

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**OTOZOMAL RESESİF İŞİTME KAYIPLI AİLELERDE  
OTOZİGOZİTE TARAMASI İLE *MYO7A* MUTASYONLARININ  
GÖSTERİLMESİ**

Duygu Duman

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Nejat AKAR

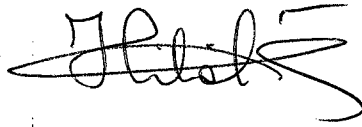
2011-ANKARA

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilimdalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir. Tez savunma tarihi 23/02/2011'dir.

Prof. Dr. Nejat AKAR



Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ



Doç. Dr. Sümer ARAS



Doç. Dr. Seyra ERBEK



Doç. Dr. Erkan YILMAZ



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK  
Enstitü Müdürü

# Otozomal Resesif İşitme Kayıplı Ailelerde Otozigozite Taraması ile *MYO7A* Mutasyonlarının Gösterilmesi

## ÖZET

Doğuştan veya dil gelişimi öncesi gelişen işitme kaybı yaklaşık 1000 doğumda bir görülmektedir. Bu olguların yarısına yakın bir bölümünde genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %30'una başka klinik bulgular eşlik etmektedir ve sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. Sendromik olmayan olguların yaklaşık %80'inde otozomal resesif kalıtım bulunmaktadır. Bugüne kadar sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı yapan 38 gen bulunmuştur. Genetik nedenler içinde *GJB2* mutasyonları beyaz ırkta en önemli yeri tutmaktadır. Türkiye'de otozomal resesif kalıtımın genetik nedenli işitme kayıplarının %90'dan fazlasında etkili olduğu görülmektedir. Bu genetik nedenler arasında *GJB2* mutasyonları yaklaşık %20'lik bir payla en büyük yeri tutmaktadır.

Ülkemizde akraba evliliğinin yüksek oranda olması ve ailelerin belli bölgelerde izole kalması nedeniyle nadir görülen otozomal resesif işitme kaybı yapıcı gen değişimlerinin Türkiye'de bulunma olasılığı yüksektir. Bu genlerden birisi olan *MYO7A* geni 11. kromozomun q13.5 bölgesinde bulunmaktadır. Bu genin 48 kodlayan ekzonu bulunmakta ve 2215 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar tip1B Usher sendromuna, atipik Usher sendromuna, sendromik olmayan resesif (DFNB2) ve sendromik olmayan dominant (DFNA11) işitme kaybına neden olmaktadır.

Bu çalışmaya sensorinöral işitme kaybı bulunan, aile ağacı otozomal resesif kalıtım gösteren, işitme kayıplı probandin anne babasının birbiriyle akraba olduğu 55 aile alınmıştır. Bu ailelerin fenotipik/odyolojik özellikleri belirlenmiş ve sendromik bulgulara veya çevresel işitme kaybı nedenlerine rastlanmamıştır. Çalışmaya dahil edilen ailelerin hiç birinde *GJB2* geninde mutasyon olmadığı gösterilmiştir. Genom boyunca SNP bazlı otozigozite haritalamasında *MYO7A* geni çevresinde otozigot bölge bulunan ailelerde mutasyon analizi yapılmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'de *MYO7A* mutasyonlarının dağılımını ortaya çıkararak tanı amaçlı mutasyon analizinin kolaylaştırılması amaçlanmıştır.

Mikrodizin analizi ile *MYO7A* geni çevresinde homozigot blok olduğu gösterilen yedi ailenin beş tanesinde mutasyon bulunmuştur. İki ailede bu gende işitme kaybı ile ilgili olabilecek bir değişim bulunmamıştır. Bir ailede c.5824 G>A (p.G1924R), bir ailede c.5838delT (p.F1946LfsX24), bir ailede c.6487 G>A (p.G2163S), bir ailede c.5581 C>T (p.R1861X), bir ailede c.5660 C>T (p.P1887L) değişimleri işitme engelli bireylerde homozigot olarak bulunmuştur.

Bu çalışma *MYO7A*'nın Türkiye'deki işitme kayıplı hastalar arasındaki yerinin küçümsenemez olduğunu göstermesiyle önemlidir. Türkiye'deki işitme kaybına sebep olan genlerin ortaya çıkarılması işitme kayıplı bireylere genetik testlerle daha hızlı tanı koyabilmeyi ve doğru genetik danışma verilmesini kolaylaştıracaktır .

**Anahtar Kelimeler:** İşitme kaybı, *MYO7A*, miyozin, Usher sendromu, mikrodizin

## Screening of *MYO7A* by Autozygosity Mapping in Families with Autosomal Recessive Hearing Loss

### ABSTRACT

Hearing loss is the most common sensorial disorder. Congenital or prelingual hearing loss occurs approximately in one case per 1000 live births. Genetic causes account for 50% of cases. Additional findings are present in 30% of cases leading to the diagnosis of a syndrome. Autosomal recessive transmission occurs in 80% of hereditary deafness. To date, 38 genes in which mutations are responsible for autosomal recessive deafness have been identified. Mutations in *GJB2*, encoding connexin 26, are the most commonly identified cause of sensorineural hearing loss in Caucasians. Our data and the results of other studies show that the autosomal recessive inheritance accounts for more than 90% of genetic cases in Turkey. The *GJB2* gene is the most common cause accounting for approximately 20% of cases.

Due to the high rate of consanguineous marriages in Turkey as well as the traditional settlements in isolated small villages, rare autosomal recessive deafness alleles are frequently present in affected individuals. One of the previously identified deafness genes, *MYO7A*, is on the q13.5 region of chromosome 11. This gene consists of 48 coding exon, and codes a protein containing 2215 amino acids. Mutations in this gene cause Usher syndrome type 1B, atypical Usher syndrome, as well as non-syndromic recessive (DFNB2) and dominant (DFNA11) sensorineural hearing loss.

This study included 55 unrelated multiplex families with sensorineural hearing loss. Autosomal recessive inheritance was evident with multiple siblings being affected as well as with the presence of parental consanguinity. The phenotypical and audiological characteristics of these families were evaluated and no syndromic findings or environmental cause for hearing loss were detected. Mutations in *GJB2* were negative in all families. Whenever genomewide SNP-based autozygosity mapping showed an autozygous segment flanking *MYO7A* in a family, mutation analysis was performed. The aim of this study was to reveal the spectrum of *MYO7A* mutations in Turkey to facilitate molecular diagnosis in clinical setting.

*MYO7A* mutations were detected in 5 out of 7 families, where an autozygotic region demonstrated by microarrays was found to flank the gene. In the remaining two families no change has been identified in this gene.

The following homozygous mutations were found in affected individuals: c.5824 G>A (p.G1924R) (one family), c.5838delT (p.F1946LfsX24) (one family), c.6487 G>A (p.G2163S) (one family), c.5581 C>T (p.R1861X) (one family), c.5660 C>T (p.P1887L) (one family).

This study shows that *MYO7A* mutations have a considerably high frequency in families with hearing loss in Turkey. Identifying genes that cause hearing loss in Turkey will accelerate the molecular diagnosis and would improve accurate genetic counseling.

**Key Words:** Hearing loss, *MYO7A*, myosin, Usher syndrome, microarray

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başından bugüne kadar benden bilgisini ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, hayatımın sonuna kadar bilgi ve yeteneğine ihtiyaç duyacağım ve onun öğrencisi olduğum için her zaman gurur duyacağım hocam Prof. Dr. Mustafa TEKİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bilimsel çalışma şartlarının ülkemizdeki zorluklarını bilerek bizden hiç bir zaman yardımlarını esirgemeyen ve danışman hocamın yokluğunu hiç hissettirmeyen Prof. Dr. Nejat AKAR'a sıcak bir çalışma ortamını paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Ece AKAR'a, birlikte çalışmaktan büyük bir keyif aldığım ve bu tezi yaparken yardımlarından hiç mahrum kalmadığım Dr. Ayşenur ÖZTÜRK, Dr. Filiz Başak CENGİZ, Uzm. Bio. Aslı SIRMACI, ve ismini saymadığım tüm Çocuk Genetik ailesine ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda yaptığım çalışmalarda benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Uzm. Bio. Seda YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Bana verdiği bilimsel ve manevi destek için eşim Yrd. Doç.Dr. Türker DUMAN'a, sabrı için biricik kızım Nehir DUMAN'a ve her zaman yanımda olan annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Duygu DUMAN

Ankara, 2011

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ .....	viii

## **1. GİRİŞ..... 1**

### 1.1. GENEL BİLGİLER..... 3

#### 1.1.1. İşitme Mekanizması..... 3

#### 1.1.2. İşitme Kaybının Sınıflandırılması ..... 7

##### 1.1.2.1. Sendromik İşitme Kaybı..... 9

###### 1.1.2.1.1. Usher Sendromu ..... 9

##### 1.1.2.2. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı ..... 13

#### 1.1.3. İç Kulakta Görev Alan Proteinler ..... 18

##### 1.1.3.1. Miyozinler ..... 19

##### 1.1.3.2. *MYO7A* Geni Ve Proteini ..... 21

### 1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER ..... 25

#### 1.2.1. Otozigozite Haritalaması ..... 25

#### 1.2.2. Mikrodizin Analizi ..... 26

#### 1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ..... 28

#### 1.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim ..... 29

#### 1.2.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi ..... 30

#### 1.2.6. DNA Dizi Analizi..... 31

## **2. MATERYAL VE YÖNTEMLER ..... 33**

### 2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması ..... 33

### 2.2. Yöntemler ..... 33

#### 2.2.1. Strateji..... 34

2.2.2. DNA İzolasyonu .....	36
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	37
2.2.4. <i>GJB2</i> ve <i>I2SrRNA</i> Geni Mutasyon Analizi .....	38
2.2.4.1. <i>GJB2</i> Geni Mutasyon Analizi .....	38
2.2.4.2. Mitokondriyal DNA'da <i>I2SrRNA</i> m.A1555G Mutasyon Analizi .....	41
2.2.5. Mikrodizin Analizi .....	43
2.2.6. Otozigozite Haritalaması .....	49
2.2.7. <i>MYO7A</i> Geni Mutasyon Taraması .....	49
2.2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	49
2.2.7.2. SSCP İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı .....	52
2.2.7.3. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama .....	54
2.2.7.4. DNA Dizi Analizi .....	54
<b>3.BULGULAR .....</b>	<b>56</b>
3.1. Otozigozite Haritalaması .....	56
3.2. Mutasyon Analizi .....	59
<b>4.TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>64</b>
KAYNAKLAR .....	71
EKLER .....	87
ÖZGEÇMİŞ .....	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1.	Kulağın anatomik yapısı.....	3
Şekil 1.2.	İç kulaktaki korti organı ve burada yer alan hücreler .....	5
Şekil 1.3.	Kohlear tüy hücresi yapısı .....	6
Şekil 1.4.	Miyozin VIIa protein yapısı. ....	22
Şekil 2.1.	<i>GJB2</i> geni c.35delG mutasyonunun BseLI enzimi ile belirlenmesi .....	39
Şekil 2.2.	<i>GJB2</i> geni kodlayan ekzonunun 2 bölgesinin PCR görüntüsü.....	40
Şekil 2.3.	<i>GJB2</i> geninin kodlamayan TATA bölgesi PCR görüntüsü.....	41
Şekil 2.4.	<i>12SrRNA</i> m.A1555G mutasyonunun BsmAI enzimi ile belirlenmesi .....	42
Şekil 2.5.	Mikrodizin PCR görüntüsü.....	44
Şekil 2.6.	Fragmentasyon görüntüsü. ....	45
Şekil 2.7.	Taranmış array görüntüsü.....	48
Şekil 2.8.	<i>MYO7A</i> geninin kodlayan 48 ekzonun tek bir hastadaki PCR görüntüleri .....	52
Şekil 3.1.	<i>MYO7A</i> geninde bant farklılığı saptanan ekzonların SSCP jel görüntüsü .....	59
Şekil 3.2.	<i>MYO7A</i> geninin 41. ekzonundaki c.5660C>T (p.P1887L) değişimi .....	60
Şekil 3.3.	<i>MYO7A</i> geninin 42. ekzonundaki c.5824G>A (p.G1924R) değişimi .....	60
Şekil 3.4.	<i>MYO7A</i> geninin 42. ekzonundaki c.5838delT (p.F1946LfsX24) değişimi. ....	61
Şekil 3.5.	<i>MYO7A</i> geninin 48. ekzonundaki c.6487G>A (p.G2163S) değişimi .....	61
Şekil 3.6.	<i>MYO7A</i> geninin 40. ekzonundaki c.5581 C>T (p.R1861X) değişimi .....	62
Şekil 3.7.	<i>MYO7A</i> geninde belirlenen gen değişimlerinin aile bireylerinde dağılımları.....	63



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Çizelge 1.1.</b> Usher sendromunun farklı klinik tipleri .....	10
<b>Çizelge 1.2.</b> Usher sendromunda tanımlanan genler ve proteinler .....	11
<b>Çizelge 1.3.</b> Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı işitme kaybı yapan genler .....	15
<b>Çizelge 2.1.</b> <i>MYO7A</i> geni mutasyon analizi için kullanılan primerler, PCR programları ve Ts dereceleri .....	50
<b>Çizelge 3.1.</b> <i>MYO7A</i> geni çevresinde bulunan homozigot bölgelerin ailelere göre kromozomal lokasyonu .....	56
<b>Çizelge 3.2.</b> SNP 10K mikrodizin analizi sonucunda ailelerde <i>MYO7A</i> geni çevresindeki SNP verileri .....	57
<b>Çizelge 3.3.</b> <i>MYO7A</i> geninde bu çalışmada bulunan mutasyonlar .....	59
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>MYO7A</i> genindeki Homo sapiens'te 1942. pozisyondaki glisin (G) amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi .....	66

## SİMGELER DİZİNİ

A	: Adenin bazı
a.a	: Amino asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozintrifosfat
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin bazı
°C	: Santigrat derece
Ca <sup>++</sup>	: Kalsiyum
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dB	: Desibel
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dCTP	: Deokisitozintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanintrifosfat
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
ddATP	: Dideoksiadenintrifosfat
ddCTP	: Dideoksisitozintrifosfat
ddGTP	: Dideoksiguanintrifosfat
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
ddTTP	: Dideoksitimidintrifosfat
ddH <sub>2</sub> O	: Deiyonize su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Glutamik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
ERG	: Elektroretinogram
F	: Fenilalanin
Fs	: Çerçeve kayması (frameshift)
g	: Gram

G	: Glisin aminoasiti
G	: Guanin bazı
H	: Histidin aminoasiti
HCl	: Hidroklorik asit
I	: İzolösin aminoasiti
IHC	: İç tüy hücresi
K <sup>+</sup>	: Potasyum iyonu
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
L	: Lösin
M	: Metiyonin
M	: Molar
mg	: Miligram
Mg <sup>++</sup>	: Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikromol
Na <sup>+</sup>	: Sodyum iyonu
NaOAc	: Sodyum asetat
OH	: Hidroksil
OHC	: Dış tüy hücresi
P	: Prolin aminoasiti
<sup>32</sup> P	: Fosfor 32
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Asitlik-Bazlık Derecesi
pmol	: Pikomol
R	: Arjinin aminoasiti
RBC	: Kırmızı Kan Hücresi
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit

RP	: Retinitis pigmentosa
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
s	: Saniye
S	: Serin aminoasiti
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	: Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
T	: Treonin aminoasiti
T	: Timin bazı
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
X	: Dur kodonu
V	: Valin aminoasiti
V	: Volt

## 1. GİRİŞ

İşitme, sosyal hayatın temeli olan iletişimin en önemli parçasıdır. İşitme konuşabilmeyi, konuşabilmek de kendini ifade edebilmeyi sağlar. Bu yeteneğin doğuştan veya dil gelişimi öncesi (prelingual) kaybedilmesi kişilerin eğitim ve çevresiyle olan iletişimde zorluklara yol açarken daha sonra (postlingual) ortaya çıkan işitme kaybı kişilerin yaşam kalitesini düşürmektedir. İşitme kaybı, dünya genelinde en sık görülen duyuşal bozukluktur (Bitner-Glindzic 2002). Toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte doğuştan ortaya çıkan işitme kaybı yaklaşık olarak her 1000 canlı doğumda 1-2 görülmektedir (Nance 2003).

İşitme kaybı etiyolojik olarak heterojen bir olgu olup birçok genetik ve çevresel faktör işitme kaybına neden olabilmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik nedenli işitme kaybı, kalıtım şekli ve işitme kaybının fenotipe yansımalarına göre sendromik işitme kaybı ve sendromik olmayan işitme kaybı olarak sınıflandırılabilir (Nance 2003).

Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kayıplarıdır. Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini ise otozomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır (Morton ve Nance 2006). Bugün işitme kaybına neden olan 100'den fazla kromozomal lokus tespit edilmiş ve bunların önemli kısmında genler klonlanmıştır (<http://hereditaryhearingloss.org>). Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının önemli bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır (Kelsell vd 1997).

Genetik nedenlerin sıklığı ve dağılımı toplumlara göre farklılık göstermektedir. Türkiye'de otozomal resesif kalıtımın genetik nedenli işitme kayıplarının %90'dan fazlasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu genetik nedenler arasında *GJB2* mutasyonları yaklaşık %20'lik payla en büyük yeri tutmaktadır (Tekin ve Arıcı 2007). Ancak ülkemizde akraba evliliğinin yüksek oranda olması ve ailelerin belli bölgelerde izole kalması nedeniyle nadir görülen otozomal resesif işitme kaybı yapıcı gen değişimlerinin Türkiye'de bulunma olasılığı yüksektir. Bu nedenle diğer otozomal resesif genlerin de Türkiye'deki işitme kayıpları içindeki öneminin saptanması tanı konulamamış işitme kayıplı bireylere genetik testlerle tanı koyabilmeyi ve doğru genetik danışma verilmesini sağlayacaktır. Bu genlerden birisi olan *MYO7A*'daki mutasyonlar hem sendromik hem de dominant ve resesif sendromik

olmayan işitme kaybına neden olabilmektedir. 49 ekzonlu *MYO7A* geni için mutasyon analizi yapmak oldukça zordur.

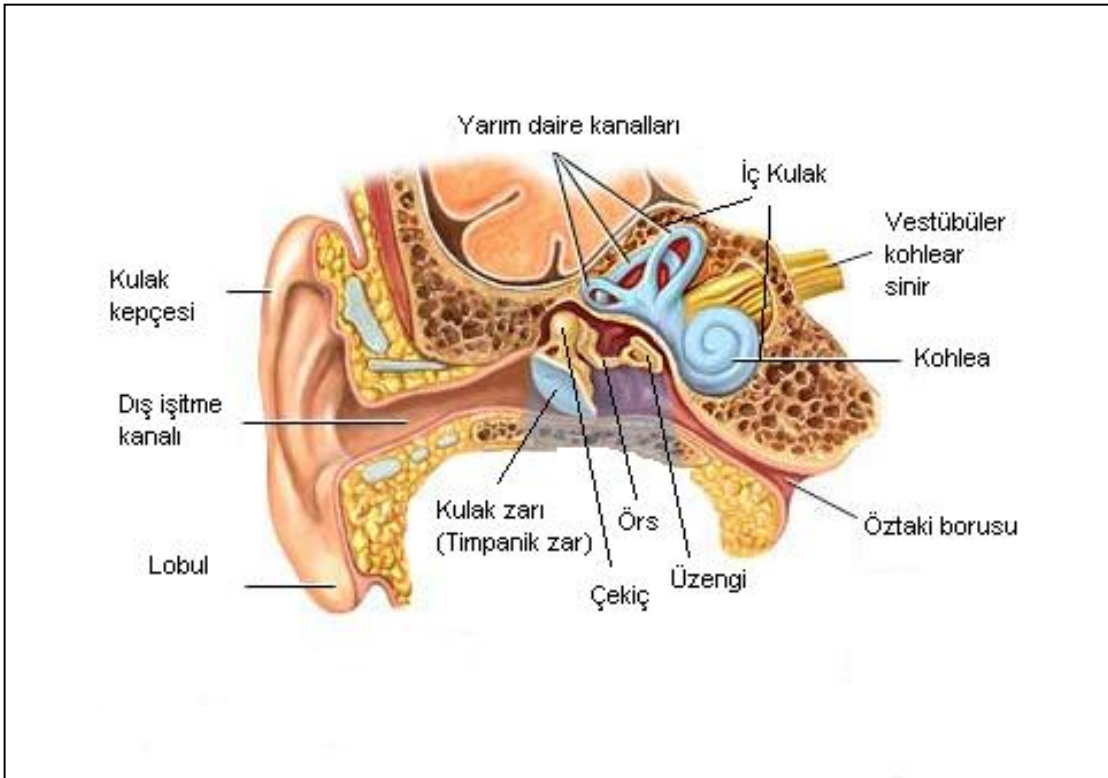
Bu çalışma ile *MYO7A* geninde Türkiye`de sık görülen mutasyonların olup olmadığının gösterilerek tanı amaçlı mutasyon analizinin kolaylaştırılması amaçlanmıştır.

## 1. 1. GENEL BİLGİLER

### 1. 1. 1. İşitme Mekanizması

İşitme sistemi dış, orta, iç kulak ve beyine giden sinir yolları olmak üzere 4 ana bölümden oluşmuştur. Dış kulak; kulağın dış kıkırdağı ve kulak kanalından oluşur. Orta kulak işitme kemikleri olan çekiç, örs, üzengiye ve orta kulaktaki hava basıncını korumaya yarayan öztaki borusunu, iç kulak ise kohlea ve denge organını taşımaktadır.

Kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgaları kulağın içine yönlendirilir. Ses dalgaları işitme kanalından geçerek, dış işitme kanalı ile işitme kemiklerinin bulunduğu timpanik boşluğu birbirinden tamamen ayıran kulak zarına (timpanik zar) iletilir. Kulak zarı, ses dalgalarını değiştirmeden hava ile dolu olan orta kulağa iletir (Şekil 1.1).

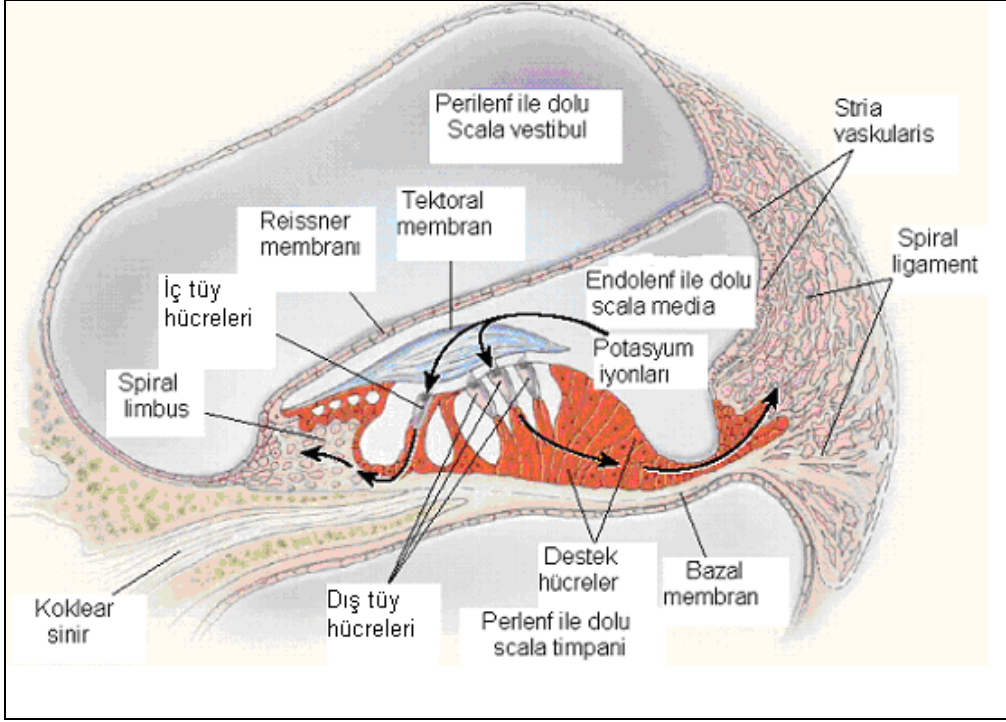


**Şekil 1.1.** Kulağın anatomik yapısı (<http://health.allrefer.com/pictures-images/ear-anatomy.html> adresinden değiştirilerek alınmıştır).

Orta kulaktaki çekiç kemiğinin tabanı kulak zarının iç yüzeyine, üzengi kemiğinin tabanı oval pencereye bağlıdır. Örs kemiği hem çekiç hem üzengiyle temas halindedir. Kemikler arasında eklem yerleri vardır. Bu üç kemik kulak zarından oval pencereye kadar bir zincir oluşturur. Bu kemikçikler zinciri, kulak zarının iç kulağa olan hareketlerini yöneten bir kaldırkaç mekanizması oluşturur. Kulak zarında oluşan ses titreşimleri üzengi kemiğinin tabanına iletilir. Oval pencere bu sayede içe ve dışa doğru hareketler oluşturur. Böylece kulak zarı ve kemikleri havadaki titreşimleri iç kulağın sıvı ortamına taşıyan bir dönüştürme görevi yaparlar.

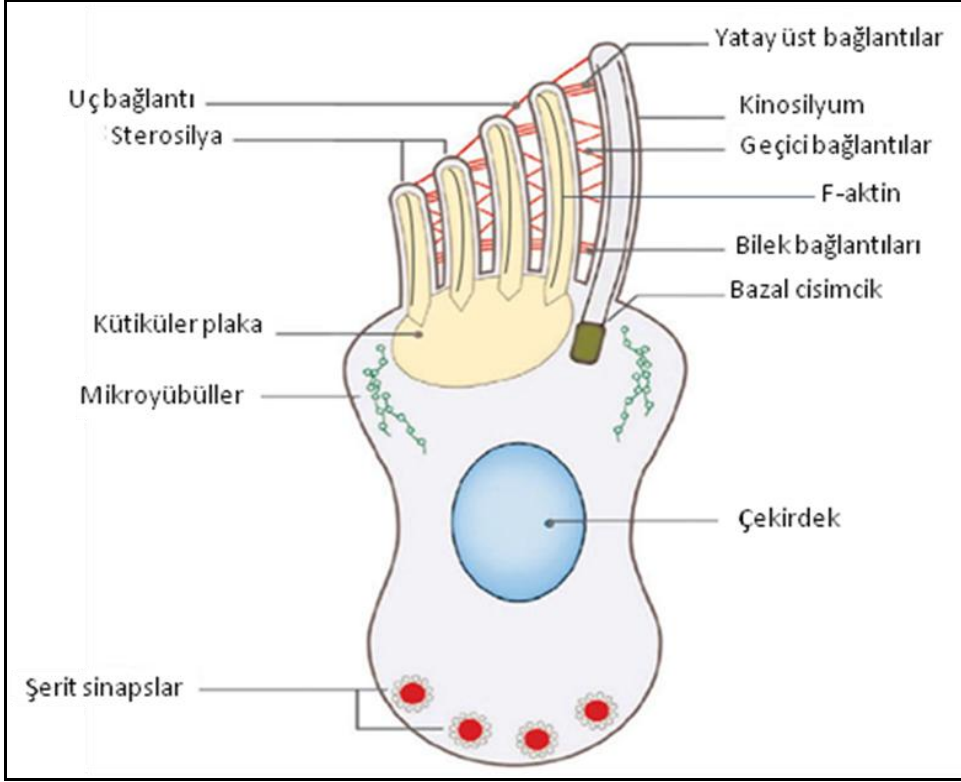
İç kulak zarsı ve kemiksi labirent adı verilen içi sıvı dolu, iki yapıdan oluşmuştur. Kemiksi labirent perilenf sıvısıyla, zarsı labirent ise endolenf sıvısıyla doludur. Kemiksi labirent kohlea, yarım daire kanalları ve bu kanalların yapısında bulunan utrikul ile sakkulu içeren vestibül aygıtından oluşmuştur. Denge duyumuz vestibül aygıtına bağlıdır. Kohlea, bağ dokusundan oluşan baziller membran ve ince zar şeklindeki Reissner membranıyla uzunluğu boyunca üç bölmeye ayrılmıştır. Ortadaki bölme scala media adını alır ve işitme reseptörü olan korti organını taşır. Skala medianın bir tarafında skala vestibuli diğer tarafında skala timpani bulunur. Skala media endolenfle, skala vestibuli ve skala timpani perilenfle doludur (Şekil 1.2). Perilenf ve endolenfin iyonik kompozisyonu birbirinden farklıdır. Endolenf yüksek  $K^+$  (150 mM), düşük  $Na^+$  (1 mM), az miktarda  $Ca^{++}$  (0,02 mM) konsantrasyonuna sahiptir. Perilenf plazmaya benzer şekilde, düşük  $K^+$  (3,5 mM), yüksek  $Na^+$  (140 mM) ve endolenfden daha yüksek miktarda  $Ca^{++}$  (1 mM) konsantrasyonunu içermektedir (Petit vd 2001). Endolenfin perilenfden farklı olan iyon konsantrasyonu kohlear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskularisin marjinal hücreleri tarafından sağlanmaktadır.





**Şekil 1.2.** İç kulaktaki korti organı ve burada yer alan hücreler (Willems 2000'den değiştirilerek alınmıştır).

Korti organı işitme sisteminin en önemli elemanıdır. İşitme reseptörü olan tüy hücrelerini taşır. İç tüy hücreleri (IHC) ve dış tüy hücreleri (OHC) olmak üzere iki çeşit tüy hücresi vardır. Bir sıra halinde bulunan iç tüy hücreleri, akustik sinire ve işitme korteksine sinyaller ileten reseptör hücreleridir. Üç sıra halinde bulunan dış tüy hücreleri ise hem sensör elemanlarına, hem de alınan sesleri arttırarak işitmenin hassasiyetine ve frekans seçiciliğine katkıda bulunan motor elemanlara sahiptir. Dış tüy hücreleri akustik olarak uyarıldıklarında uzayıp büzülme özelliğine sahiptir. Her bir tüy hücresi apikal kutbunda 100 silindirik stereosilden oluşmuş bir saç yumağı ile kaplıdır. Bu stereosil demeti boy sırasında ve uzunlukları boyunca birbirlerine fibröz bağlantılarla bağlı olarak bulunurlar. Stereosillerin gelişiminin yönlendirilmesinden kinosilyum sorumludur. Her bir stereosil, plazma membranıyla kaplı aktin filamentlerinin hücrenin dışına doğru uzanan uzantısı şeklindedir (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Kohlear tüy hücresi yapısı (Kremer vd 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

Ses dalgalarının mekanik etkisi perilenf içinde sıvı dalgalanmasına neden olur. Perilenfteki dalga hareketi endolenfe yansır ve tektoral membranda titreşimlere yol açar. Tektoral membrandaki titreşimlerden dolayı stereosiller bükülür. Böylece stereosillerin tepe uçlarında bulunan harekete duyarlı (mekanosensitiv) katyon kanalları açılır ve potasyum ( $K^+$ ) açısından zengin endolenfden hücre içine doğru potasyum akışı başlar ve hücreler depolarize olur. Bu durum hücrenin bazolateral kısmındaki kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) kanallarını aktive eder. Hücreye giren kalsiyum iyonları akustik siniri aktive eden nörotransmitterlerin salınımını tetikler. Bu şekilde mekanik enerji kohlear sinire aktarılan elektrik enerjisine dönüşmüş olur (Şekil 1.2) (Willems 2000).

Normal işitmenin devamı için tüy hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşturan  $K^+$  iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Hücrede kalsiyum miktarının artması, kalsiyuma duyarlı potasyum geçiş yollarını açar; potasyum iyonları hücreden dışarı çıkarlar (Noyan 1999). Bu geri dönüş sırasında  $K^+$  iyonları ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmında kanalı geçerler. Burada iyonların hücrelerarası geçişi aralıklı

birleşkeler (gap junction) ile sağlanır. Stria vaskularise gelen iyonlar voltaj kapılı potasyum kanallarından geçerek endolenfe geri pompalanır (Tekin vd 2001a).

Memelilerde işitmenin normal olarak sağlanması işitme sisteminin iki temel fonksiyonu olan mekanik ve elektrokimyasal fonksiyonlarının devamlılığına bağlıdır. Öncelikle ses direkt olarak kohleaya ulaştırılmalı, orada frekans yönünden analiz edilmeli ve kohlear tüy hücrelerinin osilasyonunu sağlamalıdır. Ardından kohlear tüy hücrelerinin osilasyonu elektrokimyasal sinyallere dönüştürülmelidir. İşitme sistemindeki herhangi bir yapının fonksiyon bozukluğu veya tahribatı işitme kaybı ile sonuçlanır. İşitme kaybının dünya çapında yaklaşık 270 milyon insanı etkilediği bilinmektedir (Eisen ve Ryugo 2007).

### **1. 1. 2. İşitme Kaybının Sınıflandırılması**

İşitme kaybı organ defektlerine göre, iletim tipi işitme kaybı ve sensorinöral tip işitme kaybı olarak ikiye ayrılmaktadır. İletim tipi işitme kaybı, dış veya orta kulak bozuklukları sonucunda meydana gelen işitme kaybıdır. İşitme işleminin mekanik kolundaki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişir. Bu tip işitme kaybına orta kulak patolojileri, timpanik membran perforasyonu, kemikçiklerin hastalıkları, orta kulak enfeksiyonları neden olabilir. Sensorinöral işitme kaybı ise elektrokimyasal koldaki fonksiyon bozuklukları olup; iç kulak, duyu sinirleri veya merkezi sinir sistemindeki hasarlar sonucu ortaya çıkar. Her iki tipin birlikte görüldüğü olgular ise karışık tip işitme kaybı olarak adlandırılır (Eisen ve Ryugo 2007, Petit vd 2001, Tekin vd 2001a).

Odyolojik bulgularına göre beş tip işitme kaybı bulunmaktadır (Petit 2006).

1. Hafif işitme kaybı, 26-40 dB (fısıltı duyamazlar)
2. Orta dereceli işitme kaybı, 41-55 dB (karşılıklı konuşmaları duyamazlar)
3. Orta-ileri dereceli işitme kaybı, 56-70 dB
4. Şiddetli işitme kaybı, 71-90 dB (bağırtiları duyamazlar)
5. Çok ileri işitme kaybı, >90 dB (hiç ses duyamazlar)

Başlangıç yaşına göre; doğuştan, erken başlangıçlı (prelingual) ve geç başlangıçlı (postlingual) işitme kaybı olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Prelingual (dil gelişimi öncesi-5 yaşına kadar) işitme kayıpları otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı veya

mitokondrial kalıtım göstermekte ancak postlingual (dil gelişimi sonrası) işitme kayıpları genellikle otozomal dominant kalıtım göstermektedir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Progresyonuna göre; ilerleyici işitme kaybı, ilerleyici olmayan işitme kaybı ve değişken progresyon gösteren işitme kaybı olarak üç gruba ayrılmaktadır.

İşitme kaybı nedenlerine göre çevresel nedenli ve genetik nedenli olmak üzere temel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Çevresel nedenli işitme kayıpları işitme kayıplarının yaklaşık %40-50'sini oluşturmaktadır. Bunlar rubella, sitomegalovirüs gibi teratolojik ajanlar, menenjit, kabakulak gibi enfeksiyonlar, ototoksik ilaçlar, akustik travma, erken doğum ve düşük doğum ağırlığı gibi genetik olmayan nedenlerdir (Tekin vd 2001a, Bitner-Glindzicz vd 2002).

Genetik nedenli işitme kayıpları ise kalıtım şekline ve fenotipe yansımalarına göre iki gruba ayrılır.

Kalıtım şekline göre; tek genli kalıtım ve çok genli kalıtım olarak iki grupta sınıflandırılır. Tek genli kalıtım otozomal resesif (%70-80), otozomal dominant (%10-20), X'e bağlı (%1-2) ve mitokondrial (%0-20) olarak gruplandırılır. Çok genli kalıtım ise kromozomal anomaliler ve oligogenik kalıtım olarak ayrılmaktadır (Nance 2003). Bazı durumlarda aynı gendeki mutasyonlar hem otozomal dominant hem de otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybına neden olabilmektedirler (Finsterer ve Fellingner 2005).

Fenotipe yansımalarına göre; sendromik işitme kayıpları (%30-40) ve sendromik olmayan işitme kayıpları (%60-70) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

Türkiye'de işitme kayıplı olguların %23,2'sinde çevresel nedenli ve %76,8'inde genetik nedenli işitme kaybı saptanmıştır. Genetik olguların %93,4'ünden resesif ve %6,6'sından da dominant kalıtımın sorumlu olduğu gösterilmiştir (Tekin ve Arıcı 2007).

### **1. 1. 2. 1. Sendromik İşitme Kaybı**

İşitme kaybının klinik başka anomalilerle birlikteliği sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. Genetik nedenli işitme kaybının yaklaşık %30'unu sendromik işitme kaybı oluşturmaktadır. İşitme kaybına, göz, pigment, sinir, böbrek, iskelet anomalilerin eşlik ettiği 400'den fazla sendrom tanımlanmıştır (Kalatzis ve Petit 1998). Sendromik işitme kayıpları otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmektedir. Bir çok sendromda işitme kaybı orta düzeyde veya değişken bir bulgu olup, bir kısmında da oldukça nadir görülmektedir.

Pendred sendromu, Usher sendromu, Waardenburg sendromu, Brankiootorenal sendrom (BOR) sendromik işitme kaybının en sık görülen dört formudur (Hone ve Smith 2003). Bazı mitokondrial mutasyonlar da işitme kaybı ile birlikte seyreden sendromlara yol açabilmektedir. Bu sendromlar arasında; Kearns-Sayre Sendromu, Pearson Sendromu, MELAS (myoclonic epilepsy, lactic acidosis, stroke-like episodes), MERRF (mitokondrial encephalomyopathy with ragged red fibers), Leber'in kalıtsal optik nöropatisi (LHON) sayılabilir (Kokotas vd 2007).

#### **1. 1. 2. 1. 1. Usher Sendromu**

Usher sendromu işitme ve görme kaybının birlikte bulunduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Görme kaybına, periferal (yan) görüşün kaybı ve az aydınlatılmış alanlarda görme zorluğu (gece körlüğü) ile karakterize retinitis pigmentosa adı verilen ilerleyici retinal bozulmalar sebep olur. Vestibüler bozukluklar da hastalığa eşlik edebilir. İşitme ve görme kaybının birlikte eşlik ettiği 50'den fazla sendrom tanımlanmıştır ancak Usher sendromu sağır-kör vakaların %50'sini oluşturmasıyla en sık görülenidir (Nikolopoulos vd 2006, Marazita vd 1993, Rosenberg vd 1997, Spandau vd 2002, Boughman vd 1983, Grondahl 1987). Sağır popülasyonunun %3-6'sının, retinitis pigmentozalı hastaların %8-33'ünün USH olduğu tahmin edilmektedir. Sendromun genel görülme sıklığı 100.000 canlı doğumda 3.5-6.2'dir (Yan ve Liu 2010).

1858'de Alman göz doktoru Alfred von Graefe tarafından, retinitis pigmentozalı sağır erkek hasta ve aynı bulgulara sahip iki erkek kardeşin olduğu ailede hastalık ilk defa tanımlanmıştır (Von Graefe 1858). 1966'da başka araştırmaların da eklenmesiyle, 1914'de

69 retinitis pigmentozalı sağır hastada hastalığın geçişini ve patolojisini incelemiş olan Charles Usher'ın ismiyle adlandırılmıştır (Kloepfer ve Laguaite 1966).

İşitme kayıplı hastalarda retinitis pigmentozaya bulunması Usher sendromunu sendromik olmayan işitme kaybından ayıran en önemli özelliktir. Gece körlüğü ile birlikte ilerleyici periferik görüş kaybı ile tanımlanan retinitis pigmentozaya anormal veya kaydedilemeyen elektoretinogram (ERG) ile tanı koyulabilmektedir (Heckenlively 1988). Usher genlerinde mutasyon bulunan sendromik olmayan işitme kayıplı hastalara ERG yapılmadan Usher sendromunu dışlamak mümkün değildir.

Usher sendromu klinik ve genetik olarak heterojendir. Klinik olarak 3 alt tipe sınıflandırılmaktadır; USH1, USH2 ve USH3 (Çizelge 1.1). Retinitis pigmentozaya 3 grup için de ortak bulgu olduğu için sınıflama işitme kaybının şiddeti ve ilerleyişine ve vestibüler fonksiyon bozukluklarının varlığı ya da yokluğuna göre yapılmaktadır. Bu alt tipler de genetik olarak heterojendir (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.1.** Usher sendromunun farklı klinik tipleri

<b>Tip</b>	<b>İşitme kaybı</b>	<b>Vestibüler bozukluk</b>	<b>Gece körlüğü</b>	<b>Görüş alanı kaybı</b>	<b>Frekans</b>
<b>USH1</b>	İlerleyici olmayan, çok ileri, doğuştan	Var	Ergenlikten önce	Ergenlikten önce	%33-44
<b>USH2</b>	İlerleyici olmayan veya yavaş ilerleyen, yüksek frekanslarda hafiften şiddetliye kadar	Yok	Ergenlikte	Değişken	%56-67
<b>USH3</b>	İlerleyici	Değişken	Değişken	Değişken	%2-42

**Çizelge 1.2.** Usher sendromunda tanımlanan genler ve proteinler

Lokus	Lokasyon	Gen	Protein	Protein Sınıfı	Sendromik olmayan form
<b>USH1B</b>	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Miyozin VIIa	Aktin bazlı motor proteini	DFNB2 DFNA11
<b>USH1C</b>	11p14.3	<i>USH1C</i>	Harmonin	İskelet proteini	DFNB18
<b>USH1D</b>	10q22.3	<i>CDH23</i>	Kaderin23	Hücre-hücre adezyon proteini	DFNB12
<b>USH1E</b>	21q21	--	--	--	--
<b>USH1F</b>	10q21.1	<i>PCDH15</i>	Protokaderin15	Hücre-hücre adezyon proteini	DFNB23
<b>USH1G</b>	17q25.2	<i>USH1G</i>	SANS	İskelet proteini	--
<b>USH2A</b>	1q41	<i>USH2A</i>	Usherin	Transmembran proteini	Retinitis pigmentosa
<b>USH2C</b>	5q14.3-21.3	<i>VLGR1 (GPR98)</i>	VLGR1 (GPR98)	Transmembran reseptör proteini	Refleks nöbetler
<b>USH2D</b>	9q31-34	<i>WHRN</i>	Virlin	İskelet proteini	DFNB31
<b>USH3A</b>	3q25.1-2	<i>USH3A</i>	Klarin 1	Transmembran proteini	--

USH1, hastalığın en ağır formudur ve vakaların %30-40'ını oluşturur (Smith vd 1994, Verpy vd 2000, Bolz vd 2001). Hastalarda doğuştan çok ileri işitme kaybı, vestibüler fonksiyon bozukluğu ve prepubertal RP bulunmaktadır (Moller vd 1989, Hope vd 1997). Kaba motor gelişme geriliği varsa vestibüler fonksiyon bozukluğunun doğuştan olduğunun göstergesidir. USH1 için bugüne kadar yedi genetik lokus haritalanmış ve bunların beş tanesinde sorumlu gen bulunmuştur. Sırasıyla en çok *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1C*, ve *SANS* genlerindeki mutasyonlar USH1 fenotipinden sorumludur. *MYO7A*, *CDH23*, *USH1C*, *PCDH15* genlerindeki mutasyonlar sendromik olmayan işitme kaybı ile de ilişkilendirilmiştir. *SANS* genindeki mutasyonların, ortadan şiddetliye kadar işitme kaybı olabilen, vestibüler ve görme fonksiyonları normal olan atipik Usher 1'e sebep olabileceği

gösterilmiştir (Kalay vd 2005). *CDH23* genindeki homozigot anlamsız mutasyonlar, çerçeve kayması ve kırılma mutasyonları USH1D fenotipine sebep olurken yanlış anlamlı mutasyonlar sendromik olmayan işitme kaybına sebep olmaktadır (Bork vd 2001, Astuto vd 2002).

USH2, yüksek frekanslarda daha ağır olmak üzere orta-şiddetli işitme kaybı ile karakterizedir. Vestibüler fonksiyon normaldir. Gece körlüğü görülme yaşı ortalama 15, retinitis pigmentosa tanı koyma yaşı ortalama 24'tür (Tsilou vd 2002). USH2A, USH2C ve USH2D olmak üzere 3 lokus USH2 ile ilişkilendirilmiştir. Vakaların %85'inden *USH2A* genindeki mutasyonlar sorumludur. Bu gendeki mutasyonlar atipik USH2 ve sendromik olmayan RP fenotipine de neden olmaktadır. *USH2C* ve *USH2D* mutasyonları nadir görülmektedir. USH2D lokusundaki mutasyonlar hem USH2 hem de sendromik olmayan işitme kaybına neden olmaktadır (Yan ve Liu 2010).

USH3, başlangıç yaşı değişken, ilerleyici işitme kaybı ve RP, varlığı değişken vestibüler bozukluk ile karakterizedir. USH vakaları içindeki sıklığı %2-4 iken, Finlandiya ve Askenazi Yahudi toplumlarında bu oran %40'a kadar çıkmaktadır (Ness vd 2003, Pakarinen vd 1995). *USH3A* genindeki mutasyonların bu fenotipe sebep olduğu gösterilmiştir (Joensuu vd 2001) .

Usher genleri, farklı sınıflara ait proteinleri kodlar. USH1 proteinleri, motor proteini Miyozin VIIa, hücre-hücre adezyon proteinleri CDH23 ve PCDH15, PDZ bölgesi içeren iskelet proteini harmonin ve SAM bölgesi içeren SANS proteinidir. USH2 proteinleri, PDZ bölgesi içeren iskelet proteini olan virilin, büyük transmembran proteinleri olan usherin ve GPR98'dir. USH3 proteini ise klarin ailesinden 4 transmembran bölgesi içeren membran glikoproteini olan klarin proteinidir. Bu proteinler iç kulak ve retinada sinaptik ve silli alanlarda yerleşmişlerdir. İç kulakta, sinaptik bölge ve stereosillerde USH proteinleri birlikte yerleşmiş bulunurlar. Fare modellerinde, birlikte yapılan moleküler ve lokalizasyon çalışmaları USH1 ve USH2 proteinleri arasında sıkı bir etkileşim ağı olduğunu göstermiştir. Bu etkileşim, stereosilleri taşıyan tüy hücresi demetinin doğru ve tam gelişmesi için temeldir. Mekanoelektriksel sinyal iletimi ve olgun tüy hücrelerinin sinaptik fonksiyonunda bu etkileşim ağının rolü olabileceği düşünülmektedir (Yan ve Liu 2010).



### 1. 1. 2. 2. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı

Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir. Sendromik olmayan işitme kaybında işitme kaybına kulak ve vestibuler sistem hastalıkları dışında başka klinik veya laboratuvar bulgusu eşlik etmez.

Sendromik olmayan işitme kaybı gen bölgeleri "DFN" olarak kısaltılır. DFNA otozomal dominant, DFNB otozomal resesif, DFN X'e bağlı kalıtım gösteren lokusları belirtmektedir (Willems 2000).

Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan genler oldukça geniş bir heterojeniteye sahiptir. Bu genlerin bir kısmı hem otozomal resesif hem de otozomal dominant işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. (*TECTA, GJB2, GJB6, TMCI, MYO6, MYO7A*) (Petersen ve Willems 2006).

Bazı genlerdeki mutasyonlar hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olabilir. Bunlara *CDH23* (Usher send. Tip1), *COL11A2* (Sticker send. Tip3, Osmed send.), *DSPP* (Dentinogenesis imperfecta), *GJB2* (Palmoplantar keratoderma ve işitme kaybı, Vohwinkel's send., KID), *MYO7A* (Usher send. Tip1B), *SLC26A4* (Pendred send.), *USH1C* (Usher send. Tip1C), *PCDH15* (Usher send. Tip1F) örnek olarak verilebilir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olan genler içinde en önemli yeri "konnesin 26 (*GJB2*)" tutmaktadır. Konnesinler, iyon ve moleküllerin hücrelerarası geçişini sağlayan aralıklı bileşkelerin proteininin alt ünitelerini kodlayan bir gen ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan *GJB2* geni bir aralıklı bileşke proteini olan konnesin 26 proteinini kodlar. Birçok toplumda bu gendeki mutasyonların genetik nedenli işitme kaybının %50'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Bitner-Glindzicz 2002). Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz'de bu gendeki en çok rastlanan mutasyon altılı guanin serisinden birinin delesyonuyla oluşan c.35delG mutasyonudur (Cohn ve Kelley 1999, Green vd 1999, Gasparini vd 2000). Bugüne kadar bu gen içinde 100'den fazla mutasyon bildirilmesine rağmen c.35delG mutasyonu beyaz ırkta tüm mutasyonların yaklaşık %60-70'ini kapsamaktadır. Bu mutasyonun taşıyıcılığı Avrupalı beyazlarda %2-4 arasındadır (Gasparini vd 2000). Sağlıklı Türk toplumunda ise %1.8 olarak bulunmuştur (Tekin vd 2001b). Türk işitme

kayıplı bireylerde *GJB2* mutasyonlarının konjenital veya prelingual sendromik olmayan işitme kayıplı olguların yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Barış vd 2001, Tekin vd 2001b, Uyguner vd 2003, Tekin vd 2003a, Tekin vd 2005a). Genetik nedenlerin sıklığı ve dağılımı neredeyse her toplumda farklılık göstermektedir.

İşitme engellilerin arasında akraba evliliğinin oranı Türkiye ortalamasının üzerindedir. *GJB2* mutasyonları taşıyanlar arasında bu oran Türkiye ortalamasına yakinken *GJB2* mutasyonları olmayanlarda %55 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur (Tekin vd 2003a). Ayrıca akraba evliliğinin yüksek oranda olduğu doğu bölgelerimizde (%72.4) işitme kayıplı bireylerde *GJB2* mutasyonlarının oranı %17.2 iken, akraba evliliğinin daha düşük olduğu batı bölgelerimizde (%39.5) bu oran %31.4'tür (Tekin ve Arıcı 2007). Bu veriler, coğrafik izolasyon ve akraba evliliğinin etkileri sonucunda Türkiye'de işitme kaybı nedeni olan otozomal resesif gen değişimlerinin bölgesel öneme sahip olduğunu, çok sayıda gen değişiminin küçük oranlarda bulunduğunu düşündürmektedir. Otozomal resesif işitme kaybı nedeni olarak bugüne kadar gösterilen 38 farklı genin büyük çoğunluğu Hindistan, Pakistan, Kuzey Afrika ülkeleri gibi eş akrabalığının yüksek olduğu toplumlarda tek tek ailelerde tanımlanmıştır.

Türkiye'deki mutasyonların dağılımı Anadolu'nun tarihsel özelliklerini yansıtmaktadır (Barış vd 2001, Bayazıt vd 2003, Kalay vd 2005a, Tekin vd 2001b, Tekin vd 2003a, Tekin vd 2005a, Uyguner vd 2003).

Mitokondriyal DNA'daki *12SrRNA* geninde bulunan A1555G mutasyonu da özellikle İspanya ve Uzak Doğu ülkelerinde önemli bir sendromik olmayan işitme kaybı nedenidir. Türk hastalarla yapılan çalışmada bu mutasyonun sıklığı %1.8 bulunmuştur (Tekin vd 2003b).

Sendromik olmayan işitme kayıplarının genetiğini çalışmak iki nedenle büyük güçlük göstermektedir. 1. İç kulağın karmaşık yapısı ve işlevleri yüzlerce farklı proteinin görev almasıyla sağlanabilmekte ve bunlardan herhangi birindeki sorun işitme kaybıyla sonuçlanabilmektedir. 2. Sendromik olmayan işitme kayıplı aileleri fenotipik olarak gruplara ayırmak son derece güçtür. Dolayısıyla birçok farklı genetik sorun sadece işitme kaybı ile kliniğe yansımaktadır. Bu iki zorluk uzun yıllar işitme kaybının genetik özelliklerinin aydınlatılmasına engel olmuştur. Ancak 1990'lı yılların başında büyük ve

akraba evliliği olan işitme kayıplı ailelerin Pakistan, Hindistan, Lübnan ve Kuzey Afrika ülkelerinde ortaya çıkarılması çok önemli adımların atılmasına ön ayak olmuştur. Bu aileler sayesinde tek bir ailede genom boyu bağlantı analizi yapılabilmiş ve büyük bir hızla işitme kaybı gen lokusları ortaya çıkarılmıştır. Bu hızlı süreç 1997’de ilk sendromik olmayan işitme kaybı geni olan *GJB2* (konneksin 26)’nin saptanmasıyla yeni bir ivme kazanmıştır (Kelsell vd 1997). Bugüne değin 100’den fazla kromozomal lokus sendromik olmayan işitme kaybı ailelerinde tespit edilmiştir (<http://webhost.ua.ac.be/hhh>). Bu bölgelerden 25’inde otozomal dominant, 38’inde otozomal resesif ve ikisinde de X’e bağlı kalıtım biçimlerine uyan bir veya birden fazla hastalık yapıcı mutasyon tespit edilmiştir (Çizelge 1.3).

**Çizelge 1.3.** Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X’e bağlı işitme kaybı yapan genler ([webhost.ua.ac.be/hhh](http://webhost.ua.ac.be/hhh))

Lokus	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli	Referans
Yok	<i>CRYM</i>	16p13.11-p12.3	Otozomal dominant	Abe vd 2003
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	5q31	Otozomal dominant	Lynch vd 1997
DFNA2	<i>GJB3 (Cx31)</i>	1p34	Otozomal dominant	Xia vd 1998
DFNA2	<i>KCNQ1</i>	1p34	Otozomal dominant	Kubisch vd 1999
DFNA3	<i>GJB2(Cx26)</i>	13q12	Otozomal dominant	Kelsell vd 1997
DFNA3	<i>GJB6(Cx30)</i>	13q12	Otozomal dominant	Grifa vd 1999
DFNA4	<i>MYH14</i>	19q13	Otozomal dominant	Donaudy vd 2004
DFNA5	<i>DFNA5</i>	7p15	Otozomal dominant	Van Laer vd 1998
DFNA6/14	<i>WFS1</i>	4p16.3	Otozomal dominant	Bespalova vd 2001, Young vd 2001
DFNA8/12	<i>TECTA</i>	11q22-24	Otozomal dominant	Verhoeven vd 1998
DFNA9	<i>COCH</i>	14q12-q13	Otozomal dominant	Robertson vd 1998
DFNA10	<i>EYA4</i>	6q22-q23	Otozomal dominant	Wayne vd 2001
DFNA11	<i>MYO7A</i>	11q12.3-q21	Otozomal dominant	Liu vd 1997a

<b>Lokus</b>	<b>Gen</b>	<b>Kromozomal lokalizasyon</b>	<b>Kalıtım Modeli</b>	<b>Referans</b>
DFNA13	<i>COL11A2</i>	6p21	Otozomal dominant	McGuirt vd 1999
DFNA15	<i>POU3F4</i>	5q31	Otozomal dominant	Vahava vd 1998
DFNA17	<i>MYH9</i>	22q	Otozomal dominant	Lalwani vd 2000
DFNA20/26	<i>ACTG1</i>	17q25	Otozomal dominant	van Wijk vd 2003, Zhu vd 2003
DFNA22	<i>MYO6</i>	6q13	Otozomal dominant	Melchionda vd 2001
DFNA28	<i>TFCP2L3</i>	8q22	Otozomal dominant	Peters vd 2002
DFNA36	<i>TMC1</i>	9q13-q21	Otozomal dominant	Kurima vd 2002
DFNA39	<i>DSPP</i>	4q21.3	Otozomal dominant	Xiao vd 2001
DFNA44	<i>CCDC50</i>	3q28	Otozomal dominant	Modamio-Hoybjor vd 2007
DFNA48	<i>MYO1A</i>	12q13-q14	Otozomal dominant	Donaudy vd 2003
DFNA50	<i>MIRN96</i>	7q32.2	Otozomal dominant	Mencia vd 2009
DFNA51	<i>TJP2</i>	9q12-q13	Otozomal dominant	Walsh vd 2010
Yok	<i>GJB3(Cx31)</i>	1p34.3	Otozomal resesif	Liu vd 2000
DFNB1	<i>GJB2 (Cx26)</i>	13q11-q12	Otozomal resesif	Kelsell vd 1997
DFNB1	<i>GJB6(Cx30)</i>	13q12	Otozomal resesif	del Castillo vd 2002
DFNB2	<i>MYO7A</i>	11q	Otozomal resesif	Liu vd 1997b, Weil vd 1997
DFNB3	<i>MYO15A</i>	17p11.2	Otozomal resesif	Wang vd 1998
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	7q31	Otozomal resesif	Li vd 1998
DFNB6	<i>TMIE</i>	3p21	Otozomal resesif	Naz vd 2002
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	9q13-q21	Otozomal resesif	Kurima vd 2002
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	Otozomal resesif	Scott vd 2001
DFNB9	<i>OTOF</i>	2p23-p22	Otozomal resesif	Yasunaga 1999
DFNB12	<i>CDH23</i>	10q21-q22	Otozomal resesif	Bork vd 2001

<b>Lokus</b>	<b>Gen</b>	<b>Kromozomal lokalizasyon</b>	<b>Kalıtım Modeli</b>	<b>Referans</b>
DFNB16	<i>STRC</i>	15q15	Otozomal resesif	Verpy vd 2001
DFNB18	<i>USH1C</i>	11p15.1	Otozomal resesif	Ahmed vd 2002, Ouyang vd 2002
DFNB21	<i>TECTA</i>	11q22-q24	Otozomal resesif	Mustapha vd 1999
DFNB22	<i>OTOA</i>	16p12.2	Otozomal resesif	Zwaenepoel vd 2002
DFNB23	<i>PCDH15</i>	10q21-q22	Otozomal resesif	Ahmed vd 2003a
DFNB24	<i>RDX</i>	11q.23	Otozomal resesif	Khan vd 2007
DFNB25	<i>GRXCRI</i>	4p13	Otozomal resesif	Schraders vd 2010a
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	22q13.1	Otozomal resesif	Riazuddin vd 2006a, Shahin vd 2006
DFNB29	<i>CLDN14</i>	21q22.3	Otozomal resesif	Wilcox vd 2001
DFNB30	<i>MYO3A</i>	10p11.1	Otozomal resesif	Walsh vd 2002
DFNB31	<i>WHRN</i>	9q32-q34	Otozomal resesif	Mburu vd 2003
DFNB35	<i>ESRRB</i>	14q24.3	Otozomal resesif	Collin vd 2008
DFNB36	<i>ESPN</i>	1p36.3-p36.1	Otozomal resesif	Naz vd 2004
DFNB37	<i>MYO6</i>	6q13	Otozomal resesif	Ahmed vd 2003b
DFNB39	<i>HGF</i>	7q21.11	Otozomal resesif	Schultz vd 2009
DFNB49	<i>TRIC</i>	5q12.3-q14.1	Otozomal resesif	Riazuddin vd 2006b
DFNB53	<i>COL11A2</i>	6p21.3	Otozomal resesif	Chen vd 2005
DFNB59	<i>PJVK</i>	2q31.1-q31.3	Otozomal resesif	Delmaghani vd 2006
DFNB61	<i>SLC26A5</i>	7q22.1	Otozomal resesif	Liu vd 2003
DFNB63	<i>LRTOMT</i>	11q13.4	Otozomal resesif	Ahmed vd 2008
DFNB67	<i>TMHS</i>	6p21.3	Otozomal resesif	Shabbir vd 2006
DFNB73	<i>BSND</i>	1p32	Otozomal resesif	Riazuddin vd 2009
DFNB77	<i>LOXHDB1</i>	11q13.3-q13.4	Otozomal resesif	Grillet vd 2009

Lokus	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli	Referans
DFNB79	<i>TPRN (C9orf75)</i>	9q34.3	Otozomal resesif	Rehman vd 2010,Li vd 2010
DFNB84	<i>PTPRQ</i>	12q15	Otozomal resesif	Schraders vd 2010b
DFNB91	<i>SERPINB6</i>	6p25.2	Otozomal resesif	Sırmacı vd 2010
Yok	<i>PDZD7</i>	10q24.31	Otozomal resesif	Schneider vd 2009
DFN2	<i>PRPS1</i>	Xq22-q24	X'e bağlı	Liu vd 2010
DFN3	<i>POU3F4</i>	Xq21.1	X'e bağlı	de Kok vd 1995

### 1. 1. 3. İç Kulakta Görev Alan Proteinler

İşitmenin karmaşık mekanizmasının yoğun trafiğinin sağlanmasında rol alan proteinleri görevlerine göre gruplamak mümkündür. Genel olarak bunlar, kohlear homeostazı sağlayan proteinler, kohlear matrix proteinleri, nöral iletim proteinleri, stereosil yapısında görevli proteinler, hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalmasında görevli proteinlerdir.

Gap junction (aralıklı bileşkeler), tight junction (sıkı bağlantılar), iyon kanalı ve taşıyıcısı olan proteinler kohlear homeostazın sağlanmasında görevlidirler. Gap junctionlar, komşu hücrelere iyon geçişine izin veren, hücrelerarası, konnekzon adı verilen kanalları oluştururlar. Bu kanallar iç kulakta ( $K^+$ ) homeostazını sağlarlar. İç kulakta ifade olan dört konneksin bulunmaktadır. Bunlar; Cx26, Cx31, Cx30 ve Cx45'dir. Sıkı bağlantılar, korti organının potasyumca zengin endolenfi ile sodyumca zengin perilenfini ayırmak için bariyer görevi yaparlar. *CLDN14* ve *TRIC* genleri bu proteinlerin üyelerini kodlar. *KCNQ4*, *KCNQ1*, *KCNE1* genlerinin kodladığı potasyum kanalı proteinleri, *SLC26A4*, *TMC1*, *TMPRSS3* genlerinin ürünleri olan transmembran proteinleri ve transkripsiyon faktörlerinden oluşan kohlear pigmentasyon proteinleri ise iyon kanalı ve taşıyıcısı olan proteinlerdir. *ESSRB* genini kodladığı transkripsiyon faktörlerinin nüklear hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan östrojen ilişkili reseptör beta proteini de homeostazda görevli diğer bir proteindir.

Ekstraselüler matrix proteinleri kohleada sesin meydana gelmesi ve yayılmasının biyomekanik işleminde kritik rol oynar. Tektoral membran, bu yapının anahtar elemanı olan kollajen ve kollajen olmayan glikoproteinleri içerir. *TECTA*, *COL11A2*, *COL11A1*, *COL2A1*, *OTOA*, *STRC*, *OTOG* genleri tektoral membran proteinlerini kodlayan genlerdendir.

*PJVK* ve *OTOF* genlerinin kodladığı proteinler nöral iletimde görevli proteinlerdir.

Miyozin genleri (*MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYO15A*), *ESPN*, *SLC26A5*, *TRIOBP*, *RDX*, *WHRN*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15* genleri, stereosil yapısındaki proteinleri kodlar. Bu proteinler tüy hücrelerinin hareket ve hücre sel organizasyonunda görev alırlar.

Hepatosit büyüme faktörü olan HGF ve hücre içi proteaz inhibitörü olan SERPINB6 proteinleri hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalımında görev alırlar.

Henüz görevi tam olarak tanımlanamamış yüzlerce protein iç kulağın yapısında yer almaktadır.

### **1. 1. 3. 1. Miyozinler**

Miyozinler, aktin filamentine bağlanarak ATP hidrolizi ile mekanik güç sağlayan proteinlerdir. Ağır zincirlerindeki sekans benzerliklerine göre 30'dan fazla sınıfa ve filament yapısına göre konvansiyonel ve konvansiyonel olmayan miyozinler olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

İlk bulunan sınıf olan Sınıf II miyozinler konvansiyonel miyozinler grubunu oluşturur. Diğer miyozinler konvansiyonel olmayan miyozinlerdir. Konvansiyonel miyozinlerde uzun bir  $\alpha$ -heliks dizisi bulunmaktadır. Bu dizi sayesinde filament yapısı oluşturmak üzere kendisi ile etkileşime girebilmektedir. İki başlı filament şeklindeki yapıları ile kas kasılımının temelini oluşturarak kas ve kas olmayan hücrelerde ifade edilirler (Sellers 2000, Friedman vd 1999).

Konvansiyonel olmayan miyozinler filament oluşturmayan miyozinlerdir. Bu miyozin sınıflarının bazılarında (V, VI, VII, VIII, X, XI ve XIII) ise daha kısa bir halkasal bölge

bulunur, bu bölge ile yine kendi üzerlerine katlanabilirler ama kendileri ile etkileşime giremezler. Bazı sınıflarda (I, III, IV, IX, XII, XIV ve XV) ise böyle bir yapıya hiç rastlanmamaktadır ve bunlar monomerik olan miyozin proteinleridir (Friedman vd 1999).

Miyozinler genel olarak üç fonksiyonel alt birimden oluşmaktadırlar:

1. Aktinlerle ilişki kurulması ve ATP bağlanmasında görevli olan baş (motor) bölgesi
2. Hafif zincir ve kalmodülün bağlanmasında görevli olan boyun bölgesi
3. Aktinle etkileşime giren ve hücre içinde taşınmada görev yapan kuyruk bölgesi (Sellers 2000).

Miyozinlerdeki SH3 bölgesi, GAP bölgesi, FERM bölgesi, PH bölgesi gibi diğer fonksiyonel gruplar ise genelde kuyruk kısmında yer alırlar (Sellers 2000).

Miyozin ailelerinde sınıflandırma, proteinlerin N-terminal bölgerindeki farklılıklara bakılarak yapılmaktadır. N-terminal bölge aynı zamanda aktin ve ATP bağlanma bölgelerini de içerdiğinden motor bölgesi olarak da adlandırılmaktadır ve miyozin molekülünün bu bölgesi aktin filamentlerinin hareketinin sağlanmasında görev yapmaktadır (Redowicz 1999). Miyozinlerin boyun kısmında ise sayıları farklı olmakla birlikte IQ motifleri bulunmaktadır. Bu motiflere kalmodülün ya da miyozin hafif zincirleri bağlanmaktadır. Miyozinlerin C-terminal kuyruk bölgesi ise değişkenlik göstermektedir. Bu bölge filamentlerle ilişki kurma, spesifik membran bölgelerine hedeflenme ya da hücrel iletim gibi spesifik miyozin fonksiyonları için gereklidir (Redowicz 1999).

Konvansiyonel olmayan miyozinler; endositoz, iyon kanallarının regülasyonu, kalmodulin lokalizasyonu, keseciklerin ve sitoplazmadaki partiküllerin hareketleri ve iç kulak hücresi stereosillerin bağlanması gibi farklı birçok görevde yer alırlar. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, miyozinlerin enzimatik özellikleri, aktin taşınmasındaki yetenekleri ve regülasyon modellerinde, hem sınıf içinde hem de sınıflar arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Kulakta bulunan konvansiyonel olmayan miyozinler stereosillerin organizasyonunda ve uç bağlantıların hareketinde görev alırlar (Friedman vd 1999).

İç kulakta yer alan miyozinler, aktinle dolu olan stereosillerde ve aktince zengin olan kütikula tabakasında mevcuttur. Stereosillerin uç bağlantılarının gerginliğinden ve



hareketinden sorumlu olan miyozinler aynı zamanda tüy hücrelerinin hücre iskeleti organizasyonundan da sorumludurlar (Sellers 2000).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda insanda sendromik olmayan otozomal resesif ya da dominant işitme kaybına neden olan beş miyozin geni (*MYO15A*, *MYO7A*, *MYO6*, *MYO3A* ve *MYO1A*) gösterilmiştir (Dror ve Avraham 2009).

*MYO15A* geni tüy hücrelerinde aktin moleküllerinin organizasyonu için gerekli konvansiyonel olmayan Miyozin XVa proteinini kodlar. Bu gendeki mutasyonlar konjenital otozomal resesif çok ileri işitme kaybına neden olmaktadır (Friedman vd 1995).

İnsanda *MYO6* mutasyonları dominant (DFNA22) ve resesif (DFNB37) sendromik olmayan işitme kaybına neden olmaktadır (Melchionda vd 2001, Ahmed vd 2003b).

*MYO1A* genindeki mutasyonlar sendromik olmayan otozomal dominant (DFNA48) işitme kaybına neden olmaktadır. Bu genin ürünü olan Miyozin Ia proteininin iç kulakta ve kohleada ifade edildiği gösterilmiştir (D'Adamo vd 2003).

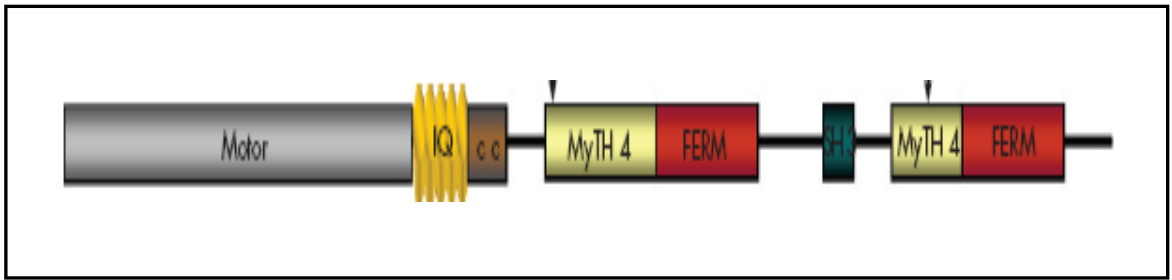
*MYO3A* geninde mutasyon olduğunda sendromik olmayan otozomal resesif (DFNB30) işitme kaybı görülmektedir. Bu genin kodladığı Miyozin IIIa proteini insan retinasında fotoreseptör hücrelerinde ve özellikle kohleadaki i ve dış tüy hücrelerinde ifade olmaktadır (Walsh vd 2002).

### **1. 1. 3. 2. *MYO7A* Geni ve Proteini**

*MYO7A* geni 11. kromozomun q13.5 (kromozom 11: 76,839,310-76,926,286) bölgesinde yaklaşık 87 kb'lık genomik sekans üzerinde bulunmakta ve 49 ekzondan oluşmaktadır. Genin 48 ekzonu, 2215 aminoasitlik 254 kDa moleküler ağırlığında konvansiyonel olmayan bir miyozin olan miyozin VIIa proteinini kodlamaktadır. Genin 14 transkripti bulunmaktadır. En büyük transkripti 7.4 kb büyüklüğündedir.

Bu gendeki mutasyonlar, fotoreseptör hücrelerindeki mikrotübüllerde, nazal silya ve sperm hücrelerinde anormal organizasyona ve korti organının dejenerasyonuna sebep olmaktadır.

Bu genin kodladığı miyozin VIIa proteini diğer miyozinler gibi 3 bölgeden oluşmaktadır. Proteinin baş kısmı N-terminal ve motor bölgelerini, boyun kısmı 5 IQ motifini ve kuyruk kısmı kısa bir sarılmış sarmal motifini takip eden iki uzun MyTH4 ve FERM bölgesi tekrarını ve tekrarların arasında bulunan SH3 bölgesini içermektedir (Şekil 1.4). Motor bölgesi aktin filamentleri ile proteinin ilişkisine izin verir. Kuyruk bölgesindeki sarılmış sarmal motifi proteinin homodimer oluşturmasını, FERM bölgesi ise plazma membranı ile etkileşimini sağlar. SH3 bölgesi ise proteinin prolince zengin dizilere bağlanmasında görev yapmaktadır (Chen vd 1996).



**Şekil 1.4.** Miyozin VIIa protein yapısı (Jaijo vd 2007)

Proteinin motor bölgesi 17 ekzonun kodladığı 729 a.a.'ten, boyun bölgesi 3 ekzonun kodladığı 126 a.a. ve kuyruk bölgesi 28 ekzonun kodladığı 1360 a.a.'ten oluşmaktadır (Weil vd 1996). Miyozin VIIa konvansiyonel olmayan miyozinler içinde en uzun kuyruk bölgesine sahiptir (Weil vd 1996). Miyozin VIIa kuyruk kısmıyla, harmonin, SANS ve PCDH15'e bağlanır (Adato vd 2005, Reiners vd 2006, Senften vd 2006).

İnsanda miyozin VIIa proteini, iç kulak, retina, testis, akciğer ve böbrekte eksprese olmaktadır. İç kulakta tüy hücrelerinin sitoplazmasında ve stereosillerinde bulunur. Retinada fotoreseptörlerin sillerinde, retinal pigment epitelyum hücrelerinin apikal kısmında ve bu hücrelerin içindeki melanosomelarda yer alır (Wolfrum vd 1998, El-Amraoui vd 2002, Gibbs vd 2004). İç kulakta vezikül taşınmasında, retinada ise fotoreseptör hücrelerinin iç kısmından dış kısmına opsin taşınmasında görevli olduğu düşünülmektedir (Hasson vd 1997, Liu vd 1999).

*Myo7a* mutasyonu taşıyan 2 fare modeli tanımlanmıştır; resesif mutant “shaker1” ve dominant mutant “headbanger” modelleri. “Shaker1” farelerinde “headbanger” fareleri ile benzer şekilde hiperaktivite, baş sallama, dönme ve corti organında ilerleyen dejenerasyon ve fonksiyon bozukluğu ve “headbanger” modelinden farklı olarak stereosil organizasyonunda bozulmalar görülmektedir (Gibson vd 1995). “Headbanger” modelinde dış tüy hücresi stereosilleri “V” şekli yerine “O” şeklindedir ve çoğu iç tüy hücresi stereosilleri kaynaşarak ve uzayarak dev stereosil şeklini almıştır (Rhodes vd 2004). Farelerde miyozin VIIa, fotoreseptör hücrelerde değil, onların altında yer alan pigment epitelyum hücrelerde (RPE) ekspresyon göstermektedir. Bu yüzden “shaker1” farelerinde insandan farklı olarak retinal dejenerasyon görülmemektedir. RPE içindeki melanozomun yerleşimi miyozin VIIa’nın doğru fonksiyonuna bağlıdır. Mutant farelerin fotoreseptör hücreleri üzerindeki çalışmalar bu hücrelerde bulunan membran bağlı G protein bağlı ışığa duyarlı reseptörler olan opsin taşınmasının bozulduğunu göstermiştir (Liu vd 1999).

İnsanda *MYO7A* genindeki mutasyonlar tip1B Usher sendromuna, atipik Usher sendromuna, sendromik olmayan resesif (DFNB2) ve sendromik olmayan dominant (DFNA11) işitme kaybına neden olmaktadır. (Yan ve Liu 2010, Liu vd 1997a, Liu vd 1997b, Liu vd 1998). Bu gende bugüne kadar 212 mutasyon tanımlanmış olup bunların yalnızca 4 tanesi sendromik olmayan resesif işitme kaybı ile 5 tanesi sendromik olmayan dominant işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı ile ilk ilişkilendirilmiş mutasyon Tunuslu bir ailede tanımlanan p.M599I’dır (Weil vd 1997). Ancak bu hastalarda ilerleyen yaşlarda RP geliştiği bildirilmiştir (Zina vd 2001). RP’leri olmadığı ERG ile gösterilmiş ancak vestibüler bozukluk bulguları bulunan Çinli iki ailenin birinde homozigot p. R244P mutasyonu, diğerinde de IVS3nt-2A>G ve p.V1199insT mutasyonu birleşik heterozigot olarak bulunmuştur (Liu vd 1997b) . Ancak etkilenmiş bireylere ERG yapıldığında yaşları 25 ile 33 arasında olduğundan geç başlangıçlı RP dışlanmamıştır. Pakistanlı işitme kayıplı bir ailede *MYO7A* geninde p.E1716del (c.5146-5148delGAG) mutasyonu tanımlanmıştır. Bu ailenin vestibüler bulguları ve ERG bulguları normaldir. 48 yaşındaki bir etkilenmiş bireyin ERG’si de normal olduğu için geç başlangıçlı olabilecek RP de dışlanmıştır. Son olarak vestibüler bulguları ve fundus muayenesi normal olan İranlı işitme kayıplı bir ailede *MYO7A* geninde p.R395H mutasyonu tanımlanmıştır. Hasta 42 yaşında olduğu için fundus

muayenesiyle şiddetli olabilecek RP dışlanabilmiş ancak ERG'si olmadığı için hafif seyredebilecek RP dışlanmamıştır (Hildebrand vd 2010).

Bugüne kadar toplam 38 gendeki değişikliklerin sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle işitme kaybı olan bir ailede sorumlu genetik değişikliğin saptanması zordur.

Uygun ailelerde az sayıda etkilenmiş birey kullanılarak yapılan genom boyunca SNP genotipleme ile sorumlu genetik değişikliklerin hangi gende olduğuna yönelenebilir ve daha sonra yapılacak mutasyon tarama yöntemleriyle gerçek değişikliklere ulaşılabilir.

## 1. 2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

### 1. 2. 1. Otozigozite Haritalaması

Otozomal resesif kalıtılan hastalıklarda etkilenmiş bir birey, sorumlu genin her iki kopyasında da ilgili mutasyonu taşımaktadır. Akraba evliliğinin olduğu ailelerde yüksek bir olasılıkla etkilenmiş bireylerde mutasyona uğrayan genin her iki kopyası da aynı atadan kalıtılmaktadır. Etkilenmiş bireyin anne babasının ortak atalarından birisinde heterozigot olarak mutasyon bulunmakta ve bu ortak atadan kuşaklar boyunca anne babaya heterozigot olarak kalıtılmaktadır. Dolayısıyla ortak atadaki mutasyonu çevreleyen polimorfik belirteçler kuşaklar boyunca daha düşük olasılıkla rekombinasyona uğramaktadır. Bu prensibe göre, etkilenmiş bireyde mutasyona uğrayan genin etrafındaki kromozomal bölgenin homozigot olması beklenir ve bu kromozomal bölge otozigot olarak adlandırılmaktadır.

Hastalık geninin lokalizasyonunun tahmin edilmesi için aynı soydan gelen etkilenmiş bireylerde homozigot kromozomal bölgeler ilk olarak RFLP haritalaması yapılarak çıkartılmıştır (Lander ve Botstein 1987). Ebeveynleri akraba olan etkilenmiş bireylerde hastalığa sebep olan lokusun çevresindeki bölgenin tercihli olarak homozigot olmasına dayanan bu yönteme otozigozite haritalaması denilmiştir (Morton 1991). Homozigot blok taraması yalnızca etkilenmiş bireylere bakılarak yapılıyorsa buna homozigozite denir. Bu yöntem için uygun ailelerde az sayıda etkilenmiş birey kullanılarak yapılan genom boyunca SNP veya mikrosatellit genotiplemesi ile sorumlu genetik değişikliklerin hangi kromozom bölgesinde olduğuna yönelinebilir (Woods vd 2004). Büyük homozigot blokların içindeki genlerin hastalıkla ilişkili olduğu düşünülebilir. Homozigot bölgeleri paylaşan etkilenmiş birey sayısı ve bölgenin büyüklüğü arttıkça hastalığa sebep olan mutasyon bölgesini tahmin etmek kolaylaşır. Mueller ve Bishop (1993) çok etkilenmiş bireyli tek aile kullanımını modellemişler ve bunun hastalık lokusu belirlemede en etkili yöntem olduğunu önermişlerdir.

Homozigozite haritalaması ile ortaya çıkarılan ilgili kromozomal bölgelerin büyüklüğü anne baba arasındaki akrabalığın derecesi, bilgi verici olan aile bireylerinin sayısı, tahmini doğal rekombinasyon oranı gibi faktörlere bağlıdır. Akraba evliliğinin derecesi düşük olan

ailelerde hastalıkla ilgili olarak aranan homozigot bölge daha küçük olmaktadır (Gibbs ve Singleton 2006).

### **1. 2. 2. Mikrodizin Analizi**

Mikrodizin teknolojisi bütün genomun basit bir çip üzerinde görüntülenmesini ve bu sayede bilim adamlarının aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmesine olanak tanıyan bir teknolojidir. Oligonükleotidlerin veya cDNA parçalarının yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkmıştır. Yöntemin temelini Northern ve Southern Blot tekniklerinin dayandığı baz eşleşmesi yani hibridizasyon oluşturmaktadır (Maskos ve Southern 1992, 1993). Bu teknikte membran yerine cam, radyoaktivite yerine floresan işaretler kullanılmaktadır. Tek zincirli işaretlenmiş DNA molekülü çipin üzerindeki oligonükleotidlere bağlanmakta ve cihazdaki okuma işlemi sırasında ışınla yapılmaktadır. Bu ışınlar değerlendirilerek örneğin genotiplendirilmesi yapılmaktadır.

Oligoçipler 20-80 bp uzunluğundaki oligonükleotidlerin önce sentezlenip sonra çip yüzeyine sabitlenmesi veya doğrudan çip üzerinde sentezlenmesi (fotolitografi) ile üretilir. DNA mikroarrayler, cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzey üzerine belirli pozisyonlarda sıralı bir şekilde oluşturulmuş binlerce farklı gen sekanslarının immobilize edildiği mikroskobik DNA spotlarıdır. Bir mikroarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yüzeye tutturulan bu DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış çipler ticari olarak satılmaktadır.

Araştırmanın amacına göre kullanılacak mikroarray çeşitleri bulunmaktadır. Oligonükleotid mikroarrayleri 20-80 bp uzunluğunda problemlerin cam yüzeye basılması ile üretilir. Karşılaştırmalı genomik analizler gibi kompleks hedefler veya genomik delesyon ve kopya sayısı değişiklikleri için kullanılmaktadır. SNP mikroarrayleri bireylerde ve popülasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılmaktadır. cDNA mikroarrayleri 500-5000 bp uzunluğunda ESTs klon problemlerin cam yüzeye basılması ile üretilir ve gen ifadesi çalışmalarında kullanılır. Protein mikroarrayleri protein-protein, protein-lipid ve protein-mRNA ilişkilerini çalışmak için kullanılmaktadır.

SNP mikroarrayleri genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen tek nükleotid polimorfizmlerini belirlemede, adli tıp çalışmalarında, ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir. SNP mikroarrayleri ayrıca kansere neden olan somatik mutasyonların, özellikle de heterozigote kaybının ya da DNA bölgelerinin artan ya da kaybedilen (delesyon) profillerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

SNP mikroarrayinde olası bütün SNP genotiplerini içeren oligonükleotid problemleri cam ya da silikon yüzey üzerinde sentezlenmiştir. Bu arrayler ticari olarak satılmaktadır. Affimetrix firmasının protokolüne göre ilgilenilen genomik DNA restriksiyon enzimiyle kesilerek parçalara ayrılır. Kesimden elde edilen parçalar ligasyon işlemine tabi tutularak parçaların ucunda 4 baz açıkta kalacak şekilde adaptör bağlanır. Adaptörün dizisini tanıyan tek bir primer ile PCR yapılır. Bu PCR sonucunda 250-1000 bp aralığında ürünler elde edilir. Bu ürünler biyotin ile işaretlenir ve çip ile hibridize edilir. Çip bundan sonra yıkama, streptavidin phycoerythrin ile boyama ve tarama işlemlerinin yapılacağı cihaza takılır. Lazer ile yapılan taramada çip üzerindeki proba bağlanmış olan florasan işaretli moleküller ile biyotin ile işaretli ürünler bağlanınca lazer ile uyarıldıklarında ışımaya yaparlar. Array tarayıcının amacı, komplementer noktalara bağlanan probun yaydığı ışını tespit etmektir.

Affimetrix firması tarafından genom boyunca SNP taraması yapmak için geliştirilen Mapping 10K 2.0 Array ile 10.200 SNP, Mapping 100K Array ile 100.000 SNP, Mapping 500K Array ile 500.000 SNP ve Genome-Wide Human SNP Array 6.0 çipleri ile 906.600 SNP tarama imkanı sağlamaktadır. Bu platformda yer alan diğer bir firma ise Illumina'dır. Illumina HumanHap300 ile 317.000 SNP, Illumina HumanHap550 ile 550.000 SNP, Illumina HumanHap650Y ile 650.000 SNP, Illumina 1M ile 1.000.000 SNP taranabilmektedir.

Mikrodizin teknolojisi, çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimi izlemede, polimorfizm ve mutasyon analizinde, evölüsyonel çalışmalarda, asosiyasyon çalışmalarında, bağlantı analizlerinde ve yeniden sekanslamada kullanılabilir (Adomas vd 2008, Pollack vd 1999, Moran vd 2004, Hacia vd 1999). Bunların yanı sıra potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmelerinde mikroarraylerden yararlanılabilmektedir.

### 1. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA dizisinin in-vitro ortamda çoğaltılması yöntemidir. Bu yöntem bir polimeraz enzimiyle gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Yöntem hızlı ve az miktarda DNA örneği ile çalışma avantajı sağlamaktadır ve bu sayede moleküler biyoloji, adli tıp, evrim çalışmaları ve pek çok alanda tercih edilen önemli bir teknik oluşmuştur (Akar 1999).

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridisasyon), son olarak zincirin uzamasıdır (polimerizasyon). Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40'dır. Bir PCR işleminde "n" döngü sonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık  $2^n$  kez çoğaltılmış olur (Akar 1999).

İlk adımda, çift zincirli DNA 90-95°C'de yaklaşık 5-10 dk süreyle tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır. Ardından sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve DNA'nın uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidlerin tek zincirli DNA'ya özgül olarak bağlanması sağlanır. Bu oligonükleotidler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Öner 2002).

PCR reaksiyonu için kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir (Akar 1999).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi birçok faktöre bağlıdır. DNA polimerazın çalışabilmesi için en etkin olduğu pH değerinin tüm uygulama boyunca korunabilmesi gereklidir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde Tris.HCl pH: 8,4 tampon olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tampon karışımında 50-60 mM düzeyinde  $K^+$  ve 100 µg/mg jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Öner 2002).



Oligoprimelerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca  $T_m: 4(GC) + 2(AT)$  formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliği arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılan oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmalıdır aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri de rastgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermeme ve guanin, sitozin nükleotidlerinin %50'yi geçmemesi gerekmektedir (Öner 2002).

Kullanılan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan her bir dNTP'nin konsantrasyonunun eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur (Öner 2002).

$Mg^{++}$ , DNA polimerazın çalışmasını sağlayan en önemli faktör olup pozitif yükü sayesinde, negatif yüklü DNA molekülü arasına girerek oligonükleotidlerin DNA molekülüne bağlanmasını kolaylaştırır. Fazla  $Mg^{++}$  miktarı enzimin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzimin aktivitesini düşürür ve enzimin inaktive olmasına neden olur (Akar 1999).

#### **1. 2. 4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim**

Restriksiyon endonükleazlar (RE), bakterilerden izole edilen, çift sarmal DNA moleküllerini spesifik parçalara kesen ve bu şekilde DNA'yı manipüle etmeyi mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği ya da kısıtladığı için bu ismi almışlardır. Esas görevleri, dışarıdan bakteriye giren ve bazı

özel gen veya markörleri taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonları engellemek ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır (Akar 1999, Klug vd 2000).

RE'ler özgün DNA dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini şeker ve fosfat omurgasından kırarlar. Klonlama için çok önemli araçlar olmalarının nedeni, DNA'yı her zaman özgün bölgelerden parçalayabilmelerinden ileri gelmektedir. Tanıma dizileri çoğu restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçiğinde de aynıdır, bunlar "palindromik diziler" olarak adlandırılır (Akar 1999, Klug vd 2000).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken izole edilen prokaryotun cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır (Kaynak: **Desulfolobus desulfiricans**, RE enzimi: Dde I). İzosizomerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar 1999, Klug vd 2000).

#### **1. 2. 5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)**

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP)'dir. PCR tekniği kullanılarak uygulanan bu yöntem; denatüre edici olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jeldeki yürüme farklılığına dayanarak belirlemesini sağlar. Bu yöntem ile nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişikliklerini, delesyon ve insersiyonları belirlemeyi mümkün kılar (Akar 1999).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotid dizisine bağlı olarak belli bir şekil alır. DNA'daki herhangi bir değişiklik DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısıyla elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner 2002).

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde, mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılacak bölgenin baz içeriğine göre bir sıcaklık hesabı yapılır. PCR ürününün spesifikliğini arttırmak için belli oranda oligonükleotid ve formamid içeren yükleme boyası ile karıştırılır ve yüksek ısıda (99°C) tek zincirli hale getirilip, vertikal elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel hesaplanan sıcaklık değerinde belirli bir

voltajda yürütülür. Göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Baz dizisi farklı olan DNA parçacığı normal DNA parçacığına göre bant kayması gösterir (Öner 2002).

SSCP tekniği birçok öreğe aynı anda mutasyon taramasını yapabilmeyi sağladığı için moleküler teknik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 baz çiftini geçmemesi önerilmektedir. Bu yöntemle 200 bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400 bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80'dir (Akar 1999).

SSCP tekniğinin belirleme yeteneği mutasyonun tek zincirli DNA'da oluşturduğu konformasyonun elektroforetik hareketlerini nasıl etkilediğine bağlıdır (Öner 2002).

### **1. 2. 6. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi ya da “sequencing” DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir ve bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir.

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif <sup>32</sup>P ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adım, herbirinde bazlardan biri için kimyasal kesimin meydana geldiği dört ayrı reaksiyon karışımında gerçekleşir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır (Lüleci 2000). DNA parçacıklarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemi ile bantlar görüntülenir (Akar 1999, Öner 2002).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002). Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz enzimi ile kataliz edilir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği,

polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanması ile gerçekleştirilir (Akar 1999). Yöntemde kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilmez ve sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Herbir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP'den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır (Akar 1999, Öner 2002).

Günümüzde dizi analizi için otomatik DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyaları kullanılmaktadır (Öner 2002). Sistem, üzerindeki lazer ışığı ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2. 1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı ile Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışma 105S464 nolu "Otozomal Resesif Sensorinöral İşitme Kaybı Yapan Gen Değişimlerinin Ortaya Çıkarılması" isimli TÜBİTAK 1001 projesiyle kısmen desteklenmiştir. Anne baba arasında akrabalık olan ve en az iki etkilenmiş bireyde doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan 55 aile araştırmaya dahil edilmiştir. Bu ailelerin fenotipik/odyolojik özellikleri belirlenmiş, aile ağaçları çizilmiş ve çevresel işitme kaybı nedenlerine rastlanmamıştır. Hastalara gece körlüğü olup olmadığı sorulmuş, gelişimsel öyküleri kaba motor gelişimi içine alacak şekilde sorgulanmış, Romberg testi yapılmış ve poliklinik şartlarında göz dibi değerlendirilmiştir. Bunların sonunda açık olarak sendrom bulgularına rastlanmamıştır. Ailelerin hiçbirinde *GJB2* mutasyonlarının olmadığı gösterilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan formlar kullanılmıştır (Tarih:30.01.2006, Karar no:85-2215).

### 2. 2. Yöntemler

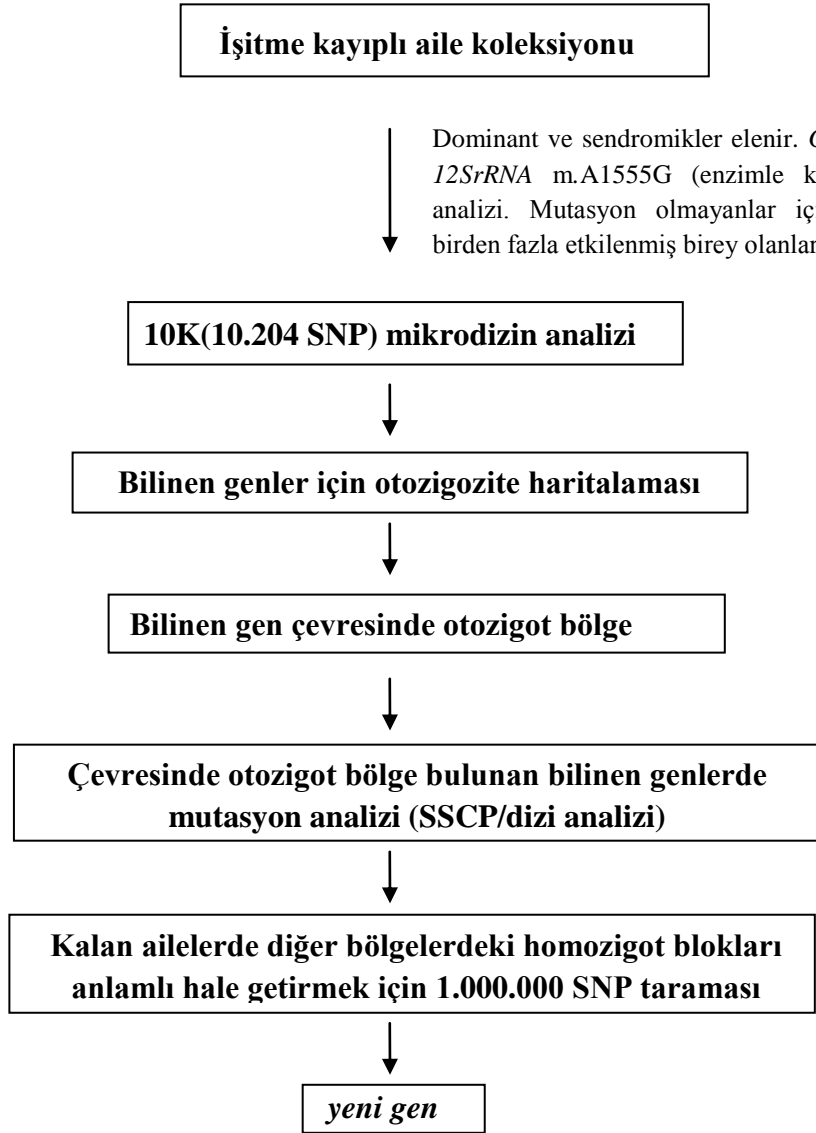
Bu çalışma Türkiye'deki işitme kaybı genlerinin ortaya çıkarılmasına yönelik projelerimizin yalnızca bir bölümünü oluşturmaktadır. İşitme kaybı genetiği ile ilgili bu projelerin amaçları;

- Bireyleri arasında sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı bulunan Türk ailelerde genom boyunca bağlantı analizi yapılarak sorumlu gen bölgelerinin ortaya çıkarılması
- Türkiye'de bugüne kadar çalışılmamış otozomal resesif genlerin Türkiye'deki işitme kayıpları içindeki öneminin saptanması

- İnsanda işitme kaybına neden olabilecek aday genlerin işitme engelli ailelerde taranarak “işitme kaybı geni” olup olmadıklarının ortaya konulmasıdır.

### 2. 2. 1. Strateji

İşitme engelli bireyleri olan 900 aileden oluşan DNA koleksiyonundan sendromik ve dominant işitme kaybı olan aileler öncelikle ayıklanıp, diğer ailelere *GJB2* ve MT DNA *12SrRNA* m.A1555G mutasyon analizi yapılır. Önce *GJB2* geninde c.35delG mutasyonu enzimle kesim yöntemiyle taranır. Bu mutasyon bulunmayan ailelerde *GJB2* geninin kodlayan ekzonu ve kodlamayan ekzonunda kırılma bölgesi mutasyonu olan c.-3201G>A mutasyonu DNA dizi analizi, MT DNA *12SrRNA* m.A1555G mutasyonu enzimle kesim yöntemleriyle taranır. Bu mutasyonların bulunmadığı aileler içinden, etkilenmiş bireylerin anne ve babası akraba olan ve birden fazla etkilenmiş bireye sahip aileler seçilir. Seçilen ailelerde 10.200 SNP taranır. Mikrodizin analizinin sonuçları ile otozomal resesif işitme kaybı yaptığı bilinen tüm genler için otozigozite taraması yapılır. Etkilenmiş bireylerde aynı olan SNP profillerinin oluşturduğu homozigot bloklar Excel tablosunda gözle taranarak büyüklüklerine göre sıralanır. Otozigozite taramasında çevresinde otozigot bölge bulunan bilinen genler SSCP ve/veya DNA dizi analiz yöntemleriyle taranır. Bilinen genler çevresinde otozigot blok bulunmayan veya otozigot bölge bulunmasına rağmen mutasyon bulunmayan ailelere, diğer homozigot blokları anlamlı hale getirebilmek için 1.000.000 SNP taraması yapılır. Bu SNP’lerin de oluşturduğu homozigot bloklar değerlendirilir ve o bölgeler içindeki genlerin fonksiyonları araştırılarak işitme kaybına sebep olabilecek aday genler seçilir. Aday genler DNA dizi analizi yöntemiyle taranır.



Bu tezin konusunu yalnızca *MYO7A* geni ile ilgili çalışmalar oluşturmaktadır. Mikrodizin analizi ile anne baba arasında akrabalık olan ve en az iki etkilenmiş bireyde doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan 55 aile taranmıştır. Ailelerin DNA izolasyonları klasik fenol kloroform yöntemiyle yapılmıştır. Mikrodizin analizi Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Array ve Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K XbaI Assay kitleri kullanılarak optimize edilmiştir. İşitme engelli bireylerin tüm genom boyunca tek nokta polimorfizmleri (SNP) genotiplendirilmiştir. İşitme engelli bireylerden elde edilen genotip verilerinde homozigoziteye bağlı, *MYO7A* geninin genomik bölgesini içine alan ve aynı aileden gelen işitme engelli bireylerin paylaştığı homozigot bloklar aranmıştır. *MYO7A* geni çevresinde

homozigot blok bulunan 7 aile için SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

### 2. 2. 2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem üç gün sürmektedir.

Bireylerden 1 mL 0,5 M etilendiamintetraasetilasilikli (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 mL kan örneği alınır. Alınan kan örneği falkon tüpüne (50 mL) konur ve içerisinde 25 mL RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4 °C'de, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki pellet üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. Bu işlem eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH:8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenerek bir gece 56 °C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilir.

İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'nu kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve yoplam hacmin iki katı kadar %95'lik Alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4°C'de, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µL %70'lik alkol eklenir ve +4°C'de, 4000 rpm'de



20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C’de bir gece bekletilerek DNA’nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C’de veya -20°C’de saklanabilmektedir.

### **2. 2. 3. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünlerini %2’lik, c.35delG mutasyonunun enzimle kesimleri %3’lük ve m.A1555G mutasyonunun enzimle kesimleri %1’lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. %1’lik agaroz jel için 1.5 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 150 ml’ye tamamlandı. %2’lik agaroz jel için 3 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 150 ml’ye tamamlandı. %3’lük agaroz jel için 4.5g agaroz tartılıp TBE 1X solüsyonu ile 150 ml’ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Trizma<sup>®</sup> (Sigma, ABD), 27,5 g Borik asit (Carlo Erba, İtalya), 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ABD) ve deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) ile 1L’ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid’in (Sigma, ABD) %5’lik stok solüsyonundan 2’şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 5 µl, enzimle kesim ürünlerinden 10 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 2 µl Brom-Fenol Mavis (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. Ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD) ürünlerle birlikte jelle 2 µg kadar yüklenir. 90-100 V akımda 20 dk kadar yürütülür (Wealtec, Tayvan). Ultraviyole ışıkta (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser’da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanır.

## 2. 2. 4. *GJB2* ve *12SrRNA* Geni Mutasyon Analizi

### 2. 2. 4. 1. *GJB2* Geni Mutasyon Analizi

Bu gende öncelikle c.35delG mutasyonu, PCR/RFLP yöntemi ile taranmıştır.

*GJB2* geninin 2. ekzonu için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanılmıştır:

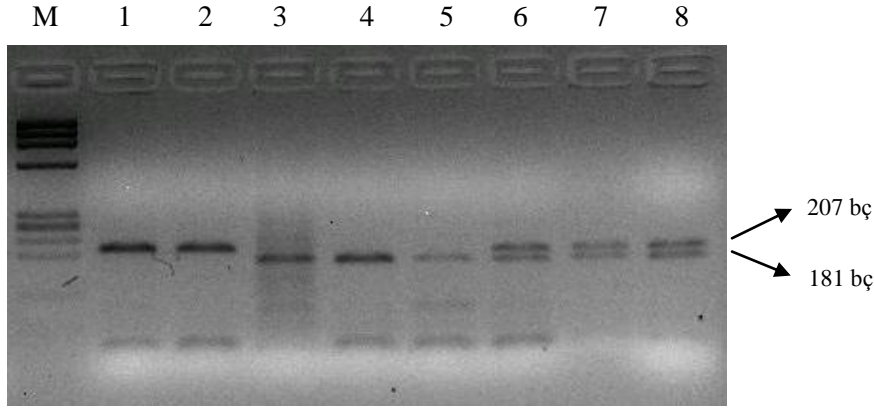
F48: 5'-GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG-3'

R233: 5'-CTGGTGGAGTGTGTTTGTCCAC-3'

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'dir. Son hacim 50 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*GJB2* geni 2. ekzon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C 10 dk, bunu izleyen 15 siklusta; 94°C'de 1 dk, 63°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk, son 20 siklusta ise 94°C 1 dk, 61°C 1 dk, 72°C 1 dk ve 72°C 7 dk olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 207 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir.

207 bç'lik PCR ürünleri c.35delG mutasyonunu belirlemek amacıyla BseLI (5'-CCNNNNN↓NNGG-3') restriksiyon endonükleaz enzimi (Fermentas, Litvanya) ile kesime tabi tutuldu. 10mM Tris-HCl (37°C'de pH: 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl ve 0.1 mg/ml BSA'dan oluşan restriksiyon endonükleaz tamponu ve 10 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi PCR ürünleriyle muamele edilerek enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 55°C'de 16 saat inkübe edildi. Kesilen örnekler %3'lük agaroz jelde oluşan bant profillerine göre incelenmiştir. Enzim mutant diziyi 181. bazdan keserek, heterozigot örneklerde 207, 181 ve 26 bç, homozigot mutant olan örneklerde ise 181 ve 26 bç'lik fragmentler oluşturur (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** *GJB2* geni c.35delG mutasyonunun BseLI enzimi ile belirlenmesi

**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker

**2:** Homozigot normal

**3,4,5:** Homozigot mutant

**6,7,8:** Heterozigot

### **c.35delG mutasyonu bulunmayan örnekler için;**

*GJB2* geninin kodlayan ve kodlamayan ekzonları DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir.

**I.** *GJB2* geninin kodlayan ekzonunu dizi analizi ile taramak için gen iki parçaya bölünerek PCR ile çoğaltılır.

1. bölge için her biri 0,1  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanılmıştır:

CX26F7: 5'-CTGCAAGAACGTGTGCTACG-3'

CX26R1: 5'-TGAGCACGGGTTGCCTCATC-3'

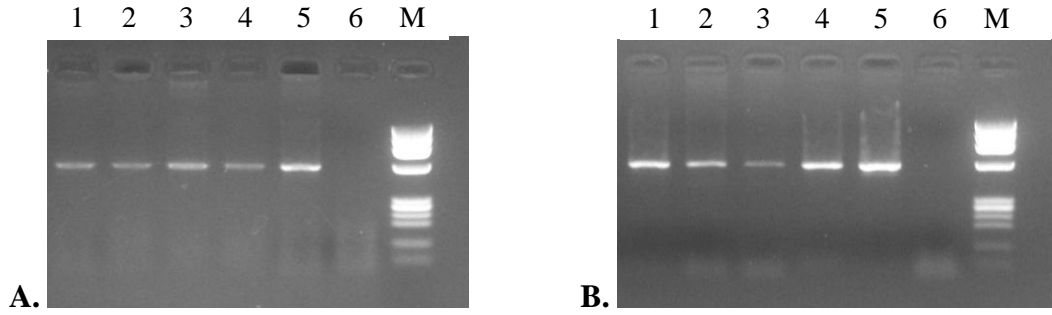
2. bölge için her biri 0,1  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanılmıştır:

CX26F4: 5'-GCTTACCCAGACTCAGAGAAG-3'

CX26R3: 5'-GAAGACGTACATGAAGGC-3'

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'dir. Son hacim 50 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C 10 dk, bunu izleyen 35 siklusta 94°C'de 1 dk, 58°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 7 dk olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 1. bölge için 569 bç, 2. bölge için ise 562 bç uzunluğunda oligonükleotid ürünler elde edilmiştir (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2:** *GJB2* geni kodlayan ekzonunun 2 bölgesinin PCR görüntüsü.

**A.** 1. bölge 569 bç'lik PCR ürünü (1-5) **B.** 2. bölge 562 bç'lik PCR ürünü (1-5). **M:** φX174 DNA-HaeIII Marker **6:** Negatif Kontrol

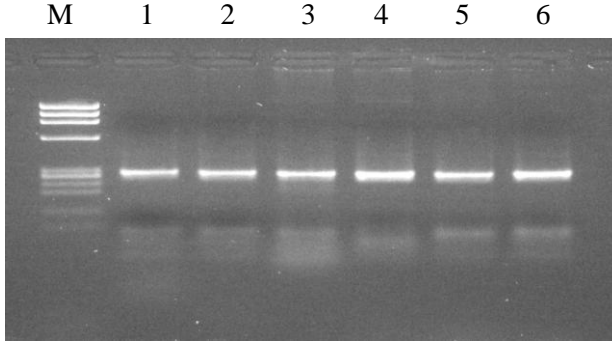
**II.** *GJB2* geninin kodlamayan TATA bölgesi için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanılmıştır:

26TATAEX1F: 5'-CCGGAAGCTCTGAGGAC-3'

26TATAEX1R: 5'-GCAACCGCTCTGGGTCTC-3'

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'dir. Ayrıca, bu bölge GC'ce zengin olduğundan örnek başına son konsantrasyon 1M olacak şekilde betain kullanılmaktadır. Son hacim 50 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C 10 dk, bunu izleyen 35 siklуста 94°C’de 1 dk, 58°C’de 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 7 dk olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 363 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3:** *GJB2* geninin kodlamayan TATA bölgesi PCR görüntüsü  
**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker  
**1-6:** 363 bç’lik PCR ürünü

DNA dizi analizi öncesinde PCR ürünlerinin dNTP ve primer artıklarından temizlenmesi için kolonlu pürifikasyon kiti kullanılmıştır (Roche, ABD).

#### **2. 2. 4. 2. Mitokondriyal DNA’da *I2SrRNA* m.A1555G Mutasyon Analizi**

Bu gende m.A1555G mutasyonu, PCR/RFLP yöntemi ile taranmıştır.

*I2SrRNA* için her biri 0,1  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanılmıştır:

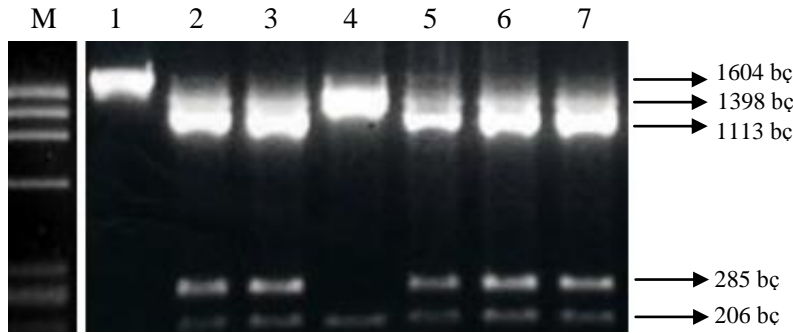
F: 5’-CCGCCATCTCTCAGCAAACCCT-3’

R: 5’-TGAAGTCTTAGCATGTACTGCTCG-3’

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 50  $\mu$ l’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C 10 dk, bunu izleyen 35 siklusta 94°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 7 dk olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 1604 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir.

1604 bp'lık PCR ürünleri m.A1555G mutasyonunu belirlemek amacıyla BsmAI (5'-GTCTCN↓N-3') restriksiyon endonükleaz enzimi (NEB, USA) ile kesime tabi tutuldu. 10mM Tris-HCl (37°C'de pH: 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl ve 0.1 mg/ml BSA'dan oluşan restriksiyon endonükleaz tamponu ve 10 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi PCR ürünleriyle muamele edilerek enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 55°C'de 16 saat inkübe edildi. Kesilen örnekler %1'lik agaroz jelde oluşan bant profillerine göre incelenmiştir. Enzim yabancı tipte; 1113, 285, 206 bp, mutasyon olması durumunda ise; 1398 ve 206 bp uzunluğunda fragmentler oluşturmaktadır. (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4:** *I2SrRNA* m.A1555G mutasyonunun BsmAI enzimi ile belirlenmesi

**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker

**1:** Kesilmemiş PCR ürünü

**2,3,5,6,7:** Yabancıl tip

**4:** Mutant

### 2. 2. 5. Mikrodizin Analizi

GeneChip Mapping XbaI 10K 2.0 Assay insan genomunda 10.200 tane tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) tek bir çip ve tek bir PCR primeri ile genotiplendirilmesini sağlamaktadır. SNP mikroarraylerin de yardımıyla hastalığa veya hastalığa yatkınlığa neden olan genler saptanmaktadır.

Bu yöntemle genomik DNA belirli yerlerinden XbaI restriksiyon enzimi yardımıyla kesilmektedir. Ardından oluşan bu parçaların ucuna adaptörler bağlanmaktadır. Tek primer yardımıyla bu parçaların çoğaltılması sağlanmaktadır. Bu işlemden sonra fragmentasyon ve işaretleme işlemleri yapılır ve örnekler çipe yüklenir.

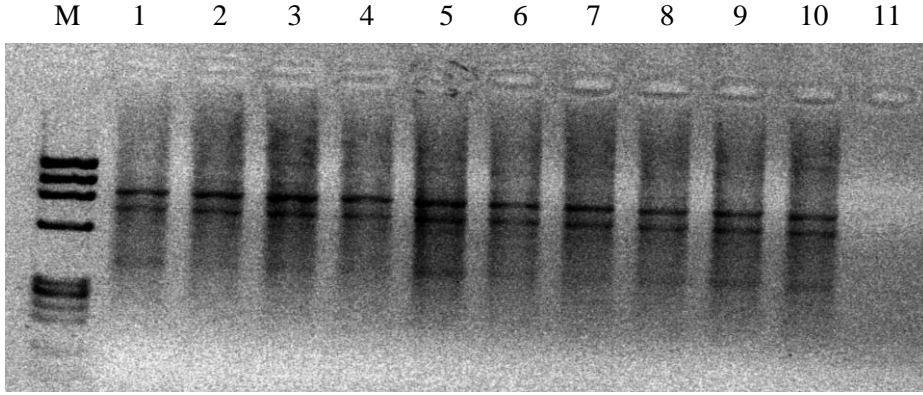
Bu yöntem aileden en az iki etkilenmiş bireye uygulanmıştır. Hastaların genomik DNA örnekleri EDTA-TE Tamponu kullanılarak 50 ng/μL olacak şekilde ayarlanır ve kesim aşamasına geçilir.

**Enzimle kesim:** Bu aşamada buzda 15 μL ddH<sub>2</sub>O, 2,5 μL buffer tango (10X) ve 1,25 μL XbaI (20U/μL) içeren bir karışım hazırlanır. Bu karışıma 6,25 μL genomik DNA eklenir ve 2000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. Hazırlanan örnek 37°C'de etüvde (Binder, Almanya) 16 saat bekletilir. Ardından PCR cihazında 70°C'de 20 dk bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanır.

**Ligasyon:** 1,25 μL Adaptor Xba, 2,5 μL T4 DNA Ligaz tamponu kullanılarak bir karışım hazırlanır ve bu karışıma 1,25 μL T4 DNA Ligaz ile 20 μL kesilmiş DNA örneği eklenir. 2000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. PCR cihazında (Primus, ABD) 16°C'de 120 dk, 70°C'de 20 dk bekletilir. Bu işlemden sonra 25 μL ligasyonlu örnek 75 μL ddH<sub>2</sub>O ile sulandırılır.

**PCR:** Her birey için gerekli olan örnek miktarını elde etmek için 5 adet PCR yapılmaktadır. Her PCR reaksiyonu için 10 μL PCR Buffer, 10 μL dNTP (herbiri 2,5 mM), 10 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 7,5 μL PCR Primer,001, 2 μL Taq polimeraz (5u/μL), 50,5 μL ddH<sub>2</sub>O ve 10 μL dilüye edilmiş ligasyon ürünü kullanılmaktadır. Bu karışım DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research (Bio-Rad, ABD) PCR cihazında; 95°C'de 3 dk, 35 döngü

95°C'de 20 s, 59°C'de 15s, 72°C'de 7 dk ve 4°C bitiş programına tabi tutulmaktadır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenir (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5:** Mikrodizin PCR görüntüsü

**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker

**1-5/6-10:** Bir örneğe ait PCR ürünleri

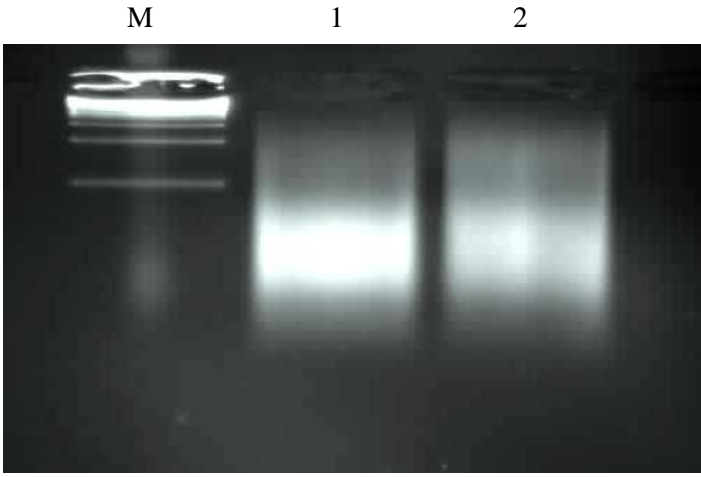
**11:** Negatif kontrol

Bu işlemlerden sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerekli cihazların bulunmaması nedeni ile geriye kalan pürifikasyon, fragmentasyon, labeling, hibridizasyon, yıkama, boyama ve tarama işlemleri için örnekler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiş ve çalışma orada tamamlanmıştır.

**Pürifikasyon:** Elde edilen PCR ürünleri vakum ile pürifiye edilir (QIAGEN MinElute 96 UF PCR Pürifikasyon Plate). Vakum derecesi 800 mbar olacak şekilde ayarlanır. Pürifikasyon plate manifoldun üzerine yerleştirilir. Plate üzerinde kullanılmayan yerler alüminyum seal ile örtülür. MinElute plate'in bir kuyusuna 4 adet PCR reaksiyonu konur. 400  $\mu$ L PCR örneği tamamen kuruyana kadar 600 mbar vakum uygulanır. Kuyulara 50  $\mu$ L PCR suyu eklenerek 600 mbar vakum uygulanır ve DNA yıkanır. Bu basamak 2 kere daha tekrarlanmalıdır. Vakum kapatılır. Plate dikkatlice manifolddan çıkarılır. Kuyulara 40  $\mu$ L EB buffer eklenir ve oda sıcaklığında 5 dk. karıştırıcıda karışması sağlanır. Tüm kuyulardaki ürünler, temiz tüplere alınır ve miktarları spektrofotometrede ölçülür. Konsantrasyonu 20  $\mu$ g olan PCR ürünleri, 45  $\mu$ L olacak şekilde EB buffer ile normalize edilir .



**Fragmentasyon:** Termal cycler 37°C önceden ısıtılır. 5 µL 10X Fragmentation Buffer buz üzerinde her bir örneğin üzerine eklenir ve vortex'de orta derecede 2 saniye karıştırılır. Tekrar buz üzerine konur. Stok Fragmentasyon reagent fragmentasyon buffer ve PCR suyu kullanılarak 0.048 U/µL olacak şekilde dilüe edilir ve 2 sn orta hızda santrifüj edilir. Dilüe fragmentasyon reagent'dan (0.048 U/µL) 5 µL, fragmentasyon karışımına eklenir. 2 saniye orta hızda vortexlenir ve 2,000 rpm 1 dk santrifüj edilir. Fragmentasyon tüpleri önceden 37 derecede ısıtılmış termal cycler'a yerleştirilir. Örnekler 37°C 35 dakika, 95°C 15 dakika'lık programa tabi tutulur ve 4°C'de bekletilir. 4 µL fragmente edilmiş PCR ürünü ile 4 µL jel yükleme boyası karıştırılarak 4% agaroz jele yüklenerek 120V- 30 dakika yürütülür (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6:** Fragmentasyon görüntüsü  
**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker  
**1-2:** Fragmentasyon ürünleri

**Labeling (İşaretleme):** Buz üzerinde 14 µL 5X TdT Buffer, 2 µL GeneChip DNA Labeling Reagent (5 mM) ve 3.5 µl TdT (30 U/µL) tüpe eklenerek labeling karışımı hazırlanır ve 2 sn orta hızda santrifüj edilir. 50.5 µL fragmente edilmiş DNA'nın üzerine 19.5 µL labeling karışımı eklenir. 2 sn. orta hızdaki vortexde karıştırılır ve 2000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilir. Bu karışım PCR cihazında 37°C 2 saat, 95°C 15 dakika programına tabi tutulur ve 4°C de bekletilir. Labeling reaksiyonu bittikten sonra tüpler 2000 rpm'de spin edilir.

**Hibridizasyon:** Öncelikle bu işlemde kullanılacak 12 X MES Stok (1.22 M MES, 0.89 M [Na<sup>+</sup>]) solüsyonu hazırlanır. 70.4 g MES Hydrate, 193.3 g MES Sodium Salt ve son hacim 1000 mL olacak şekilde.800 mL ultra saf su karıştırılır. pH 6.5 ve 6.7 arasında olmalıdır. Hazırlanan solüsyon 0.2 µM filtreden geçirilir.

Aşağıda gösterilen oranlarda hibridizasyon karışımı hazırlanır.

<u>Kimyasal</u>	<u>Hacim</u>
MES (12X; 1.22 M)	12 µL
DMSO (100%)	13 µL
Denhardt's Solution (50X)	13 µL
EDTA (0.5 M)	3 µL
HSDNA (10 mg/mL)	3 µL
Oligonucleotide Control	2 µL
Human Cot-1 (1 mg/mL)	3 µL
Tween-20 (3%)	1 µL
TMACL (5M)	40 µL
Toplam	190 µL

70 µL işaretli DNA, hibridizasyon karışımının üzerine eklenir. Hibridizasyon karışımı ve işaretli DNA 95°C ısı bloğunda 10 dakika denatüre edilir. 10 sn buzda tutulur. 2000 rpm'de 1 dk. Santrifüj edilir. Tüpler 48°C'deki ısı bloğunda 2 dk. Tutulur. Array içine 80 µL denatüre edilmiş hibridizasyon karışımı enjekte edilir. Hibridizasyon 48°C'de, 16-18 saat 60 rpm'de yapılır.

**Yıkama, Boyama ve Tarama:** Bu aşama *Fluidics Station450/250 to automate the washing and staining of GeneChip®* cihazında gerçekleştirilir. Bu işlemde kullanılacak kimyasallar hazırlanır.

**Wash A** (6X SSPE, %0.01 Tween 20); hazırlamak için 20X SSPE'den 300 mL, %10 Tween-20'den 1.0 mL, 699 mL su eklenerek 0.2 µm filtreden geçirilir.

**Wash B** (0.6X SSPE, %0.01 Tween 20); 20X SSPE'den 30 mL, %10 Tween-20'den 1.0 mL, 969 mL su eklenerek 0.2 µm filtreden geçirilir.

0.5 mg/mL Anti-Streptavidin Antibody 1 mL suda çözülür.

.

**12X MES Stok Buffer** (1.22M MES, 0.89M [Na<sup>+</sup>]): 70.4g MES hydrate, 193.3g MES Sodium Salt, son hacim su ile 1000 mL'ye tamamlanır. pH 6.5 ve 6.7 arasında olmalıdır. 0.2 µM filtreden geçirilmelidir.

**1X Array Holding Buffer** (Son 1X Konsantrasyon 100 mM MES, 1M [Na<sup>+</sup>], %0.01 Tween-20): 8.3 mL 12X MES Stock Buffer, 18.5 mL 5M NaCl, 0.1 mL %10 Tween-20 karıştırılır distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Işıktan koruyarak 2°C-8°C'de saklanır.

18 saat hibridizasyondan sonra ,arrayden hibridizasyon karışımı çıkarılır. 80 µL Array Holding Buffer ile array tamamen doldurulur. Array cihaza takılır. Wash A ve Wash B Buffer cihazı dışarıdan besler ve arrayi yıkar.

#### **Boyama Kimyasallarının Hazırlanması:**

**Stain Buffer:** 300 µL SSPE (20X), 3.3 µL Tween-20 (3%), 20 µL Denhardt's (50X) 666,7 µL su ile hazırlanır.

**SAPE Boya Solüsyonu:** 495 µL Stain Buffer, 5.0 µL 1 mg/mL Streptavidin Phycoerythrin (SAPE). Bu solüsyonu içeren tüp, istasyonun 1. modülüne yerleştirilmelidir.

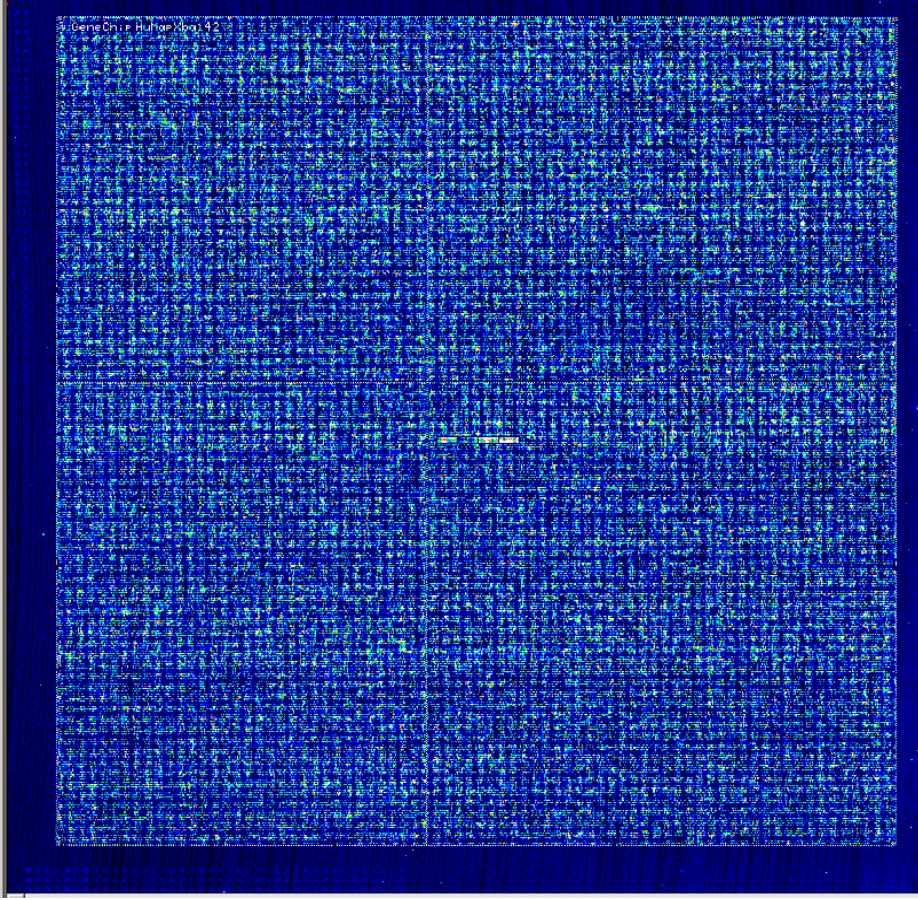
**Antikor Boya Solüsyonu:** 495 µL Stain Buffer, 5 µL 0.5 mg/mL biotinylated antibody. Solüsyonu içeren tüp istasyonun 2. modülüne yerleştirilmelidir.

**Array Holding Buffer:** 8.3 mL MES Stock Buffer (12X), 18.5 mL 5M NaCl, 0.1 mL Tween-20 (10%), 73.1 mL su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır. Amber tüp içine 800 µL array holding buffer konulur. Bu tüp istasyonun 3. modülüne yerleştirilmelidir.

İstasyonun 3 modülüne yerleştirilen solüsyonlar ile array boyama işlemine tabi tutulur.

**Tarama:** Yıkama ve boyama işlemleri istasyonda gerçekleştirildikten sonra tarama işlemi için array, *GeneChip® Scanner 3000* cihazına yerleştirilir. Veriler bilgisayar ekranında

görüntülenir (Şekil 2.7). Veri analizleri “R” istatistik paket programlarında, uygun algoritmalar kullanılarak yapılmaktadır.



**Şekil 2.7:** Taranmış array görüntüsü

Yukarıda belirtilen yöntem üretici firmanın önerilerinden yararlanılarak Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Array ve Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K XbaI Assay kitleri kullanılarak optimize edilmiştir (Affymetrix Mapping 10K 2.0 Assay Kullanma Kitapçığı).

## 2. 2. 6. Otozigozite Haritalaması

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'ndan gelen ailelere ait genetik veriler Microsoft Excel programına aktarılmış, SNP'lerin kromozomal ve DNA lokalizasyonlarına göre sıralaması yapılmıştır. Bugüne kadar tanımlanmış 38 otozomal resesif işitme kaybı geninin genomik lokalizasyonu ensembl ([www.ensembl.org-Hg18](http://www.ensembl.org-Hg18)) veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir. Bu genler daha önceden hazırlanmış SNP verilerini içeren Microsoft Excel tablolarında ilgili genomik lokalizasyona yerleştirilmiştir. Her ailede kendi içinde etkilenmiş bireylerin genotipleri bilinen bir geni homozigot olarak çevreliyorsa bu gendeki homozigot bir mutasyonun ailedeki işitme kaybına neden olabileceği düşünülmüştür. Araştırmanın ekonomik olmasını sağlamak amacıyla diğer aile bireyelerine mikrodizin veya mikrosatellit genotipleme ve geleneksel bağlantı analizi yapılmamıştır.

İşitme engelli kardeşlerde *MYO7A* gen bölgesinin homozigot olduğu gösterilen 7 (045, 347, 644, 645, 724, 790, 861 nolu aileler) aile saptanmıştır.

## 2. 2. 7. *MYO7A* Geni Mutasyon Taraması

### 2. 2. 7. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

*MYO7A* geninin kodlamayan ilk ekzonu hariç tüm ekzonları PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Yapılan PCR'da son konsantrasyonu 0,6 pmol/μl olacak şekilde primer çiftleri kullanılmıştır. Diğer PCR bileşenleri; 10 mM Tris-HCl (25°C pH: 8,8), 50 mM KCl, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde deoksiniükleotittrifosfatlar [dATG, dGTP, dCTP, dTTP (Fermentas, Litvanya)], 1 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve 15 mM MgCl<sub>2</sub>'dür. Toplam hacim 25 μl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada *MYO7A*'nın kodlayan 48 ekzonu 46 parçaya bölünerek, uygun primer çiftleri kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. 5 ayrı PCR programı kullanılmıştır (Çizelge 2.1) (Şekil 2.8).

**Çizelge 2.1. MYO7A geni mutasyon analizi için kullanılan primerler, PCR programları ve Ts dereceleri.**

Ekzon	İleri	Geri	PCR ürünü (bp)	PCR Program	SSCP Ts (°C)
2	5'CCAGCCAGGCTCAAGGCTTCCA3'	5'GCAGGAATTTTCCAAGAGAACACC3'	241	Program 1	33,97
3	5'CAGAGGGATATAGGGCTGCCTGGA3'	5'CATGGCCTCCATCTCCTTTTCGATCA3'	296	Program 2	27,16
4	5'GTGTCTGGCTGCCAGAGAGGTCTGA3'	5'AGCTGCACAGCGGACAAAAGTCTCAG3'	426	Program 2	27,04
5	5'AGCCCAAGAGCTTTCTAGAGTCAGA3'	5'GCACAGTTGGAGCTCTAGGTCCTA3'	316	Program 2	27,25
6-7	5'CTGGGCTGAGTTCCAGTTGGTGG3'	5'GGAGCAATACGGGCAGCAATACG3'	512	Program 3	27,6
8	5'ATCATCCCAGGCTAGTTCCTGATG3'	5'AAGGCTGAGTCTGCAGTAGCCAG3'	269	Program 2	28,62
9	5'GGGTACTGACGTCCTCTGCAC3'	5'GGCACTGCACTGCCCTTGGCGCA3'	260	Program 2	32,01
10	5'GTGGCAGCCTAGTCTCTTAGGAC3'	5'AACCCTTCAGAGGGACAGAAGTCATG3'	214	Program 2	40,85
11	5'GGGGCAGGCTGGCAGGTGAGCAC3'	5'ACTTCCAAGGGGTAGGGCGAGCAA3'	212	Program 1	30,75
12	5'CAAGGGCTGGAGCGACACCACG3'	5'TCCATATTGGGGAAGGAAATTCCTATG3'	285	Program 1	26,78
13	5'GGTGGGGCTGAACAACACCTTAC3'	5'AAGCAGGGAAGGAAGCTGTGCGCAC3'	318	Program 2	30,05
14	5'CATGGAGGAGAGGGTGGGCTCACA3'	5'GAGCAGGGGAAGGCAGGGCCACG3'	239	Program 1	29,24
15	5'GAGGGCCTGCCAGAGCTGGTGAGA3'	5'GCTTAGACTCAGGCCTGGCCCGTG3'	219	Program 4	26,78
16	5'GGCAGGCACAGCCCCCTCCATCG3'	5'GTCACCCTAGCCGCCACCCGCCA3'	225	Program 1	33,71
17	5'CCCAGCAGGAGCCTTGGCCCTGA 3'	5'AAGCTGGGACCCTCCCCTCCTGC3'	252	Program 1	29,96
18	5'CCCACTGGAGAGGCTGTCCATTC 3'	5'CCCAGCCCACATCATGGGAATTTACA3'	207	Program 2	30,06
19	5'CCACTGGGACTGAGCAGGTGGTC 3'	5'ACACGTACACCTGTATGTGGGCTGA3'	218	Program 2	26,83
20	5'ATCCCAAACCCACCTGTACCCTGG 3'	5'CTGGGTTCAAAGGCCTGTTTGGGCA3'	202	Program 3	28,64
21	5'GGAATGGGACAGCAGGCTCTGAGC 3'	5'GACACTCCTCGCCAGGGGTCAGA3'	319	Program 5	36,38
22	5'GGTGGGAATCCCTGCAACAACAGC 3'	5'GGACAAGCCAGCAAGTGGACACCTA3'	226	Program 2	24,12
23	5'AGCTTGTCCCTGAGGCTGTGGCA 3'	5'AGCGGTGTGTGTGGGCTCTGGA3'	323	Program 5	27,53
24	5'GCTTCTGAGTAGCTGGGACTCCA 3'	5'TACGGCCACCACCAGCAGCAGAG3'	332	Program 3	28,5
25	5'AGCAATGTCTCCGCTCTGGCCTC 3'	5'CTTGTGCGCCTGGGAGGGACATCA3'	270	Program 1	27,34
26	5'TTGCTTTCTGCTCAGCCACTTGACC 3'	5'CTGTGCTCCAGCCTAGGCCACCTA 3'	206	Program 2	25,25
27	5'GGGAACACCCCTAACTTTACCTGC 3'	5'AGGCACCACTCAGCCACCAAAAGA3'	236	Program 2	29,65
28	5'GGGCTGTTCTGTGGGTGATTCC 3'	5'GGCCTAGCTCCCCTTCCACTCCA3'	223	Program 5	33,44
29	5'GAGGGCCTGGCGGCTGCCCTCA 3'	5'CTGGGGCACTCGAGTGCCTGGA3'	333	Program 1	32,01
30	5'GTCTGAAGGGAAGGGACCCACAA 3'	5'CAAGTAGGTGGCAGCACTGGCAGC3'	300	Program 1	30,7
31	5'CCTTCCCTGACTCTGTGCCTGCTC 3'	5'AGCAGGAGGCTGTGAGCCAAGCCA3'	325	Program 2	32,78
32	5'TTGGTGGTGTGGAAGGGCTTCTG 3'	5'GTTTCAGGTCCACATCCCTTCTTAG3'	285	Program 2	27,17

Ekzon	İleri	Geri	PCR ürününü (bp)	PCR Program	SSCP Ts (°C)
33	5' CAAACTCACTCGTATGTTGTCTTCTG 3'	5'GCTGGAGCTACAGAGCAAGGGAC3'	218	Program 1	29,48
34	5' CCTGGGTGTGGGAGGCCTGCCTC 3'	5'CCCTCTCCTTCCCCTCTGTCTGTCTG3'	222	Program 1	26,18
35	5' CCCACTGGTTGGGGCATGACTGAC 3'	5'ACCCTGACCCCCAGTGCCAGGCA3'	377	Program 2	31,39
36	5' CTCAGCCTGTCTCTGCCCCATGG 3'	5'CTAGACCGTTAACCTATTGTACAGCTG3'	330	Program 2	28,41
37	5'CCACAGGTAGAGAGCTGACCTGAG3'	5' ACCAGACAGTAGCGGAAGCCTGCA3'	238	Program 5	30,29
38	5'TGCCAGCGATGGGGCGTTGCTGA3'	5'GGAGGAAGGCAGTGTGCAGACGAA3'	276	Program 2	33,97
39	5'AGTGCTCCCTCTATTCCGGCACAAG3'	5'CCCGTCACAGCAGGTGAGGTCTG3'	252	Program 2	26,38
40	5'TCCTGTGACTCCCGATGGCAGCTG3'	5'ATCCCCAAGGGGCTCATCCCACAA3'	294	Program 1	35,73
41	5'GTCTCCACAGTCCCACGCACATGC3'	5'GCCCTGTCTGGGCACTGCAGAC3'	201	Program 2	30,46
42	5'GCTCAGTATAGGAGGCATAGCCAGA3'	5'TGTCCGTAAGTTCCTATGGCCCCAG3'	288	Program 2	25,8
43-44	5'AGCTGCCAGACAGGCCTTAGGTGG3'	5'AGCAACGCTAGCTGTGCACGAAGG3'	505	Program 2	27,49
45	5'TCTGCCAGGTCCCTGCACGCCTGT3'	5'CCTGGGCTGCTGGCCAGTGTCTG3'	326	Program 2	29,39
46	5'CTGGCCTGCCCTGAGCAGGCCTG3'	5' ATGCCCTGTTCCCCTCCTCCTCTG 3'	228	Program 3	28,63
47	5'GCAACAGGAGAGGCTGACTT3'	5' TGTCTGTGGTTCAGGCAGAG 3'	250	Program 4	25,12
48	5'CTTCTGTGAGGGCATGTGTG 3'	5' AGCCGCACACTACTGTGTTT 3'	294	Program 4	31,39
49	5' TGGGAGCTGTGCTATGGTCT 3'	5' AGCTGCAGGGGTAGCTGAT 3'	245	Program 4	30,05

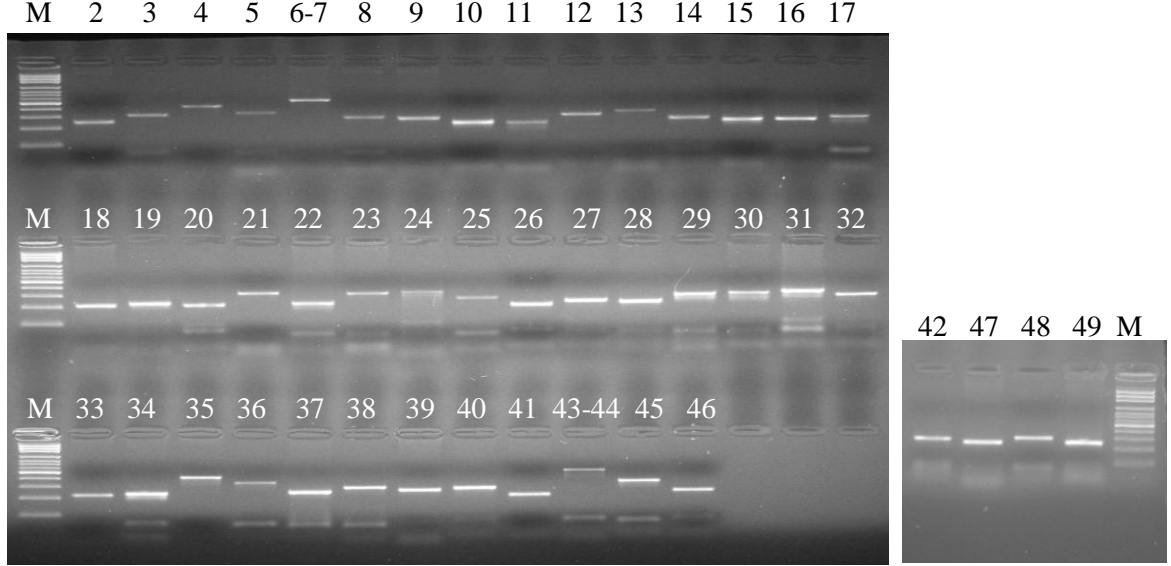
Program 1; 95°C'de 5 dk ardından 20 döngü 94°C'de 40 s, 65°C'de 40 s her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 20 döngü 94°C'de 40 s, 55°C'de 40 s her döngüde 1 s artacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 2; 95°C'de 5 dk ardından 35 döngü 94°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk , 72°C'de 1 dk, ve 72°C'de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 3; 95°C'de 5 dk ardından 35 döngü 94°C'de 1 dk, 62°C'de 1 dk , 72°C'de 1 dk, ve 72°C'de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 4; 95°C'de 5 dk ardından 20 döngü 94°C'de 40 s, 68°C'de 40 s her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 20 döngü 94°C'de 40 s, 58°C'de 40 s her döngüde 1 s artacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Biorad, ABD).

Program 5; 95°C'de 5 dk ardından 20 döngü 94°C'de 1 dk, 65°C'de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C'de 1 dk, 20 döngü 94°C'de 1 dk, 55°C'da 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).



**Şekil 2.8:** *MYO7A* geninin kodlayan 48 ekzonun tek bir hastadaki PCR görüntüleri.

**M:** Marker (Solis, Estonya 100bç).

Kuyucukların üzerindeki numaralar ekzonları belirtir.

#### 2. 2. 7. 2. SSCP İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

SSCP jelinin döküleceği camlar distile su ile yıkanıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1,5 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilip, camlar sabitlenmiştir.

Bu çalışmada %7'lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Bu jel için %40'lık, 49:1 oranındaki akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 380 g Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 g N-N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözülür ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır (Sambrook 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 g Tris (Ambresco, ABD) 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 mL 0,5 M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 mL hacime tamamlanarak yapılmıştır.



Jelin polimerleşmesi için kullanılan %10'luk Amonyum Persülfat; 1 g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 mL'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

Jel 12,34 mL %40'luk akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, 14 mL TBE 5X solüsyonu, 40,16 mL distile su ve 3,5 mL gliserol (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Karışım 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra vakum ile havası alınmıştır. Ardından bu jel içeriğine 0,6 mL %10'luk Amonyum Persülfat ve 40 mL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökölmüştür. Jel polimerleştikten sonra 1,5 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkartılmış ve camlar vertikal jel elektroforez sistemine (BioRad, ABD) yerleştirilmiştir.

PCR örneklerinin içerdiği Adenin ve Sitozin nükleotid sayılarını baz alarak aşağıda belirtilen formöl ile bir sıcaklık değeri (Ts) hesaplanmıştır (Çizelge 2.1) ve örnek yüklenmeden önce jeller hesaplanan bu sıcaklık derecesine getirilmiştir (Li vd 2003).

$$T_s = [80 \times C / (A + 1)] / \{2,71 + [C / (A + 1)]\}$$

PCR ürünlerine spesifikliğı arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası ve oligonükleotid eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20 mM EDTA, %0,05 Xylene Cyanol (AppliChem, Almanya), %0,05 Brom-fenol mavisi (Merck, Almanya) içermektedir. 2 µL PCR ürününe 7 µL yükleme boyası, 1'er µL 3 pmol düz ve ters oligonükleotid eklenerek bir karışım hazırlanmıştır ve 99°C'de 8 dk denatüre edilerek jele yüklenmiştir.

Sistemde tampon olarak TBE 1X solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler 130 volt akımda altında, belirlenen sıcaklıkta baz çifti uzunluklarına göre 12-20 saat yürütölmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

### 2. 2. 7. 3. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama

Bu yöntem için kullanılan gümüş boyama mikrosatellit jellerini boyamak için kullanılan yöntemden sadece 1. solüsyondaki gümüş nitrat solüsyonunun konsantrasyonu bakımından farklıdır. 1. solüsyon için %1'lik stok gümüş nitrat %0,1'lik olacak şekilde 100 mL %1'lik stok gümüş nitrat solüsyonu, 900 mL distile su kullanılarak seyreltilir. Jeller bu solüsyonda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra formaldehit ilave edilmiş %1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonu ile boyanmıştır. Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile muamele edilerek boyama işlemi sonlandırılmıştır. Böylece jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenmiştir.

Bu yöntemle taranan *MYO7A* geninin ekzon sayısı, ekzonlara özgü oligonükleotid dizileri, ekzon boyutları, Ts değerleri ve oligonükleotidlerin optimize olduğu PCR koşulları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu gende bant farklılığına sahip bireyler DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır.

### 2. 2. 7. 4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi öncesinde PCR ürünlerinin dNTP ve primer artıklarından temizlenmesi için kolonlu pürifikasyon kiti kullanılmıştır (Roche, ABD).

Bu çalışmada istenen DNA parçacığının nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemli çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD). Cihaz için 0,2 mL'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Her bir örnek için 8 µL sekans solüsyonu (premix; 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1µL dNTP karışımı, 2µL ddUTP, 2µL ddGTP, 2µL ddCTP, 2µL ddATP, 1µL polimeraz enzimi), 1µL temizlenmiş PCR ürünü, 2 pmol sağ veya sol oligonükleotid ve hacimi 20 µL'ye tamamlayacak kadar distile su konularak "cycle sequencing" gerçekleştirilmiştir. Bu program 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapışma ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi şeklinde gerçekleşmektedir. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra örneklerin içine reaksiyonun durdurulması için her bir örnek için 5 µL durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50 mM EDTA, 20 mg/mL'lik Glikojen) ve 60 µL %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüj edilmiştir (Hettich, Almanya).

Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µL eklenmiş, +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek üstteki kısım dökülmüştür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında 45 dk kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyon eklenerek DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanmıştır. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayardaki CEQ Sequencing Software programı aracılığı ile sonuçlar görünür hale getirilmiştir.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3. 1. Otozigozite Haritalaması

Yapılan 10K mikrodizin analizi sonuçlarına göre 045, 347, 644, 645, 724, 790, numaralı ailelerin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* genini içine alan bölgede homozigot bloklar tespit edilmiştir (Çizelge 3.1, 3.2). Bu ailelerde işitme kaybı fenotipinden *MYO7A* genindeki mutasyonların sorumlu olabileceği tahmin edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *MYO7A* geni çevresinde bulunan homozigot bölgelerin ailelere göre kromozomal lokasyonu

Aile No.	Mikrodizin yapılan etkinenmiş birey sayısı	Homozigot Bölge (hg-18)
045	2	60971628-80428536
347	2	74371677-95601239
644	3	40204315-78488179
645	3	75633996-79063051
724	2	73727910-103390007
790	4	73727821-83565887
861	4	74000000-90000000

**Çizelge 3.2.** SNP 10K mikrodizin analizi sonucunda ailelerde *MYO7A* geni çevresindeki SNP verileri

SNP No	Fiziksel Pozisyon	SNP RS No	045-101	045-102	347-101	347-102	644-101	644-102	644-103
SNP_A-1508006	59818108	rs1593480	AB	BB	AB	AB	BB	BB	AA
SNP_A-1511450	59909139	rs950803	BB	AA	AA	AA	AA	AA	BB
SNP_A-1512341	60179467	rs1080719	AA	NoCall	BB	BB	BB	BB	AA
SNP_A-1508282	60635238	rs522073	NoCall	AB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1519726	60971628	rs1377456	AB	AA	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1519757	60971788	rs720888	AA	BB	BB	BB	AA	AA	BB
SNP_A-1511129	60972195	rs720891	BB	AA	AA	AA	BB	BB	AA
SNP_A-1518487	61840118	rs953169	AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB
SNP_A-1512785	62518998	rs953894	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511931	62620442	rs1944043	AA	AA	AB	AB	AA	AA	AA
SNP_A-1511869	62620580	rs1944042	BB	BB	AB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1516404	62793443	rs1944086	BB	BB	AB	AB	BB	NoCall	BB
SNP_A-1511696	63041086	rs1404501	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1512811	64227945	rs490192	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1512512	68986287	rs1938684	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
SNP_A-1515149	69291704	rs1944130	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1507484	70642724	rs1372108	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519064	71886708	rs2077955	BB	BB	AB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1515676	73727821	rs1279293	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1515718	73727910	rs3862799	AA	AA	AB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1518953	74371677	rs624786	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512019	74375300	rs671544	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508267	75130040	rs644361	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512667	75633996	rs2226615	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
myo7a									
SNP_A-1513424	76728362	rs1377470	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
SNP_A-1511221	76774826	rs724369	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512142	77603940	rs2912	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1512004	77613712	rs1385601	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
SNP_A-1511958	77613814	rs1385600	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
SNP_A-1508420	77693600	rs4128206	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1517249	78283084	rs1945248	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1518128	78488179	rs870333	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1519556	78652934	rs570333	BB	BB	AA	AA	AB	AB	BB
SNP_A-1519587	78699221	rs726785	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1508730	78714313	rs568421	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513861	78729420	rs1511232	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518340	78800182	rs951932	BB	BB	BB	BB	AB	AB	BB
SNP_A-1513485	79063051	rs1944714	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512871	79659788	rs1479311	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512920	79659821	rs1479312	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511073	79960012	rs2373504	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA
SNP_A-1508967	79960114	rs1962677	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB
SNP_A-1515031	80262246	rs1533224	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514863	80428536	rs1608169	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518690	80645518	rs723454	AB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514587	80669801	rs2085557	AA	AA	BB	BB	AB	NoCall	BB
SNP_A-1511296	80766874	rs725696	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513472	80909349	rs1945650	AB	AB	BB	BB	AA	AA	BB
SNP_A-1515935	81286092	rs1112922	AB	AB	BB	BB	AB	NoCall	BB
SNP_A-1518248	81286325	rs1540196	AB	AB	BB	BB	AB	AB	AA

SNP No	Fiziksel Pozisyon	SNP RS No	645-101	645-102	645-103	724-101	724-102	790-101	790-104	790-102	790-103
SNP_A-1508006	59818108	rs1593480	AB	BB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AB
SNP_A-1511450	59909139	rs950803	BB	AB	AB	AA	AB	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1512341	60179467	rs1080719	BB	BB	BB	BB	BB	AB	AB	NoCall	BB
SNP_A-1508282	60635238	rs522073	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	AB
SNP_A-1519726	60971628	rs1377456	AB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1519757	60971788	rs720888	AB	NoCall	NoCall	BB	BB	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1511129	60972195	rs720891	AB	AA	NoCall	AA	AA	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1518487	61840118	rs953169	BB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1512785	62518998	rs953894	AB	AB	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511931	62620442	rs1944043	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA
SNP_A-1511869	62620580	rs1944042	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB
SNP_A-1516404	62793443	rs1944086	AA	AA	AA	AB	AB	BB	BB	AB	BB
SNP_A-1511696	63041086	rs1404501	AB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	AB	BB
SNP_A-1512811	64227945	rs490192	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512512	68986287	rs1938684	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1515149	69291704	rs1944130	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1507484	70642724	rs1372108	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519064	71886708	rs2077955	AB	AB	AB	BB	BB	BB	BB	AB	BB
SNP_A-1515676	73727821	rs1279293	AB	AB	AB	AB	AB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1515718	73727910	rs3862799	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518953	74371677	rs624786	NoCall	NoCall	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512019	74375300	rs671544	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508267	75130040	rs644361	AB	AB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512667	75633996	rs2226615	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA
myo7a											
SNP_A-1513424	76728362	rs1377470	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511221	76774826	rs724369	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512142	77603940	rs2912	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512004	77613712	rs1385601	BB	NoCall	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1511958	77613814	rs1385600	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508420	77693600	rs4128206	AA	AA	AA	AA	AA	NoCall	AA	AA	AA
SNP_A-1517249	78283084	rs1945248	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518128	78488179	rs870333	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519556	78652934	rs570333	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519587	78699221	rs726785	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508730	78714313	rs568421	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513861	78729420	rs1511232	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518340	78800182	rs951932	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513485	79063051	rs1944714	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512871	79659788	rs1479311	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512920	79659821	rs1479312	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511073	79960012	rs2373504	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508967	79960114	rs1962677	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1515031	80262246	rs1533224	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514863	80428536	rs1608169	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518690	80645518	rs723454	AB	AB	NoCall	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514587	80669801	rs2085557	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511296	80766874	rs725696	AB	AB	AB	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513472	80909349	rs1945650	AB	AB	AB	BB	BB	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1515935	81286092	rs1112922	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518248	81286325	rs1540196	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB

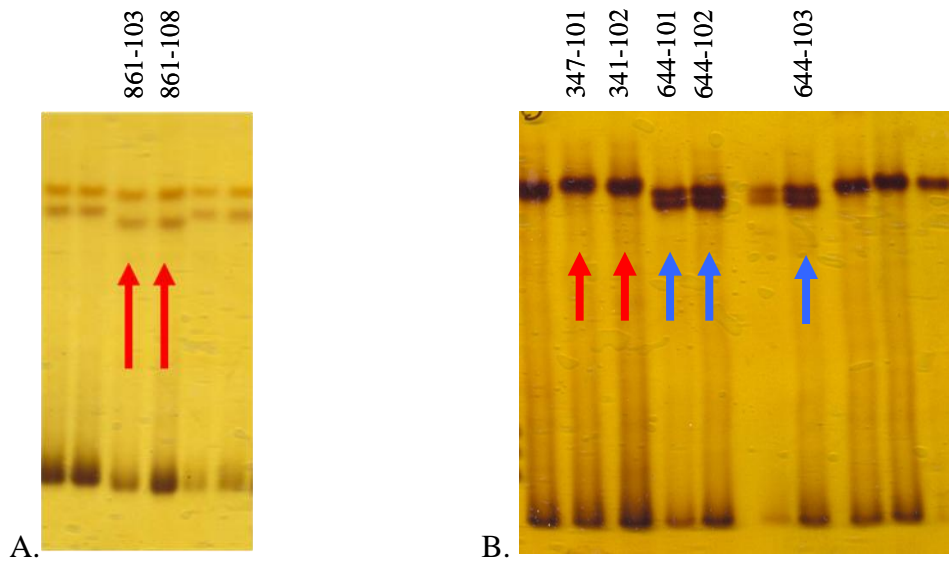
### 3.2. Mutasyon Analizi

Mutasyon analizi yapılan 7 ailenin 5 tanesinde işitme kayıplı bireylerde beş farklı homozigot mutasyon bulunmuştur (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** *MYO7A* geninde bu çalışmada bulunan mutasyonlar

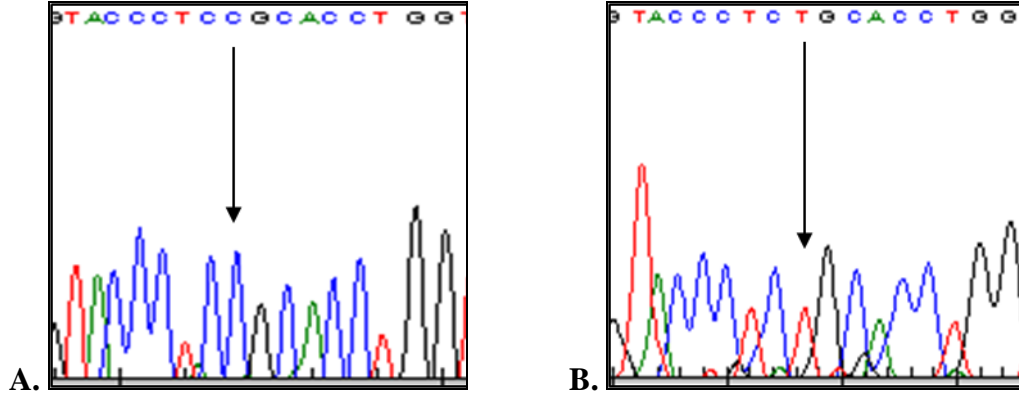
Aile Numarası	Mutasyon	Miyozin-VIIa bölgeleri
347	c.5824 G>A( p.G1942R )	FERM-2 bölgesi
644	c.5838delT (p.F1946LfsX24)	FERM-2 bölgesi
645	c.6487 G>A (p.G2163S )	FERM-2 bölgesi
790	c.5581 C>T (p.R1861X )	MyTH4-2 bölgesi
861	c.5660 C>T (p.P1887L )	MyTH4-2 bölgesi

*MYO7A* geninde 347 ve 644 nolu ailelerde 42. ekzonda, 861 nolu ailede 41. ekzonda etkilenmiş bireylerde SSCP yöntemiyle bant farklılığı saptanmıştır (Şekil 3.1). Ardından etkilenmiş bireylere, genin bu ekzonlarına DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır.



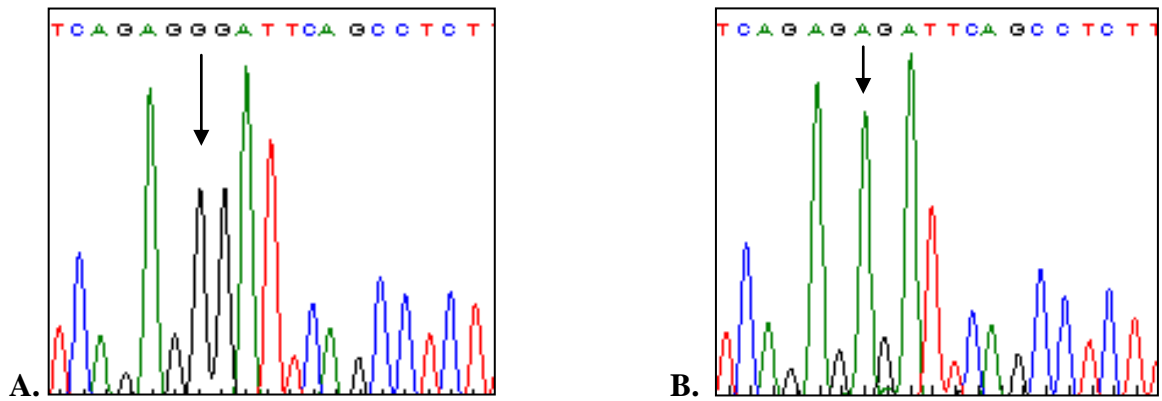
**Şekil 3.1.** *MYO7A* geninde bant farklılığı saptanan ekzonların SSCP jel görüntüsü  
A. *MYO7A* 41. ekzon B. *MYO7A* 42. ekzon (↑ ile işaretlenmemiş örnekler yabani tip)

Bu gende SSCP ile tarama sonucunda 41. ekzonda bant farklılığı tespit edilen 861 nolu ailenin etkilenmiş bireyine DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.5660 C>T (p.P1887L) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



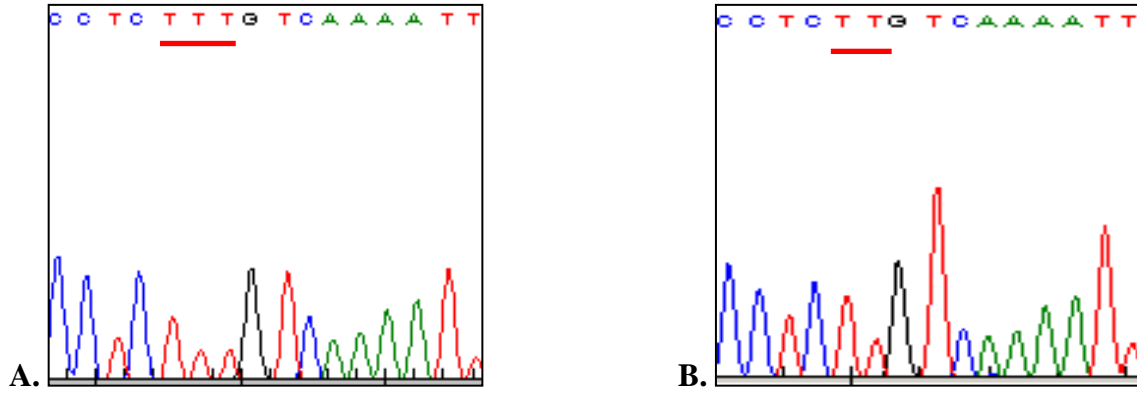
**Şekil 3.2.** *MYO7A* geninin 41. ekzonundaki c.5660 C>T (p.P1887L) değişimi  
A. Yabancıl tip B. Homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü (Düz dizi)

SSCP taramasında genin 42. Ekzonunda bant farklılığı tespit edilen 347 ve 644 ailelerinin etkilenmiş bireylerine DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda 347 nolu ailede c.5824 G>A (p.G1924R) (Şekil 3.3), 644 nolu ailede c.5838delT (p.F1946LfsX24) (Şekil 3.4) değişimleri homozigot olarak bulunmuştur.



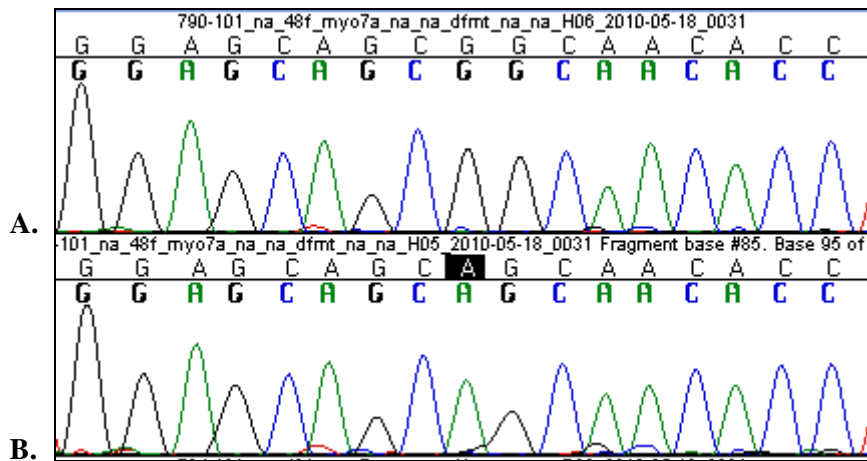
**Şekil 3.3.** *MYO7A* geninin 42. ekzonundaki c.5824 G>A (p.G1924R) değişimi  
A. Yabancıl tip B. Homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü (Düz dizi)



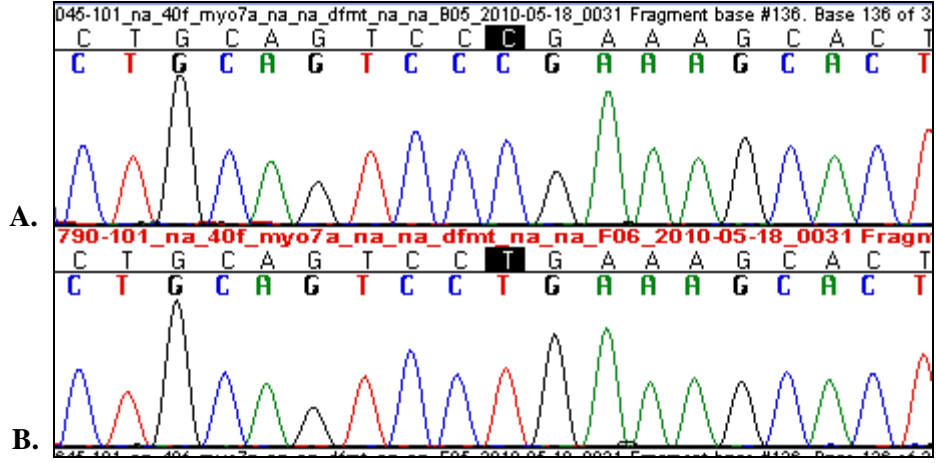


**Şekil 3.4.** *MYO7A* geninin 42. ekzonundaki c.5838delT (p.F1946LfsX24) değişimi  
**A.** Yabani tip **B.** Homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü (Düz dizi)

645,790, 045 ve 724 numaralı ailelerin etkilenmiş bireyleri direkt DNA dizi analizi yöntemiyle taranmıştır. 645 nolu ailenin etkilenmiş bireyinde genin 48.ekzonunda c.6487 G>A (p.G2163S) değişimi (Şekil 3.5), 790 nolu ailenin etkilenmiş bireyinde genin 40. ekzonunda c.5581 C>T (p.R1861X) değişimi (Şekil 3.6) homozigot olarak bulunmuştur. 045 ve 724 numaralı ailelerde etkilenmiş bireylere, *MYO7A*'nın kodlayan tüm ekzonlarına sekans yapılmış ancak bu gende işitme kaybı ile ilgili olabilecek bir değişim bulunmamıştır.

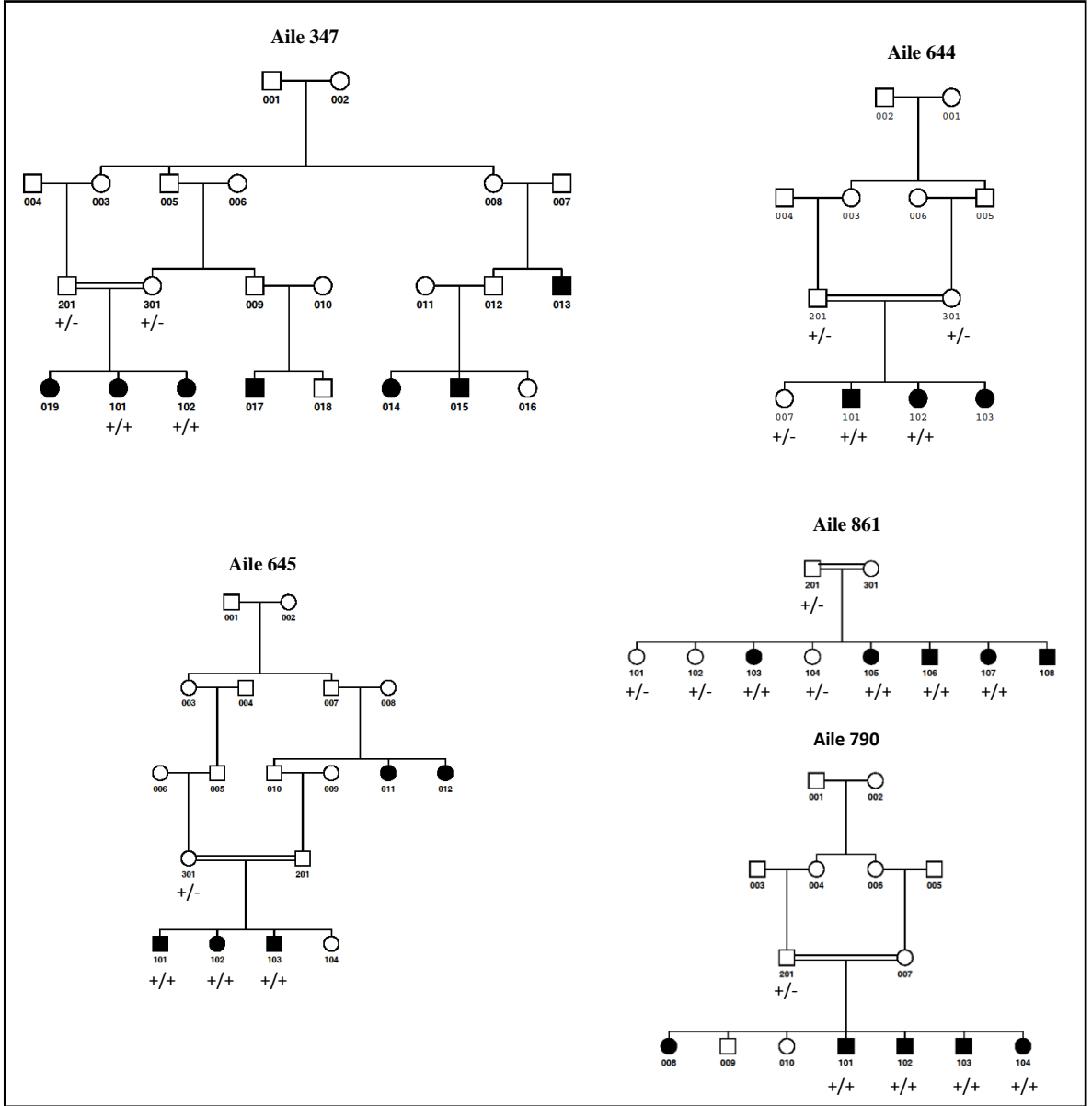


**Şekil 3.5.** *MYO7A* geninin 48. ekzonundaki c.6487 G>A (p.G2163S) değişimi  
**A.** Yabani tip **B.** Homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü (Düz dizi)



**Şekil 3.6.** *MYO7A* geninin 40. ekzonundaki c.5581 C>T (p.R1861X) değişimi  
A. Yabanıl tip B. Homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü (Düz dizi)

Bu mutasyonların ailelerde fenotiple birlikte dağıldığı gösterilmiştir (Şekil 3.7.).



**Şekil 3.7.** *MYO7A* geninde belirlenen gen değişimlerinin aile bireylerinde dağılımları.  
 +/+ : homozigot mutant  
 +/- : heterozigot

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada; otozomal resesif işitme kayıplı beş farklı ailede *MYO7A* geninde üç yanlış anlamlı, bir anlamsız, bir çerçeve kayması mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonlardan bir yanlış anlamlı, bir çerçeve kayması mutasyon ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

645 numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* geninin 48. ekzonunda c.6487G>A değişimi homozigot olarak bulunmuştur. Bu değişim proteinin kuyruk kısmında FERM2 bölgesinde 2163. pozisyonundaki GGC kodonunun AGC kodonuna dönüşmesiyle glisin aminoasiti yerine serin aminoasitinin geçmesine sebep olmaktadır (p.G2163S). Proteinin bu bölgesinin retinada RPE hücrelerinde melanozom taşınması ve iç kulakta tüy hücrelerinin gelişimi için kritik olduğu gösterilmiştir (Schwander vd 2009). Bu mutasyon daha önce bir Usher sendromlu ailede IVS24-21G>A mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak bulunmuştur (Janecke vd 1999). Cezayir'den yapılan bir çalışmada ise sendromik olmayan işitme kayıplı olduğu belirtilen bir ailede bu mutasyon p.I1775T mutasyonu ile birleşik heterozigot bulunmuştur ancak ailenin *ERG* verisi bulunmamaktadır (Ammar-Khodja vd 2009). Bizim bu değişikliği bulduğumuz 645 numaralı ailenin etkilenmiş bireyleri fenotipik olarak otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybını düşündürmektedir. Çünkü herhangi bir gece körlüğü ve denge şikayetleri bulunmamaktadır. Ancak işitme kayıplı bireylerin yaşları 8, 9 ve 11'dir. Göz muayeneleri yapılamadığından klinik olarak Usher sendromu dışlanmamıştır.

790 numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* geninin 40. ekzonunda c.5581 C>T değişimi homozigot olarak bulunmuştur. Bu değişim proteinin kuyruk kısmında MyTH4-2 bölgesinde 1861. pozisyonundaki CGA kodonunun TGA kodonuna dolayısıyla arjinin aminoasidinin dur kodonuna dönüşmesine neden olmaktadır (p.R1861X). Böylece proteinin C-terminal bölümünün de içinde olduğu kuyruk kısmının %25'den fazlası olmadığı için proteinin tam olarak ifade olmadığı ve membran bağlama fonksiyonunun bozulduğu tahmin edilmektedir (Adato vd 1997). Bu mutasyon 16 Usher sendromlu bireyi olan Ürdünlü bir ailede homozigot olarak tanımlanmıştır (Adato vd 1997). Daha sonra Usher sendromlu iki İspanyol ailenin birinde homozigot, diğerinde c.3764delA (p.L1255RfsX8) mutasyonu ile birlikte gösterilmiştir (Jaijo vd 2007, Jaijo vd 2010). Atipik Usher sendromlu bir ailede de bu mutasyon homozigot bulunmuştur (Cremers vd 2007).

Bu çalışmada p.R1861X değişimi bulunan 790 numaralı ailenin etkilenmiş bireyleri 7, 11, 15 ve 17 yaşlarındadır. Yapılan göz muayenelerinde bu bireylerde Usher sendromuna eşlik edecek göz bulguları bulunmuştur. Ancak bireylerin yaşlarının küçük olması sebebiyle göz bulguları hastaların kendilerinin fark edebileceği düzeyde değildir. Bu çalışma ile *MYO7A* geninde mutasyon bulunması, ailedeki işitme kayıplı bireylerin göz muayenesine yönlendirilmesiyle klinik olarak Usher sendromu tanısı almasına ve doğru genetik danışma verilmesine olanak sağlamıştır.

861 numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* geninin 41. ekzonunda c.5660 C>T değişimi homozigot bulunmuştur. 5660. pozisyonunda sitozin nükleotidi yerine timin nükleotidinin geçmesi proteinin 1887. pozisyonunda CCG kodonunun kodladığı prolin aminoasitinin CTG kodonunun kodladığı lösin aminoasidine dönüşmesine sebep olmaktadır (p.P1887L). Bu mutasyon proteinin kuyruk kısmında MyTH4-2 bölgesinde bulunmaktadır. İlk defa Usher sendromlu Kanadalı bir ailede p.L1858P mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak tanımlanmış (Bharadwaj vd 2000) ve bir daha rapor edilmemiştir. Bu ailenin 5 etkilenmiş bireyinin en büyüğü 17 yaşındadır. Bireylerin hiçbir göz şikayeti bulunmamaktadır. Ancak göz muayenesi yaptırılmadığından Usher sendromu dışlanmamıştır.

644 Numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* genin 42.ekzonunda 5838. Pozisyondaki timin nükleotidinin delesyonu, proteinin 1946. Pozisyonundaki fenilalanin aminoasitinin lösin aminoasidine dönüşmesine ve 24 aminoasit sonra da dur kodonu oluşmasına sebep olan bir çerçeve kayması mutasyonu bulunmuştur (p.F1946LfsX24). Bu mutasyon ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Proteinin kuyruk kısmının FERM2 bölgesinde yer alan bu mutasyon 1946. Aminoasitten sonra proteinin değişmesine ve 24 aminoasit sonra sonlanmasıyla işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu bölgede daha önce aynı aminoasiti etkileyen 5835\_5838delCTTT mutasyonu Usher sendromlu bir İtalyan ailede homozigot olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyon da 1946. aminoasit olan fenilalaninin serin aminoasidine dönüşmesine ve 23 aminoasit sonra da proteinin sonlanmasına sebep olmaktadır (p. F1946SfsX23) (Jaijo vd 2007). Bulunan değişikliğin proteinde çerçeve kayması yapması, ailede genotiple fenotipin tam segregasyon göstermesi bu değişikliğin mutasyon olduğunu kanıtlamaktadır. Bu ailenin etkilenmiş üç bireyinin en büyüğü 16 yaşındadır. Bireylerin gece körlüğü yakınması yoktur. Göz muayenelerinde retinalarında bozulmalar (atrofi) saptanmış olup ERG yapılamamıştır. Bu ailenin işitme

kayıplı bireyleri de klinik olarak Usher sendromu ile uyumludur ve uygun genetik danışma almalarına olanak sağlanmıştır.

347 numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde *MYO7A* genin 42. ekzonunda c.5824 G>A değişimi homozigot bulunmuştur. 5824 pozisyonunda guanin nükleotidi yerine adenin nükleotidinin geçmesi proteinin 1942. pozisyonunda GGA kodonunun kodladığı glisin aminoasitinin AGA kodonunun kodladığı arjinin aminoasidine dönüşmesine sebep olmaktadır (p.G1942R). Bu değişiklik ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir ve proteinin kuyruk kısmında FERM2 bölgesinde bulunmaktadır. Proteinin bu bölgesi evrimsel olarak korunmuştur (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** *MYO7A* genindeki Homo sapiens'te 1942. pozisyonadaki glisin (G) amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

Homo sapiens	KAKDFCQNIATRLLKSSSECFSLFVKIADKVLSPENDFFDFV
Macaca mulatta	KAKDFCQNIATRLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Rattus norvegicus	KAKDFCQNIASRLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Mus musculus	KAKDFCQNIASRLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Oryctolagus cuniculus	KAKDFCQNIASRLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Equus caballus	KAKDFCQSIATRLLKSSDGFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Canis familiaris	RAKDFCQNIARLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Pongo abelii	KAKDFCQNIATRLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Bos taurus	KAKDFCQNIARLLKSSSECFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Sus scrofa	KAKDFCQSIARLLKSSDGFSLFVKIADKVISVPENDFFDFV
Gallus gallus	KAKDFCQNIISRLLKSSSECFSLFVKISDKVISVPEGDFDFV
Danio rerio	KAKDFCLNISSRLLKTPSECFSLFVKISDKVISVPEGDFDFV
Harpegnathos saltator	RAKDFCQNIARLNLRSAEGFSLFVKIADKVISVPEGDFDFV
Culex quinquefasciatus	RAKDFCQNISQRLNLRSECFSLFVKIADKVISVPEGDFDFV
Pediculus humanus corporis	KAKDFCHNISQRLNLRSECFSLFVKIADKVISVPEGDFDFV
Camponotus floridanus	RAKDFCQNIARLNLRSAEGFSLFVKIADKVISVPEGDFDFV

ConSeq, protein dizilerindeki yapısal ve işlevsel olarak önemli olan amino asitleri tanımlayan internet tabanlı bir programdır. Bu program proteinde yer alan amino asitlerin evrim boyunca korunmuşluklarını değerlendirerek bir hesaplama yapar ve proteinde yer alan amino asitlere 1-9 arasında bir değer verir. Bu programa göre “9” korunmuş bölgeleri gösterirken “1” değişken bölgeleri temsil etmektedir (<http://conseq.tau.ac.il/>). ConSeq programına göre c.5824 G>A (p.G1942R) değişimi için bu değer “7” olarak hesaplanmıştır ve proteinin bu bölgesinin korunduğunu göstermektedir. Yine internet tabanlı bir diğer program olan SIFT’de ise proteinlerdeki dizilerin benzerliklerine göre hesaplama yaparak proteinde meydana gelen değişimin tolere edilemeyeceği hakkında tahmin yürütülmektedir (<http://sift.jcvi.org>). c.5824 G>A (p.G1942R) değişimi için bu programda proteinin fonksiyonunu bozduğu ve tolere edilemeyeceği öngörülmüştür. Bu değişimin

protein üzerindeki etkisini saptamak amacıyla kullanılan diğ er bir internet tabanlı program olan polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) programı kullanılmıştır. Bu programa proteinin amino asit dizisi girilmekte ve bulunan değ iş iklik belirtilmektedir. Program bu bölgenin evrim boyunca korunmuş luğ u ve proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak bir hesaplama yapmaktadır. Yapılan hesaplamada bu noktada bulunan amino asit ile değ iş im sonucunda oluş an amino asidin profil skoru 2.367 olarak hesaplanmıştır. Program 2'nin üzerindeki değ erlerde bu değ iş imin proteini büyük ihtimalle hasara uğ rattığını belirtmektedir. c.5824 G>A (p.G1942R) değ iş imi 96 sağlıklı kontrolde taranmış fakat bu değ iş ime rastlanmamıştır. İ nternet tabanlı programlardan elde edilen bilgiler, proteinin bu bölgesinin evrim boyunca korunmuş olması ve sağlıklı kontrollerde bu değ iş ime rastlanmamış olması, fenotiple genotipin ailede tam segregasyon göstermesi, değ iş imin bir mutasyon olma ihtimalini arttırmaktadır. Bu ailenin iş itme kayıplı bireyleri sendromik olmayan resesif iş itme kaybına benzemektedir ancak göz muayeneleri yapılamadığından Usher sendromu dış lanmamıştır.

Bu çalış mada mutasyon bulunan ailelerden iki tanesi ayrıntılı göz muayenesi yapılarak Usher sendromu tanısı almıştır. Bu ailelerin birisinde ilk defa bu çalış ma ile gösterilen p.F1946LfsX24, diğ erinde p.R1861X mutasyonu bulunmuştur. Bugüne kadar *MYO7A* geninde sendromik olmayan otozomal resesif iş itme kaybı ile iliş kilendirilmiş 4 mutasyon bulunmuştur. Bu çalış ma ile ilk defa gösterilmiş olan p.G1942R mutasyonunun tanımlandığı aile de sendromik olmayan iş itme kaybını düş ündürmektedir. p.G2163S ve p.P1887L mutasyonları daha önce Usher sendromu ile iliş kilendirilmiştir. Bu çalış mada bu mutasyonların bulunduğu ailelerde Usher sendromu dış lananamamış olmasına rağ men ilk değ erlendirmelerinde bu hastalar sendromik olmayan iş itme kaybını düş ündürmektedir. Usher sendromunu klinik olarak özellikle erken yaş ta sendromik olmayan iş itme kaybından ayırmak zordur. ERG, Usher sendromu tanısı için altın standarttır. *MYO7A* geninde mutasyon bulunan hastaların göz bulgusu açısından bilgilendirilmeleri gerekmektedir.

Bu çalış mada bulunan mutasyonların hepsi proteinin kuyruk kısmında yer almaktadır. Bu bölge miyozinVIIa'ya bağ lanan proteinlerin bağ lanma bölgesidir. MiyozinVIIa motor aktivitesini ancak bu proteinler bağ lanınca gerçekleştirebilir. Kuyruk bölgesinin baş-boyun bölgesine bağ lanarak ATPaz aktivitesini inhibe ettiğ i gösterilmiştir. MiyozinVIIa'ya bağ lanan proteinlerin bu inhibisyonu kaldırmak için kuyruk bölgesi ile yarıştığı tahmin

edilmektedir. Proteinin diğer proteinler bağlanana kadar hücredeki ATP'yi korumak için inhibe edildiği düşünülmektedir (Umeki vd 2009). Dolayısıyla proteinin bu bölgesindeki mutasyonlar miyozinVIIA ile kompleks oluşturması gereken proteinlerin bağlanmasına engel olarak hücre içi regülasyonu bozuyor olabilir.

Bu tezde poliklinik şartlarındaki ilk değerlendirmelerinde sendromik bulgulara rastlanmamış 55 ailenin 5'inde *MYO7A* geninde mutasyon bulunmuştur. Ancak bu gende mutasyon bulunan hastaların Usher sendromu açısından tekrar değerlendirilmesi doğru olacaktır.

Bu çalışmada *MYO7A* genini de içine alan DFNB2 lokusunun bulunduğu bölgede mikrodizin analizine göre büyük bir homozigot blok bulunan fakat *MYO7A* geninde yapılan tarama sonucunda mutasyon bulamayan iki aile (045 ve 724) vardır. Bu iki ailedeki durumu açıklamak için üç ihtimal bulunmaktadır:

1. *MYO7A* geni etrafında 3' ve 5' ucunda bulunan regülatör elemanlarda veya intronlarda mutasyon olabilir,
2. Bu bölgede *MYO7A* geninden başka bir otozomal resesif sağırılık geni daha bulunabilir. Ancak SNP 10K analizinin bu bölgede aday gen bulmak için çözünürlüğü yeterli değildir. Söz konusu homozigot bölge 11. kromozomda 045 ailesinde 60971628-80428536 pozisyonunda, 724 ailesinde 73727910-103390007 pozisyonlarında bulunmaktadır. Bu bölgeler aday gen bulmak için oldukça büyüktür. Ancak daha fazla aile bireyi daha yüksek çözünürlük sağlayacak SNP analizi ile taranarak, homozigot bölge küçültülerek aday gen aranabilir.
3. Ailelerde tespit edilen otozigozite yalnızca şans sonucu olabilir ve bu ailelerde başka bir bölgede mutasyon bulunabilir. Bu ailelerin küçük olması, az sayıda etkilenmiş bireyin incelenebilmesi (Ek-1) ve SNP 10K'nın çözünürlüğünün düşük kalması bu bölgenin homozigot gibi görünmesine sebep olmuş olabilir.

Ülkemizde *GJB2* mutasyonları ortalama %18.9'dur. Bu oran akraba evliliğinin yüksek olduğu doğu bölgelerimizde batı bölgelerimize göre daha azdır (Tekin ve Arıcı 2007). Türkiye'de işitme kaybı genlerinin dağılımında genetik sürüklenme ve akraba evliliği



etkilidir. Yeterince büyük bir popülasyonda bir mutasyon ortaya çıktığında kaybolma olasılığı yüksekken, küçük topluluklarda ortaya çıkan değişim rastgele olarak frekansını arttırabilir. Türkiye’de yaşayan insanların çoğu geleneksel olarak küçük, nispeten izole kalmış ve genellikle uzak bir bölgeden gelen az sayıda kişinin kurduğu köylerde yaşamaktadırlar. Bu şekilde oluşmuş yaklaşık olarak 40000 köy bulunmaktadır. Bu köyler mutasyon üretme fabrikası gibi çalışmaktadır. Bunlara bir de dışarıdan gelen mutasyonlar eklendiğinde yelpaze genişlemektedir. Bunun yanında yukarıda açıklandığı gibi Anadolu’daki toplumsal yapı kurucu etkisi olan mutasyonların ortaya çıkışı ve yayılması için de uygundur. Bu model insanlık tarihinde 10000 yıl önce tarımın bulunuşundan itibaren etkili olmuştur. Populasyondaki darboğazlar, bazı mutasyonlar için kurucu etkisini arttırmış ve göçler bu mutasyonların farklı bölgelere yayılmasını sağlamıştır. Ülkemizde işitme kaybı genleri açısından bunları gözlemlememiz mümkündür. Doğu bölgelerimizde akraba evliliğinin ve toplumsal yapının etkisiyle nadir genlerin ortaya çıkma olasılığı yüksektir. Bu tez bu genlerin ortaya çıkarılması için yapılan çalışmaların yalnızca bir parçasını oluşturmaktadır. Bu projeler kapsamındaki çalışmalarda ülkemizde sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybına neden olduğu bilinen genler otozigozite yöntemiyle taranmıştır. Bilinen genlere bağlantı görülmeyen bir ailede ise otozigozite yöntemiyle yeni bir sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı geni tanımlanmıştır (Sirmacı vd 2010). İşitme kaybı ile ilgili bilinen 38 gen, ülkemizdeki sendromik olmayan otozomal resesif işitme kayıplı ailelerde tarandığında işitme kaybına neden olan mutasyonlar, bu ailelerin %62’sinde bulunmuştur (Duman vd 2011). 49 ailenin 26’sında, 11 gende 19’u yeni olmak üzere 22 homozigot mutasyon bulunmuştur. Bu tezin başında sendromik olmayan işitme kaybı olduğu düşünülerek çalışılan ancak *MYO7A* geninde mutasyon bulununca tekrar göz muayenesi yaptırılarak Usher sendromu tanısı alan ailelerin dahil edilmediği çalışmamız, Türkiye’de *GJB2* geninden sonra en yaygın genlerin *MYO15A*(%9.9), *TMIE*(%6.6), *TMCI* (%6.6), *OTOF* (%5.0) olduğunu ve *MYO7A*(%3.3) geninin bunları takip ettiğini göstermiştir. Mutasyon bulunmayan 23 ailede bilinen genler dışlandığından bu ailelerde yeni gen bulunması olasılığı yüksektir. Projelerimiz kapsamında bu ailelerde araştırmalar devam edecektir.

Bu tezin yöntem kısmında anlatılan strateji, çok heterojen olan sendromik olmayan işitme kaybı genlerinin taranması ve ortaya çıkarılmasında büyük ve akraba evliliği olan ailelerde verimli bir tekniktir. Sendromik işitme kaybı genlerini ortaya çıkarmak için de bu yöntem

uygun ailelerde kullanılabilir. LAMM sendromuna *FGF3* genindeki homozigot mutasyonların sebep olduğu da bu çalışmalar kapsamında gösterilmiştir (Tekin vd 2007).

Sonuç olarak, bu çalışma *MYO7A* geni ile ilgili Türkiye'den yapılan ilk araştırma olması ve Türkiye'deki işitme kayıplı hastalar arasında *MYO7A*'nın yerinin küçümsenemez olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Birbiriyle akraba olmayan 5 ailede 5 farklı mutasyon bulunmuş olması Türkiye'de çok sayıda gen değişiminin küçük oranlarda bulunduğu göstergesidir. Türkiye'deki zengin genetik mimarinin, işitme kaybındaki yapı taşları olan genlerin ve mutasyonların böyle çalışmalarla ortaya çıkarılması, işitme kayıplı bireylere genetik testlerle daha hızlı tanı koyabilmeyi ve doğru genetik danışma verilmesini sağlayacaktır. Biyoteknoloji biliminin sağladığı ürünlerden biri olan veriler ve teknolojiler kullanılarak yapılan bu ve bunun gibi çalışmalardan elde edilen bilgiler ile ileride işitme kaybı genlerinde Türkiye'deki mutasyonlara özgü bir tarama kiti geliştirilebilir. *MYO7A* geninde bu çalışmada bulunan mutasyonlar bu kit içinde yer almaya adaydır.

## KAYNAKLAR

- Abe, S., Katagiri, T., Saito-Hisaminato, A., Usami, S., Inoue, Y., Tsunoda, T., Nakamura, Y. 2003. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet*, 72 (1): 73-82.
- Adato, A., Michel, V., Kikkawa, Y., Reiners, J., Alagramam, K. N., Weil, D., Yonekawa, H., Wolfrum, U., El-Amraoui, A., Petit, C. 2005. Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum Mol Genet*, 14(3): 347-356.
- Adato, A., Weil, D., Kalinski, H., Pel-Or, Y., Ayadi, H., Petit, C., Korostishevsky, M., Bonne-Tamir, B. 1997. Mutation profile of all 49 exons of the human myosin VIIA gene, and haplotype analysis, in Usher 1B families from diverse origins. *Am J Hum Genet*, 61(4): 813-821.
- Adomas, A., Heller, G., Olson, A., Osborne, J., Karlsson, M., Nahalkova, J., Van Zyl, L., Sederoff, R., Stenlid, J., Finlay, R., Asiogbu, F. O. 2008. Comparative analysis of transcript abundance in *Pinus sylvestris* after challenge with a saprotrophic, pathogenic or mutualistic fungus. *Tree Physiol*, 28(6): 885-897.
- Ahmed, Z. M., Masmoudi, S., Kalay, E., Belyantseva, I. A., Mosrati, M. A., Collin, R. W., Riazuddin, S., Hmani-Aifa, M., Venselaar, H., Kavar, M. N., Tlili, A., van der Zwaag, B., Khan, S. Y., Ayadi, L., Riazuddin, S. A., Morell, R. J., Griffith, A. J., Charfedine, I., Caylan, R., Oostrik, J., Karaguzel, A., Ghorbel, A., Riazuddin, S., Friedman, T. B., Ayadi, H., Kremer, H. 2008. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nat Genet*, 40(11): 1335-1340.
- Ahmed, Z. M., Morell, R. J., Riazuddin, S., Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M. M., Mohiddin, S. A., Fananapazir, L., Caruso, R. C., Husnain, T., Khan, S. N., Riazuddin, S., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Wilcox, E. R. 2003b. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet*, 72(5): 1315-1322.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S. L., Guo, Y., Sabar, M. F., Sieving, P., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Belyantseva, I. A., Wilcox, E. R. 2003a. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet*, 12(24): 3215-3223.
- Ahmed, Z. M., Smith, T. N., Riazuddin, S., Makishima, T., Ghosh, M., Bokhari, S., Menon, P. S., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Wilcox, E. R. 2002. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet*, 110(6): 527-531.
- Akar, N. 1999. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara, AÜTF Antip AŞ Yayınları.

- Ammar-Khodja, F., Faugère, V., Baux, D., Giannesini, C., Léonard, S., Makrelouf, M., Malek, R., Djennaoui, D., Zenati, A., Claustres, M., Roux, A. F. 2009. Molecular screening of deafness in Algeria: high genetic heterogeneity involving DFNB1 and the Usher loci, DFNB2/USH1B, DFNB12/USH1D and DFNB23/USH1F. *Eur J Med Genet*, 52(4): 174-179.
- Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Riazuddin, S., Kremer, H., van Hauwe, P., Moller, C. G., Cremers, C. W. R. J., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., Ramesar, R., Reardon, W., Bitoun, P., Millan, J., Legge, R., Friedman, T. B., Kimberling, W. J. 2002. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet*, 71: 262-275.
- Bariş, I., Kılınç, M. O., Tolun, A. 2001. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet*, 60(6): 452-455.
- Bayazit, Y. A., Cable, B. B., Çataloluk, O., Kara, C., Chamberlin, P., Smith, R. J., Kanlikama, M., Özer, E., Çakmak, E. A., Mumbuc, S., Arslan, A. 2003. *GJB2* gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 67(12): 1331-1335.
- Bespalova, I. N., Van Camp, G., Bom, S. J., Brown, D. J., Cryns, K., DeWan, A. T., Erson, A. E., Flothmann, K., Kunst, H. P., Kurnool, P., Sivakumaran, T. A., Cremers, C. W., Leal, S. M., Burmeister, M., Lesperance, M. M. 2001. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet*, 10(22): 2501-2508.
- Bharadwaj, A. K., Kasztejna, J. P., Huq, S., Berson, E. L., Dryja, T. P. 2000. Evaluation of the myosin VIIA gene and visual function in patients with Usher syndrome type I. *Exp Eye Res*, 71(2): 173-181.
- Bitner-Glindzicz, M. 2002. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 63: 73-94.
- Bolz, H., von Brederlow, B., Ramirez, A., Bryda, E. C., Kutsche, K., Nothwang, H. G., Seeliger, M., del C-Salcedó Cabrera, M., Vila M. C., Molina, O. P., Gal, A., Kubisch, C. 2001. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*, 27: 108-112.
- Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Morell, R. J. 2001. 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*, 68(1): 26-37.
- Boughman, J. A., Vernon, M., Shaver, K. A. 1983. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis*, 36: 595-603.

- Cengiz, F. B., Duman, D., Sirmaci, A., Tokgöz-Yilmaz, S., Erbek, S., Oztürkmen-Akay, H., Incesulu, A., Edwards, Y. J., Ozdag, H., Liu, X. Z., Tekin, M. 2010. Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 14(4): 543-550.
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N. C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., Smith, R. J. 2005. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J Med Genet*, 42(10); e61.
- Chen, Z. Y., Hasson, T., Kelley, P. M., Schwender, B. J., Schwartz, M. F., Ramakrishnan, M., Kimberling, W. J., Mooseker, M. S., Corey, D. P. 1996. Molecular cloning and domain structure of human myosin-VIIa, the gene product defective in Usher syndrome 1B. *Genomics*, 36: 440-448.
- Cohn, E. S., Kelley, P.M. 1999. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet*, 89(3): 130-136.
- Collin, R. W., Kalay, E., Tariq, M., Peters, T., van der Zwaag, B., Venselaar, H., Oostrik, J., Lee, K., Ahmed, Z. M., Caylan, R., Li, Y., Spierenburg, H. A., Eyupoglu, E., Heister, A., Riazuddin, S., Bahat, E., Ansar, M., Arslan, S., Wollnik, B., Brunner, H. G., Cremers, C. W., Karaguzel, A., Ahmad, W., Cremers, F. P., Vriend, G., Friedman, T. B., Riazuddin, S., Leal, S. M., Kremer, H. 2008. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am J Hum Genet*, 82(1): 125-38.
- Cremers, F. P., Kimberling, W. J., Külm, M., de Brouwer, A. P., van Wijk, E., te Brinke, H., Cremers, C. W., Hoefsloot, L. H., Banfi, S., Simonelli, F., Fleischhauer, J. C., Berger, W., Kelley, P. M., Haralambous, E., Bitner-Glindzicz, M., Webster, A. R., Saihan, Z., De Baere, E., Leroy, B. P., Silvestri, G., McKay, G. J., Koenekoop, R. K., Millan, J. M., Rosenberg, T., Joensuu, T., Sankila, E. M., Weil, D., Weston, M. D., Wissinger, B., Kremer, H. 2007. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet*, 44(2): 153-160.
- D'Adamo, P., Pinna, M., Capobianco, S., Cesarani, A., D'Eustacchio, A., Fogu, P., Carella, M., Seri, M., Gasparini, P. 2003. A novel autosomal dominant non-syndromic deafness locus (DFNA48) maps to 12q13-q14 in a large Italian family. *Hum Genet*, 112(3): 319-320.
- de Kok, Y. J., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcolm, S., Pembrey, M. E., Ropers, H. H., Cremers, F. P. 1995. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, 267(5198): 685-688.
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Alvarez, A., Telleria, D., Menendez, I., Moreno, F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346 (4): 243-249.

- Delmaghani, S., del Castillo, F. J., Michel, V., Leibovici, M., Aghaie, A., Ron, U., Van Laer, L., Ben-Tal, N., Van Camp, G., Weil, D., Langa, F., Lathrop, M., Avan, P., Petit, C. 2006. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet*, 38(7): 770-778.
- Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R. E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K. B., Gasparini, P. 2003. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, 72(6): 1571-1577.
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C. M., Nurnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., Van Camp, G., Gasparini, P., Savoia, A. 2004. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74(4): 770-776.
- Duman, D., Sirmacı, A., Cengiz, F.B., Özdağ, H., Tekin, M. 2011. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*, 15 (1-2):29-33.
- Dror, A. A., Avraham, K. B. 2009. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet*, 43: 411-437.
- Eisen, M. D., Ryugo, D. K. 2007. Hearing molecules; contributions from genetic deafness. *Cell Mol Life Sci*, 64(5): 566-580.
- El-Amraoui, A., Schonh, J. S., Küssel-Andermann, P., Blanchard, S., Desnos, C., Henry, J. P., Wolfrum, U., Darchen, F., Petit, C. 2002. MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep*, 3: 463-470.
- Finsterer, J., Fellingner, J. 2005. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69(5): 621-47.
- Friedman, T. B., Liang, Y., Weber, J. L., Hinnant, J. T., Barber, T. D., Winata, S., Arhya, I. N. Asher, J. H., Jr. 1995. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat Genet*, 9 (1): 86-91.
- Friedman, T. B., Sellers, J. R., Avraham, K. B. 1999. Unconventional myosins and the genetics of hearing loss. *Am J Med Genet*, 89(3):147-157.
- Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., Estivill, X. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*, 8(1): 19-23.

- Gibbs, D., Azarian, S. M., Lillo, C., Kitamoto, J., Klomp, A. E., Steel, K. P., Libby, R. T., Williams, D. S. 2004. Role of myosin VIIa and Rab27a in the motility and localization of RPE melanosomes. *J Cell Sci*, 117: 6473-6483.
- Gibbs, J. R., Singleton, A. 2006. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genet*, 2(10):150.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K. A., Antonio, M., Beisel, K. W., Steel, K. P., Brown, S. D. 1995. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature*, 374(6517): 62-64.
- Gren, G. E., Scott, D. A., McDonald, J. M., Woodworth, G. G., Sheffield, V. C., Smith, R. J. 1999. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA*, 281(23): 2211-2216.
- Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P. 1999. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*, 23(1): 16-18.
- Grillet, N., Schwander, M., Hildebrand, M. S., Sczaniecka, A., Kolatkar, A., Velasco, J., Webster, J. A., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Kimberling, W. J., Stephan, D., Bahlo, M., Wiltshire, T., Tarantino, L. M., Kuhn, P., Smith, R. J. H., Muller, U. 2009. Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *Am J Hum Genet*, 85: 328-337.
- Grondahl, J. 1987. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet*, 31: 255-264.
- Hacia, J. G., Fan, J. B., Ryder, O., Jin, L., Edgemon, K., Ghandour, G., Mayer, R. A., Sun, B., Hsie, L., Robbins, C. M., Brody, L. C., Wang, D., Lander, E. S., Lipshutz, R., Fodor, S. P., Collins, F. S. 1999. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, 22: 164-167.
- Hasson, T., Gillespie, P. G., Garcia, J. A., MacDonald, R. B., Zhao, Y., Yee, A. G., Mooseker, M. S., Corey, D. P. 1997. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol*, 137(6):1287-1307.
- Heckenlively, J. R. 1988. *Retinitis pigmentosa*. Philadelphia. J. B. Lippincott
- Hildebrand, M. S., Thorne, N. P., Bromhead, C. J., Kahrizi, K., Webster, J. A., Fattahi, Z., Bataejad, M., Kimberling, W. J., Stephan, D., Najmabadi, H., Bahlo, M., Smith, R. J. 2010. Variable hearing impairment in a DFNB2 family with a novel MYO7A missense mutation. *Clin Genet*, 77(6): 563-571.
- Hone, S. W., Smith, R. J. H. 2003. Genetic screening for hearing loss. *Clin Otolaryngol*, 28: 285-290.

- Hope, C. I., Bunday, S., Proops, D., Fielder, A. R. 1997. Usher syndrome in the city of Birmingham: prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol*, 81: 46-53.
- Jaijo, T., Aller, E., Beneyto, M., Najera, C., Graziano, C., Turchetti, D., Seri, M., Ayuso, C., Baiget, M., Moreno, F., Morera, C., Perez-Garrigues, H., Millan, J. M. 2007. MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet*, 44(3): e71.
- Jaijo, T., Aller, E., García-García, G., Aparisi, M. J., Bernal, S., Avila-Fernández, A., Barragán, I., Baiget, M., Ayuso, C., Antiñolo, G., Díaz-Llopis, M., Külm, M., Beneyto, M., Nájera, C., Millán, J. M. 2010. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(3): 1311-1317.
- Janecke, A. R., Meins, M., Sadeghi, M., Grundmann, K., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Rosenberg, T., Gal, A. 1999. Twelve novel myosin VIIA mutations in 34 patients with Usher syndrome type I: confirmation of genetic heterogeneity. *Hum Mutat*, 13(2): 133-140.
- Joensuu, T., Hamalainen, R., Yuan, B., Johnson, C., Tegelberg, S., Gasparini, P., Zelante, L., Pirvola, U., Pakarinen, L., Lehesjoki, A. E., de la Chapelle, A., Sankila, E. M. 2001. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet*, 69: 673-684.
- Kalatzis, V., Petit, C. 1998. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet*, 7:1589-1597.
- Kalay, E., de Brouwer, A. P., Caylan, R., Nabuurs, S. B., Wollnik, B., Karaguzel, A., Heister, J. G., Erdol, H., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Brunner, H. G., Kremer, H. 2005. A novel D458V mutation in the SANS PDZ binding motif causes atypical Usher syndrome. *J Mol Med*, 83: 1025-1032.
- Kalay, E., Caylan, R., Kremer, H., de Brouwer, A. P., Karagüzel, A. 2005a. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res*, 203(1-2): 88-93.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F. Leigh, I. M. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628): 80-83.
- Khan, S. Y., Ahmed, Z. M., Shabbir, M. I., Kitajiri, S., Kalsoom, S., Tasneem, S., Shayiq, S., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Khan, S. N., Smith, R. J., Riazuddin, S., Friedman, T. B. 2007. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat*, 28(5): 417-423.
- Kloepfer, H. W., Lagaite, J. K. 1966. The hereditary syndrome of congenital deafness and retinitis pigmentosa (Usher's syndrome). *Laryngoscope*, 76: 850-862.
- Kokotas, H., Petersen, M. B., Willems, P. J. 2007. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71(5): 379-391.



- Kremer, H., van Wijk, E., Märker, T., Wolfrum, U., Roepman, R. 2006. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet*, 15(2): 262-270.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T. J. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96(3): 437-446.
- Kurima, K., Peters, L. M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P. S., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Deininger, P. L., Hampton, L. L., Sullivan, S. L., Battey, J. F., Jr., Keats, B. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Griffith, A. J. 2002. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet*, 30(3): 277-284.
- Lalwani, A. K., Goldstein, J. A., Kelley, M. J., Luxford, W., Castelein, C. M., Mhatre, A. N. 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet*, 67(5): 1121-1128.
- Lander, E. S., Botstein, D. 1987. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236(4808): 1567-1570.
- Li, W., Gao, F., Liang, J., Li, C., Zhang, H., Tang, Z., Chen, L., Jin, Q., Tang, W. 2003. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single-strand conformation polymorphism by DNA base composition. *Electrophoresis*, 24(14): 2283-2289.
- Liu, X., Han, D., Li, J., Han, B., Ouyang, X., Cheng, J., Li, X., Jin, Z., Wang, Y., Bitner-Glindzicz, M., Kong, X., Xu, H., Kantardzhieva, A., Eavey, R. D., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Du, L. L., Chen, Z. Y., Dai, P., Teng, M., Yan, D., Yuan, H. 2010. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am J Hum Genet*, 86(1): 65-71.
- Liu, X., Udovichenko, I. P., Brown, S. D., Steel, K. P., Williams, D. S. 1999. Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J Neurosci*, 19(15): 6267-6274.
- Li, X. C., Everett, L. A., Lalwani, A. K., Desmukh, D., Friedman, T. B., Green, E. D., Wilcox, E. R. 1998. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 18(3): 215-217.
- Liu, X. Z., Hope, C., Walsh, J., Newton, V., Ke, X. M., Liang, C. Y., Xu, L. R., Zhou, J. M., Trump, D., Steel, K. P., Bunday, S., Brown, S. D. 1998. Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome. *Am J Hum Genet*, 63(3): 909-912.

- Liu, X. Z., Ouyang, X. M., Xia, X. J., Zheng, J., Pandya, A., Li, F., Du, L. L., Welch, K. O., Petit, C., Smith, R. J., Webb, B. T., Yan, D., Arnos, K. S., Corey, D., Dallos, P., Nance, W. E., Chen, Z. Y. 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet*, 12(10): 1155-1162.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J. T. V., Steel, K. P., Brown, S. D. M. 1997b. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nature Genet*, 16: 188-190.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P., Brown, S. D. 1997a. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*, 17(3): 268-269.
- Liu, X. Z., Xia, X. J., Xu, L. R., Pandya, A., Liang, C. Y., Blanton, S. H., Brown, S. D. M., Steel, K. P., Nance, W. E. 2000. Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Molec Genet*, 9: 63-67.
- Li, Y., Pohl, E., Boulouiz, R., Schradars, M., Nurnberg, G., Charif, M., Admiraal, R. J. C., von Ameln, S., Baessmann, I., Kandil, M., Veltman, J. A., Nurnberg, P., Kubisch, C., Barakat, A., Kremer, H., Wollnik, B. 2010. Mutations in TPRN cause a progressive form of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 86: 479-484.
- Lüleci, M., Sakızlı, M., Alper, Ö. 2000. Renkli Genetik Atlası. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.
- Lynch, E. D., Lee, M. K., Morrow, J. E., Welcsh, P. L., Leon, P. E., King, M. C. 1997. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science*, 278 (5341): 1315-1318.
- Marazita, M. L., Ploughman, L. M., Rawlings, B., Remington, E., Arnos, K. S., Nance, W. E. 1993. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet*, 46: 486-491.
- Maskos, U., Southern, E. M. 1992. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res*, 20(7):1679-1684.
- Maskos, U., Southern, E. M. 1993. A novel method for the analysis of multiple sequence variants by hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 21(9): 2267-2268.
- Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R. H., Rump, A., Hardisty, R. E., Blanchard, S., Coimbra, R. S., Perfettini, I., Parkinson, N., Mallon, A. M., Glenister, P., Rogers, M. J., Paige, A. J., Moir, L., Clay, J., Rosenthal, A., Liu, X. Z., Blanco, G., Steel, K. P., Petit, C., Brown, S. D. 2003. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet*, 34(4): 421-428.

- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M. C., Brunner, H. G., Cremers, C. W., Takanosu, M., Li, S. W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., Van Camp, G., Smith, R. J. 1999. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet*, 23(4): 413-419.
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M. L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K. B., Gasparini, P. 2001. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 69(3): 635-640.
- Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Redshaw, N., Morin, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L. A., del Castillo, I., Steel, K. P., Dalmay, T., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M. A. 2009. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genet*, 41: 609-613.
- Modamio-Hoybjor, S., Mencia, A., Goodyear, R., del Castillo, I., Richardson, G., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M. A. 2007. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *Am J Hum Genet*, 80: 1076-1089.
- Moran, G., Stokes, C., Thewes, S., Hube, B., Coleman, D.C., Sullivan, D. 2004. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology*, 150(10): 3363-3382.
- Morton, C. C., Nance, W. E. 2006. Newborn hearing screening-a silent revolution. *N Engl J Med*, 354(20): 2151-2164.
- Morton, N. E. 1991. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci*, 630: 16-31.
- Möller, C. G., Kimberling, W. J., Davenport, S. L., Priluck, I., White, V., Biscone-Halterman, K., Odkvist, L. M., Brookhouser, P. E., Lund, G., Grissom, T. J. 1989. Usher syndrome: an otoneurologic study. *Laryngoscope*, 99: 73-79.
- Mueller, R. F., Bishop, D. T. 1993. Autozygosity mapping, complex consanguinity, and autosomal recessive disorders. *J Med Genet*, 30(9): 798-799.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J. S., Loiselet, J., Petit, C. 1999. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet*, 8(3): 409-412.
- Nance, W. E. 2003. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9(2): 109-119.

- Naz, S., Giguere, C. M., Kohrman, D. C., Mitchem, K. L., Riazuddin, S., Morell, R. J., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Smith, R. J., Wilcox, E. R. 2002. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet*, 71(3): 632-636.
- Naz, S., Griffith, A. J., Riazuddin, S., Hampton, L. L., Battey, J. F., Jr., Khan, S. N., Wilcox, E. R., Friedman, T. B. 2004. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet*, 41(8): 591-595.
- Ness, S. L., Ben Yosef, T., Bar-Lev, A., Madeo, A. C., Brewer, C. C., Avraham, K. B., Kornreich, R., Desnick, R. J., Willner, J. P., Friedman, T. B., Griffith, A. J. 2003. Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type 3. *J Med Genet*, 40: 767-772.
- Nikolopoulos, T. P., Lioumi, D., Stamataki, S., O'Donoghue, G. M. 2006. Evidence-based overview of ophthalmic disorders in deaf children: a literature update. *Otol Neurotol*, 27 (2 Suppl 1):1-24.
- Noyan, A. 1999. *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Ankara, Meteksan.
- Ouyang, X. M., Xia, X. J., Verpy, E., Du, L. L., Pandya, A., Petit, C., Balkany, T., Nance, W. E., Liu, X. Z. 2002. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum. Genet*, 111: 26-30.
- Öner, C. 2002. *Genetik Kavramlar*. Ankara, Palme Yayıncılık.
- Pakarinen, L., Karjalainen, S., Simola, K. O., Laippala, P., Kaitalo, H. 1995. Usher's syndrome type 3 in Finland. *Laryngoscope*, 105: 613-617.
- Peters, L. M., Anderson, D. W., Griffith, A. J., Grundfast, K. M., San Agustin, T. B., Madeo, A. C., Friedman, T. B., Morell, R. J. 2002. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet*, 11(23): 2877-2885.
- Petersen, M. B., Willems, P. J. 2006. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet*, 69(5): 371-392.
- Petit, C. 2006. From deafness genes to hearing mechanisms; harmony and counterpoint. *Trends Mol Med*, 12(2): 57-64.
- Petit, C., Levilliers, J., Hardelin, J. P. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*, 35: 589-646.
- Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A, Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., Brown, P. O. 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23(1): 41-46.
- Redowicz, M. J. 1999. Myosins and deafness. *J Muscle Res Cell Motil*, 20(3): 241-248.

- Rehman, A. U., Morell, R. J., Belyantseva, I. A., Khan, S. Y., Boger, E. T., Shahzad, M., Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Khan, S. N., Riazuddin, S., Friedman, T. B. 2010. Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am J Hum Genet*, 86: 378-388.
- Reiners, J., Nagel-Wolfrum, K., Jürgens, K., Märker, T., Wolfrum, U. 2006. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res*, 83(1): 97-119.
- Rhodes, C. R., Hertzano, R., Fuchs, H., Bell, R. E., de Angelis, M. H., Steel, K. P., Avraham, K. B. 2004. A Myo7a mutation cosegregates with stereocilia defects and low-frequency hearing impairment. *Mamm Genome*, 15: 686-697.
- Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Fanning, A. S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S. N., Chattaraj, P., Friedman, P. L., Anderson, J. M., Belyantseva, I. A., Forge, A., Riazuddin, S., Friedman, T. B. 2006b. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79: 1040-1051.
- Riazuddin, S., Anwar, S., Fischer, M., Ahmed, Z. M., Khan, S. Y., Janssen, A. G., Zafar, A. U., Scholl, U., Husnain, T., Belyantseva, I. A., Friedman, P. L., Riazuddin, S., Friedman, T. B., Fahlke, C. 2009. Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *Am J Hum Genet*, 85(2): 273-280.
- Riazuddin, S., Khan, S. N., Ahmed, Z. M., Ghosh, M., Caution, K., Nazli, S., Kabra, M., Zafar, A. U., Chen, K., Naz, S., Antonellis, A., Pavan, W. J., Green, E. D., Wilcox, E. R., Friedman, P. L., Morell, R. J., Friedman, T. B. 2006a. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet*, 78(1): 137-143.
- Robertson, N. G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S. N., Eavey, R. D., McKenna, M., Nadol, J. B., Jr., Miyamoto, R. T., Linthicum, F. H., Jr., Lubianca Neto, J. F., Hudspeth, A. J., Seidman, C. E., Morton, C. C., Seidman, J. G. 1998. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet*, 20(3): 299-303.
- Rosenberg, T., Haim, M., Hauch, A. M., Parving, A. 1997. The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet*, 51:314-321.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (2<sup>nd</sup> Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schneider, E., Marker, T., Daser, A., Frey-Mahn, G., Beyer, V., Farcas, R., Schneider-Ratzke, B., Kohlschmidt, N., Grossmann, B., Bauss, K., Napiontek, U., Keilmann, A., Bartsch, O., Zechner, U., Wolfrum, U., Haaf, T. 2009. Homozygous disruption of PDZD7 by reciprocal translocation in a consanguineous family: a new member of the Usher syndrome protein interactome causing congenital hearing impairment. *Hum Molec Genet*, 18: 655-666.
- Schraders, M., Lee, K., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Ali, G., Hoefsloot, L. H., Veltman, J. A., Cremers, F. P. M., Basit, S., Ansar, M., Cremers, C. W. R. J., Kunst, H. P. M., Ahmad, W., Admiraal, R. J. C., Leal, S. M., Kremer, H. 2010a. Homozygosity mapping reveals mutations of GRXCR1 as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am J Hum Genet*, 86: 138-147.
- Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., van Wijk, E., Kunst, H. P. M., Hoefsloot, L. H., Cremers, C. W. R. J., Admiraal, R. J. C., Kremer, H. 2010b. Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am J Hum Genet*, 86: 604-610.
- Schultz, J. M., Khan, S. N., Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Waryah, A. M., Chhatre, D., Starost, M. F., Ploplis, B., Buckley, S., Velasquez, D., Kabra, M., Lee, K., and 11 others. 2009. Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am J Hum Genet*, 85: 25-39.
- Schwander, M., Lopes, V., Sczaniecka, A., Gibbs, D., Lillo, C., Delano, D., Tarantino, L. M., Wiltshire, T., Williams, D. S., Müller, U. 2009. A novel allele of myosin VIIa reveals a critical function for the C-terminal FERM domain for melanosome transport in retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci*, 29(50): 15810-15818.
- Scott, H. S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S. Q., Radhakrishna, U., Papasavvas, M. P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S. E. 2001. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet*, 27(1): 59-63.
- Sellers, J. R. 2000. Myosins; a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496(1): 3-22.
- Senften, M., Schwander, M., Kazmierczak, P., Lillo, C., Shin, J. B., Hasson, T., Géléoc, G. S., Gillespie, P. G., Williams, D., Holt, J. R., Müller, U. 2006. Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. *J Neurosci*, 26(7): 2060-2071.
- Shabbir, M. I., Ahmed, Z. M., Khan, S. Y., Riazuddin, S., Waryah, A. M., Khan, S. N., Camps, R. D., Ghosh, M., Kabra, M., Belyantseva, I. A., Friedman, T. B. 2006. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 43(8): 634-640.

- Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Abu Sa'ed, J., Abu Rayan, A., Lynch, E. D., Lee, M. K., Avraham, K. B., King, M. C., Kanaan, M. 2006. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 78(1): 144-152.
- Sirmaci, A., Duman, D., Oztürkmen-Akay, H., Erbek, S., Incesulu, A., Oztürk-Hişmi, B., Arici, Z. S., Yüksel-Konuk, E. B., Taşir-Yılmaz, S., Tokgöz-Yılmaz, S., Cengiz, F. B., Aslan, I., Yildirim, M., Hasanefendioğlu-Bayrak, A., Ayçiçek, A., Yılmaz, I., Fitoz, S., Altin, F., Ozdağ, H., Tekin, M. 2009a. Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural hearing loss: a report of five novel mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 73(5): 699-705.
- Sirmaci, A., Erbek, S., Price, J., Huang, M., Duman, D., Cengiz, F. B., Bademci, G., Tokgöz-Yılmaz, S., Hişmi, B., Ozdağ, H., Oztürk, B., Kulaksizoğlu, S., Yildirim, E., Kokotas, H., Grigoriadou, M., Petersen, M. B., Shahin, H., Kanan, M., King, M. C., Chen, Z. Y., Blanton, S. H., Liu, X. Z., Zuchner, S., Akar, N., Tekin, M. 2010 A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, 86(5): 797-804.
- Sirmaci, A., Oztürkmen-Akay, H., Erbek, S., Incesulu, A., Duman, D., Taşir-Yılmaz, S., Ozdağ, H., Tekin, M. 2009b. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin Genet*, 75(6): 562-567.
- Smith, R. J., Berlin, C. I., Hejtmancik, J. F., Keats, B. J., Kimberling, W. J., Lewis, R. A., Möller, C. G., Peliás, M. Z., Tranebjaerg, L. 1994. Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *Am J Med Genet*, 50: 32-38.
- Spandau, U. H., Rohrschneider, K. 2002. Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240: 495-498.
- Tekin, M., Akar, N., Cin, Ş., Blanton, S. H., Xia, X. J., Liu, X. Z., Nance, W. E., Pandya, A. 2001b. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet*, 108(5): 385-389.
- Tekin, M., Arici, Z. S. 2007. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet*, 143A(14): 1583-1591.
- Tekin, M., Arnos, K. S., Pandya, A. 2001a. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358(9287): 1082-1090.
- Tekin, M., Boğoçlu, G., Arican, S. T., Orman, M. N., Taştan, H., Elsobky, E., Elsayed, S., Akar, N. 2005a. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the *GJB2* gene in Anatolia. *Clin Genet*, 67(1): 31-37.
- Tekin, M., Duman, T., Boğoçlu, G., Incesulu, A., Çomak, E., İlhan, İ., Akar, N. 2003a. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat*, 21(5): 552-553.

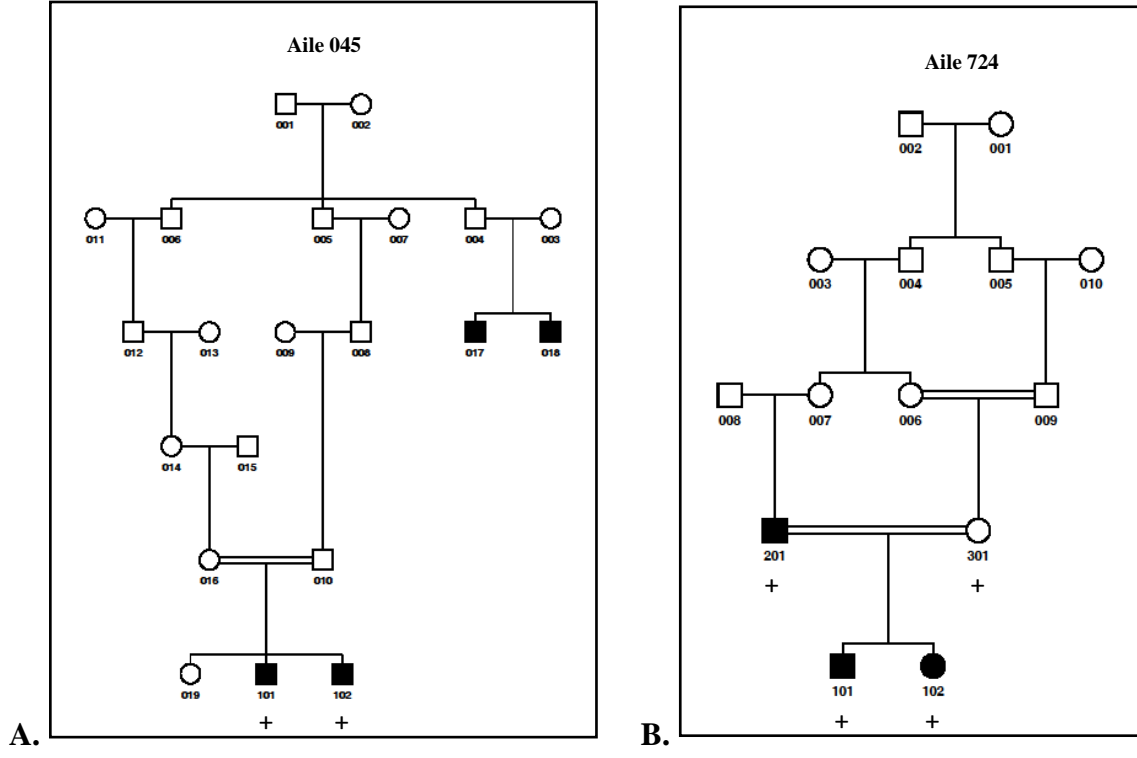
- Tekin, M., Duman, T., Boğoçlu, G., İncesulu, A., Çomak, E., Fitoz, S., Yılmaz, E., İlhan, İ., Akar, N. 2003b. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr*, 162(3): 154-158.
- Tekin, M., Hişmi, B. O., Fitoz, S., Ozdağ, H., Cengiz F.B., Sirmaci, A., Aslan, I., Inceoğlu, B., Yüksel-Konuk, E. B., Yılmaz, S. T., Yasun, O., Akar, N. 2007. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am J Hum Genet*. 80(2):338-344.
- Tsilou, E. T., Rubin, B. I., Caruso, R. C., Reed, G. F., Pikus, A., Hejtmancik, J. F., Iwata, F., Redman, J. B., Kaiser-Kupfer, M. I. 2002. Usher syndrome clinical types 1 and 2: could ocular symptoms and signs differentiate between the two types? *Acta Ophthalmol Scand*, 80: 196-201.
- Umeki, N., Jung, H. S., Watanabe, S., Sakai, T., Li, X. D., Ikebe, R., Craig, R., Ikebe, M. 2009. The tail binds to the head-neck domain, inhibiting ATPase activity of myosin VIIA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(21): 8483-8488.
- Uyguner, O., Emiroğlu, M., Üzümcü, A., Hafız, G., Ghanbari, A., Başerer, N., Yüksel-Apak, M., Wollnik, B. 2003. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet*, 64(1): 65-69.
- Vahava, O., Morell, R., Lynch, E. D., Weiss, S., Kagan, M. E., Ahituv, N., Morrow, J. E., Lee, M. K., Skvorak, A. B., Morton, C. C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T. B., King, M. C., Avraham, K. B. 1998. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*, 279(5358): 1950-1954.
- Van Laer, L., Huizing, E. H., Verstreken, M., van Zuijlen, D., Wauters, J. G., Bossuyt, P. J., Van de Heyning, P., McGuirt, W. T., Smith, R. J., Willems, P. J., Legan, P. K., Richardson, G. P., Van Camp, G. 1998. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet*, 20(2): 194-197.
- van Wijk, E., Krieger, E., Kemperman, M. H., De Leenheer, E. M., Huygen, P. L., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Kremer, H. 2003. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J Med Genet*, 40(12): 879-884.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., Van Camp, G. 1998. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 19(1): 60-62.



- Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X. Z., Gal, A., Salem, N., Mansour, A., Blanchard, S., Kobayashi, I., Keats, B. J., Slim, R., Petit, C. 2000. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet*, 26: 51-55.
- Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, T. P., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Laine, S., Popot, J. L., Moreno, F., Mueller, R. F., Petit, C. 2001. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet*, 29(3): 345-349.
- Von Graefe, A. 1858. Exceptionelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei Pigmententartung der Netzhaut. *Archiv für Ophthalmologie*, 4: 250-253.
- Walsh, T., Pierce, S. B., Lenz, D. R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., Roeb, W., McCarthy, S., Nord, A. S., Gordon, C. R., Ben-Neriah, Z., Sebat, J., Kanaan, M., Lee, M. K., Frydman, M., King, M. C., Avraham, K. B. 2010. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am J Hum Genet*, 87: 101-109.
- Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., Lee, M. K., Kanaan, M., King, M. C., Avraham, K. B. 2002. From flies' eyes to our ears; mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(11): 7518-7523.
- Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., Probst, F. J., Wilcox, E. R., Touchman, J. W., Morton, C. C., Morell, R. J., Noben-Trauth, K., Camper, S. A., Friedman, T. B. 1998. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 280(5368): 1447-1451.
- Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G., Smith, R. J. 2001. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, 10(3): 195-200.
- Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., Petit, C. 1997. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 16(2): 191-193.
- Weil, D., Levy, G., Sahly, I., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., El-Amraoui, A., Crozet, F., Philippe, H., ağabeytbol, M., Petit, C. 1996. Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(8): 3232-3237.
- Wilcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J., Friedman, T. B. 2001. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 104(1): 165-172.
- Willems, P. J. 2000. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*, 342(15): 1101-1109.

- Wolfrum, U., Liu, X., Schmitt, A., Udovichenko, I. P., Williams, D. S. 1998. Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell Motil Cytoskeleton*, 40: 261-271.
- Woods, C. G., Valente, E. M., Bond, J., Roberts, E. 2004. A new method for autozygosity mapping using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and EXCLUDEAR. *J Med Genet*, 41(8): e101.
- Xia, J. H., Liu, C. Y., Tang, B. S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H. P., Zhang, B. R., Xie, W., Hu, D. X., Zheng, D., Shi, X. L., Wang, D. A., Xia, K., Yu, K. P., Liao, X. D., Feng, Y., Yang, Y. F., Xiao, J. Y., Xie, D. H., Huang, J. Z. 1998. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet*, 20(4): 370-373.
- Xiao, S., Yu, C., Chou, X., Yuan, W., Wang, Y., Bu, L., Fu, G., Qian, M., Yang, J., Shi, Y., Hu, L., Han, B., Wang, Z., Huang, W., Liu, J., Chen, Z., Zhao, G., Kong, X. 2001. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet*, 27(2): 201-204.
- Yan, D., Liu, X. Z. 2010. Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *J Hum Genet* 55: 327-335.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C. 1999. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet*, 21(4): 363-369.
- Young, T. L., Ives, E., Lynch, E., Person, R., Snook, S., MacLaren, L., Cater, T., Griffin, A., Fernandez, B., Lee, M. K., King, M. C. 2001. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet*, 10(22): 2509-2514.
- Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A. T., Morell, R. J., Elfenbein, J. L., Fisher, R. A., Leal, S. M., Smith, R. J., Friderici, K. H. 2003. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet*, 73(5): 1082-1091.
- Zina, Z. B., Masmoudi, S., Ayadi, H., Chaker, F., Ghorbel, A. M., Drira, M., Petit, C. 2001. From DFNB2 to Usher syndrome: variable expressivity of the same disease. *Am J Med Genet*, 101(2): 181-183.
- Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X. Z., Nouaille, S., Nance, W. E., Kanaan, M., Avraham, K. B., Tekaiia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C. 2002. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(9): 6240-6245.

## EKLER



**Ek-1.** *MYO7A* geninde mutasyon bulunmayan ailelerin aile ağaçları **A.** Aile 045 **B.** Aile 724 (+: DNA'sı temin edilip, çalışılmış bireyleri göstermektedir.)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : **DUYGU DUMAN**  
Doğum Tarihi : 07.05.1980  
Doğum Yeri : Ankara  
Medeni hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce

## EĞİTİMİ:

**Yüksek lisans** : AÜTF Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D.  
Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik B.D. (2003-2005)  
**Üniversite** : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara  
(1997-2002)  
**Lise** : Yüce Fen Lisesi (1994-1997)

## TEZLER:

**Yüksek Lisans:** Bir Grup Türk Hastada *SLC26A4* Gen Analizi (2005)  
(Danışman: Doç. Dr. Mustafa Tekin)

## ÇALIŞTIĞI KURUM:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Genetik Bilim Dalı: 2004-halen

## YAYINLAR:

### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan ve SCI'e giren makaleler

1. Tekin M, **Akcayoz D**, Comak E, Bogoclu G, Duman T, Fitoz S, Ilhan I, Akar N. Screening the *SLC26A4* gene in probands with deafness and goiter (Pendred syndrome) ascertained from a large group of students of the schools for the deaf in Turkey. Clin Genet.2003;64:371-4.
2. Tekin M, **Akcayoz D**, Incesulu A. A novel missense mutation in a C2 domain of *OTOF* results in autosomal recessive auditory neuropathy. Am J Med Genet A.2005;138: 6-10.
3. Tekin M, **Akcayoz D**, Ucar C, Gulen H, Akar N. 657del5 mutation of the Nijmegen breakage syndrome gene (*NBS1*) in the Turkish population. Hum Biol. 2005 Jun;77(3):393-7.
4. Sirmaci A, **Akcayoz-Duman D**, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the *GJB2* gene is prevalent and large deletions involving the *GJB6* gene are not present in the Turkish population. J Genet.2006;85:213-6.

5. Tekin M, Oztürkmen Akay H, Fitoz S, Birnbaum S, Cengiz FB, Sennaroğlu L, Incesulu A, Yüksel Konuk EB, Hasanefendioğlu Bayrak A, Sentürk S, Cebeci I, Utine GE, Tunçbilek E, Nance WE, **Duman D**. Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Clin Genet*. 2008;73:554-65.
6. Ergür AT, Ocal G, Berberoglu M, Tekin M, Kiliç BG, Aycan Z, Kutlu A, Adiyaman P, Siklar Z, Akar N, Sahin A, **Akçayöz D**. Paternal X could relate to arithmetic function; study of cognitive function and parental origin of X chromosome in Turner syndrome. *Pediatr Int*. 2008;50:172-4.
7. Sirmaci A, **Duman D**, Oztürkmen-Akay H, Erbek S, Incesulu A, Oztürk-Hişmi B, Arici ZS, Yüksel-Konuk EB, Taşir-Yilmaz S, Tokgöz-Yilmaz S, Cengiz FB, Aslan I, Yildirim M, Hasanefendioğlu-Bayrak A, Ayçiçek A, Yilmaz I, Fitoz S, Altin F, Ozdağ H, Tekin M. Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural hearing loss: a report of five novel mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009 May;73(5):699-705.
8. Sirmaci A, Oztürkmen-Akay H, Erbek S, Incesulu A, **Duman D**, Taşir-Yilmaz S, Ozdağ H, Tekin M. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin Genet*. 2009;75:562-7.
9. Sirmaci A, Erbek S, Price J, Huang M, **Duman D**, Cengiz FB, Bademci G, Tokgöz-Yilmaz S, Hişmi B, Ozdağ H, Oztürk B, Kulaksizoğlu S, Yildirim E, Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB, Shahin H, Kanaan M, King MC, Chen ZY, Blanton SH, Liu XZ, Zuchner S, Akar N, Tekin M. A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):797-804.
10. Cengiz FB, **Duman D**, Sirmaci A, Tokgöz-Yilmaz S, Erbek S, Oztürkmen-Akay H, Incesulu A, Edwards YJ, Ozdag H, Liu XZ, Tekin M. Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Aug;14(4):543-50
11. **Duman D**, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M. Screening of 38 Genes Identifies Mutations in 62% of Families with Nonsyndromic Deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Nov 30.
12. Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Sakalar YB, Hasanefendioğlu-Bayrak A, **Duman D**, Farooq A, King MC, Tekin M. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet*. 2010 Nov 12;87(5):679-86

## **B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

1. Duman T, Tekin M, Ayvali C, Bogoclu G, **Akcayoz D**, Akar N. Frequencies of mitochondrial DNA mutations among the Turkish people with prelingual nonsyndromic hearing loss. European Human Genetics Meeting, May 2003, Birmingham, UK. (özet).
2. Tekin M, **Akcayoz D**, Incesulu A. A novel missense mutation in a C2 domain of OTOF results in autosomal recessive sensorineural hearing loss. European Human Genetics Meeting, May 2005, Prague, Czech Republic (özet)
3. Tekin M, Ozdag H, Sirmaci A, Cengiz FB, Aslan I, Tasir-Yilmaz S, **Duman D**, Ozturk-Hismi B, Arici ZS, Incesulu A, Erbek S, Yilmaz I. Significant locus heterogeneity in Turkish families with autosomal recessive sensorineural hearing loss. 57th American Society of Human Genetics Meeting, San Diego, October 2007 (özet).
4. Tekin M, Sirmaci A, Ozdag H, **Duman D**, Ozturkmen-Akay H, Erbek S, Tasir-Yilmaz S, Incesulu A, Ozturk-Hismi B, Arici ZS, Yuksel-Konuk B, Cengiz FB, Aslan I. Mutations in TMC1 are Relatively Frequent Among Families with Nonsyndromic Autosomal Recessive Deafness in Turkey. 57th American Society of Human Genetics Meeting, Philadelphia, November 2008 (özet). 5. Tekin M, Cengiz FB, Duman D, Sirmaci A, Erbek S, Ozturkmen-Akay H, Ozdag H. Unique spectrum of MYO15A mutations associated with autosomal recessive deafness in Turkey. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), Honolulu, Hawaii, Oct. 20-24 (2009).

## **C. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan Türkçe makaleler**

Yalaki Z, **Akçayöz-Duman D**, Ünlü A, Can Z, Tekin M. Apert sendromlu bir çocukta FGFR2 geninde Pro253Arg mutasyonu. Klinik Bilimler & Doktor 2005; 11: 714-717.

## **ULUSAL KONGRELERDE SÖZLÜ BİLDİRİLER:**

**Akçayöz-Duman, D.**, Incesulu, A., Tekin, M. Otozomal Resesif Kalıtım Gösteren İşitme Engelli Ailelerde 11 Gen Bölgesi ve Genin Taranması: OTOF Geninde Yeni Bir Mutasyon. 41. Türk Pediatri Kongresi, 22-25 Haziran 2005, Ankara.

## **DAVETLİ KONUŞMALAR:**

“**İşitme Kaybının Genetiği**”. Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Derneği tarafından gerçekleştirilen 2009-2010 Eğitim dönemi toplantılarının üçüncüsü içerisinde yer alan İç Kulak Hastalıkları ve Genetik Paneli. 19 Aralık 2010, Ankara Sheraton Oteli.

## **ÖDÜLLER:**

41. Türk Pediatri Kongresi 22-25 Haziran 2005, Ankara. Prof. Dr. Bahtiyar Demirağ **Genç Araştırmacı 1.'lik Ödülü**.