPA analizi	43
Tablo 4.7 35delG heterozigot kontrol kullanıldığında karşılaştırmalı MLPA analizi	44

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Yaklaşık her 1000 çocuktan 1 tanesi konjenital işitme kaybı ile doğar ve bunların yarısı genetik faktörler nedeni ile olmaktadır.

Herhangi bir sendromun eşlik etmediği nörosensöriyal (sensörinöral, sinirsel) tip işitme kaybında etyoloji olguların büyük kısmında genetik temellidir. İşitme kaybına neden olan bir çok gen tanımlanmıştır. Bazı genler ve gen gruplarında meydana gelen mutasyonlar diğerlerine göre çok daha fazla görülmektedir. Konneksin genlerinden özellikle konneksin 26 (GJB2) ve daha az sıklıkla konneksin 30 (GJB6) ve 31 (GJB3) genlerindeki mutasyonlar sendromik olmayan sinirsel tip işitme kaybında önemli bir yere sahiptir. Konneksin 26 gen mutasyonları tek başına otozomal resesif non-sendromik sensörinöral işitme kayıplı (NSSNİK) hastaların %50 sinden sorumludur (11).

Konneksin 26 geninde bulunan 35delG mutasyonu konneksin 26 da görülen mutasyonların yaklaşık %70 ini oluşturmaktadır. 35delG Avrupa, Akdeniz ülkelerinde ve ülkemizde sık görülen bir mutasyondur. 35delG mutasyonun yüksek oranda görülmesi hem etkilenmiş bireylere hem de genetik danışma açısından ebeveynlere (taşıyıcılık açısından) analiz yapılması endikasyonunu doğurmaktadır (11,34).

Çalışmamızda hızlı, pratik ve ucuz bir yöntem olan MLPA yöntemi ile NSSNİK bireylerde GJB2, GJB3 ve GJB6 genleri incelenmiştir. Yöntemin bu hastalık grubunda mutasyonların saptamasındaki kullanılabilirliği avantaj ve dezavantajlarının ortaya konması ve mutasyon tiplerinin sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İşitme Duyusu ve Ses

İnsanlar duyuları aracılığı ile dış dünyayı algılayarak zihinsel, duygusal ve sosyal gelişiminin devamını sağlar. Duyulardan birinin eksikliği algılamanın bütünlüğünü bozarak kişinin yaşamını etkiler. İşitme duyusu kişinin konuşmayı öğrenip iletişim kurabilmesi için önemlidir. İşitmenin meydana gelebilmesi için bir ses kaynağı, ses dalgalarını ileten bir ortam ve bunları algılayan reseptör organ kulak gereklidir.

Ses bir enerji kaynağından yayılan titreşimlerin etkisi sonucu gaz, sıvı ve katı ortamlarda moleküllerin sıkışıp gevşemesi ile ortaya çıkan enerjidir. Moleküllerin bir defa sıkışıp gevşeme hareketi içinde kalan mesafe sesin dalga boyunu belirler. Bir saniyedeki titreşim sayısı o sesin frekansını ifade eder. Sesin frekansı Hertz (HZ) olarak gösterilmektedir. Normal bir insan kulağı her titreşim enerjisini ses olarak algılayamamakla beraber ancak 20-20.000 Hz arası sesleri işitebilir. Ses dalgalarının amplitüdü ise sesin şiddetini oluşturur. Sesin şiddet birimi desibel (dB) olarak gösterilir. Normal bir insan kulağı 0-120 dB arasındaki şiddetteki sesleri duyabilir (34).

Örnek seslerin şiddetleri :

Fısıltı sesi 20-25 dB

Konuşma sesi 50-70 dB

Yüksek sesle bağırma 70-85 dB

Trafik gürültüsü 90-100 dB

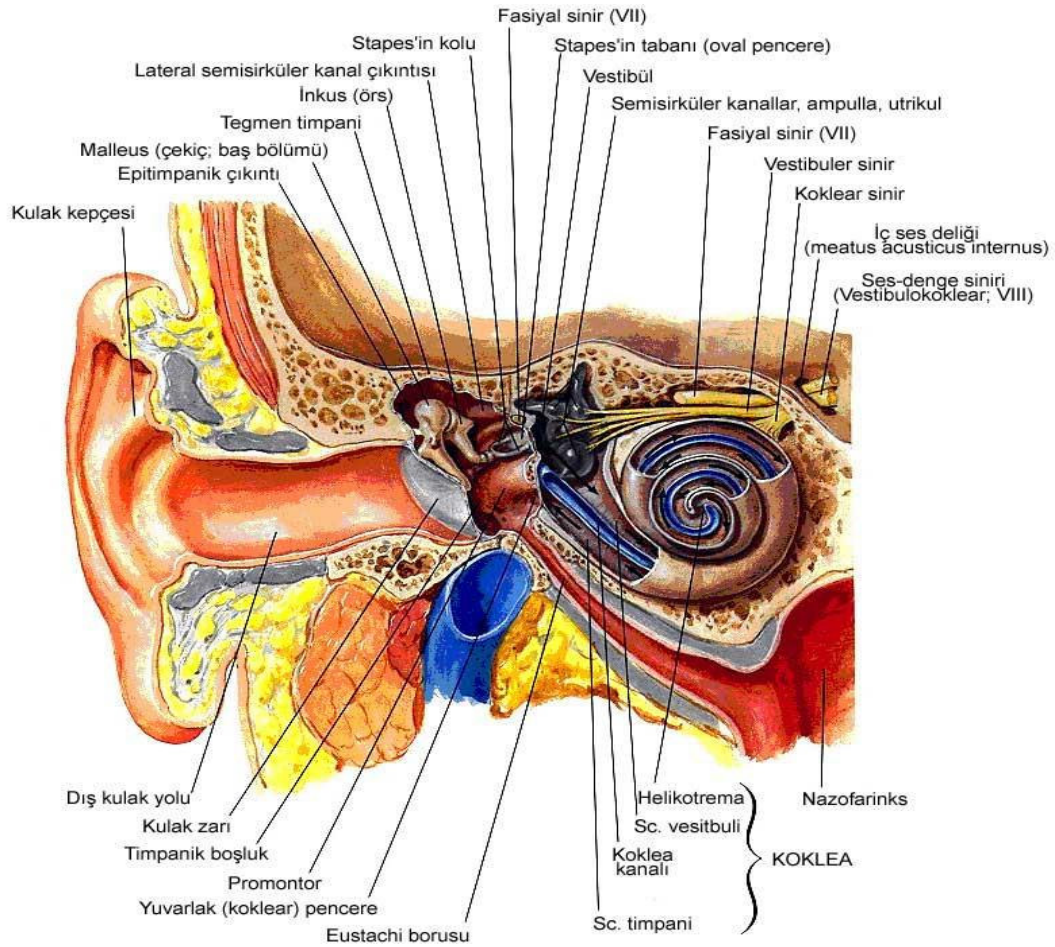
Jet motoru sesi 120-150 dB (34).

2.2 Kulağın Yapısı

İşitme ve dengenin periferik organı olan kulak, temporal kemik içine yerleşmiş, görevleri ve yapıları birbirinden farklı üç yapıdan oluşur.

2.2.1 Dış Kulak; Dış kulak, kulağın kulak zarı dışında kalan kısmıdır ve kulak kepçesi (auricula) ile dış kulak yolundan oluşmaktadır (Şekil 2.1).

2.2.2 Orta Kulak; Kulak zarı ve birbirine eklemlenmiş 3 tane kemikçikten oluşan hava dolu bir boşluktur. Bu 3 kemik dıştan içe doğru sırasıyla malleus (çekiç), inkus (örs) ve stapes (üzengi)'dir. Kulak zarı gergin bir yapıdadır. Kulak zarı çekiç kemiği ile bağlantılı olduğundan, zarı titreştiren ses dalgaları aynı zamanda çekiç kemiğini de titreştirir ve çekicinin hareketi diğer iki kemiği (örs ve üzengi) de hareket ettirir. Üzengi tabanının iç kulaktaki oval pencereyle bağlantılı olması sayesinde, bu titreşimler iç kulağa iletilir (21,34,65,75,77).



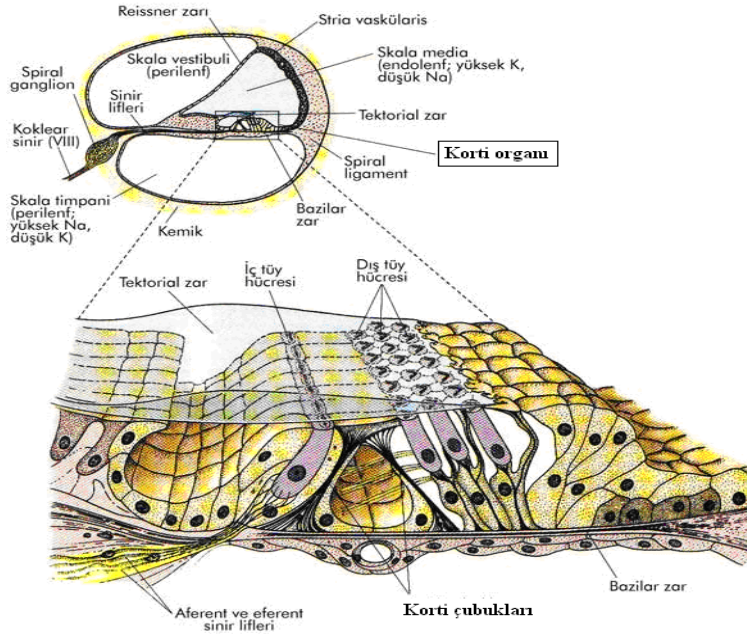
Şekil 2.1: Kulağın anatomisi*

*Ses Dalgalarının özellikleri ve sesin algılanması.

<http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/index.htm> 27/07/2008 (71)'den

değiştirilerek alınmıştır.

2.2.3 İç Kulak. İç kulak, denge ile ilişkili olan ‘vestibüler sistem’ ve işitme merkezi olan ‘koklear sistem’i içermektedir. Koklea giderek azalan çapı ile kendi üzerine yaklaşık üç defa kıvrılıp kör olarak sonlanan bir sarmal kemik sistemidir. İçerisinde içi sıvı dolu üç tane tüp bulunur (Şekil 2.2). Kokleadan enine kesit alındığında bu tüpler yukardan aşağıya doğru “skala vestibüli” (vestibüler boşluk), “skala media” ve “skala timpani” şeklinde sıralanırlar (9,21,65,77). Skala media, stria vaskülaris denen özel damar ağının aktivitesine bağlı olarak sentezlenip salgılanan, potasyum miktarı oldukça yüksek bir sıvıyla (“endolenf” sıvısı ile) doludur. Skala media ile skala vestibuli’yi ‘Reissner zarı’ ayırır. Skala timpani ile skala media’yı ise “baziler zar” ayırır. Skala timpani ve skala vestibüli, perilenf sıvısı ile doludur. Endolenf ve perilenf sıvıları birbirlerine karışmaz. Korti organı işitme fonksiyonunda görev alan en önemli yapıdır. Baziller zarın yüzeyinde bulunur ve bir seri tüy hücreleri adı verilen elektromekanik duyarlı hücre içermektedir. Tüy hücreleri alıcı son organlar olup ses titreşimlerine yanıt olarak sinir uyarıları üretirler (9,21,34,65).



Şekil 2.2: Korti organının yapısı.*

*Ses Dalgalarının özellikleri ve sesin algılanması.

<http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/index.htm> 27/07/2008 (71)'den

değiştirilerek alınmıştır.

2.3 İşitme Fizyolojisi:

Dış ortamdan gelen ses dalgalarının karşılaştığı ilk organ kulak kepçesidir. Kulak kepçesi sesleri toplayıp dış kulak yoluna iletir. Yetişkinlerde ortalama boyu 2.7 cm olan dış kulak yolu ses dalgalarını kulak zarına amplifiye ederek iletim görevini gerçekleştirir.

Kulak zarı ve orta kulakta bulunan kemikçiklerin en önemli görevi sesin hava ortamından sıvı ortama geçişi ve iç kulak sıvılarının akustik direncinden oluşan enerji kaybını karşılamaktır.

Malleus ve inkus arasındaki kaldıraç şeklindeki eklemin özelliği ile malleus kolundaki işitsel enerjinin inkus koluna 1.3 kat daha fazla aktarılmasına olanak tanır. Buna ek olarak kulak zarının yüzey alanı yaklaşık 55 milimetre kare iken stapesin alanı ortalama 3.2 milimetre karedir. Bu 17 farklı kat ile kaldıraç sisteminin 1.3 katlık oranının çarpımı koklea sıvısı üzerine uygulanan basıncın kulak zarı üzerine ses dalgasının uyguladığı basınçtan 22 kat daha büyük olmasını sağlamaktadır.

Orta kulakta bulunan tensor timpani ve stapedius kasları kokleanın aşırı yüksek seslerin neden olacağı harap edici titreşimlerden korunması ve gürültülü ortamlarda düşük frekanslı seslerin maskelenmesine olanak tanımaktadır. Tensor timpani ve stapedius kaslarının bir diğer işlevi kişinin kendi konuşma sesine olan duyma duyarlılığını azaltmaktır.

Stapesin ayağı oval pencereye karşı içeri doğru hareket ettiğinde kokleanın kemik duvarlar tarafından çepeçevre sarılı olmasından ötürü yuvarlak pencere dışa doğru çıkıntı yapar. Baziller liflerde oval pencereye doğru bükülürken oluşan esnek gerim baziller zar üzerinde ilerleyen (yürüyen) bir dalga başlatır.

Korti organında bulunan tüy hücrelerinin oluşan dalga ile titreşimi sonucu tüy hücreleri depolarize ve hiperpolarize olmaktadır. Oluşan hücre reseptör potansiyeli tüy hücrelerinin tabanları ile sinaps yapan koklear sinir uçlarını uyararak işitme duyusunun algılanmasını sağlar (9,21,34).

2.4 İşitme Kaybı ve Sınıflaması

İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde sorunlara neden olan en yaygın algılama bozukluklarından biridir. İşitme kaybının sıklığı 1000 canlı doğumda bir olarak saptanmıştır. Bu rakamın yaklaşık yarısı genetik nedenlere ve diğer yarısı çevresel nedenlere bağlıdır (24). Temelinde kolayca saptanabilecek genetik nedenler olmayan olgular için erken doğum, farmakolojik ototoksisite, doğum öncesi geçirilmiş kızamıkçık veya sitomegalovirus gibi infeksiyonlar veya doğum sonrası sepsis ya da menenjit geçirilmesi işitme kaybı nedenleri olarak sayılabilir (81).

İşitme kaybı, genetik veya genetik olmayan, ileti tipi, nörosensöriyal(sinirsel, sensorinöral) tip veya miks tip ve sendromik veya non-sendromik(sendromik olmayan) olmak üzere etyolojisine, fenotipine, başlama yaşına veya şiddetine göre sınıflandırılabilir (50).

İşitme kayıplarının sınıflaması

Odyolojik fenotipine göre

Tip

Sinirsel tip

İleti tip

Miks tip

Progresyon

İlerleyici

İlerleyici olmayan

Düzensiz değişim gösteren

Frekans

Düşük (<500 Hz)

Orta (501–2000 Hz)

Yüksek (>2000 Hz)

Şiddet

Hafif işitme kaybı (21–40 dB)

Orta derece işitme kaybı (41–60 dB)

Orta şiddetli derece işitme kaybı (61–80 dB)

Şiddetli işitme kaybı (81–100 dB)

Derin işitme kaybı (>100 dB)

Başlangıç

Konjenital (prelingual)

Erken başlangıçlı (çocukluk dönemi)

Geç başlangıçlı (erişkin dönemi)

Eşlik eden vestibüler bulgu

Mevcut

Mevcut değil

Nedene göre*

Genetik (50–60%)

Fenotip

Sendromik (30–40%)

Non-sendromik (60–70%)

Kalıtım kalıbı

Otozomal resesif (70–80%)

Otozomal dominant (10–20%)

X kromozomal (1–2%)

Mitokondriyal (0–20%)**

Multigenik**Kromozomal anomali****Genetik olmayan (40–50%)**

Teratolojik ajan (CMV, rubella, v.b)

Prematürite

Postnatal infeksiyon (menenjit,otitis media, v.b)

Ototoksik ilaç alımı

Akustik veya kranial travma

*Yüzdeler konjenital veya erken başlangıçlı işitme kaybı içindir (50).

**Mitokondriyal mutasyon frekansı etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir (79).

İşitme kaybı sinirsel, ileti tipi ve miks tip olarak 3 tipe ayrılır. İşitme kaybının nedeni koklea veya işitme sinirindeki bir bozukluğa bağlı geliyorsa bu duruma sinirsel tip işitme kaybı denir. Dış kulak yolu, kulak zarı ve kemikçik sistemindeki bir bozukluğa bağlı gelişen işitme kaybına ise ileti tipi işitme kaybı adı verilmektedir (21).

Genetik etyolojisi belirlenmiş olgular sendromik ve sendromik olmayan olarak ikiye ayrılmaktadır. İşitme kaybına başka hiçbir patolojik organ veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği duruma non-sendromik işitme kaybı denilmektedir. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70' i bu gruba girmektedir. Bunun dışında kalan %30'luk grupta işitme kaybı dışında bulgular olmakta ve bu bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde bir sendrom tanısı konabilmektedir. Günümüzde bulguları arasında işitme kaybı olan yüzlerce sendrom tanımlanmıştır. Bunların büyük kısmı klasik Mendel tipi kalıtım biçimlerine uymakta, bir kısmı ise mitokondrial kalıtım göstermektedir. Sendromik olmayan grupta da benzer biçimde Mendel tipi kalıtım biçimlerinden birine veya mitokondrial kalıtıma uyan geçiş biçimleri tanımlanmıştır. Otozomal resesif kalıtım, sendromik olmayan grupta yaklaşık %80 sıklıkta görülmektedir. Otozomal dominant ve X kromozomal kalıtım biçimleri sırasıyla %15-20 ve %1-2 olguda saptanmaktadır. Mitokondrial kalıtımın non-sendromik işitme kaybı içindeki yeri etnik gruplara göre değişim göstermekle birlikte %1 ile %20 arasındadır (24,56,81).

2.4.1 Sendromik İşitme Kaybı

Sendromik işitme kaybı, sağırılık ile birlikte bir veya birkaç spesifik anomalinin kombinasyonunu ifade etmektedir. En çok bilinen örnekler Goldenhar, Waardenburg, Usher, Pendred ve Brakiootorenal sendromlarıdır (9).

Pendred Sendromu: Pendred sendromunun en önemli klinik bulguları konjenital sensörinöral işitme kaybı ile guatrdir. Fakat guatr olguların tümünde bulunmayabilir. Hastaların yaklaşık yarısında hipotiroidi saptanmaktadır (61). Hastaların çoğunda radyolojik görüntüleme yöntemleriyle saptanabilecek Mondini malformasyonu veya genişlemiş vestibüler kanallar gibi iç kulak anomalileri eşlik etmektedir (62). Pendred sendromuna neden olan “PDS” geni 7. kromozomda lokalizedir ve pendrin proteinini kodlamaktadır. Pendrin proteini iyon/klor taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır (69).

Usher Sendromu : Sensorinöral işitme kaybı ile birlikte retinitis pigmentosa bulunması Usher sendromunun bulgusudur. Usher sendromunda vestibüler bulgular da görülebilmektedir. Klinik olarak 3 tipi mevcuttur: Tip 1’de ileri derecede doğuştan işitme kaybına vestibüler fonksiyon bozukluğuna bağlı denge bozuklukları eşlik eder. Tip 2’de vestibüler fonksiyon bozukluğu yoktur ve sağırılığın şiddeti daha azdır. Tip 3’te ise sağırılık ilerleyicidir, vestibüler fonksiyon bozukluğu eşlik edebilir veya etmeyebilir (74). Usher sendromu genetik olarak heterojendir. Yapılan çalışmalarda değişik ailelerde 10 farklı gen bölgesi saptanmıştır. İncelenen lokalizasyonlarda altı farklı gende mutasyonlar ortaya çıkarılmıştır. Mutasyon saptanan genler; MYO7A (USH1B) (27), USH1C (5,87), USH1D(6,7), USH1F(1,2), USH2A (27) ve USH3 (23) olarak bildirilmiştir.

Goldenhar Sendromu: Hemifasiyal mikrozomi veya fasioaurikülo vertebral displazi olarak bilinen Goldenhar sendromunda konjenital unilateral ileti tipi işitme kaybı görülmektedir. Fasiyal asimetri, preauriküler deri katlantıları, ileti tipi işitme kaybı, servikal vertebral displazi, kolobom ve epibulber dermoid Goldenhar sendromunun tipik bulgularıdır (9).

Waardenburg Sendromu (WS): Otozomal dominant geçişli olup yüksek penetrans göstermesine rağmen aynı aile içinde bile klinik bulgular değişiklik göstermektedir. Klinik olarak dört tipi vardır.

- WS Tip 1: Sağırılık, iki iç kantal arasındaki mesafenin artması (distopia kantorum), saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri vardır. Neden olan gen 2q35 kromozomal bölgesinde bulunan PAX3 genidir.

- WS Tip 2: Sağırılık, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri vardır. Distopia kantorum yoktur. Neden olan gen 3p14.1 kromozomal bölgesinde lokalize MITF genidir.

- WS Tip 3: Sağırılık, distopia kantorum, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri ve ek olarak ekstremitelerde kontraktürleri vardır. Neden olan gen 2q35 kromozomal bölgesinde lokalize PAX3 genidir.

- WS Tip 4: Sağırılık, distopia kantorum, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri ve ek olarak Hirschprung hastalığı vardır. Neden olan genler 13q22 ve 20q13 kromozomal bölgelerine lokalize ENDRB, EDN3 ve SOX10 genleridir (60,81).

Brankiotoorenal Sendrom (BOR): Brankial sinüs ve fistüller, basit ve belirgin dış kulaklar, iç kulakta Mondini malformasyonu ve basit üriner sistem malformasyonundan renal agenezise kadar değişen üriner sistem patolojileri ile karakterize bir sendromdur (38). Sendroma neden olan gen 8q13 kromozomal bölgede bulunan EYA1 (drosophila 'eyeless') genidir (24).

Treacher-Collins Sendromu: Otozomal dominant kalıtım kalıbı ile birlite ve sporadik olarak ta görülebilmektedir. Yüzde simetrik olarak zigomatik kemiklerin az gelişmesi, palpebral fissürlerin aşağı çekikliği, mikrognati ve kulaklar ileri derece küçük veya belirgin olabilmektedir. Treacher Collins sendromu 5q32-33 kromozomal bölgesinde bulunan TCOF1 genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Genin sentezlediği protein nükleolus ile sitoplazma arasında molekül taşınmasında aracılık etmektedir (24,81).

Uzun QT Sendromu: Uzun QT sendromu EKG'de QT mesafesinin uzaması, senkop, ani ölüm gibi klinik bulgulara yol açmakta ve sağırılıkla birlikte görüldüğünde Jervell ve Lange-Nielsen sendromu olarak adlandırılmaktadır. Otozomal resesif geçiş gösterip sendroma kalpte ve iç kulakta görev alan potasyum kanallarını kodlayan KVLQT1 ve KCNE1 genlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır. Aynı genlerdeki dominant kalıtılan mutasyonlar sağırılığa eşlik etmeyen uzun QT sendromuna neden olmaktadır (88)

2.4.2 Non-Sendromik İşitme Kaybı

Non-sendromik (sendromik olmayan) genetik etyolojinin neden olduğu işitme kaybı ile çevresel faktörlere bağlı olarak gelişen işitme bozuklukları sadece klinik muayene ile birbirlerinden ayırt edilemeyebilmektedir. Genetik testler neticesinde, ailede görülen sağırılığın genetik bir kökeninin var olup olmadığı anlaşılabilen ve kesin teşhis konulabilmektedir (11). Gen lokalizasyon çalışmalarının başlangıcında, yalnızca sendromik işitme kaybına neden olan genlerin lokalizasyonları belirlenmiş ve tanımlanmıştır. 1994 yılına kadar non-sendromik işitme kaybından sorumlu olan yalnızca üç genin lokusu insan genomu üzerinde haritalanmıştır (90). Sağırılığın non-sendromik formu için, çok sayıda gen lokusu DFN (DeaFNess) olarak adlandırılmış ve keşiflerindeki kronolojik sıraya göre numaralandırılmıştır (Tablo 2.1). Non-sendromik otozomal dominant lokuslar DFNA, otozomal resesif lokuslar DFNB ve X kromozomal lokuslar DFX olarak gösterilmektedir (79).

Tablo 2.1: Otozomal resesif NSSNİK na neden olan genler.*

*Petersen MB ve ark.(58)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Lokus	Kromozomal lokasyon	Gen
DFNB1	13q11-q12	<i>GJB2</i> <i>GJB6</i>
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i>
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15</i>
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i>
DFNB5	14q12	
DFNB6	3p21	<i>TMIE</i>
DFNB7	9q13-q21	<i>TMC1</i>
DFNB8	21q22.3	<i>TMPRSS3</i>
DFNB9	2p23.1	<i>OTOF</i>
DFNB10	21q22.3	<i>TMPRSS3</i>
DFNB11	9q13-q21	
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>
DFNB13	7q34-q36	
DFNB14	7q31	
DFNB15	3q21.3-q25.2/19p13.3-p13.1	
DFNB16	15q15	<i>STRC</i>
DFNB17	7q31	
DFNB18	11p15.1	<i>USH1C</i>
DFNB20	11q25-qter	
DFNB21	11q23-q25	<i>TECTA</i>
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i>
DFNB23	10q21.1	<i>PCDH15</i>
DFNB26	4q31	
DFNB27	2q23-q31	
DFNB29	21q22.1	<i>CLDN14</i>
DFNB30	10p11.1	<i>MYO3A</i>
DFNB31	9q32-q34	<i>WHRN</i>
DFNB32	1p22.1-p13.3	
DFNB33	9q34.3	
DFNB35	14q24.1-q24.3	
DFNB36	1p36.3	<i>ESPN</i>
DFNB37	6q13	<i>MYO6</i>
DFNB38	6q26-q27	
DFNB39	7q11.22-q21.12	
DFNB40	22q11.21-q12.1	
DFNB42	3q13.31-q22.3	
DFNB44	7p14.1-q11.22	
DFNB46	18p11.32-p11.31	
DFNB48	15q23-q25.1	
DFNB49	5q12.3-q14.1	
DFNB53	6p21.3	<i>COL11A2</i>
DFNB55	4q12-q13.2	

Non-Sendromik İşitme Kayıplarından Sorumlu Genler

İşitme kaybına (İK) neden olan genler ve bu genlerin fonksiyonel analizi hakkında hızla artan bilgiler, işitmenin moleküler mekanizmasını anlamamızı kolaylaştırmaktadır. İşitme kaybından sorumlu olduğu bilinen genlerin büyük bir kısmının fonksiyonu bilinmemektedir. Bununla birlikte işitme kaybı ile ilgili tanımlanan genler arasında iyon kanalları ve gap junction proteinlerini kodlayan genler, yapısal bütünlükte rol alan proteinleri kodlayan genler ve regülatör proteinleri kodlayan genler yer almaktadır (11,58). Bu genlerin bir kısmı fonksiyonlarına göre sınıflandırılmış olarak Tablo 2.2 de görülmektedir.

Tablo 2.2: Genlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.*

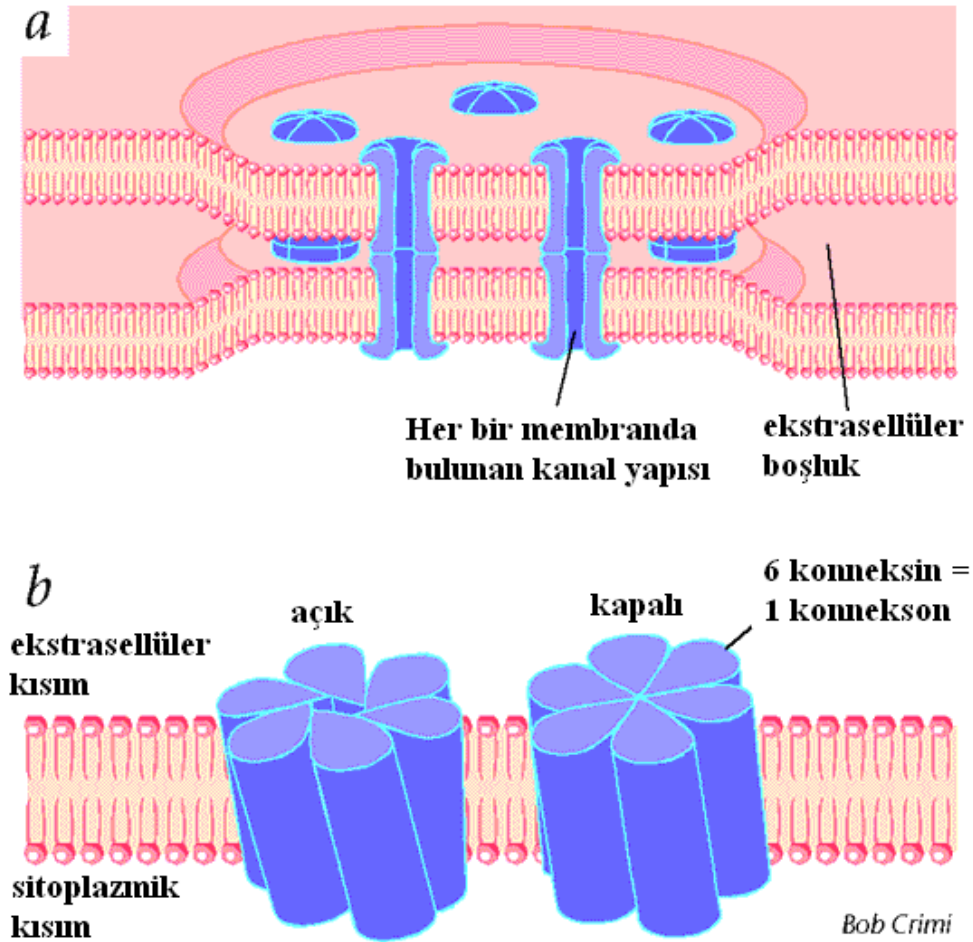
*Petersen MB ve ark.(58)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Protein	gen	Non-sendromik İK lokusu
Sitoskeletal proteinler		
Myozin III	MYO3A	DFNB30
MyozinVI	MYO6	DFNB37
Myozin VIIA	MYO7A	DFNB2-DFNA11
Yapısal proteinler		
Stereosilin	STRC	DFNB16
α -Tektorin	TECTA	DFNB21-DFNA8/12
Otoankorin	OTOA	DFNB22
Kollagen 11 α 2	COL11A2	DFNB53
İyon transport proteinleri		
Konnexin 26	GJB2	DFNB1/DFNA3
Konnexin 30	GJB3	DFNB1/DFNA3
Konnexin 31	GJB6	DFNA2
Pendrin	SLC26A4	DFNB4
KCNQ4	KCNQ4	DFNA2
Transkripsiyon faktör proteinleri		
POU3F4	POU3F4	DFN3
POU4F3	POU4F3	DFNA15

İyon Transportundan Sorumlu Olan Genler

Konneksin Proteinlerini Kodlayan Genler

Konneksin genleri, komşu hücreler arasındaki hızlı haberleşmenin sağlanması için iyonların, ikincil habercilerin ve küçük metabolitlerin hızlı geçişine imkan veren "gap junction" proteinlerinin alt birimlerini kodlarlar. Altı konneksin alt ünitesi birleşerek konneksonu meydana getirir (Şekil 2.3). Her biri iki komşu hücrede bulunan birer çift konneksin bir arada intersellüler kanalı meydana getirirler (34). GJB2 (konneksin 26), GJB3 (konneksin 31), GJB6 (konneksin 30) ve GJA1 (konneksin 43) olmak üzere 4 konneksin geni tanımlanmıştır (11).



Şekil 2.3 Konneksinlerin yapısı.*

*Steel KP (78)'den değiştirilerek alınmıştır.

Konneksin 26 (GJB2) Geni

GJB2 (gap junction β -2) geni konneksin 26 olarak adlandırılan 26 kD'lik bir konneksin protein kodlamaktadır. GJB2 'nin stria vasculariste, basement membranda, limpu ve spiral çıkıntıda (Şekil 2.4) eksprese olduğu gösterilmiştir (31). GJB2 geni kromozom 13q11-q12 bölgesinde haritalanmıştır (52). GJB2 geni 2 ekzondan oluşmakta ve birinci ekzon translasyona uğramamaktadır (33). Konneksin 26'nın fonksiyonu işitme uyarılarının mekanik uyarıdan elektriksel uyarıya dönüşümünden sonra, potasyum iyonlarının silyalı hücrelerden destek hücrelere ve oradan da tekrar endolenfe dönmelerini sağlayan kanallar olabileceği üzerinde durulmaktadır (30).

Non-sendromik otozomal resesif işitme kayıplarının yaklaşık %50'sini GJB2 mutasyonları oluşturmaktadır. Bu gendeki önemli mutasyonlardan biri 35delG'dir. Avrupa, Kuzey Amerika ve Akdeniz toplumlarında görülen patolojik GJB2 mutasyonlarının yaklaşık %70'ini 35delG oluşturmaktadır (16,68).

Türkiye'de ise otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarının %20.8'inde 35delG mutasyonu görülmektedir (25). Türkiyede farklı şehirlerde 35delG mutant allel görülme oranı %5 ile %53 arasında değişmektedir (82). Ülkemizde yapılan çalışmalarda GJB2 geninde saptanan diğer mutasyonlar W24X (%1.4), delE120 (%1), 233delG (<%1), Q80R (<%1), 310del14 (<%1), 299-300delAT (<%1), c.167delT (<%1), P184R (<%1), 236-239TGCAinsAGATCCG (<%1), L90P (<%1), P173S(<%1), R127H (<%1), Q80K (<%1) mutasyonlarıdır (26).

Yapılan çalışmalarda sırasıyla, Ashkenazi Yahudileri'nde 167delT ve uzak doğuda özellikle Japon toplumunda 235delC en sık görülen GJB2 mutasyonlarıdır (36,37,53). GJB2 mutasyonları genellikle şiddetli ve derin prelingual sensorinöral işitme kaybına neden olmaktadır (76). GJB2 mutasyonlarının non-sendromik otozomal dominant (DFNA3) ve sendromik (palmoplantar keratoderma) işitme kayıplarına da neden olduğu rapor edilmiştir (22,49,64).

Konneksin 31 (GJB3) Geni

GJB3 (gap junction β -3) geni, kromozom 1p35-33 bölgesinde lokalize edilmiş ve 31 kD'lik bir konneksin proteini kodlamaktadır. Hayvan modellerinde yapılan in situ hibridizasyon çalışmaları GJB3'ün kokleada, işitsel sinirlerde ve periferal

sinirlerde eksprese edildiğini göstermiştir (42,43). GJB3 mutasyonları hem dominant hem de resesif sensorinöral işitme kayıplarına neden olabilmektedir (47,92). Ayrıca, GJB3 mutasyonlarının sağırlığa neden olmadan otozomal dominant deri bozukluklarına (eritrokeratoderma variabilis) (63) ve sensorinöral işitme kaybı ile birlikte periferik nöropatilere de neden olduğu bilinmektedir (48).

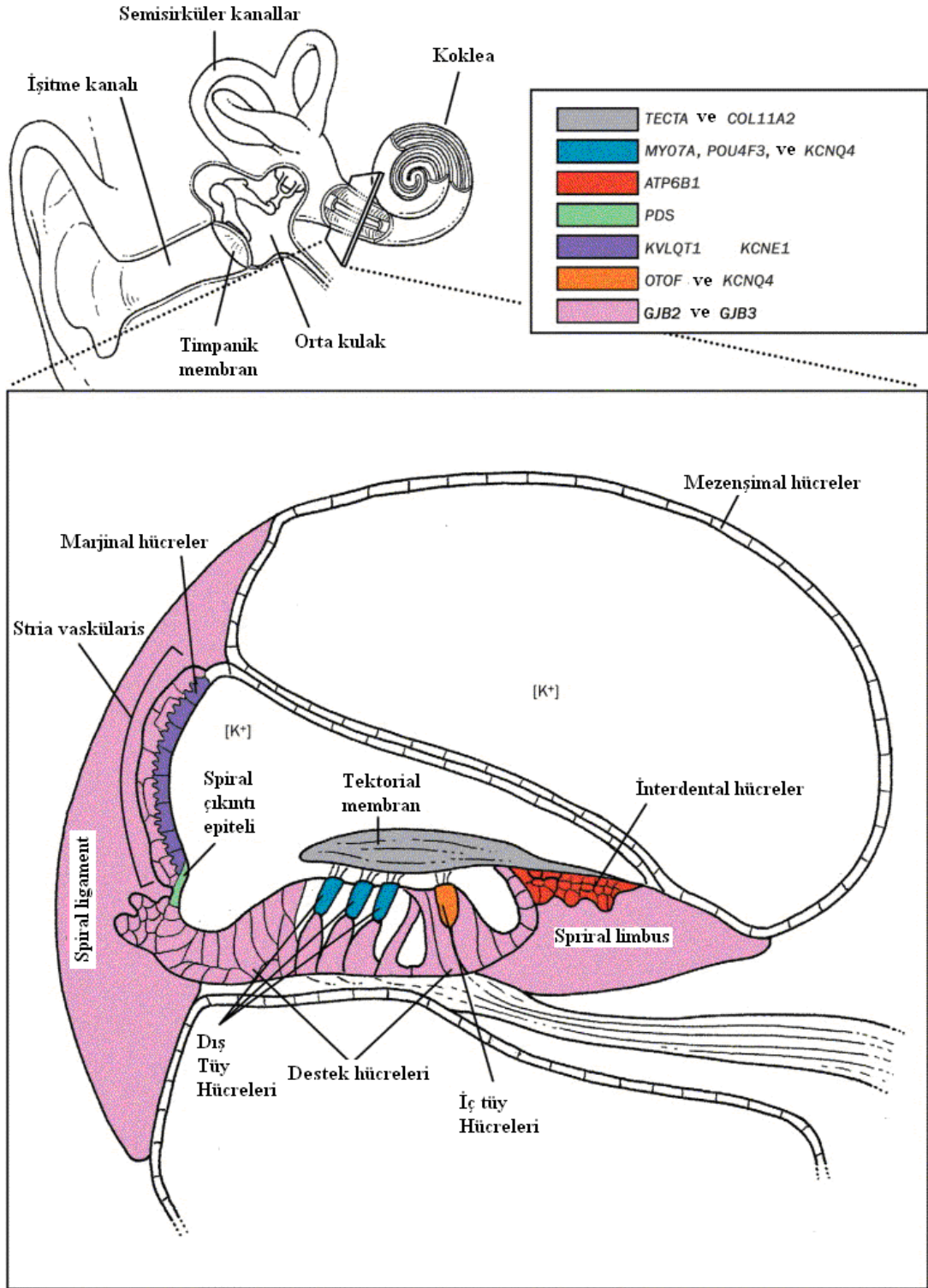
GJB3 genine ilişkin otozomal dominant kalımlı NSSNİK olgularında R180X ve E183K (48) mutasyonları tanımlanırken otozomal resesif tip NSSNİK olgularında I41del, I141V (47) ve P223T (84) mutasyonları tanımlanmıştır (83). Ülkemizde yapılan bir çalışmada P223T (%1.7) mutasyonu literatürde ilk defa tanımlanmıştır (84).

Konneksin 30 (GJB6) Geni

GJB6 (gap junction β -6) geni kromozom 13q12 bölgesinde haritalanmış (28) ve 30 kD'lik bir konneksin proteini kodlamaktadır (25). GJB2 ve GJB6 genleri birbirlerine yakın konumlanmıştır (18).

Yapılan çalışmalarda, NSSNİK olan bireylerde DFNB1 lokusunda bulunan GJB2 geni mutasyonlar açısından incelendiğinde yüksek sıklıkta tek allelde mutasyonlar saptanmıştır. Farklı çalışmalarda bu oran %10 ile %50 arasında değişmektedir (30). Tek allel mutasyon sıklığının geniş bir yelpaze içerisinde dağılması DFNB1 lokusunda GJB2 geni dışındaki bölge(ler)de de mutasyon olabileceğini düşündürmüştür. DFNB1 lokusunda bulunan gap junction proteinlerin kokleadaki bir diğer komponenti olan GJB6 genini kapsayan 342 kb(kilobaz) uzunluğundaki bir delesyonun [del(GJB6-D13S1830)] saptanması ile bu düşünce doğrulanmıştır (14,41,57).

İspanya, Fransa, İngiltere, İsrail ve Brezilya'da del(GJB6-D13S1830) mutasyonu tüm DFNB1 allelerinde %5.9 ile 9.7 arasında saptanırken (55) Türkiye (82,84), Avusturya (19) ve Çin'de (46) yapılan çalışmalarda del(GJB6-D13S1830) mutasyonu saptanmamıştır.



KCNQ4 Geni

KCNQ4 geni, potasyum kanalı kodlayan KCNQ1 ve KCNE1 genlerini de içeren süper gen ailesinin bir üyesidir. Bu genlerin mutasyonları işitme kaybına neden olmaktadır (35,55,67). KCNQ4 gen ürününün fonksiyonu, tüylü hücrelerin bazolateral tarafında potasyum kanalı oluşturarak potasyum iyonlarının tüylü hücrelerden destek hücrelerine akışını sağlamaktır (32). Potasyum iyonları daha sonra destek hücreleri ile sitriavaskularis arasındaki konneksin kanalları aracılığı ile döngüyü tamamlayarak KCNQ1 ve KCNE1 gen ürünlerinin oluşturduğu potasyum kanallarından geçer ve sitria vaskularisten endolenfe salgılanır. Bu proteinler, ayrıca kalpteki potasyum homeostazisinde de görev alırlar (10,35). KCNQ4 mutasyonları otozomal dominant kalıtım gösteren, genç yaşta başlayan, ilerleyici sensorinöral işitme kaybına neden olmaktadır (10).

SLC26A4 (PDS, Pendrin) Geni

Pendred sendromu, PDS (SLC26A4) geni mutasyonları sonucu gelişmektedir. PDS geni tiroit bezinde, iç kulakta ve böbrekte Pendrin olarak adlandırılan bir transmembran protein kodlamaktadır. Başlangıçta sülfat transportunda görev aldığı düşünülmeye rağmen son çalışmalar Pendrin'in sodyumdan bağımsız olarak klor ve iyot anyonlarını taşıdığı gösterilmiştir (70).

PDS mutasyonları farklı etnik orijinlere sahip çok sayıda pendred sendromlu ailede rapor edilmiştir (17). Prelingual non-sendromik işitme kayıplı bireylerin %15'inde klasik Pendred sendromuna neden olan mutasyonlardan farklı mutasyonlar gösterilmiştir. Bu mutasyonların bir kısmı vestibüler sıvı kanallarında genişlemeye neden olurken tiroit bezinin büyümesine de neden olmamaktadır (70).

Sitoskelatal Protein Kodlayan Genler

Konvansiyonel Olmayan Miyozinler

Miyozin molekülleri motor ve kuyruklarına göre çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Klas II miyozinler konvansiyonel miyozinleri oluştururken geri kalan 13 farklı miyozin (klas I, III-XIV) ise konvansiyonel olmayan miyozinleri oluşturmaktadır. Konvansiyonel olmayan miyozinler sitokinez, morfogenez ve hücre polaritesinin

oluşturulması gibi çeşitli hücrel fonksiyonlara sahiptirler. Bu moleküller kulakta tüylü hücrelerin stereosilyialarının organizasyonunda görev almaktadır (25,39).

MYO7A Geni

Miyozin 7A proteinini kodlayan MYO7A geni sensorinöral işitme kayıplı geniş bir Tunus ailesinde tanımlanmıştır. MYO7A genindeki mutasyonlar ilk olarak retinitis pigmentosa, vestibüler semptom, ve prelingual sağırlıkla karakterize Usher sendrom tip 1B'li bir hastada tanımlanmıştır (43,89). MYO7A mutasyonlarının tip 1B Usher sendromuna, atipik Usher sendromuna, non-sendromik otozomal resesif (DFNB2) ve non-sendromik otozomal dominant (DFNA11) işitme kaybına da neden olabildiği gösterilmiştir (14).

Non-sendromik otozomal resesif işitme kaybına neden olan MYO7A mutasyonları doğumdan 16 ncı yaşa kadar olan herhangi bir dönemde başlayabilen derin işitme kaybına neden olurken, non-sendromik otozomal dominant kalıtım gösteren MYO7A mutasyonlarının ilerleyen işitme kaybına neden olduğu bir Japon ailesinde gösterilmiştir (43,89).

MYO15 Geni

MYO15 geni tüylü hücrelerde aktin moleküllerinin organizasyonu için gerekli konvansiyonel olmayan Miyozin 15 proteinini kodlar. Gelişmekte olan fare kokleasında yapılan İn situ hibridizasyon çalışmaları miyozin 15'in nörosensöriyal epitel hücrelerinde, sakkulus, utriculus ve crista ampullariste eksprese edildiğini göstermiştir (42). MYO15 mutasyonları konjenital otozomal resesif derin işitme kaybına neden olmaktadır (25).

Yapısal Protein Kodlayan Genler

TECTA (α -tektorin) Geni

TECTA geni, kokleaya spesifik α -tektorin proteinini kodlamaktadır (40). Alfa-tektorin, kokleanın nöroepitelini örten ve hücrel yapıda olmayan tektorial membranın kollajen olmayan yapıdaki bileşenlerinden biridir. Alfa-tektorin, tektorial membranın kollajen olmayan glikoprotein bileşenlerinin en büyüğüdür (86).

Alfa-tektorin, mekanik uyarıların elektriksel uyarılara dönüştürülmesinde görev alır. TECTA gen (DFNA8 ve DFNA12) mutasyonları, otozomal dominant non-sendromik prelingual işitme kaybı olan farklı ailelerde görülmüştür. Otozomal resesif kalıtım gösteren TECTA mutasyonları hafif, orta ve şiddetli işitme kayıplarına neden olmaktadır (86). Bunun yanında, bir Lübnan ailesinde otozomal resesif kalıtım gösteren TECTA mutasyonu da bildirilmiştir. Bu mutasyonun bütün frekanslarda orta, şiddetli ve derin sensorinöral işitme kaybına neden olduğu gösterilmiştir (54).

COL11A2 Geni

Kollajenler oldukça heterojen olup 30'dan fazla farklı gen tarafından kodlanırlar. Bu proteinler bir araya gelen trimerik protein komplekslerine göre farklı sınıflara ayrılırlar. Bazı kollajen genlerindeki mutasyonların sendromik işitme kayıplarına neden olduğu bilinmektedir (8,51).

Kollajen 11'in α -2 alt birimini kodlayan COL11A2 geni mutasyonlarının 20-40 yaşlar arasında başlayan otozomal dominant, postlingual progressif non-sendromik işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Mutasyonlar orta frekanslı seslerin algılanmasını etkilemektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda COL11A2 mutasyonlarının tektorial membrandaki kollajen fibrillerin organizasyonlarını bozması sonucunda işitme kaybının geliştiği gösterilmiştir (8,51).

Transkripsiyon Faktör Genleri

POU3F4 Geni

POU3F4 geni, iç ve orta kulakta eksprese olup kemiklerin olgunlaşmasında görev alırlar. POU3F4'ün hedef alınarak inaktive edilmesi ile oluşturulan mutant farelerde kemiksi labirentlerin ve orta kulak kemiklerinin anormal gelişimi gösterilmiştir.

Transkripsiyon faktörü kodlayan POU3F4'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak POU3F4'ün mutasyonları stapesin tabanının fiksasyonu ile karakterize olup X kromozomal, non-sendromik, progressif işitme kaybına neden olmaktadır (12,13).

POU4F3 Geni

POU4F3 yalnızca tüylü hücrelerde eksprese edilir ve corti organındaki hücrelerin hayatlarını devam ettirmesinde önemli olan genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumludur.

Transkripsiyon faktörü kodlayan POU4F3 geninin farelerde meydana getirilen mutasyonları derin işitme kaybına ve vestibüler fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. İsrail’li bir ailede POU4F3 geninde tanımlanan 8 baz çiftlik bir delesyonun otozomal dominant non-sendromik ilerleyici işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (25,85).

2.5 MLPA Yöntemi

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tarafından relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir (66).

MLPA; 45 tane farklı spesifik dizinin, bir multiplex PCR dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metodur. Amplifikasyon ürünleri bir kapiller elektroforez cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek evrensel primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130-490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon, amplifikasyon veya nokta mutasyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA sı yeterli olmaktadır. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir (91).

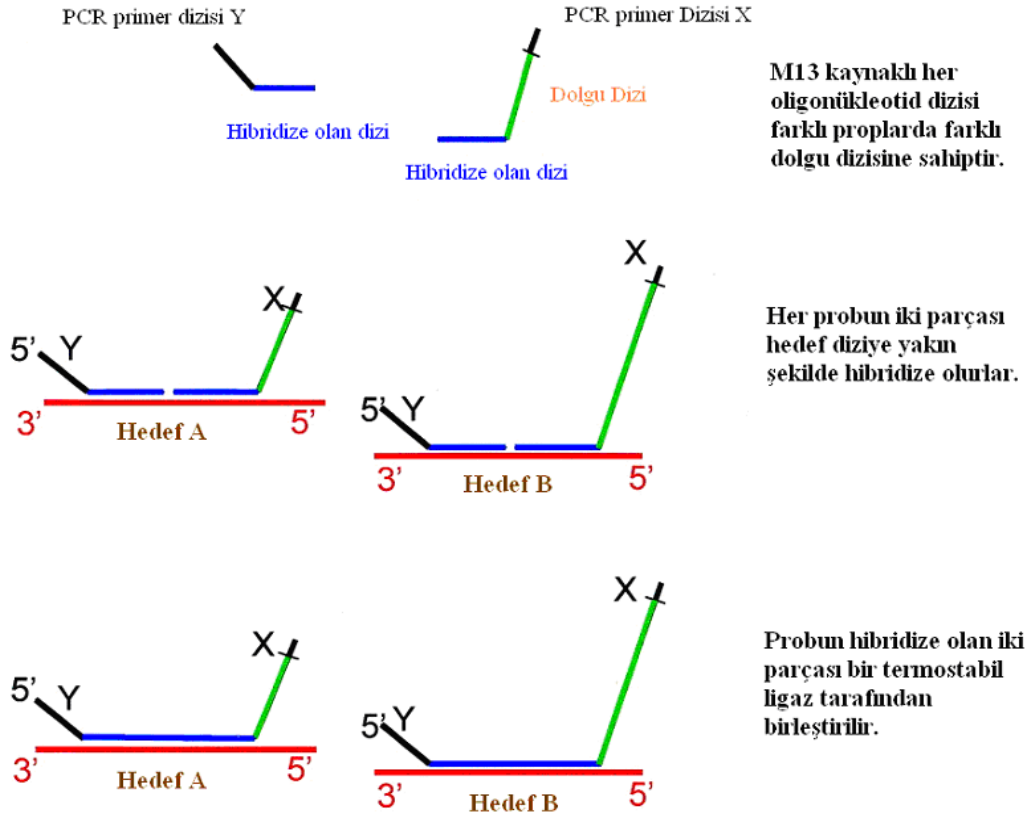
Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduğunda birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış probalar 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk

oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA sı kullanılmıştır. M13 DNA sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle problemler arasında 6 ya da 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodupleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır (Şekil 2.5). Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotitler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki problemler amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (66).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problemler için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N- (3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (73). Günümüzde MLPA yöntemi çeşitli genlerde, nokta mutasyon, delesyon ve amplifikasyonların tanımlanmasında kullanılmaktadır (91).

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

- Denatüre genomik DNA 40 ayrı prob ile hibridize edilir.
- Her bir MLPA probu, biri sentetik, diğeri M13 kaynaklıdır.



Bütün prob ligasyon ürünleri tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edilirler.



Amplifikasyon ürünleri elektroforez ile ayrıştırılır. Prop amplifikasyon ürünlerinin göreceli miktarları hedef dizinin göreceli doz miktarını belirler.

Şekil 2.5.: MLPA Reaksiyonunun İşleyişi.*

*Schouten, J.P ve ark. (66)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2.5.1. Salsa MLPA P163 B1 (lot:0208) Prob Kitinin Özellikleri.

MLPA P163 B1 (lot 0208) işitme kaybı kiti ile NSSNİK olan bireylerde GJB2, GJB3 ve GJB6 genleri incelenebilmektedir. Toplam 41 farklı prob içeren kit GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerinin DNA dizilerine hibridize olabilen 17 farklı prob içermektedir (Tablo 2.3). Bunların dışında kalan 24 prob ise kontrol referans problemleri ile Wolfram sendromuna neden olan WFS1 genini inceleyen problemlerdir. GJB2 geni sekiz prob ile incelenmektedir. Problemlerden üç tanesi gende bulunan nokta mutasyonlarını araştırmak için dizayn edilmiştir. Nokta mutasyona spesifik problemler ile 35delG, 313del14 (310del14 olarakta gösterilir) ve IVS1+1 G>A mutasyonları incelenebilmektedir. Kalan beş prob ise GJB2 geninin farklı bölgelerine hibridize olmaktadır. GJB3 geninde dört farklı bölgeye, GJB6 geninde ise beş farklı bölgeye hibridize olan problemleri içermektedir (91).

İşitmede görev yapan proteinleri kodlayan genlerin sayısının fazla olmasına rağmen mutasyonların büyük bir kısmı belli genlerde ve gen gruplarında gerçekleşmektedir. Konneksin proteinlerini kodlayan genlerin mutasyonları olgularda yüksek oranda görülmektedir. Özellikle GJB2 gen mutasyonları NSSNİK lı hastaların yaklaşık yarısından sorumludur (16,68). DFNB1 lokusu (GJB2 ve GJB6) en sık görülen otozomal resesif NSSNİK dir ve konjenital, prelingual işitme kayıplarının tamamının %20 sini teşkil eder (93).

GJB2 geninde sık görülen mutasyonlar popülasyonlar arasında farklılıklar göstermekle birlikte Avrupa, Kuzey Amerika ve Akdeniz toplumlarında görülen patolojik GJB2 mutasyonlarının yaklaşık %70'ini 35delG oluşturmaktadır (16,68). 167delT Ashkenazi Yahudilerinde ve 235delC Japon toplumunda en sık görülen GJB2 mutasyonlarıdır (36,37,53).

Popülasyonumuzda NSSNİK lı hastalarda en önemli gen olan GJB2 geni ve bu gende en sık görülen mutasyon olan 35delG ile birlikte GJB3 ve GJB6 genleri de MLPA P163 B1 (lot 0208) işitme kaybı kiti kullanılarak mutasyonlar açısından incelenmiştir (25,91).

Tablo 2.3: Salsa MLPA P163 B1 prob kitinin özellikleri.*

*www.mlpa.com 26/07/2008 (91)'dan alınmıştır.

Length(nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			
		Control	13q12	GJB3	WFS1
64-70-76-82	DQ-control fragments				
88-92-96	DD-control fragments				
124	Reference probe 2782-L02224	2q37			
130	GJB2 Probe 6698-L4752		Exon 1		
137	Reference probe 0662-L0158	6p21			
141	ZNF198 Probe 5170-L6282		13q11		
147	WFS1 Probe 5375-L4766				Exon 1
154	GJB3 Probe 5366-L4757			Exon 1	
159	GJB6 Probe 5370-L4761		Exon 1		
164	WFS1 Probe 5377-L11414				Exon 3
172	GJB2 Probe 9862-L9257		35delG mutation specific		
178	GJB2 Probe 5362-L4753		Exon 1		
183	WFS1 Probe 5379-L4770				Exon 5
190	GJB3 Probe 5367-L4758			Exon 2	
196	GJB6 Probe 5371-L4762		Exon 1		
202	ZNF198 Probe 5730-L6767		13q12		
208	WFS1 Probe 6699-L4772				Exon 7
217	Reference probe 0769-L0274	17q21			
222	PSPC1 Probe 2399-L6768		13q12		
229	WFS1 Probe 5376-L4767				Exon 2
238	GJB3 Probe 5368-L4759			Exon 3	
247	GJB2 Probe 6700-L4754		Exon 1		
254	WFS1 Probe 5378-L4769				Exon 4
265	GJB2 Probe 9861-L9255		IVS1+1G>A mutation specific		
274	GJB2 Probe 5364-L4755		Exon 2		
283	GJB6 Probe 6701-L4763		Exon 2		
292	GJB3 Probe 5369-L4760			Exon 3	
301	GJB6 Probe 5373-L4764		Exon 3		
307	GJB2 Probe 9118-L9202		WT at 313del14 mutation		
312	WFS1 Probe 5382-L6285				Exon 8
321	WFS1 Probe 6702-L9985				Exon 6
328	GJB2 Probe 5365-L4756		Exon 2		
337	GJB6 Probe 5374-L476		Exon 3		
346	Reference probe 2473-L1917	15q21			
355	LATS2 Probe 6704-L3639		13q12		
364	Reference probe 1234-L0781	10p14			
374	SGCG Probe 3394-L2787		13q12		
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731		13q12		
392	LATS2 Probe 6705-L3638		13q12		
402	PSPC1 Probe 2717-L3608		13q12		
410	Reference probe 2669-L2136	11q23			
417	ZNF198 Probe 5764-L5202		13q12		
428	Reference probe 1439-L0908	2p16			

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3. 1. GEREÇLER:

3. 1. 1. Kullanılan Gereçler:

Thermal cyclers (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Kapiller Elektforez Cihazı (ABI Prizm 310)

MagNa Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Elektforez aleti (Consort E844)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Buzdolabı (Arçelik)

Santrifüj tüpleri

Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)

ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)

3. 1. 2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)

Salsa MLPA Deafness Probe Mix (Salsa P163 B1- MRC Holland) (lot 0208)

Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)

10X EDTA lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

6X Jel yükleme tamponu (Sigma)

Agoroz (Genaxis)

Etidyum Bromid (Sigma)

Distile Su

AL buffer (QIAGEN)

Buffer AW1 (QIAGEN)

Buffer AW2 (QIAGEN)

Buffer AE (QIAGEN)

Etanol (95%) (Tekel)

3. 2. YÖNTEMLER:

3. 2. 1. Materyal Seçimi:

Anadolu Üniversitesi İşitme Engelli Çocuklar Eğitim ve Araştırma Merkezinde eğitim görmüş ve eğitim görmekte olan NSSNİK olan fizik muayeneleri yapılmış 90 olgu çalışmaya alınmıştır. Olgular çalışmaya dahil edilmeden önce çalışma hakkında bilgi verilmiş ve her olguya (veya ebeveyne) onam formu imzalatıldıktan sonra olgular çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmamız 25 Aralık 2006 gün ve 03 sayılı karar ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp fakültesi Etik Kurulundan etik kurul onayı almıştır.

Olguların anamnezi ile birlikte aile öyküsü, daha önce geçirilmiş enfeksiyon öyküsü ve ototoksik ilaç kullanım öyküleri incelenmiştir. Hastaların tümünde işitme kaybı prelingual dönemde tesbit edilmiştir. Sensörinöral işitme kaybı ile birlikte görülen sendromları düşündürecek öykü olan veya fizik muayene bulguları olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Olguların ayrıntılı fizik muayenesi yapıldıktan sonra 2cc EdTA lı tüpe periferik kan örnekleri alınmıştır. 50 olguya ait periferik kan örnekleri Qiagen DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA elde edilirken kalan 40 olguya ait periferik kan örneklerinde DNA izolasyonu Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotunda MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MLPA analizinde Salsa MLPA P163 B1 işitme kaybı kiti kullanılmıştır.

3.2.2 QIAamp DNA Mini Kiti Kullanarak DNA İzolasyonu

- 1.5 ml lik ependorf tüpünün içerisine, 20 µl QIAGEN proteaz (ya da proteinaz K) konmuştur.

- Daha sonra EDTA lı tüp içerisinde bulunan 200 µl lik kan örneği tüpe eklenmiştir.

- 200 µl lik Buffer AL eklenip, 15 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır.

- 56°C de 10 dakika inkübe edilmiştir.

- 1.5 ml lik ependorf tüpünün kapağında oluşan damlacıkların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapılmıştır.

- %96 lık 200 µl etanol eklenip, 15 saniye vorteksledikten sonra kısa süreli santrifüj yapılmıştır.

- Dikkatli bir şekilde karışım ependorf tüpünden alınıp, kitle birlikte gelen QIAamp spin column (2ml lik toplama tüpünün içerisinde bulunan) boşatıldı ve 1 dakika 8000 rpm de santrifüj yapılmıştır. QIAamp spin column;1,5 ml lik temiz başka bir ependorf tüpüne yerleştirilip filtratı içeren tüp atılmıştır.

- QIAamp spin column kapağı açılıp 500 µl AW1 solüsyonu eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 14000 rpm de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

- QIAamp spin column;1,5 ml lik temiz başka bir ependorf tüpüne yerleştirilip filtratı içeren tüp atılmıştır.

- QIAamp spin column kapağı açılıp 500 µl AW2 solüsyonu eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 14000 rpm de 3 dakika daha santrifüj yapılmıştır.

- Spin column temiz 1.5 ml lik temiz ependorf tüpüne yerleştirilip, QIAamp spin column kapağı açılıp 200 µl lik Buffer AE eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip daha sonra 8000 rpm de 1dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA -20 °C de saklanmıştır.

3.2.3. MagNa Pure Ekstraksiyon Robotu ile DNA İzolasyonu

- EDTA lı tüpten alınan 200 µl kan kit ile birlikte gelen örnek tüplerine kondu ve tüpler cihaza yerleştirilmiştir.

- Manyetik parçacıklar, proteinaz K ve yıkama solüsyonları içeren kartuş üzerindeki barkod okutulduktan sonra cihaza yerleştirilmiştir.

- Uygun program ile başlangıç yüklenen kan 200 µl ve istediğimiz dilüsyon oranları 200 µl olarak programa girilmiştir.

- Cihazla birlikte gelen uçların (tip tray) bulunduğu kartuş cihaza yerleştirilmiştir.

- Elüsyon tüplerinin barkodları okutulduktan sonra cihaza yüklendi ve DNA eldesi için cihaz başlatılmıştır.

3.2.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi:

DNA Denatürasyonu Ve SALSA MLPA P163 B1 Probe Miks İle Hibridizasyonu:

- Elde ettiğimiz DNA örneklerimizden 5 µl (20-250 ng DNA) alınmıştır.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarılmıştır.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA denatüre edilmiştir.
- Örnekler 25 °C'ye soğutulmuştur.
- 25 °C'de bulunan DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P163) ve 1.5 µl MLPA Buffer eklenip pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir.
- Buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklenmiştir.
- 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

Ligasyon Reaksiyonu:

- Hibridizasyon süresi bitiminde Termal Cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirilmiştir.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra mineral yağ alınmayarak hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks solusyonu tüpün dip kısmından (üstteki yağ seviyesinin altına inerek) ilave edilmiştir.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlanmıştır.

PCR:

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarılmıştır.

- Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:

- 4 µl 10XSALSA PCR Buffer
- 26 µl distile su
- 10 µl Polimeraz miks,
eklenerek PCR başlatılmıştır.

- PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 35 döngü
Annealing	30 sn	60 °C	
Ekstansiyon	60 sn	72 °C	
Son Ekstansiyon	20 dk	72 °C	

ABI 310 Cihazına Yükleme:

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarılmıştır.

- Daha sonra tüplere:

0.5 µl internal size standart (Rox 500)

12 µl deiyonize formamid eklenerek pipetajla homojenize edilmiştir.

- Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlanmıştır.

- Örnekler buz üzerine alınmıştır.

- ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 30 dakika yürütme zamanı, filtre C şartları sağlanmıştır.

- Daha sonrasında ABI cihazına yüklenilerek, GeneMapper V3.7 programında okutulmaya başlatılmıştır.

- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edilmiştir.

Değerlendirme:

MLPA fragmentleri farklı büyüklüklerde oldukları için belli bir sırayla kapiller elektroforezden geçmektedir. Her bir fragmente ait uzunluk (size) ve bu fragmentin oluşturduğu pikin altında kalan alan GeneMapper V3.7 programı ile değerlendirildikten sonra excel dosyası formatında kaydedildi.

Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Kaldırılma işlemi yapılırken MLPA salsa P163 B1 prob miksinde bulunan standart prob pikleri değerlendirilmeye alındı. Non spesifik pikler veya rox piki kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları, problemin elde edilen boyut ve pik alanları Fragment Analyzer V2.0 programına aktarıldı. Normal olan örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Salsa MLPA P163 B1 probmiksi önceki problemlara göre farklı olan blok normalizasyona göre hesaplanarak değerlendirildi. Blok normalizasyon bu MLPA prob kitine özgü olup kullanılması önerilmektedir. Önceki MLPA prob miklerinde normalizasyon yapılırken bir olgu için prob miksinde bulunan tüm problemlerin pik alanları toplam değeri kullanılırken, Salsa MLPA P163 B1 prob miksinde referans kontrol problemleri pik alanları toplam değeri kullanılmaktadır. Blok normalizasyon yaparken analiz programı ile hasta birey için her bir pike ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans kontrol problemlerin toplamına bölünür. Kontrol olarak alınan sağlıklı bireyler için her bir pike ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans kontrol problemlerin toplamına bölünür. Son olarak işitme kaybı olan hasta olgular ile kontrol olgulardan elde edilen verileri oranlayarak doz hesaplaması yapar. Bu değer 0.7'nin altında ise delesyon yönünde, 1.3'ün üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilir.

Kontrol olguları olarak herhangi bir işitme kaybı öyküsü bulunmayan ve GJB2 geni DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiş üç olguya ait DNA örneği kullanıldı.

Her deneyde üç normal negatif kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Fragment Analyzer V2.0 programı otomatik olarak aşağıdaki formülü (formül 3.1) kullanarak her bir spesifik prob bölgesi için doz tayini yapmaktadır

$$\text{Doz Oranı} = \frac{\text{Hasta TPAD}}{\text{Hasta RPATD}} = \frac{\frac{1. \text{ Kontrol TP AD}}{1. \text{ Kontrol RPATD}} + \frac{2. \text{ Kontrol TPAD}}{2. \text{ Kontrol R. P. A. T. D.}} + \frac{3. \text{ Kontrol TPAD}}{3. \text{ Kontrol RPATD}}}{3} \quad (3.1)$$

TPAD.: Test Piki Alan Değeri

RPATD.: Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri

35delG Mutasyonunun Değerlendirilmesi

Salsa MLPA P163 B1 işitme kaybı prob miksinde 172 bp uzunluğundaki prob 35delG mutasyonuna spesifiktir. Her iki allel de 35delG mutasyonu açısından negatif ise 172 bp prob uzunluğuna uyan bölgede herhangi bir pik görülmemektedir. Heterozigot ve homozigot mutasyon varlığında pik görülebilmektedir. Kullandığımız formüle göre kontrol bireylerde mutasyon olmaması nedeniyle pik görülemeyecek kadar küçüktür ve alanı da bununla orantılı olacak şekilde az olmaktadır. Bu yüzden normalde formül gereği 0.7-1.3 aralığı amplifikasyon ve delesyonlar için kullanıldığında homozigot veya heterozigot durumlarda 1.3 katsayısının çok üzerinde değerler çıkmaktadır. Heterozigot ve homozigot mutasyon ayrımı yapmakta zorluk çekilmektedir.

Çalışmamızda heterozigot 35delG mutasyonu olduğu (DNA dizi analizi ile çalışılmış) bilinen bir heterozigot 35delG pozitif kontrol ile hastalar çalışılmıştır. 35delG mutasyon analizi GeneMapper V3.7 programında pik olarak görülebilse de Excel tabanlı program analiziyle hastalara ait örnekler ile 35delG heterozigot mutasyonuna sahip pozitif kontrol bireyleri formüle göre hesaplanmıştır. Bu durumda 172 bp uzunluğuna uyan 35delG probunun pik alanı doz oranı 0.7 ile 1.3 aralığında olduğunda 35delG mutasyonu için heterozigot. Pik alanı doz oranı 1.3 ten büyük olduğunda homozigot 35delG mutasyonu olarak değerlendirilmiştir. 0.7 değerinin altında kalan ise yabancıl tip (mutasyon yok) olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Anadolu Üniversitesi İşitme Engelli Çocuklar Eğitim Merkezinde eğitim görmüş ve görmekte olan nörosensöriyal tip işitme kaybı olan 90 olgu çalışmamıza dahil edilmiştir. Olguların aile öyküsü (akrabalık ve ailede işitme engelli birey varlığı), pedigrı özellikleri, daha önce geçirilmiş enfeksiyon, travma ve ototoksik ilaç kullanım öyküleri incelenmiştir. Fizik muayene ile olgular sendromik açıdan değerlendirilmiş, bir sendromun parçası olabilecek bulgusu veya bulguları olan olgular çalışmaya alınmamıştır. Olguların ayrıntılı fizik muayenesi yapıldıktan sonra EDTA lı tüplere 2cc periferik kan örnekleri alınmıştır.

4. 1. Çalışmamıza Katılmış Olan Olguların Özellikleri:

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 42'si kız, 48'i erkek olup, yaş ortalaması $12,13 \pm 6,1$ olarak saptandı. Olguların işitme kaybı; hafif (20-40 dB), orta(41 dB-70 dB), ileri (71 dB-95 dB) ve çok ileri (95 dB üstü) düzey işitme kaybı olarak sınıflandırıldı. Çok ileri düzeyde işitme kaybı olan 67 (%74.4) olgu hasta grubumuzun en önemli kısmını oluşturmaktadır. İleri düzey işitme kaybı olan 16 (%17.8) olgu, orta düzey işitme kaybı olan 7 (%7.8) olgu çalışmamızda mevcut iken hafif düzey işitme kaybı olan olgu çalışmamızda bulunmamaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Olguların işitme kaybı düzeyine göre sınıflandırılması.

İşitme kaybı düzeyi	Olgu sayısı n	Yüzde %
Çok ileri	67	74.4
İleri	16	17.8
Orta	7	7.8
Toplam	90	100

Çalışmamızdaki olguların aile öyküleri ve pedigri özellikleri incelendiğinde birbirinden bağımsız ailesel otozomal resesif kalıtım kalıbı ile uyumlu işitme kaybı olan 15 olgu tespit edildi (Tablo 4.2).

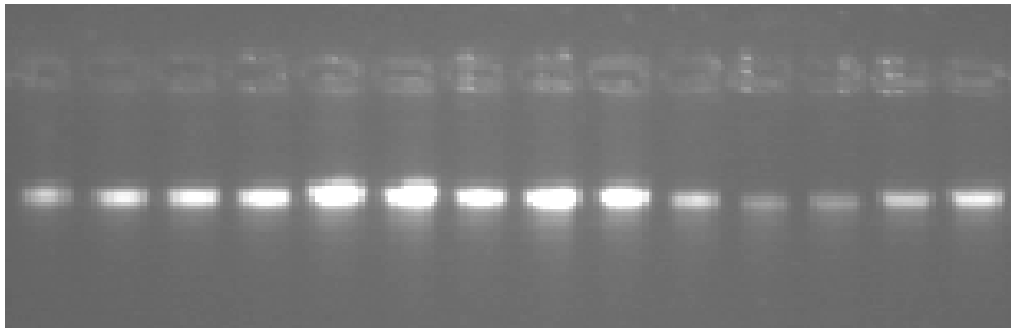
Tablo 4.2 Ailesel otozomal resesif NSSNİK olan bireylerin oranı

Ailesel otozomal resesif NSSNİK	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Var	14	15.6
Yok	76	74.4
Toplam	90	100

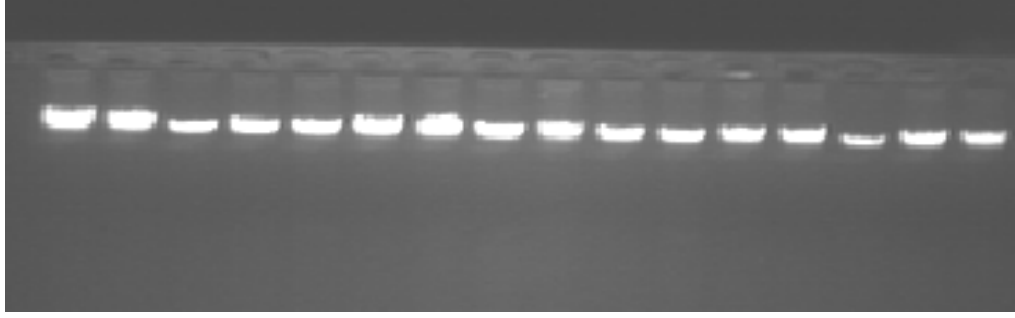
4.2. Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları:

4.2.1 DNA Ekstraksiyonu

Çalışmamızda bulunan 90 olgunun 50 tanesinde Qiagen ekstraksiyon kiti ile manuel olarak DNA elde edilmiştir. Kalan 40 olguda MagNa pure ekstraksiyon kiti ile robotik sistemle DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri %1 lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 4.1, Şekil 4.2). 90 olgunun tümünde başarılı bir şekilde DNA eldesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1: Manuel ekstraksiyon ile elde edilen DNA nın jel görüntüsü.



Şekil 4.2: Robotik sistem ile elde edilen DNA nın jel görüntüsü.

4.2.2 MLPA Analizi

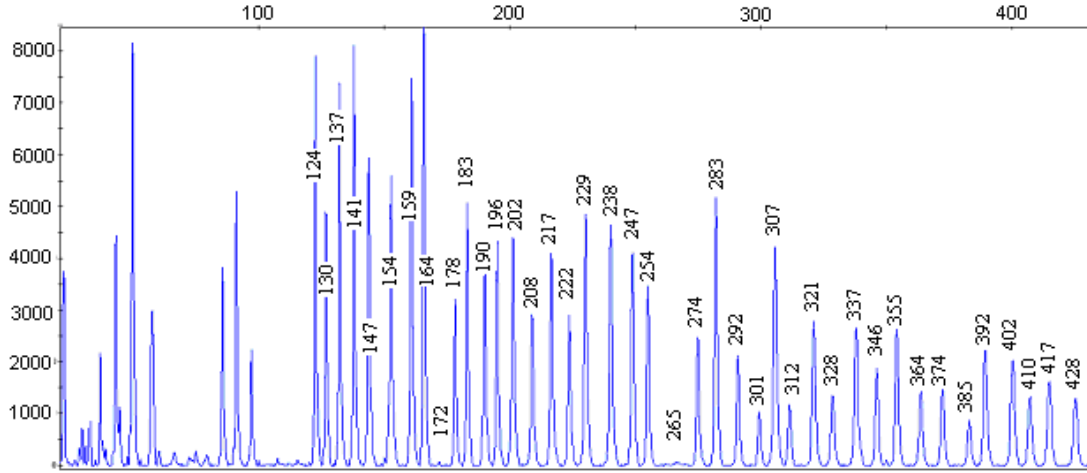
Çalışmamızda bulunan olguların periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde MLPA P163 B1(lot 0208) kiti kullanılarak MLPA yöntemi çalışılmıştır.

ABI 310 kapiller elektroforez cihazına örnekler yüklenmiş ve GeneMapper V3.7 programı ile incelenmiştir.

Kapiller elektroforezde yürütülen fragmentler farklı uzunlukta olduğu için her fragment uzunluğuna göre belli sırayla analiz edilmektedir. Fragmentlerin miktarı ve büyüklükleri GeneMapper V3.7 programında pik olarak görülebilmektedir (Şekil 4.3).

Programdan elde edilen piklerin büyüklükleri (önemli olan pik uzunluğu değil piklerin altında kalan alanın değeridir) kontrol hastaları ile karşılaştırmak ve blok normalizasyon yapmak amacıyla Excel tabanlı Fragment Analyzer V2.0 yazılımına yüklenmiştir.

İşitme kaybı olan hasta olgular ile kontrol olgulardan elde edilen verileri Fragment Analyzer V2.0 yazılımı ile oranlanarak doz hesaplaması yapılmıştır. Doz oranı 0.7'nin altında ise delesyon yönünde, 1.3'ün üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilir.



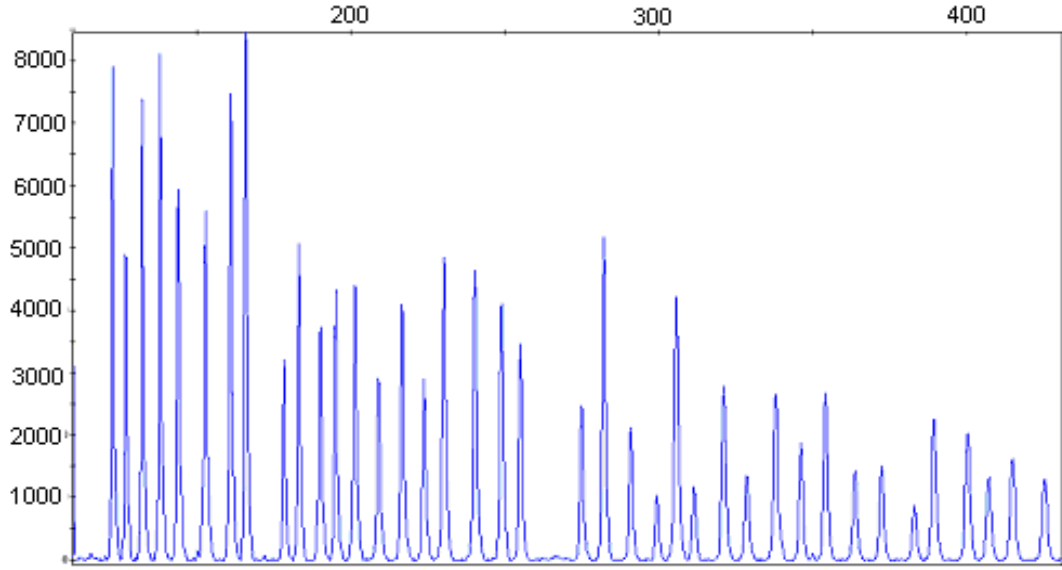
Şekil 4.3: Örnek analiz görüntüsü

DQ (DNA Quantity) fragmentleri ile DNA miktar düzeyi analiz edilebilirken DNA denatürasyon düzeyi DD (DNA Denatürasyon) fragmentleri ile incelenebilmektedir. DQ kontrol pikleri 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda dört pik ile, DD kontrol pikleri ise 88, 92, 96 bp uzunluğunda 3 pik ile değerlendirilmektedir. DQ ve DD pikleri DNA'nın miktarı ve denatürasyonun efektif bir şekilde yapıldığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu piklerin verileri nokta mutasyon, delesyon ve amplifikasyon değerlendirilmelerinde kullanılmamaktadır.

Her MLPA deneyi esnasında işitme kaybı olmayan ve ailesinde işitme kaybı öyküsü bulunmayan üç sağlıklı bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri de kontrol olarak çalışmaya dahil edildi.

GeneMapper V3.7 programı ile piklerin bp uzunlukları görsel olarak değerlendirilebilmektedir. 35delG mutasyonuna spesifik 172 bp uzunluğunda bulunan prob, mutasyona spesifik bir probtur. Olguda mutasyon olmadığı durumda 172 bp uzunluğunda bulunan pik görülmemektedir (Şekil 4.4). 172 bp uzunluğunda alınan belirgin bir pik, 35delG mutasyonu için bilgi verici olmaktadır. IVS1+1 A>G mutasyonuna spesifik 265 bp uzunluğunda bulunan prob ancak mutasyon olması durumunda belirgin bir şekilde görülebilmektedir.

GeneMapper V3.7 programı ile olası non spesifik pikler (Rox piki v.s) elendikten sonra pik alanları Excel programına aktarılarak kaydedilir. Excel formatında kaydedilmiş pik alanları, Excel tabanlı çalışan Fragment Analyzer V2.0 programında değerlendirmeye alınır.



Şekil 4.4: Normal bir olguya ait pik görüntüleri.

Cihaza yükleme yapıldıktan sonra GeneMapper V3.7 software programı ile elde edilen piklerin görüntüsü şekildeki gibidir.

MLPA tekniğinde özellikle mutasyon spesifik piklerin analizinde pikleri görsel olarak değerlendirdikten sonra Excel tabanlı programda analiz edilmelidir.

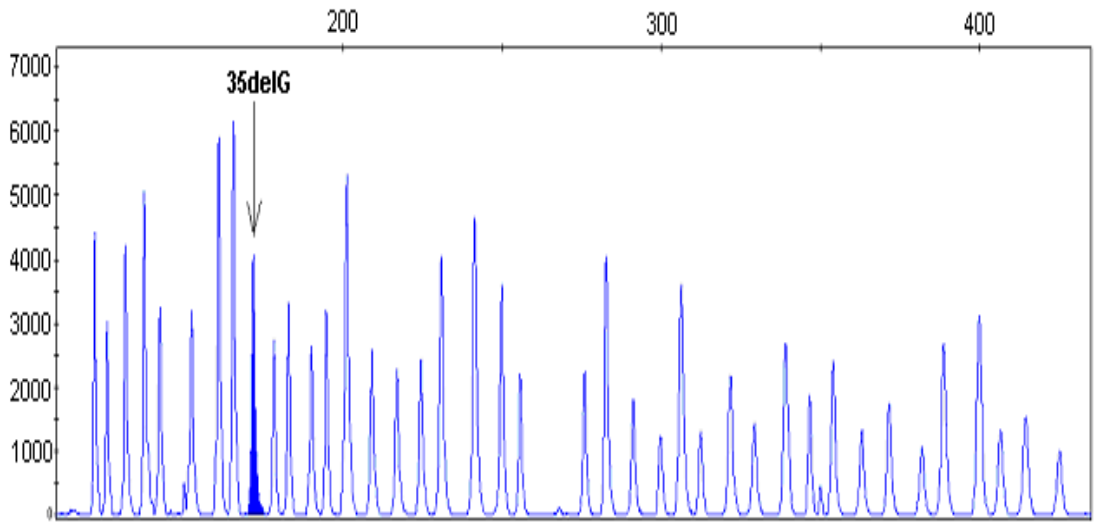
Şekil 4.4 de normal bir bireye ait pikler görülmektedir. Piklerin altında kalan alanlar Excel tabanlı analiz programı ile analiz edilmişlerdir. Normal bir olguya ait fragment analiz tablosu Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3: Normal bir olguya ait doz oranı analiz görüntüsü.

Length	SALSA MLPA probe p163	Chromosomal position	SONUC
124	Reference probe 2782-L02224	2q37	0,9
130	GJB2 Probe 6698-L4752	13q12 (exon 1)	1,26
137	Reference probe 0662-L0158	6p21	1,02
141	ZNF198 Probe 5170-L6282	13q11	0,78
147	WFS1 Probe 5375-L4766	(exon 1)	1,09
154	GJB3 Probe 5366-L4757	(exon 1)	1,08
159	GJB6 Probe 5370-L4761	13q12 (exon 1)	1,11
164	WFS1 Probe 5377-L11414	exon 3	0,95
172	GJB2 Probe 9862-L9257	Exon 2 35delG	1,14
178	GJB2 Probe 5362-L4753	13q12 (exon 1)	1,01
183	WFS1 Probe 5379-L4770	Exon 5	0,99
190	GJB3 Probe 5367-L4758	Exon 2	0,94
196	GJB6 Probe 5371-L4762	13q12 (exon 1)	0,83
202	ZNF198 Probe 5730-L6767	13q12	0,93
208	WFS1 Probe 6699-L4772	Exon 7	1,09
217	Reference probe 0769-L0274	17q21	0,96
222	PSPC1 Probe 2399-L6768	13q12	1,15
229	WFS1 Probe 5376-L4767	Exon2	1,05
238	GJB3 Probe 5368-L4759	Exon 3	1,02
247	GJB2 Probe 6700-L4754	Exon 1	1,03
254	WFS1 Probe 5378-L4769	Exon4	0,94
265	GJB2 Probe 9861-L9255	IVS1+1G>A mut spec	1,23
274	GJB2 Probe 5364-L4755	Exon 2	1,24
283	GJB6 Probe 6701-L4763	Exon2	1,05
292	GJB3 Probe 5369-L4760	Exon 3	1,08
301	GJB6 Probe 5373-L4764	Exon3	1
307	GJB2 Probe 9118-L9202	WT 313del14	1,11
312	WFS1 Probe 5382-L6285	Exon 8	0,88
321	WFS1 Probe 6702-L9985	Exon 6	0,98
328	GJB2 Probe 5365-L4756	Exon 2	0,94
337	GJB6 Probe 5374-L476	Exon 3	0,93
346	Reference probe 2473-L1917	15q21	0,98
355	LATS2 Probe 6704-L3639	13q12	1
364	Reference probe 1234-L0781	10p14	1,06
374	SGCG Probe 3394-L2787	13q12	1,01
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731	13q12	1,09
392	LATS2 Probe 6705-L3638	13q12	1,15
402	PSPC1 Probe 2717-L3608	13q12	1,28
410	Reference probe 2669-L2136	11q23	1,05
417	ZNF198 Probe 5764-L5202	13q12	0,95
428	Reference probe 1439-L0908	2p16	1,15

Heterozigot 35delG Mutasyon Bulguları

Şekil 4.5 de Salsa MLPA P163 B1 kitinde bulunan 172 bp uzunluğuna ait prob ile GJB2 geninin ikinci ekzonundaki 35delG mutasyonunu göstermektedir. 172 bp uzunluğundaki pik heterozigot 35delG mutasyonu olan hastada görülmektedir (Şekil 4.5). Farklı uzunlukta bulunan problemlerin altında kalan alan Excel tabanlı analiz programında analiz edildiğinde 1.3 değerinin çok üzerinde olan bir değer elde edilmiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.5: 35delG heterozigot mutasyonun pik görüntüsü.

GeneMapper V3.7 programında 35delG mutasyonu görsel olarak değerlendirilebilmektedir. Olguların 6 (%6.6) tanesinde 35delG mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.

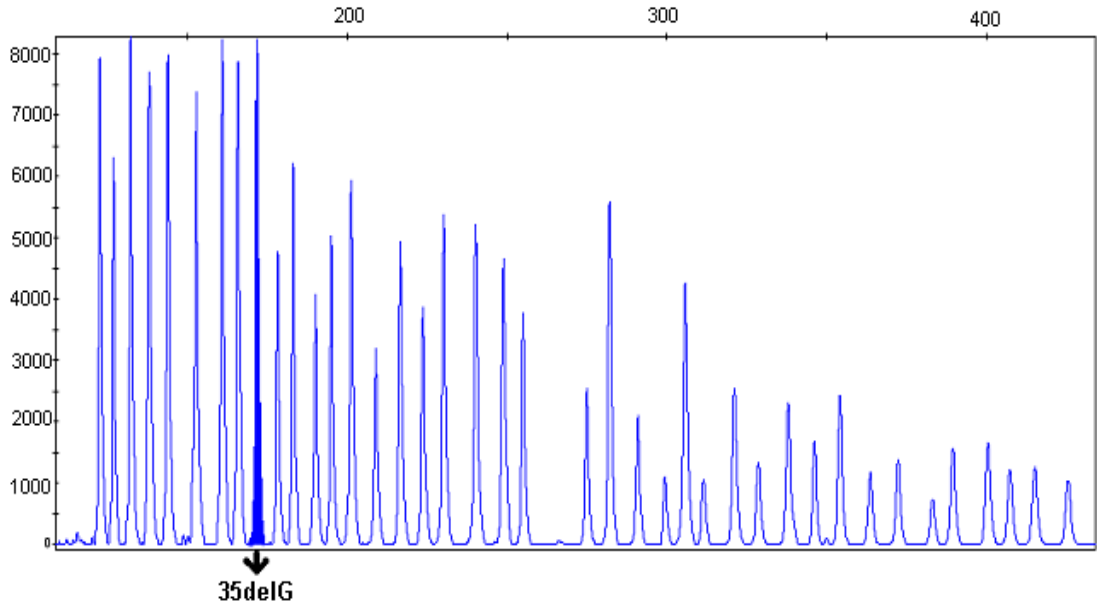
MLPA piklerinin altında kalan alanların hesaplanması durumunda 35delG mutasyonuna spesifik prob için bulunan değer 76,28 dir. Bu değer 1,3 değerinin çok üzerindedir.

Tablo 4.4: 35delG heterozigot mutasyonu olan bir olgunun analiz görüntüsü.

Length	SALSA MLPA probe p163 B1	Chromosomal position	SONUC
124	Reference probe 2782-L02224	2q37	0,98
130	GJB2 Probe 6698-L4752	13q12 (exon 1)	1,2
137	Reference probe 0662-L0158	6p21	1
141	ZNF198 Probe 5170-L6282	13q11	1,07
147	WFS1 Probe 5375-L4766	(exon 1)	1,24
154	GJB3 Probe 5366-L4757	(exon 1)	1,09
159	GJB6 Probe 5370-L4761	13q12 (exon 1)	1,18
164	WFS1 Probe 5377-L11414	exon 3	0,97
172	GJB2 Probe 9862-L9257	Exon 2 35delG	76,28
178	GJB2 Probe 5362-L4753	13q12 (exon 1)	1,04
183	WFS1 Probe 5379-L4770	Exon 5	0,93
190	GJB3 Probe 5367-L4758	Exon 2	1,15
196	GJB6 Probe 5371-L4762	13q12 (exon 1)	1
202	ZNF198 Probe 5730-L6767	13q12	1,03
208	WFS1 Probe 6699-L4772	Exon 7	1,03
217	Reference probe 0769-L0274	17q21	1,05
222	PSPC1 Probe 2399-L6768	13q12	1,09
229	WFS1 Probe 5376-L4767	Exon2	1,02
238	GJB3 Probe 5368-L4759	Exon 3	1,02
247	GJB2 Probe 6700-L4754	Exon 1	1,04
254	WFS1 Probe 5378-L4769	Exon4	1,04
265	GJB2 Probe 9861-L9255	IVS1+1G>A mut spec	1,55
274	GJB2 Probe 5364-L4755	Exon 2	1,21
283	GJB6 Probe 6701-L4763	Exon2	1,05
292	GJB3 Probe 5369-L4760	Exon 3	1,12
301	GJB6 Probe 5373-L4764	Exon3	0,97
307	GJB2 Probe 9118-L9202	WT 313del14	1,2
312	WFS1 Probe 5382-L6285	Exon 8	0,84
321	WFS1 Probe 6702-L9985	Exon 6	0,94
328	GJB2 Probe 5365-L4756	Exon 2	0,88
337	GJB6 Probe 5374-L476	Exon 3	1,03
346	Reference probe 2473-L1917	15q21	0,99
355	LATS2 Probe 6704-L3639	13q12	0,96
364	Reference probe 1234-L0781	10p14	0,96
374	SGCG Probe 3394-L2787	13q12	0,92
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731	13q12	0,94
392	LATS2 Probe 6705-L3638	13q12	1,18
402	PSPC1 Probe 2717-L3608	13q12	1,27
410	Reference probe 2669-L2136	11q23	0,94
417	ZNF198 Probe 5764-L5202	13q12	0,92
428	Reference probe 1439-L0908	2p16	1,03

Homozigot 35delG Mutasyon Bulguları

Salsa MLPA P163 B1 kitinde bulunan 172 bp uzunluğuna ait prob GJB2 geninin ikinci ekzonundaki 35delG mutasyonunu taramaktadır. Normalde olmaması gereken 172 bp uzunluğundaki pik homozigot 35delG mutasyonu varlığında belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.6). Excel tabanlı analiz programında değerlendirildiğinde 1.3 değerinin çok üzerinde olan bir değer elde edilmiştir (Tablo 4.5). GeneMapper V3.7 programında 35delG mutasyonu görsel olarak değerlendirilebilmektedir. Olguların 22 tanesinde (%24.4) 35delG mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır. MLPA piklerinin altında kalan alanların hesaplanması durumunda 35delG mutasyonuna spesifik prob için bulunan değer 134.82 dir. Bu değer 1,3 değerinin çok üzerindedir (Tablo 4.5).



Şekil 4.6: 35delG homozigot mutasyonun pik görüntüsü

Tablo 4.5: 35delG homozigot mutasyonu olan bir olguya ait analiz görüntüsü.

Length	SALSA MLPA probe p163 B1	Chromosomal position	SONUC
124	Reference probe 2782-L02224	2q37	0,89
130	GJB2 Probe 6698-L4752	13q12 (exon 1)	1,22
137	Reference probe 0662-L0158	6p21	1,05
141	ZNF198 Probe 5170-L6282	13q11	0,99
147	WFS1 Probe 5375-L4766	(exon 1)	1,18
154	GJB3 Probe 5366-L4757	(exon 1)	1,02
159	GJB6 Probe 5370-L4761	13q12 (exon 1)	1,14
164	WFS1 Probe 5377-L11414	exon 3	1
172	GJB2 Probe 9862-L9257	Exon 2 35delG	134,82
178	GJB2 Probe 5362-L4753	13q12 (exon 1)	1,02
183	WFS1 Probe 5379-L4770	Exon 5	0,96
190	GJB3 Probe 5367-L4758	Exon 2	1,01
196	GJB6 Probe 5371-L4762	13q12 (exon 1)	0,98
202	ZNF198 Probe 5730-L6767	13q12	0,99
208	WFS1 Probe 6699-L4772	Exon 7	1,03
217	Reference probe 0769-L0274	17q21	1,03
222	PSPC1 Probe 2399-L6768	13q12	1,03
229	WFS1 Probe 5376-L4767	Exon2	1
238	GJB3 Probe 5368-L4759	Exon 3	1,04
247	GJB2 Probe 6700-L4754	Exon 1	1,03
254	WFS1 Probe 5378-L4769	Exon4	0,96
265	GJB2 Probe 9861-L9255	IVS1+1G>A mut spec	1,01
274	GJB2 Probe 5364-L4755	Exon 2	1,18
283	GJB6 Probe 6701-L4763	Exon2	1,08
292	GJB3 Probe 5369-L4760	Exon 3	1,14
301	GJB6 Probe 5373-L4764	Exon3	0,95
307	GJB2 Probe 9118-L9202	WT 313del14	1,12
312	WFS1 Probe 5382-L6285	Exon 8	0,84
321	WFS1 Probe 6702-L9985	Exon 6	1,02
328	GJB2 Probe 5365-L4756	Exon 2	0,94
337	GJB6 Probe 5374-L476	Exon 3	1,03
346	Reference probe 2473-L1917	15q21	0,9
355	LATS2 Probe 6704-L3639	13q12	0,94
364	Reference probe 1234-L0781	10p14	1,13
374	SGCG Probe 3394-L2787	13q12	0,97
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731	13q12	0,91
392	LATS2 Probe 6705-L3638	13q12	0,16
402	PSPC1 Probe 2717-L3608	13q12	1,17
410	Reference probe 2669-L2136	11q23	1,01
417	ZNF198 Probe 5764-L5202	13q12	0,89
428	Reference probe 1439-L0908	2p16	1,05

Çalışmamızda non sendromik sensörinöral işitme kaybı olan 90 olgunun 22 (%24.4) tanesinde homozigot 35delG mutasyonu saptanırken 6 (%6.6) tanesinde heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır. 62 olguda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. GJB2 geninde 35delG mutasyonu saptanırken GJB3 ve GJB6 genlerinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Mutasyon saptanan genler, olgu sayısı ve oranları

	GJB2 (35delG)	GJB3	GJB6
Homozigot mutant	22 olgu (% 24.4)	0	0
Heterozigot mutant	6 olgu (% 6.6)	0	0
Normal	62 olgu (% 59)	90	90

Olgu grubumuzda bulunan 14 olguda ailesel otozomal resesif NSSNİK mevcuttu. Bu 14 olgunun 5 (%35.7) tanesinde homozigot 35delG mutasyonu, 1 (%7.1) tanesinde heterozigot 35delG mutasyonu saptanırken 8 (%57.2) tanesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

35delG Heterozigot Pozitif Kontrol ile Analiz Bulguları:

Salsa MLPA P163 B1 (lot:0208) işitme kaybı kiti ile kontrol olarak işitme kaybı olmayan mutasyon açısından normal bireyler kullanıldığında heterozigot mutant ve homozigot mutant durumlarda 35delG mutasyonuna spesifik 172 bp uzunluğundaki bölgelerde doz oranı olarak 1.3 ten çok yüksek değerler elde edilmektedir (Bkz. Tablo 4.4, Tablo 4.5). Karşılaştırma yapabilmek amacıyla 3 olguya ait değerler Tablo 4.7 de verilmiştir. Aynı örnekler normal kontrol ile değil de 35delG için heterozigot mutasyonu olan pozitif kontrol ile kullanıldığında Tablo 4.8'de görüldüğü gibi 0.7 den düşük olan değer normal bireyi, 0.7 ile 1.3 arasında kalan değer 35delG için heterozigot mutasyonu ve 1.3 ten büyük değer ise 35delG için homozigot mutasyonu göstermektedir.

Tablo 4.7: Normal kontrol ile karşılaştırmalı MLPA analizi

Length	SALSA MLPA probe p163 B1	Chromosomal position	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3
124	Reference probe 2782-L02224	2q37	0,9	0,98	0,89
130	GJB2 Probe 6698-L4752	13q12 (exon 1)	1,26	1,2	1,22
137	Reference probe 0662-L0158	6p21	1,02	1	1,05
141	ZNF198 Probe 5170-L6282	13q11	0,78	1,07	0,99
147	WFS1 Probe 5375-L4766	(exon 1)	1,09	1,24	1,18
154	GJB3 Probe 5366-L4757	(exon 1)	1,08	1,09	1,02
159	GJB6 Probe 5370-L4761	13q12 (exon 1)	1,11	1,18	1,14
164	WFS1 Probe 5377-L11414	exon 3	0,95	0,97	1
172	GJB2 Probe 9862-L9257	Exon 2 35delG	1,14	76,28	134,82
178	GJB2 Probe 5362-L4753	13q12 (exon 1)	1,01	1,04	1,02
183	WFS1 Probe 5379-L4770	Exon 5	0,99	0,93	0,96
190	GJB3 Probe 5367-L4758	Exon 2	0,94	1,15	1,01
196	GJB6 Probe 5371-L4762	13q12 (exon 1)	0,83	1	0,98
202	ZNF198 Probe 5730-L6767	13q12	0,93	1,03	0,99
208	WFS1 Probe 6699-L4772	Exon 7	1,09	1,03	1,03
217	Reference probe 0769-L0274	17q21	0,96	1,05	1,03
222	PSPC1 Probe 2399-L6768	13q12	1,15	1,09	1,03
229	WFS1 Probe 5376-L4767	Exon2	1,05	1,02	1
238	GJB3 Probe 5368-L4759	Exon 3	1,02	1,02	1,04
247	GJB2 Probe 6700-L4754	Exon 1	1,03	1,04	1,03
254	WFS1 Probe 5378-L4769	Exon4	0,94	1,04	0,96
265	GJB2 Probe 9861-L9255	IVS1+1G>A mut spec	1,23	1,21	1,01
274	GJB2 Probe 5364-L4755	Exon 2	1,24	1,21	1,18
283	GJB6 Probe 6701-L4763	Exon2	1,05	1,05	1,08
292	GJB3 Probe 5369-L4760	Exon 3	1,08	1,12	1,14
301	GJB6 Probe 5373-L4764	Exon3	1	0,97	0,95
307	GJB2 Probe 9118-L9202	WT 313del14	1,11	1,2	1,12
312	WFS1 Probe 5382-L6285	Exon 8	0,88	0,84	0,84
321	WFS1 Probe 6702-L9985	Exon 6	0,98	0,94	1,02
328	GJB2 Probe 5365-L4756	Exon 2	0,94	0,88	0,94
337	GJB6 Probe 5374-L476	Exon 3	0,93	1,03	1,03
346	Reference probe 2473-L1917	15q21	0,98	0,99	0,9
355	LATS2 Probe 6704-L3639	13q12	1	0,96	0,94
364	Reference probe 1234-L0781	10p14	1,06	0,96	1,13
374	SGCG Probe 3394-L2787	13q12	1,01	0,92	0,97
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731	13q12	1,09	0,94	0,91
392	LATS2 Probe 6705-L3638	13q12	1,15	1,18	0,16
402	PSPC1 Probe 2717-L3608	13q12	1,28	1,27	1,17
410	Reference probe 2669-L2136	11q23	1,05	0,94	1,01
417	ZNF198 Probe 5764-L5202	13q12	0,95	0,92	0,89
428	Reference probe 1439-L0908	2p16	1,15	1,03	1,05

Tablo 4.7: 35delG heterozigot kontrol kullanıldığında karşılaştırmalı MLPA analizi

Length	SALSA MLPA probe p163	Chromosomal position	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3
124	Reference probe 2782-L02224	2q37	0,98	1,07	0,97
130	GJB2 Probe 6698-L4752	13q12 (exon 1)	1,26	1,09	1,11
137	Reference probe 0662-L0158	6p21	1,11	1,09	1,14
141	ZNF198 Probe 5170-L6282	13q11	0,78	1,07	0,99
147	WFS1 Probe 5375-L4766	(exon 1)	0,94	1,07	1,02
154	GJB3 Probe 5366-L4757	(exon 1)	1,02	1,04	0,96
159	GJB6 Probe 5370-L4761	13q12 (exon 1)	0,95	1,01	0,97
164	WFS1 Probe 5377-L11414	exon 3	1,01	1,04	1,06
172	GJB2 Probe 9862-L9257	Exon 2 35delG	0,01	0,99	1,75
178	GJB2 Probe 5362-L4753	13q12 (exon 1)	1,03	1,06	1,04
183	WFS1 Probe 5379-L4770	Exon 5	1,03	0,97	0,99
190	GJB3 Probe 5367-L4758	Exon 2	0,84	1,02	0,90
196	GJB6 Probe 5371-L4762	13q12 (exon 1)	0,78	0,93	0,92
202	ZNF198 Probe 5730-L6767	13q12	0,94	1,05	1
208	WFS1 Probe 6699-L4772	Exon 7	0,99	0,94	0,94
217	Reference probe 0769-L0274	17q21	0,96	1,06	1,04
222	PSPC1 Probe 2399-L6768	13q12	1,08	1,03	0,97
229	WFS1 Probe 5376-L4767	Exon2	1	0,98	0,96
238	GJB3 Probe 5368-L4759	Exon 3	0,95	0,95	0,97
247	GJB2 Probe 6700-L4754	Exon 1	1	1,01	1
254	WFS1 Probe 5378-L4769	Exon4	0,98	1,09	1
265	GJB2 Probe 9861-L9255	IVS1+1G>A mut spec	1,02	1,23	1,12
274	GJB2 Probe 5364-L4755	Exon 2	1,15	1,01	1
283	GJB6 Probe 6701-L4763	Exon2	0,98	0,98	1,04
292	GJB3 Probe 5369-L4760	Exon 3	0,98	1,02	0,99
301	GJB6 Probe 5373-L4764	Exon3	1,04	1	1,01
307	GJB2 Probe 9118-L9202	WT 313del14	1	1,01	0,81
312	WFS1 Probe 5382-L6285	Exon 8	0,85	0,80	1
321	WFS1 Probe 6702-L9985	Exon 6	0,96	0,93	0,91
328	GJB2 Probe 5365-L4756	Exon 2	0,91	0,85	0,96
337	GJB6 Probe 5374-L476	Exon 3	0,86	0,96	0,85
346	Reference probe 2473-L1917	15q21	0,93	0,94	0,90
355	LATS2 Probe 6704-L3639	13q12	0,96	0,92	1,02
364	Reference probe 1234-L0781	10p14	0,96	0,87	0,89
374	SGCG Probe 3394-L2787	13q12	0,92	0,84	0,86
385	FLJ13046 Probe 6697-L0731	13q12	1,04	0,90	0,82
392	LATS2 Probe 6705-L3638	13q12	0,82	0,83	0,84
402	PSPC1 Probe 2717-L3608	13q12	0,92	0,91	0,94
410	Reference probe 2669-L2136	11q23	0,97	0,88	0,79
417	ZNF198 Probe 5764-L5202	13q12	0,84	0,81	0,88
428	Reference probe 1439-L0908	2p16	0,96	0,86	1,05

5. TARTIŞMA

5.1 Manuel ve Robotik DNA Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen DNA Örneklerinin MLPA Analizlerinde kullanılabilirliğinin karşılaştırılması.

MLPA tekniği son yıllarda amplifikasyon ve delasyonlarla birlikte nokta mutasyonlarını da incelemeye olanak vermesiyle daha fazla sayıda laboratuvarın kullandığı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

MLPA yöntemi hibridizasyon-ligasyon-PCR ve kapiller elektroforez yardımı ile fragman analizi olmak üzere 4 aşamada gerçekleşmektedir. Elde edilen fragmentlerin kalitesi ve analiz edilebilirliği DNA miktarına bağlıdır. Genel olarak 50-500ng arasında DNA örneği analiz için yeterlidir. DNA miktarının çalışılan örneklerde bir birine yakın miktar ve kalitede olması iyi bir analiz için önemlidir.

Çalışmamızda periferik kandan farklı DNA elde etme yöntemlerinin MLPA yönteminin uygulanabilirliğine bir etkisi olup olmadığını inceledik. 90 olgunun 50 sinde DNA eldesi manuel olarak Qiagen ekstraksiyon kiti ile yapıldı. Kalan 40 olguda Roche MagNa pure ekstraksiyon robotu kullanılarak DNA elde edildi. Ekstraksiyon yapıldıktan sonra örnekler %1 lik agaroz jelde yürütüldü.

Örnekler MLPA yöntemi ile analiz edildiğinde piklerin kalitesi ve yüksekliği her iki grupta incelendi. Manuel ekstraksiyon ile robotik sistemle DNA ekstraksiyonu sırasında MLPA yönteminin uygulanabilirliği ve analizi açısından fark görülmedi. Çalışmaya alınan 90 olguda başarılı bir şekilde MLPA analizi yapıldı ve hiçbir olguda tekrar DNA ekstraksiyonunu gerektirecek bir durumla karşılaşılmadı.

5.2 GJB2, GJB3 ve GJB6 Genlerindeki Mutasyonların Literatür ile Tartışılması

NSSNİK olan bireylerde genetik inceleme hastalığın etyolojisini ortaya koymak açısından önemlidir. Literatür taramasında şuana kadar bir çalışmada MLPA yöntemi NSSNİK olan bireylerde kullanılmıştır. Gürtler ve ark. (20) tarafından yapılmış olan bu çalışmada NSSNİK lı 32 olguda GJB2, GJB3 ve GJB6 gen mutasyonları DNA dizi analizi yöntemi ile dizilenmiş ayrıca bu üç gen Salsa MLPA P163 kiti ile incelenmiştir. Çalışmalarında kullanmış oldukları MLPA probu nokta mutasyonları içermeyen sadece delesyon ve amplifikasyonları analize imkan tanıyan

bir prob olduğu için (MLPA firmasının ürettiği ilk işitme kaybı prob kiti) bir olguda MLPA yöntemi ile GJB6 geninde del(GJB6-D13S1830) mutasyonu saptamışlardır. Aynı hastada DNA dizi analizi ile 35delG mutasyonu da saptanmış ve MLPA yönteminin GJB6 genindeki büyük delesyonları göstermek için kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda non-sendromik sensörinöral işitme kayıplı bireylerin büyük çoğunluğunda etkin olan GJB2 geninde 35delG mutasyonu homozigot (%24.4) ve heterozigot (%6.6) olarak saptanırken GJB3 ve GJB6 genlerinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz Salsa MLPA P163 B1 (lot:0208) işitme kaybı kiti aynı anda nokta mutasyon (35delG, IVS1+1 G>A, 313del14 mutasyonları) delesyon ve amplifikasyonların incelenmesine olanak tanımaktadır. Çalışmamızda saptamış olduğumuz 35delG mutasyonu NSSNİK olan olgu grubunda ilk defa MLPA yöntemi ile saptanmıştır. Bu nedenle MLPA analiz sonuçlarımız literatürdeki diğer yöntemlerle elde edilen veriler ile tartışılmıştır.

5.2.1 35delG Mutasyonlarının Literatür ile Tartışılması

Ülkemizde ve Dünya da NSSNİK genetiği ile ilgili çalışmalar değerlendirildiğinde 35delG mutasyonu NSSNİK nın genetik etyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. GJB2 geninde bulunan mutasyonların yaklaşık yarısını 35delG mutasyonu oluşturmaktadır (58,80).

İşitme kaybına neden olan 35delG mutasyonunun görülme sıklığı ırklara ve popülasyonlara göre büyük farklılıklar göstermektedir. Dünyada farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda 35delG homozigot mutasyonu farklı oranlarda saptanmıştır. Amerikada yapılan 3 farklı çalışmada 35delG homozigot mutasyonunu Kenna MA ve ark. %2, Prasad S ve ark. %14.8 ve Kelley PM ve ark. %24.1 oranında saptamışlardır (20,31,59). Lui Xz ve ark. (45) tarafından Çin de yapılan bir çalışmada 118 olgunun hiç birinde homozigot 35delG mutasyonu saptanmamıştır. NSSNİK olan bireylerde Japonya, Gana, Hindistan, Kore, Pakistan, Tayvan ve Tayland da yapılan çalışmalarda homozigot 35delG mutasyonu rapor edilmemiştir (58).

Homozigot 35delG mutasyon oranı popülasyonlarda %1.8 (Danimarka, Gronskov K ve ark.) ile %40 (Slovakya, Minarik G ve ark.) arasında değişmektedir.

Aynı ülkede farklı populasyonlar arasında yapılan çalışmalarda çok büyük farklar ortaya çıkabilmektedir. Minarik G ve arkadaşları tarafından 2005 yılında Slovakya'da yapılan bir çalışmada %40 oranında homozigot 35delG mutasyonu saptanırken aynı çalışma grubu tarafından 2003 yılında doğu Slovakya'da roman populasyonunda yapılan bir çalışmada homozigot 35delG mutasyonu NSSNİK olan bireylerde %1.9 oranında saptanmıştır (58).

Tekin M ve ark (80) yapmış olduğu bir çalışmada Ankara, Amasya, Afyon, ve Denizli illerinde işitme engelliler okullarında eğitim gören prelingual başlangıçlı NSSNİK olan 371 birey GJB2 geninin ikinci ekzonunda bulunan mutasyonlar açısından araştırılmıştır. Toplam 371 olgunun 56 (%15) sında homozigot 35delG mutasyonu, 29 (%7.81) tanesinde heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır. Tekin M ve ark (82) Türkiye'de farklı illerde 35delG mutasyonunu %5 ile %53 arasında değişen oranlarda saptamışlardır.

Baris İ ve ark.nın (3) yapmış oldukları bir çalışmada NSSNİK 235 olgu 35delG mutasyonu açısından araştırılmıştır. Homozigot 35delG mutasyonu 48 (%20.4) olguda saptanırken 5 (%2.1) olguda heterozigot olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda 90 olgunun 22 (%24.4) sinde homozigot 35delG mutasyonu saptandı. Heterozigot 35delG mutasyonu ise 6 (%6.6) olguda saptandı. Çalışmamızda saptadığımız 35delG mutasyon görülme oranları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Ailesel Otozomal Resesif NSSNİK Olan Bireylerde 35delG Mutasyonlarının Karşılaştırılması

GJB2 geninde 35delG mutasyonu her iki allelde mutant olduğu durumda sensörinöral işitme kaybına neden olmaktadır. Olgu grubumuzda bulunan ailesel otozomal resesif kalıtım gösteren bireylerde saptanan mutasyonlar literatür ile tartışılmıştır. Çalışmamızda bulunan 90 olgunun 14 tanesinde (%15.6) ailesel otozomal resesif NSSNİK mevcuttur.

Uyguner O ve ark. (84) tarafından yapılan bir çalışmada Ailesel otozomal resesif kalıtım kalıbına uyan NSSNİK olan 60 birey GJB2 geninde 35delG mutasyonu açısından taranmıştır. 35delG homozigot mutasyonu 13 ailede %21.7

oranında saptanmıştır. 35delG heterozigot mutasyonu ise 2 (%3.3) ailede saptanmıştır.

Tekin M ve ark.nın (82) yapmış olduğu bir çalışmada ailesel otozomal resesif NSSNİK olan 154 birey GJB2 geni 2.ekzonunda bulunan mutasyonlar açısından taranmıştır. 27 olguda (%17.5) 35delG homozigot mutasyon üç olguda (%1.9) heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır.

Bayazit ve ark.nın (4) yaptıkları çalışmada ailesel otozomal resesif kalıtım kalıbına uyan 14 NSSNİK birey çalışmaya alınmış bir (%7.1) olguda 35delG homozigot mutasyonu 1 olguda (%7.1) 35delG heterozigot mutasyonu tespit edilmiştir.

Kalay E ve ark.nın (26) yapmış oldukları bir çalışmada ise 93 ailesel otozomal resesif NSSNİK birey 35delG mutasyonları açısından incelenmiştir. Homozigot 35delG mutasyonu 20 olguda (%21.5), heterozigot 35delG mutasyonu ise dört (%4.3) olguda saptanmış.

Çalışmamızda Ailesel otozomal resesif NSSNİK olan 14 olgunun beş (%35.7) tanesinde homozigot 35delG mutasyonu saptanırken bir (%7.1) tanesinde heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır. Kalan sekiz (%57.2) olguda ise mutasyon saptanmamıştır. 35delG homozigot mutasyonu Ailesel otozomal resesif NSSNİK olan bireylerde %35.7 oranında saptanmıştır ve bu oran genel hasta grubumuzdaki mutasyon oranına (%24.4) göre daha yüksek bir değerdir. Bu veri NSSNİK olan bireylerde ailesel öykünün ve pedigrî özelliklerinin önemli olduğunu göstermektedir.

İşitme Kaybı Düzeyi ile 35delG Mutasyonlarının Karşılaştırılması

Çalışmamızdaki olgu grubunda işitme kaybı düzeyi çok ileri, ileri ve orta düzey olarak sınıflandırıldı. Çok ileri işitme kaybı olan olgu sayısı 67 (%74.4), ileri düzey işitme kaybı olan olgu sayısı 16 (%17.8) ve orta düzey işitme kaybı olan olgu sayısı 7 (%7.8) idi. Olgu grubumuzda homozigot 35delG mutasyonu çok ileri düzey işitme kaybı olan 21 olguda ve ileri düzey işitme kaybı olan bir olguda saptandı. Heterozigot 35delG mutasyonu ise sadece çok ileri düzey işitme kaybı olan altı olguda saptandı.

İleri düzey ve çok ileri düzey işitme kaybı olan bireyler 35delG mutasyonunun saptandığı işitme kaybı seviyeleri olarak dikkat çekmektedir. Özellikle çok ileri derece işitme kaybı olan bireylerde 35delG mutasyonunun incelenmesi önem kazanmaktadır.

5.2.2 GJB2 (IVS1+1, G>A, 313del14 mutasyonları), GJB3 ve GJB6 Genlerindeki Mutasyonların Literatür ile Tartışılması.

Çalışımızda 90 olguda GJB2 geninde kodlamayan ekzonda IVS1+1 G>A ve 2. ekzonda 313del14 (310del14 olarak gösterilebilir) nokta mutasyonları MLPA yöntemi ile taranmıştır. Her iki nokta mutasyonu da çalışma grubumuzda saptanmamıştır. GJB3 ve GJB6 genlerinin MLPA yöntemi ile analizi sonucunda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. GJB3 geninde bugüne kadar sadece nokta mutasyonlar tanımlanmış büyük delesyonların tanımlandığı bir rapora ulaşamamıştır (83).

Uyguner ve ark.nın (84) yapmış oldukları bir çalışmada 60 ailesel otozomal resesif NSSNİK birey incelenmiş ve bir ailede GJB3 geninde C667A (P223T) mutasyonu literatürde ilk defa saptanırken GJB6 geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Kalay E ve ark.(80) 93 ailesel otozomal resesif NSSNİK olan bireyin bir tanesinde 310del14 nokta mutasyonu homozigot olarak saptanırken heterozigot 310del14 mutasyonu bir olguda saptanmış, GJB6 geni 93 olguda incelenmiş ve herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Tekin ve ark.nın (26) inceledikleri 371 vakanın 1 tanesinde heterozigot 310del14 mutasyonu rapor edilmiştir.

Sırmacı A ve ark.nın (72) 295 NSSNİK olan bireyi GJB2 genindeki mutasyonlar açısından incelemişlerdir. GJB2 geni ikinci ekzonu dizi analizi sonucunda 15 olguda heterozigot 35delG mutasyonu ve bir olguda heterozigot W24X mutasyonu saptamıştır. Heterozigotluk saptanan toplam 16 olguda GJB2 geni kodlanmayan ekzondaki IVS1+1 G>A mutasyonu araştırılmış ve 8 inde IVS1+1 G>A mutasyonu saptanmıştır. GJB6 genine ait herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun bugüne kadar saptanmamış olmasına rağmen diğer popülasyonlarda ilgili gen mutasyonu

rapor edilmiştir. GJB2 geni ile GJB6 genleri DFNB1 lokusunda bulunduğu için GJB2 geninde heterozigot mutasyon saptanması durumunda, diğer allelde GJB6 geninde mutasyon olabileceğini düşündürmüştür ve araştırmalar bu yönde ağırlık kazanmıştır. Castillo ve ark.nın (72) yapmış olduğu çalışmalarda Avusturalya popülasyonunda GJB2 geni için heterozigot mutasyonu olan 29 bireyin iki tanesinde, Fransa'da GJB2 geni için heterozigot mutasyonu olan 60 bireyin 23 tanesinde, İspanya'da GJB2 geni için heterozigot mutasyonu olan 68 bireyin 29 tanesinde GJB6 D13S1830 delesyonu saptanmıştır.

Olgu grubumuzda del(GJB6-D13S1830) mutasyonu saptanmamıştır. Ülkemiz popülasyonunda yapılan önceki çalışmalarda da bu mutasyonun saptanmamış olması 35delG mutasyonu gibi del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun da belli popülasyonlara özgü olduğunu düşündürmektedir. Aynı şekilde kendi çalışmamızda saptanmamış olsa da Türkiyede yapılan çalışmalarda nadir olarak görülen IVS1+1 G>A ve 310del14 mutasyonlarının bölgesel farklılığa bağlı olarak görülebileceğini düşündürmüştür.

5.3 MLPA Yönteminin NSSNİK Olan Bireylerde Kullanılabilirliği, Avantaj ve Dezavantajları

MLPA multipl gen dozaj analizi yapmamıza imkan tanıyan hibridizasyon, ligasyon, PCR ve analiz basamaklarından oluşan bir yöntemdir. İlk MLPA problemleri delesyon ve amplifikasyonları araştırmak amaçlı kullanılsa da son zamanlarda MLPA yöntemi ile nokta mutasyona spesifik problemler ile nokta mutasyonlar da incelenebilmektedir. Bu sayede MLPA yönteminin analiz edilebilirliği tek baz seviyesine inebilmektedir.

MLPA yöntemi uygulamamız esnasında 16 saatlik hibridizasyonda 8 mikrolitrelik ürünün buharlaşmaması için mineral yağ kullanıldı. Daha sonra ligasyon basamağında mineral yağın alınması durumunda örnek kaybı gerçekleştiği için mineral yağ alınmadan striplerin dibinde bulunan örnek sıvılarına temas edecek şekilde ligasyon ürünleri eklendi ve çalışmaya devam edildi. Örnek kaybı olmadığı için yeterli miktarda ligasyon ürünü ile PCR reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

35delG mutasyonunu gösteren MLPA probu nokta mutasyon spesifik bir probtur. Mutasyon olması durumunda pik alınmaktadır. GeneMapper V3.7 programı ile incelendiğinde görsel olarak homozigot pik daha büyük ve pik altında kalan alanının heterozigota göre daha geniş olduğu gözlenebilmektedir. Bu görsel olarak yapılmakta ve 35delG heterozigot/homozigot mutasyon ayırımı için her zaman geçerli olmayabilmektedir. GeneMapper V3.7 ile pik alanları elde edildikten sonra bu alanların hasta ve kontroller ile karşılaştırılması durumunda 35delG mutasyon spesifik probu için 0.7-1.3 aralığı geçerli olmamaktadır. Çünkü MLPA yönteminde delesyon ve amplifikasyonlar araştırıldığında hastalarda bulunan değerler negatif kontrol olarak kullanılan normal bireylerdeki değerler ile karşılaştırılmaktadır. 35delG mutasyonu negatif kontrol olan normal bireylerde bulunmadığı için pik alanı yok denecek kadar az bir değerde olmaktadır. Heterozigot veya homozigot mutasyon saptanması durumunda hastaya ait pik alanı kontrole ait pik alanı ile oranlandığında 1.3 değerinin çok üzerinde (çalışmamızda 20 ila 450 arasında saptandı) çıkmaktadır.

Heterozigot mutasyon ile homozigot mutasyon ayırımı yapılmasında güçlük çekilmektedir. Çalışmamızda bu sorunu aşmak için heterozigot 35delG mutasyonu DNA dizi analizi yöntemi ile saptanmış heterozigot pozitif kontrol kullanıldı. Çalışılan hasta grubunda üç normal birey kullanılırken bir tane 35delG heterozigot mutasyonu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Delesyon ve amplifikasyonlar için negatif kontroller ile analiz yapıldıktan sonra 35delG mutasyonuna spesifik probta anormal değerler saptanan (GeneMapper V3.7 programında 35delG mutasyonuna spesifik probun pikinde yükselme, pik alanında artmış olan) örnekler 35delG mutasyonu için heterozigot pozitif kontroller kullanılarak hesaplandı. Böylece hastaya ait 35delG mutasyonuna spesifik proba ait değer 0.7 ile 1.3 arasında bulunduğu hasta heterozigot mutant olarak değerlendirildi. 35delG heterozigot mutasyonu olan pozitif kontrol kullanıldığı için iki değer birbirine yakın çıkması durumu gerçekleşmiştir. Doz oranı 1.3 ten yüksek bulunduğu homozigot 35delG mutasyonu olarak ve 0.7 den küçük bulunduğu normal olarak değerlendirildi. Kullandığımız bu yöntem homozigot ve heterozigot 35delG mutasyonu olduğu DNA dizi analizi yöntemi ile bilinen örneklerde de denendi ve başarılı sonuçlar alındı.

NSSNİK olan bireylerde GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerinin kullandığımız MLPA kiti ile incelenmesi literatürde daha önce bildirilmemiştir. Kullanmış olduğumuz MLPA prob miksi GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerinde delesyon amplifikasyon ve nokta mutasyonları (GJB2 geninde IVS1+1 G>A, 310del14 ve 35delG) tek bir reaksiyonla gösterebilmektedir.

Çalışmamızda sadece 35delG mutasyonu saptanmıştır. 35delG mutasyonu gibi diğer mutasyonlar da populasyonlarda çok farklı oranlarda görülebilmektedir. Salsa MLPA P163 B1 prob miksi populasyonumuzda 35delG den sonra daha az sıklıkla görülen GJB2 geninde bulunan delE120, W24X gibi mutasyonları göstermemesi bir dezavantaj oluşturmaktadır.

MLPA yöntemi aynı anda 40 tan fazla bölgenin analizine imkan tanıyan hızlı ve pratik bir yöntem avantajı ile ön plana çıkarken İşitme kaybı olan bireylerde görülen mutasyonlar populasyonlara göre farklılıklar göstermesinden dolayı araştırma yapılacak populasyona özgü mutasyonları inceleyen problemlerin kullanılması veya prob dizaynı yapılarak prob miks oluşturulması ile yöntemin kullanılabilirliği artacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda NSSNİK olan bireylerde GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerinin MLPA yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Kullanmış olduğumuz prob miksi ile MLPA yöntemi bu alanda ilk defa kullanılmıştır. İşitme kaybı sinirsel olan ve beraberinde herhangi bir sendromun eşlik etmediği 90 olgu çalışmamıza alınmış ve elde edilen veriler literatür ile tartışılmıştır. Çalışmamızda sonuç olarak;

- 1) MLPA yöntemi NSSNİK olan bireylerde başarı ile kullanılabilir.
- 2) Manuel ekstraksiyon yöntemi ile robotik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA örneklerinden yapılan MLPA analizinde fark saptanmamıştır.
- 3) 35delG mutasyonu NSSNİK lı bireylerde önemli bir yer tutmaktadır.
- 4) Olgu grubumuzdaki GJB2 genindeki 35delG mutasyon oranı literatür ile uyumlu bulunmuştur.
- 5) Olguların işitme kaybı seviyesinin çok ileri düzey olması ve olgularda aile öyküsünün bulunması durumunda 35delG mutasyonu yüzde olarak daha yüksek oranda görülmektedir.
- 6) NSSNİK olan bireylerde MLPA deneyi planlandığında 35delG mutasyonunun heterozigot veya homozigotluk durumunun belirlenmesi için sağlıklı negatif kontrol ile birlikte 35delG mutasyonu açısından heterozigot pozitif kontrol kullanılması yararlı olacaktır.
- 7) GJB2, GJB3 ve GJB6 genlerindeki mutasyonlar popülasyonlara göre farklılıklar gösterdiği için gereken durumlarda popülasyona özgü mutasyonları incelemeye olanak veren prob dizaynı ile daha iyi veriler elde edilebilecektir.

KAYNAKLAR

- 1) Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet* 2001; 69:25-34
- 2) Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH, Murcia CL, Wayne S, Srisailpathy CR, Lowry RB, Knaus R, Van Laer L, Bernier FP, Schwartz S, Lee C, Morton CC, Mullins RF, Ramesh A, Van Camp G, Hagemen GS, Woychik RP, Smith RJ. Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1709-18
- 3) Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet* 2001; 60:452-5.
- 4) Bayazit YA, B.B. Cable, O. Cataloluk, C. Kara, P. Chamberlin, R.J. Smith, M. Kanlikama, E. Ozer, E.A. Cakmak, S. Mumbuc and A. Arslan, GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2003, 67; 1331–1335.
- 5) Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, et al. Recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet* 2000; 26: 56- 60
- 6) Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A, et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 2001; 27:108-112
- 7) Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, et al. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic

- mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 2001; 68:26-37
- 8) Brown MR, Tomek MS, Van Laer L, et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA13, maps to chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1997; 61:924-7.
 - 9) Canalis RF, Lambert P.R, The ear: comprehensive otology. In: Knopp D, Haris S, Verriest H, editors, Philadelphia ; Lippincott Williams & Wilkins; 2000
 - 10) Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, Kunst H, Schatteman I, Van Velzen D, et al. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1321-8.
 - 11) Çapaloğlu NŞ, Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2006;13(2)/ 37-46
 - 12) De Kok YJ, Van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995;3;267(5198):685-8.
 - 13) De Kok YJ, Vossenaar ER, Cremers CW, et al. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. *Hum Mol Genet* 1996; 5(9):1229-35.
 - 14) Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243-9.
 - 15) Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus

in hearing impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2003;73:1452–8.

- 16) Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of the childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999; 353:1298-303.
- 17) Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997;17(4):411-22.
- 18) Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23:16-8.
- 19) Gunther B, Steiner A, Nekahm-Heis D, Albegger K, Zorowka P, Utermann G, Janecke A. The 342-kb deletion in GJB6 is not present in patients with non-syndromic hearing loss from Austria. *Hum Mutat* 2003;22:180.
- 20) Gurtler N, Egenter C, Nemya Bosch N, Plasilova M. Mutation analysis of the Cx26, Cx30, and Cx31 genes in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Acta Otolaryngol.* 2008 Mar 12:1-7.
- 21) Guyton & Hall. *Tibbi Fizyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi. 1996
- 22) Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis. *J Med Genet* 2000; 37(1):50-1.
- 23) Joensuu T, Hamalainen R, Yuan B, Johnson C, Tegelberg S, Gasparini P, Zelante L, Pirvola U, Pakarinen L, Lehesjoki AE, la Chapelle Ad, Sankila EM.. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 673-84

- 24) Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998;7:1589-97
- 25) Kalay E, Caylan R, Karagüzel A. Non-Sendromik İşitme Kayıpları Genetiğindeki gelişmeler. *Otoscope* 2004; 4:130-138
- 26) Kalay E, Caylan R, Kremer H, Brouwer APM, Karagüzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hearing Research* 2005;203:88-93
- 27) Keats BJB, Corey DP. The Usher syndromes. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 1999; 89: 158-166
- 28) Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, Usami S, Kimberling WJ. Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 1999; 62: 172-176
- 29) Kelley PM, Harris DJ, Comer BC et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 792–799.
- 30) Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3.
- 31) Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 1037–1042.
- 32) Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, et al. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is

expressed in the inner ear and the central auditory pathway. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:4333- 8.

- 33) Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. Gene 1997; 199: 165-171.
- 34) Koç C. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyun cerrahisi Güneş kitabevi. 2004
- 35) Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. Cell 1999; 96(3):437-46.
- 36) Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. Am J Med Genet 2000; 17;90(2):141-5.
- 37) Kudo T, Ikeda K, Qshima T, et al. GJB2 (Connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. Otology & Neurotology 2001; 22:858-8.
- 38) Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications. Am J Hum Genet 2000; 66: 1715-1720
- 39) Lawani AK, Goldstein JA, Kelley MJ et al. Human Nonsyndromic Hereditary Deafness DFNA17 is Due to a Mutation in Nonmuscle Myosin MYH9. Am J Hum Genet 2000; 67:1121-8.
- 40) Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP. The Mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. J Biol Chem 1997; 28;272(13):8791-801.

- 41) Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenazi jews. *Hum Mutat* 2001;18:460
- 42) Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 1999; 1;61(3):243-58.
- 43) Liu XZ, Walsh J, Mburu P, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997;16(2):188-90.
- 44) Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet* 1997;17(3):268-9.
- 45) Liu XZ, Xia XJ, Ke XM et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002: 111: 394–397.
- 46) Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, Angeli S, Telischi FF, Nance WE, Balkany T, Xu LR. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002;111:394–7
- 47) Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, et al. Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2000; 1;9(1):63-7.
- 48) Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R, et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2001; 15;10(9):947-52.

- 49) Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, et al. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1237-43.
- 50) Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46: 486–91.
- 51) McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet* 1999; 23(4):413-9.
- 52) Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, Gros D, Yamasaki H, Mesnil M. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 1996;72:185-186
- 53) Morell RJ, Kim HJ, Hood JL, et al. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Eng J Med* 1998; 19:1500-5.
- 54) Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, et al. An alpha tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual nonsyndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 1999; 8(3):409-12.
- 55) Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997; 15:186-9.
- 56) Online Mendelian Inheritance in Man. <http://ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/23/07/2008>

- 57) Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 2002;10:72–6
- 58) Petersen MB, Willems PJ Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006; 69: 371–392
- 59) Prasad S, Cucci RA, Green GE et al. Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645–648delTAGA). *Hum Mutat* 2000; 16: 502–508.
- 60) Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *JMed Genet* 1997; 34: 656-65
- 61) Reardon W, Coffey R, Chowdhury T, Grossman A, Jan H, Britton K, Kendall-Taylor P, Trembath R. Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J Med Genet* 1999; 36: 595-8
- 62) Reardon W, Mahoney CF, Trembath Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: radiological marker of pendred syndrome, and the PDS gene. *QJM* 2000; 93: 99-104
- 63) Richard G, Smith LE, Bailey RA, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet* 1998; 20(4):366-9.
- 64) Richard G, White TW, Smith LE, et al. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 1998; 103(4):393-9.
- 65) Ross MH, Kaye GI, Pawlina W, *Histology: a text atlas*, 4th edition, Philadelphia,; Lippincott Williams & Wilkins; 2003

- 66) Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: e57.
- 67) Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, et al. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997; 17:267-8.
- 68) Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11(5):387-94.
- 69) Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; 21: 440-3.
- 70) Scott DA, Wang R, Kreman TM, et al. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; 21(4):440-3.
- 71) Ses Dalgalarının özellikleri ve sesin algılanması. <http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/index.htm> 27/07/2008
- 72) Sirmaci A, Akcayoz DD, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J Genet*. 2006 Dec;85(3):213-6
- 73) Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA, Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet*; 2003, 40: 907– 912.

- 74) Smith RJH, Berlin CI, Hejtmancik JF, Keats BJB, Kimberling WJ, Lewis RA, Möller CG, Pelias MZ, Tranebjaerg L. Clinical diagnosis of the Usher syndromes. *Am J Med Genet* 1994; 50: 32-38
- 75) Snell RS. Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Klinik Anatomi. Beşinci baskı. Nobel tıp kitabevi. 1998
- 76) Sobe T, Vreugde S, Shahin H, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106 (1):50-7.
- 77) Staubesand J, Sobotta İnsan anatomisi atlası. Çeviri; Arıncı K, Türkçe 3.baskı, Urban & Schwarzenberg ,1990
- 78) Steel K.P. One connexin two diseases, *Nature genet* 1998; 20;319-320
- 79) Tekin, M., Arnos, KS., Pandya, A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001;358 (9287): 1082-1090.
- 80) Tekin, M., Bogoclu, G., Arıcan, ST., Orman, MN., Tastan, H., Elsayed, S., Akar, N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clinical Genetics*, 2005: 67 (3): 273-273.
- 81) Tekin M, Cin Ş. İşitme kaybının genetik özellikleri., Ankara üniversitesi Tıp fakültesi mecmuası. 2002;3:211-216
- 82) Tekin, M., Duman, T., Bogoclu, G., Incesulu, A., Comak, E., Ilhan, I., Akar, N. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Human Mutation*, 2003;21: 552-553.
- 83) The Connexin-deafness homepage <http://davinci.crg.es/deafness/> 25/07/2008

- 84) Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, Yuksel-Apak M, Wollnik B. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet.* 2003;64(1):65-9.
- 85) Vahava O, Morell R, Lynch ED, et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 1998; 20;279(5358):1950-4.
- 86) Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 1998;19(1):60-2.
- 87) Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, Liu XZ, Gal A, Salem N, Mansour A, Blanchard S, Kobayashi I, Keats BJ, Slim R, Petit C.. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet* 2000; 26:51-55
- 88) Wang Q, Bowles NE, Towbin JA. The molecular basis of long QT syndrome and prospects for therapy. *Mol Med Today* 1998; 4:382-8
- 89) Weil D, Kussel P, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 1997;16(2):191-3.
- 90) Willems PJ. Review:Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; (342):1101-28.
- 91) www.mlpa.com 26/07/2008

- 92) Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998 ;20(4):370-373.

- 93) Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D.Agruma L, Govea N, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6(9):1605-9.