

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SENDROMİK OLMAYAN OTOZOMAL RESESİF İŞİTME KAYIPLI  
VE *MYO15A* GENİNE BAĞLANTI BULUNAN AİLELERDE  
MUTASYON ANALİZİ**

Filiz Başak CENGİZ

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Nejat AKAR

2010-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 29/03/2010'dur.

Prof. Dr. Nejat AKAR

Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ

Prof. Dr. Levent SENNAROĞLU

Prof. Dr. Ajlan TÜKÜN

Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan Atakol  
Enstitü Müdür V.

## ÖZET

### **Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kayıplı ve *MYO15A* Genine Bağlantı Bulunan Ailelerde Mutasyon Analizi**

Doğuştan veya dil gelişimi öncesi gelişen işitme kaybı yaklaşık 1000 canlı doğumda bir görülmektedir. İşitme kaybına birçok çevresel ve genetik faktör sebep olabilmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kaybıdır. Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini otozomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır.

Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının önemli bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır. *GJB2* geni dışında bugüne kadar otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı yapan 30 gen tanımlanmıştır. Bu nedenle işitme kaybı olan bir ailede sorumlu genetik değişikliğin saptanması oldukça zordur. Bu genlerden bir tanesi olan *MYO15A* 1998 yılında bulunmuştur.

*MYO15A* geni tüy hücrelerinde aktin moleküllerinin organizasyonu için gerekli konvansiyonel olmayan Miyozin XVa proteinini kodlar. Bu gen 17. kromozomun p11.2 bölgesinde DFNB3 lokusunda bulunmaktadır ve 71 kb'lık bir alanda 66 ekzondan oluşmaktadır. En uzun *MYO15A* mRNA transkripti 3,530 amino asit içermektedir. *MYO15A* mutasyonları konjenital otozomal resesif işitme kaybına neden olmaktadır.

Anne baba arasında akrabalık olan ve en az iki etkilenmiş bireyde sendromik olmayan doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan 104 aile araştırmaya dahil edilmiştir. 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. Bu ailelerde otozigozite haritalaması ile ilgili gene bağlantı olan ailelerde mutasyon taraması yapılmıştır.

Bu çalışma ile iki ailede c.5807\_5813delCCCGTGG (p. R1937TfsX10), bir ailede c.4441T>C (p.S1481P), bir ailede c.4198G>A (p.V1400M), bir ailede c.867C>G (p.Y289X) ve üç ailede c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335TfsX119) değişimleri saptanmıştır. *MYO15A* geninde 8 ailede bulduğumuz 5 değişiklik de ilk defa bu çalışma ile gösterilmiş ve bu ailelerde sendromik olmayan işitme kaybından *MYO15A* genindeki mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda Türkiye'deki ailelerde *GJB2* genindeki mutasyon sıklığı 0.189 olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada ise Türkiye'deki otozomal resesif sendromik olmayan işitme kayıplarında *MYO15A* genindeki mutasyon sıklığı 0.062 (%95 güvenlik aralığı 0.020-0.105) olarak bulunmuştur ve bu çalışma ile bulunan mutasyonlar Türk toplumu için önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** İşitme kaybı, *MYO15A*, miyozin, mikrosatellit, mikrodizin

## ABSTRACT

### **Mutation Analysis of Families With Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss Linked to the *MYO15A* Gene**

Congenital or prelingual hearing loss occurs approximately in one case per 1000 live births. Genetic causes are responsible in 50% of cases. Additional findings are present in 30% of cases, which are referred to as having syndromic deafness. Autosomal recessive transmission occurs in 80% of hereditary deafness.

Mutations in *GJB2* are the most common cause of hereditary hearing loss in many countries. In addition to *GJB2*, mutations in 30 genes have been identified for autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. It is difficult to determine the genetic cause in a hearing loss family due to extensive genetic heterogeneity.

The *MYO15A* gene is located on chromosome 17p11.2, has 66 exons, and encodes for unconventional myosin XVa. The longest isoform of myosin XVa has 3,530 amino acid residues. In the inner ear, myosin XVa is necessary for the development of hair cell stereocilia, which are actin-filled projections on the apical surface. Recessive mutations of *MYO15A* are associated with profound nonsyndromic hearing loss.

In order to reveal the frequency and spectrum of *MYO15A* mutations, we screened 104 unrelated multiplex and consanguineous Turkish families with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss using autozygosity mapping with SNP and microsatellite markers. Mutations in *GJB2* were excluded in each family. Autozygosity mapping showed that the locus containing the *MYO15A* gene (DFNB3) co-segregated with autosomal recessive deafness in 10 families.

Screening of 66 exons and flanking intronic regions of the *MYO15A* gene in families mapped to the DFNB3 locus revealed five previously unreported mutations, c.867C>G (p.Y289X) (1 family), c.4198G>A (p.V1400M) (1 family), c.4441T>C (p.S1481P) (1 family), c.5807\_5813delCCCGTGG (p.R1937TfsX10) (3 families), and c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335TfsX119) (2 families). Each homozygous mutation co-segregated with deafness in each family and was absent in Turkish hearing controls.

Biallelic *GJB2* mutations are present in 0.189 of comparable families in Turkey. We estimate the prevalence of homozygous *MYO15A* mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness in Turkey as 0.062 (95% CI is 0.020-0.105).

**Key Words:** Hearing loss, *MYO15A*, myosin, microsatellites, microarray

## ÖNSÖZ

Laboratuvardaki çalışmalarım boyunca 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 Doç. Dr. Mustafa TEKİN'e, bilimsel çalışma şartlarının ülkemizdeki zorluklarını bilerek bize 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 Uzm. Bio. Duygu DUMAN, Uzm. Bio. Aslı SIRMACI, Dr. Ayşenur ÖZTÜRK, Dr. İdil ASLAN ve ismini sayamadığım tüm Çocuk Genetik ailesine ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yaptığım çalışmalarda benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Uzm. Bio. Seda YILMAZ'a çok teşekkür ederim. Bana verdiği koşulsuz destek, sevgi ve sabır için biricik anneme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

KABUL ONAY	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. GENEL BİLGİLER	2
1.1.1. İşitme Mekanizması	2
1.1.2. İşitme Kaybının Sınıflandırılması	5
1.1.3. Sendromik İşitme Kaybı	6
1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı	7
1.1.5. Otozigozite Haritalaması	9
1.1.6. Miyozin genleri	10
1.1.7. <i>MYO15A</i> Geni	12
1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER	15
1.2.1. Mikrodizin Analizi	15
1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
1.2.3. Mikrosatellit Analizi	16
1.2.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorfism, SSCP)	18
1.2.5. DNA Dizi Analizi	19
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>21</b>
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	21
2.2. Yöntemler	21
2.2.1. DNA İzolasyonu	22
2.2.2. Mikrodizin analizi	23
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	25
2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama	26
2.2.6. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	27
2.2.7. SSCP Jeli için Gümüş Boyama	28
2.2.8. DNA Dizi Analizi	30
<b>3.BULGULAR</b>	<b>31</b>
3.1. Otozigozite Haritalaması	31
3.2. Mutasyon Analizi	34
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>40</b>
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

Şekil 1.1.	Kulağın Anatomik Yapısı.	2
Şekil 1.2.	İç Kulağın Yapısı.	3
Şekil 1.3.	Miyozin XVa proteininin yapısal bölgeleri.	12
Şekil 3.1.	<i>MYO15A</i> geni için kullanılan D17S1857 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	33
Şekil 3.2.	<i>MYO15A</i> geni için kullanılan D17S2196 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	33
Şekil 3.3.	<i>MYO15</i> geninde bant farklılığı saptanan eksonların SSCP jel görüntüsü.	34
Şekil 3.4.	<i>MYO15A</i> geninin 24. Ekzonundaki c.5807_5813delCCCGTGG (p.R1937TfsX10) değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan yabancı tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.	35
Şekil 3.5.	<i>MYO15</i> geninin 12. ekzonundaki c.4441T>C (p.S1481P) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabancı tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.	35
Şekil 3.6.	<i>MYO15</i> geninin 9. ekzonundaki c.4198G>A (p.V1400M) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabancı tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.	36
Şekil 3.7.	<i>MYO15</i> geninin 2. ekzonundaki c.867C>G (p.Y289X) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabancı tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.	36
Şekil 3.8.	<i>MYO15A</i> geninin 62. ekzonundaki c.10002_10003dupCCGGCCC (p.S3335TfsX119) değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.	37
Şekil 3.9.	Bulunan <i>MYO15A</i> mutasyonlarının ailelerde dağılımı.	38
Şekil 3.10.	550 ve 780 numaralı ailelerin aile ağaçları ve D17S1857, D17S2196, D17S620, D17S805 ve D17S689 mikrosatellit belirteçleri ile oluşturulmuş haplotipleri.	39
Şekil 4.1.	MiyozinXVa proteininin yapısal bölgeleri ve bu çalışmada gösterilen mutasyonlar.	40
Şekil 4.2.	<i>MYO15A</i> geninde bulunan mutasyonların illere göre dağılımı.	41

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Çizelge 1.1.</b> Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı işitme kaybı yapan genler.	8
<b>Çizelge 1.2.</b> <i>MYO15A</i> bölgerinin eksonlara göre lokalizasyonları.	12
<b>Çizelge 2.1.</b> <i>MYO15A</i> geni için kullanılan mikrosatellit belirteçleri.	25
<b>Çizelge 2.2.</b> <i>MYO15A</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.	29
<b>Çizelge 3.1.</b> 013, 550, 553, 555, 679, 719, 724, 780, 801, 815 numaralı ailelerde <i>MYO15A</i> geninin olduğu bölgenin 10K mikrodizin analizi.	32
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>MYO15A</i> geninde bu çalışmada bulunan mutasyonlar.	34
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>MYO15A</i> genindeki homosapiens'te 1400. pozisyondaki valin amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi.	42
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>MYO15A</i> genindeki homosapiens'te 1481. pozisyondaki serin amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi.	43



## SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikromolar
A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Arg	: Arjinin
As	: Akseptör site (alıcı bölge)
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozintrifosfat
Bç	: Baz Çifti
C	: Sitozin
Ca <sup>++</sup>	: Kalsiyum
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dB	: Desibel
dCTP	: Deokisitozintrifosfat
ddATP	: Dideoksiadenintrifosfat
ddCTP	: Dideoksisitozintrifosfat
ddGTP	: Dideoksiguanintrifosfat
ddH <sub>2</sub> O	: Didistile su
ddTTP	: Dideoksitimidintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanintrifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozid trifosfat
Ds	: Donör site (verici bölge)
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
Fs	: Çerçeve kayması (frameshift)
G	: Guanin
g	: Gram
Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin
His	: Histidin
IHC	: İç tüy hücresi
Ile	: İzolösin
K <sup>+</sup>	: Potasyum iyonu

Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
Leu	: Lösin
Lys	: Lizin
Mg <sup>++</sup>	: Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Mikromolar
Na <sup>+</sup>	: Sodyum iyonu
NaOAc	: Sodyum asetat
OHC	: Dış tüy hücresi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	: Fenilalanin
Pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
Ser	: Serin
sn	: Saniye
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	: Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
T	: Timin
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
TE	: Tris EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
Term	: Terminasyon
Thr	: Treonin
Tyr	: Tirozin

## 1. GİRİŞ

İşitme kaybı dünyada sık görülen duyuşal bir bozukluktur. Doğuştan veya çocukluk döneminde meydana gelen işitme kayıpları kişilerin eğitim ve çevresiyle olan iletişimde zorluklara yol açarken erişkin dönemde başlayan işitme kayıpları toplumdan soyutlanmalarına neden olarak yaşam standartlarını düşürmektedir. Yere ve zamana göre farklılık göstermesine rağmen doğuştan işitme kaybı yaklaşık 1000 canlı doğumda bir görülmektedir (Nance 2003).

İşitme kaybına birçok çevresel ve genetik faktör sebep olabilmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kaybıdır (Nance 2003). Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini otozomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır.

Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının önemli bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır (Kelsell vd 1997). *GJB2* geni dışında bugüne kadar otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı yapan 30 gen tanımlanmıştır. Bu nedenle işitme kaybı olan bir ailede sorumlu genetik değişikliğin saptanması oldukça zordur. Bu genlerden bir tanesi olan *MYO15A* 1998 yılında bulunmuştur (Wang vd 1998). Ancak çok büyük bir gen olduğu için farklı toplumlarda işitme kaybının ne kadarından sorumlu olduğu büyük ölçüde bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, *MYO15A* geninde mutasyon olduğu düşünölen ailelerde mutasyon taraması yapılarak Türk toplumunda sık görölen mutasyonların araştırılmasıdır. Böylece daha sonraki çalışmalarda mutasyon analizi yapılırken bu değişikliklerin öncelikle taranarak hem zaman hem de maliyet açısından fayda sağlanması amaçlanmıştır.

## 1.1 GENEL BİLGİLER

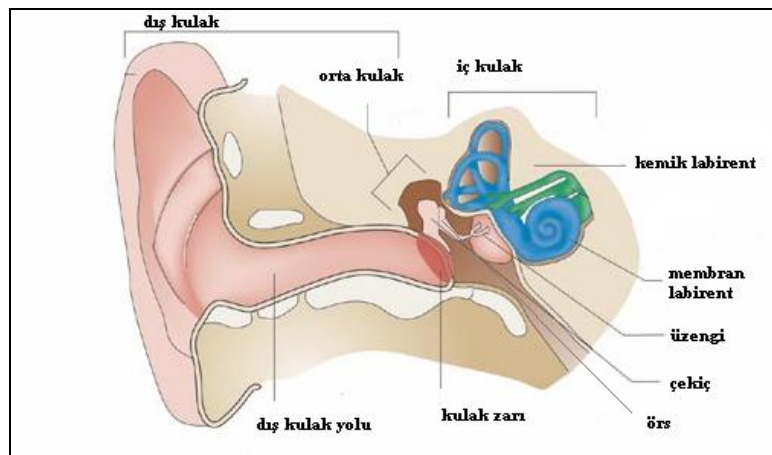
### 1.1.1 İşitme Mekanizması

İşitme ve denge işlevlerinden sorumlu olan kulak üç bölümden oluşmaktadır. Yapı ve görev bakımından ayrı olan bu bölümler dış kulak, orta kulak ve iç kulaştır (Şekil 1.1)

Dış kulak; kulak kepçesi (aurikula) ve dış işitsel kanaldan oluşur. Kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgaları işitme kanalından geçerek dış işitme kanalı ile kulak zarına (timpanik zar) iletilir. Kulak zarı, ses dalgalarını değiştirmeden hava ile dolu orta kulağa iletir.

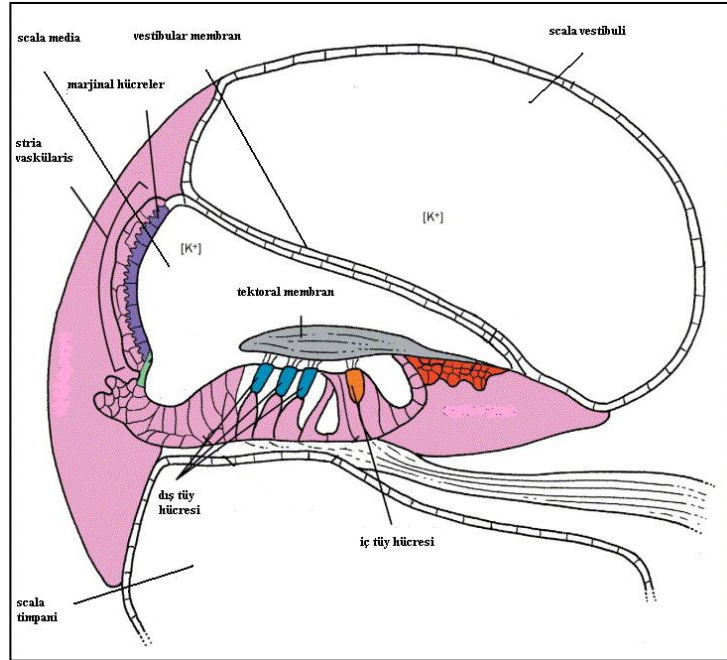
Orta kulak; çekiç (malleus), örs (inkus), özengi (stapes) adı verilen üç hareketli işitme kemikçığinden oluşur. İçi hava dolu olan bu yapı kulak zarından gelen titreşimleri toplayıp iç kulağın oval penceresine iletir (Petit vd 2001).

İç kulak; kohlea ve denge organı olan vestibülden oluşur. Kulak zarında meydana gelen ses titreşimleri özengi kemiğinin tabanına iletilir. Oval pencere bu sayede içe, dışa doğru hareketler oluşturur. Böylece kulak zarı ve kemikleri havadaki titreşimleri iç kulağın sıvı ortamına taşır.



Şekil 1.1. Kulağın Anatomik Yapısı (Kelley 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

Temporal kemiğin içine gömülmüş olan iç kulak; membran (zar) ve kemik labirent adı verilen içi sıvı dolu iki yapıdan oluşmuştur. Membran labirent içi endolenf ile dolu alandır. Kemik labirent ve membran labirent arasında kalan dar alan perilenf ile doludur. Kemik labirent; kohlea, yarım daire kanalları ve bu kanalların yapısında bulunan utrikul ve sakkulu içeren vestibül aygıtından oluşmuştur. Kohlea 35 mm boyunda kıvrım yapan sarmal bir tüptür. Bağ dokusundan oluşan bazillar membran ve ince zar şeklinde Reissner membran kohleayı uzunluğu boyunca üç bölüme ayırmaktadır. Ortadaki bölüm scala media adını alır ve işitme reseptörü olan Corti organını taşır. Scala media'nın bir tarafında scala timpani diğer tarafında scala vestibuli bulunur. Scala media endolenf, scala vestibuli ve scala timpani perilenfle doludur. Endolenf ve perilenfin iyonik kompozisyonları birbirinden farklıdır. Endolenf yüksek  $K^+$  (150 mM), düşük  $Na^+$  (1 mM) ve çok az miktarda  $Ca^{++}$  (0,02 mM) iyon konsantrasyonuna sahipken perilenf plazmaya benzer şekilde düşük  $K^+$  (3,5 mM), yüksek  $Na^+$  (140 mM) ve endolenften daha yüksek bir  $Ca^{++}$  (1 mM) iyon konsantrasyonuna sahiptir (Petit vd 2001). Endolenfin perilenften farklı olan iyon konsantrasyonu kohlear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskularisin marginal hücreleri tarafından sağlanmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. İç Kulağın Yapısı (Tekin vd 2001'den değiştirilerek alınmıştır).

Kohlea'da işitmeden sorumlu yapı, bazal membran üzerinde bulunan Corti organıdır. Corti organı işitme sisteminin en önemli elemanıdır ve reseptörlere sahip tüy hücreleri içermektedir. Bu tüy hücreleri iki tip olup, iç tüy hücresi (IHC) ve dış tüy hücresi (OHC) olarak adlandırılır (Petit vd 2001). Tüy hücreleri mekanik uyarıların elektriksel uyarılara dönüşümüne neden olurlar. Bir sıra halinde bulunan iç tüy hücreleri akustik sinire ve işitme korteksine sinyaller ileten reseptör hücrelerdir. Üç sıra halinde bulunan dış tüy hücreleri hem sensorinöral elemanlarına hem de alınan sesleri arttırarak işitmenin hassasiyetine ve frekans seçiciliğine katkıda bulunan motor elemanlarına sahiptir. Dış tüy hücreleri akustik olarak uyarıldıklarında uzayıp bükülme özelliğine sahiptirler. Tüy hücrelerinin tepe uçlarında stereosil denen ve birbirlerine uç bağlantıları ile bağlı olan çıkıntılar bulunmaktadır. Her bir stereosil plazma membranı ile kaplı aktin filamentlerinin hücrenin dışına doğru uzanan uzantısı şeklindedir. Tüy hücreleri kollajence zengin olan tektorial membran ile korunmaktadır (Dror ve Avraham 2009).

Ses dalgalarının mekanik etkisi perilemf içindeki sıvının dalgalanmasına neden olur. Bu hareket titreşimlere yol açar ve stereosiller bükülür. Stereosillerin tepe uçlarında bulunan harekete duyarlı (mekanosensitiv) katyon kanalları açılır böylece  $K^+$  iyonu endolenften hücre içine girer ve hücrelerin depolarizasyonuna neden olur. Bu durum bazolateral kısımdaki  $Ca^{++}$  kanallarını aktive eder.  $Ca^{++}$  iyonları akustik siniri aktive eden nörotransmitterlerin salınımını tetikler. Bu sayede mekanik enerji kohlear sinire aktarılan elektrik enerjisine dönüşmüş olur (Willems 2000).

Normal işitmenin devamı için; tüy hücrelerine giriş yapan ve aksiyon potansiyeli oluşturan  $K^+$  iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Hücrede  $Ca^{++}$  iyonu miktarının artması  $Ca^{++}$  iyonuna duyarlı  $K^+$  iyonu geçiş yollarını açar ve  $K^+$  iyonlarının hücreden dışarı çıkmalarını sağlar (Noyan 1999). Bu sırada  $K^+$  iyonları ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmındaki kanalı geçer. Burada iyonlar hücreler arası kanalları (gap junction) kullanarak hücreler içinde yol alır.  $K^+$  iyonları stria vaskularise ulaştınca voltaj kapaklı potasyum kanallarından geçerek endolenfe geri pompalanır (Tekin vd 2001).

### 1.1.2 İşitme Kaybının Sınıflandırılması

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).

İşitme sistemi içinde herhangi bir sorun işitme kaybına yol açar. İşitme kaybının etkisi şiddetine ve yaşa bağlı olarak değişir.

İşitme kaybı 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 2001, Bitner-Glindzicz vd 2002). Genetik nedenli işitme kayıpları ise işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'nı oluşturmaktadır.

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. Sensorinöral tip işitme kaybı; iç kulak, duyu sinirleri ve merkezi sinir sistemindeki hasarlar sonucu meydana gelen işitme kaybıdır. Her iki tipin de görüldüğü olgular ise karışık tip işitme kaybı olarak adlandırılır (Petit vd 2001, Tekin vd 2001).

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

1. Hafif işitme kaybı, 26-40dBHL (fısıltı duyamazlar)
2. Orta dereceli işitme kaybı, 41-55 dBHL (karşılıklı konuşmaları duyamazlar)
3. Orta-ileri dereceli işitme kaybı, 56-70 dBHL

4. Şiddetli işitme kaybı, 71-90 dBHL (bağırtıları duyamazlar)
5. Çok ileri işitme kaybı, >90 dBHL (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.

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 (*GJB2*, *GJB6*, *MYO7A*, *MYO6*, *TMCI*, *TECTA*) (Finsterer ve Fellingner 2005).

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

### **1.1.3. Sendromik İşitme Kaybı**

İşitme kaybına sinir, böbrek, iskelet, göz, pigment anomalileri gibi başka klinik anomalilerin de eşlik etmesi sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. 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. Bu sendromlar arasında; Pendred Sendromu, Usher Sendromu, Waardenburg Sendromu, Brankio-Oto-Renal Sendrom (BOR), Biotinidaz



eksikliği, Alport Sendromu, Tracher-Collins Sendromu, Stapes fiksasyonu, Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu sayılabilir (Tekin vd 2002, Nance 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 nöropati (LHON) si sayılabilir (Kokotas vd 2007, Petersen ve Willems 2007).

#### **1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı**

Sendromik olmayan işitme kaybına; kulak ve vestibuler sistem hastalıkları dışında başka klinik veya laboratuvar bulgusu eşlik etmemektedir. Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen lokusları “DFN” şeklinde gösterilmektedir. 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. Bu genler arasında *TECTA*, *GJB2*, *GJB6*, *TMC1*, *MYO6* sayılabilir (Petersen ve Willems 2006).

Bazı genlerdeki mutasyonlar hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına neden olabilirler. 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).

İç kulağın anatomik yapısının karmaşık olması ve işitme mekanizmasında bir çok proteinin görev alması nedeni ile işitme kaybına neden olan genler oldukça fazladır. Bugüne kadar *GJB2* dışında 21 tane otozomal dominant, 30 tane otozomal resesif ve 1 tane X'e bağlı

kalıtılan genlerdeki mutasyonların sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir (Dror ve Avraham 2009) (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı işitme kaybı yapan genler (webhost.ua.ac.be/hhh/).

Lokus	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli	Referans
Yok	CRYM		Otozomal dominant	(Abe 2003)
DFNA1	DIAPH1	5q31	Otozomal dominant	(Lynch 1997)
DFNA2	GJB3 (Cx31)	1p34	Otozomal dominant	(Xia 1998)
DFNA2	KCNQ1	1p34	Otozomal dominant	(Kubisch 1999)
DFNA3	GJB2(Cx26)	13q12	Otozomal dominant	(Kelsell 1997)
DFNA3	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal dominant	(Grifa 1999)
DFNA4	MYH14	19q13	Otozomal dominant	(Donaudy 2004)
DFNA5	DFNA5	7p15	Otozomal dominant	(Van Laer 1998)
DFNA6/14	WFS1	4p16.3	Otozomal dominant	(Bespalova 2001; Young 2001).
DFNA8/12	TECTA	11q22-24	Otozomal dominant	(Verhoeven 1998)
DFNA9	COCH	14q12-q13	Otozomal dominant	(Robertson 1998)
DFNA10	EYA4	6q22-q23	Otozomal dominant	(Wayne 2001)
DFNA11	MYO7A	11q12.3-q21	Otozomal dominant	(Liu 1997)
DFNA13	COLL11A2	6p21	Otozomal dominant	(McGuirt 1999)
DFNA15	POU3F4	5q31	Otozomal dominant	(Vahava 1998)
DFNA17	MYH9	22q	Otozomal dominant	(Lalwani 2000)
DFNA20/26	ACTG1	17q25	Otozomal dominant	(van Wijk 2003; Zhu 2003)
DFNA22	MYO6	6q13	Otozomal dominant	(Melchionda 2001)
DFNA28	TFCP2L3	8q22	Otozomal dominant	(Peters 2002)
DFNA36	TMC1	9q13-q21	Otozomal dominant	(Kurima 2002)
DFNA39	DSPP	4q21.3	Otozomal dominant	(Xiao 2001)
DFNA48	MYO1A	12q13-q14	Otozomal dominant	(Donaudy 2003)
Yok	PRES (Prestin)	7q21.1	Otozomal resesif	(Liu 2003)
DFNB1	GJB2 (Cx26)	13q11-q12	Otozomal resesif	(Kelsell 1997)
DFNB1	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal resesif	(del Castillo 2002)
DFNB2	MYO7A	11q	Otozomal resesif	(Liu 1997; Weil 1997)
DFNB3	MYO15A	17p11.2	Otozomal resesif	(Wang 1998)
DFNB4	SLC26A4	7q31	Otozomal resesif	(Li 1998)
DFNB5	TMIE	3p21	Otozomal resesif	(Naz 2002)
DFNB7/11	TMC1	9q13-q21	Otozomal resesif	(Kurima 2002)
DFNB8/10	TMPRSS3	21q22.3	Otozomal resesif	(Scott 2001)
DFNB9	OTOA	2p23-p22	Otozomal resesif	(Yasunaga 1999)
DFNB12	CDH23	10q21-q22	Otozomal resesif	(Bork 2001)
DFNB16	STRC	15q15	Otozomal resesif	(Verpy 2001)
DFNB18	USH1C	11p15.1	Otozomal resesif	(Ahmed 2002; Ouyang 2005)
DFNB21	TECTA	11q22-q24	Otozomal resesif	(Mustapha 1999)
DFNB22	OTOA	16p12.2	Otozomal resesif	(Zwaenepoel 2002)
DFNB23	PCDH15	10q21-q22	Otozomal resesif	(Ahmed 2003)
DFNB24	RDX	11q.23	Otozomal resesif	(Khan 2007)
DFNB28	TRIOBP	22q13.1	Otozomal resesif	(Riazuddin 2006; Shahin 2006)
DFNB29	CLDN14	21q22.3	Otozomal resesif	(Wilcox 2001)
DFNB30	MYO3A	10p11.1	Otozomal resesif	(Walsh 2002)
DFNB31	WHRN	9q32-q34	Otozomal resesif	(Mburu 2003)
DFNB35	ESRRB	14q24.3	Otozomal resesif	(Collin 2008)
DFNB36	ESPN	1p36.3-p36.1	Otozomal resesif	(Naz 2004)
DFNB37	MYO6	6q13	Otozomal resesif	(Ahmed 2003)
DFNB49	TRIC	5q12.3-q14.1	Otozomal resesif	(Riazuddin 2006)
DFNB53	COL11A2	6p21.3	Otozomal resesif	(Chen 2005)
DFNB59	PJVK	2q31.1-q31.3	Otozomal resesif	(Delmagnani 2006)
DFNB61	SLC26A5	7q22.1	Otozomal resesif	(Liu 2003)
DFNB63	LRTOMT	11q13.4	Otozomal resesif	(Ahmed 2008)
DFNB67	TMHS	6p21.3	Otozomal resesif	(Shabbir 2006)
DFN3	POU3F4		X'e bağlı	(de Kok 1995)

### 1.1.5 Otozigozite Haritalaması

İlk defa Lander ve Botstein 1987 yılında otozigozite haritalamasına dikkat çekmişler ve akraba evliliklerinde etkilenmiş çocukların bulunduğu ailelerde sorumlu genetik değişikliğin bulunması için güçlü bir yaklaşım olduğunu önermişlerdir.

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. Bu prensibe göre mutasyona uğrayan genin etrafındaki kromozomal bölgenin homozigot olması beklenir ve bu kromozomal bölge otozigot olarak adlandırılmaktadır. Hastalıklara neden olan genlerin tanımlanmasında, aynı soydan gelen etkilenmiş bireylerde homozigot kromozomal bölgeler araştırılabilir. Bu yolla hastalık geninin lokalizasyonu bulunur ve buna homozigozite haritalaması veya otozigozite haritalaması denilmektedir (Lander ve Botstein 1987).

Bu yöntem için uygun ailelerde az sayıda etkilenmiş birey kullanılarak yapılan genom boyunca SNP veya mikrosatellit genotipleme ile sorumlu genetik değişikliklerin hangi kromozom bölgesinde olduğuna yönelinebilir. Çünkü 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 nedenle polimorfik belirteçlerle yapılan taramalar sonucunda heterozigot olan bölgeler dışlanır ve homozigot olarak dağılan bölgelerin ise hastalıkla ilişkili olduğu düşünülebilir.

Bu yöntem ilgilenilen kromozomal bölgeleri ve bölgelerin büyüklüğünü tanımlamak için kullanılır fakat yine de sınırlayıcı olan bazı etkenler bulunmaktadır. Bunlar; anne baba arasındaki akrabalığın derecesi, bilgi verici olan aile bireylerinin sayısı, tahmini doğal rekombinasyon oranıdır. Akraba evliliğinin derecesi düşük olan ailelerde ise hastalıkla ilgili olarak aranan homozigot bölge daha küçük olmaktadır (Gibbs ve Singleton 2009).

### 1.1.6 Miyozin Genleri

Miyozin genleri, mekanik güç sağlayan proteinleri kodlayan geniş bir gen ailesinin üyesidir. Sınıf II (konvansiyonel) miyozinler, iki başlı filament şeklindeki yapıları ile kas kasılımının temelini oluşturarak kas ve kas olmayan hücrelerde ifade edilirler (Sellers 2000, Friedman vd 1999). Sınıf II miyozinlerde uzun bir  $\alpha$ -heliks dizisi bulunmaktadır, bu dizi sayesinde filament yapısı oluşturmak üzere kendisi ile etkileşime girebilmektedir. Diğer sınıflardaki 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).

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).

Miyozinler genel olarak üç fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır:

1. Aktinlerle ilişki kurulması ve ATP bağlanmasında görevli olan 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 baş kısmında ise sayıları farklı olmakla birlikte IQ motifleri bulunmaktadır. Bu motiflere kalmodülün ya da miyozin hafif zincirleri bağlanmaktadır. Miyozinlerin C-terminal bölgesi ise değişkenlik göstermektedir. Bu bölge

filamentlerle ilişki kurma, spesifik membran bölgelerine hedeflenme ya da hücreliletim 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 sonucunda 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).

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).

İnsanda *MYO7A* mutasyonları dominant (DFNA11) ve resesif (DFNB2) sendromik olmayan işitme kaybına neden olmaktadır (Liu vd 1997, Riazuddin vd 2008). Ayrıca yine *MYO7A* geninde mutasyon olduğu zaman resesif kalıtılan, konjenital işitme kaybı ve ilerleyici retinal dejenerasyonlarla karakterize olan Usher sendromu tip 1b görülmektedir. (Weil vd 1995, Weil vd 1997).

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

*MYO1A* geninde mutasyon olduğu zaman 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 iç ve dış tüy hücrelerinde ifade olmaktadır (Walsh vd 2002).

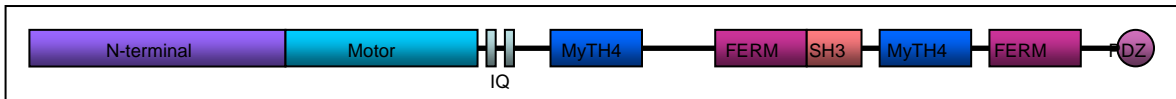
### 1.1.7 MYO15A Geni

*MYO15A* geni tüy hücrelerinde aktin moleküllerinin organizasyonu için gerekli konvansiyonel olmayan Miyozin XVa proteinini kodlar (Friedman vd 1995). Bu gen 17. kromozomun p11.2 bölgesinde DFNB3 lokusunda bulunmaktadır ve 71 kb'lık bir alanda 66 ekzondan oluşmaktadır. En uzun *MYO15A* mRNA transkripti 3,530 amino asit içermekte ve 395 kDa ağırlığında bir protein kodlamaktadır (Nal vd 2007).

Miyozin XVa proteini diğer miyozinler gibi üç bölgeden oluşmaktadır (baş, boyun ve kuyruk bölgeleri). Proteinin baş bölgesi N-terminal ve motor bölgelerinden, boyun kısmı IQ motiflerinden ve kuyuk kısmı da MyTH4, FERM, SH3 ve PDZ bölgelerinden oluşmaktadır (izelge1.2 ve şekil 1.3) (Krendel vd 2005, Belyantseva vd 2005, Shearer vd 2009).

**Çizelge 1.2** *MYO15A* bölgerinin ekzonlara göre lokalizasyonları (Liang vd 1999).

Bölge	Ekzon	Nükleotit	Amino asit
N-terminal bölgesi	2-3	337-4007	1-1223
Motor	3-24	4008-6035	1224-1899
ATP-bağlanma bölgesi	7	4281-4304	1315-1322
Aktin-bağlanma bölgesi	17	5304-5327	1656-1663
IQ motif 1	24	6063-6095	1909-1919
IQ motif 2	24	6132-6164	1932-1942
MyTH4 bölgesi 1	29-31	6534-6860	2066-2174
FERM-benzeri	43-48	8397-8939	2687-2867
MyTH4 bölgesi 2	53-57	9489-9821	3051-3161
FERM	59-65	9987-10829	3217-3497
SH3 bölgesi	49-51	8931-9215	2865-2959



**şekil 1.3.** MiyozinXVa proteininin yapısal bölgeleri.

*MYO15A* geninin ürünü olan protein dizisi diğer miyozinlerde bulunmayan ve N-terminal bölgesinde yer alan 1200 rezidden oluşan bir bölge içerir. Bu kısım 2. ekzon tarafından kodlanır ve korunmuş olan motor bölgesinden nde yer alır. N-terminal bölgede yer alan

bu kısım proteinin fonksiyonu için belli bir motif oluşturmamaktadır (Friedman vd 1999). Miyozin XVa'da yer alan N-terminal bölgeye diğer miyozin sınıflarında rastlanmaması proteinin fonksiyonu için önemli olabileceğini göstermektedir (Liang vd 1999).

N-terminal motor bölgesinde 2 tane hafif zincir bağlayan IQ motifi ve kuyruk bölgesinde de MyTH4 ve FERM-benzeri bölge içermektedir. Bu bölgeler çeşitli motor proteinlerinde de bulunmaktadır ve fonksiyonel olarak benzer moleküllerle etkileşime girdikleri düşünülmektedir. Bu güne kadar MyTH4 bölgesine yalnızca miyozinlerde ve kinesin-benzeri motor proteinlerde rastlanmıştır. FERM bölgesi ise hücre iskeleti ve plazma membranında yer alan bir çok farklı grup proteinde bulunmaktadır ve fonksiyonel olarak integral membran proteinlerine bağlanmada görev yaptığı düşünülmektedir (Liang vd 1999, Liburd vd 2001).

SH3 bölgesi ise proteinin kuyruk kısmında yer almaktadır. Bu bölge proteinin prolince zengin dizilere bağlanmasında görev yapmaktadır. Ayrıca SH3 bölgesi sınıf IV, sınıf VII ve bazı sınıf I miyozinlerde de görülmektedir (Liang vd 1999).

Belyantseva vd. (2005) miyozin XVa'nın C-terminal kısmında yer alan PDZ bölgesinin Whirlin'in üçüncü PDZ bölgesi ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Whirlin çoklu-PDZ bölgesi içeren bir moleküldür ve miyozin XVa tarafından stereosillerin uç kısmına taşınmaktadır, böylece stereosillerin uzaması ve yapısının oluşturulması sağlanmaktadır (Lezirovitz vd 2008).

İn situ hibridizasyon yapılarak fare iç kulağında *Myo15*'in kohlea, saccule, utricule ve crista ampularisin nörosensori epitelyal bölgelerinde ekprese olduğu gösterilmiştir (Liang vd 1999).

Miyozin XVa'nın iç kulaktaki rolü, shaker-2 ve mutant shaker-2 farelerden elde edilen dokuların elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda ortaya konmuştur. Shaker-2 farelerde DFNB3 lokusunun bulunduğu bölgede 11. kromozom üzerinde *MYO15A* geninin ortoloğu yer almaktadır (Friedman vd 1999). Transgenik olarak elde edilen ve mutant olan farelerin sese yanıt vermedikleri gösterilmiştir (Probst vd 1998).

Mutant farelerden alınan doku örneklerinde tüy hücrelerinin bulunduğu ve dizilimlerinin normal olduğu fakat hem dış hem de iç tüy hücrelerinin stereosillerinin uzunluğunun normalin ancak 1/10'u kadar olduğu gözlenmiştir (Friedman vd 1999, Liang vd 1999,

Probst vd 1998). Stereosiller sesin fiziksel uyarısının kohleadan elektriksel uyarılara taşınmasında ve buradan da işitsel sinirlerin uyarılmasında görev alırlar. Sese tepki verildiği zaman stereosil kümelerinin mekanik bükülmeleri stereosiller üzerindeki iyon kanallarının açılıp ya da kapanmaları ile olmaktadır böylece bir elektriksel uyarı oluşur ve santral sinir sistemine iletilir (Liang vd 1999). Shaker-2 farelerde gözlenen çok kısa stereosiller, işitme probleminin nedenini ortaya koymakta ve miyozin XVa'nın tüy hücrelerindeki stereosil hücre iskeletinin yapımında ve/veya korunmasında rolü olduğunu düşündürmektedir (Anderson vd 2000, Wang vd 1998, Liang vd 1999).

*MYO15A* geninin iki alternatif kırılma transkripti ekzon 2'nin varlığı (sınıf 1 izoformu) veya yokluğuyla (sınıf 2 izoformu) ayırt edilmektedir. Nal vd. (2007)'lerinin yapmış olduğu çalışmada insanda normal işitmenin gerçekleşebilmesi için sınıf 1 izoformunun gerekli olduğu gösterilmiştir. Fare iç kulağında, miyozin XVa sınıf 1 izoformunun mRNA'sı tüy hücrelerinde ifade olmaktadır (Liang vd 1999). Ancak sınıf 1 izoformu stereosillerin uzamasında ya da tüy hücrelerinin boşluk kısmının oluşturulmasında gerekli değildir (Belyantseva vd 2005). Shaker-2 farelerinde tüy hücrelerine sınıf 2 izoformu transfekte edildiğinde anormal şekilde kısa olan stereosillerin yeniden uzadığı ve tüy hücrelerindeki boşluğun yabancıl tipe benzer şekilde oluştuğu görülmektedir (Belyantseva vd 2005). Sınıf 1 izoformunun olmadığı durumlarda fonksiyonel anormallikler ya da hemen göze çarpmayan yapısal sapmalar oluşabilmektedir. Hem sınıf 1 hem de sınıf 2 izoformunun motor bölgesinde yanlış anlamlı mutasyon olduğu zaman miyozin XVa proteini bozulur ve Shaker-2 farelerde kısa stereosiller meydana gelir bu nedenle normal bir şekilde iletim yapılamamaktadır (Stepanyan ve Frolenkov 2006). Bu verilere göre her iki izoform da işitmenin normal gerçekleştirilebilmesi için gerekli bileşenlerdir (Nal vd 2007).

*MYO15A* mutasyonları konjenital otozomal resesif derin işitme kaybına neden olmaktadır (Friedman vd 1995). İnsanda ve farede işitme kaybı ile ilişkili *MYO15A* geninden başka iki konvansiyonel olmayan miyozin geni daha gösterilmiştir. Myo6 (miyozin VI) ve Myo7a (miyozin VIIa)'daki mutasyonlar Snell's waltzer ve shaker-1 farelerinde işitme kaybı ve vestibular hasarlara neden olmaktadır (Avraham vd 1997, Liang vd 1999).

İnsanlarda *MYO15A* geninde mutasyon olduğu zaman işitme kaybı dışında başka bir anomali görülmemektedir fakat mutant shaker-2 farelerde başlarını sallama, kendi etraflarında dönmek gibi vestibular hasarlar gözlenmiştir (Probst vd 1998).



Friedman vd. (1995) Endonezya'da izole bir köyde yaşayan Bengkala yerlilerinde %2 oranında doğuştan sendromik olmayan işitme kaybı olduğunu ve bu işitme kaybına DFNB3 lokusunda otozomal resesif bir mutasyonun neden olduğunu göstermişlerdir. Bu izole köyde yaşayan ve işitme kaybı olan bireylerde vestibular anomaliler ve dismorfik özellikler görülmemektedir (Friedman vd 1995). Yine aynı köyde yaşayan bireylerde yapılan çalışmalar sonucunda *MYO15A* geninde homozigot mutasyon olduğu saptanmıştır (Wang vd 1998).

## **1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER**

### **1.2.1. Mikrodizin Analizi**

Mikrodizin teknolojisi, oligonükleotidlerin veya cDNA parçalarının yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkmıştır. Temeli Northern ve Southern Blot tekniklerine dayanmaktadır. Yöntemin temelini baz eşleşmesi yani hibridizasyon oluşturmaktadır. Tek zincirli işaretlenmiş DNA molekülü çipin üzerindeki oligonükleotidlere bağlanmakta ve cihazdaki okuma işlemi sırasında ışınım yapılmaktadır. Bu ışınım değerlendirilerek örneğin genotiplendirilmesi yapılmaktadır.

Mikrodizin teknolojisi, çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimi izlemek, polimorfizm analizi, mutasyon analizi, evolüsyonel çalışmalar ve sekanslamada kullanılabilir. Bunların yanı sıra potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmelerinde mikroarraylerden yararlanılabilmektedir.

Oligoçipler 20-80 bp uzunluğundaki oligonükleotidlerin önce sentezlenip sonra çip yüzeyine sabitlenmesi veya doğrudan çip üzerinde sentezlenmesi (fotolitografi) ile üretilir. Affimetrix firması tarafından genom boyunca SNP taraması yapmak için Mapping 10K 2.0 Array, Mapping 100K Array, Mapping 500K Array, Genome-Wide Human SNP Array 5.0 ve Genome-Wide Human SNP Array 6.0 çipleri geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde genom boyunca 906.600 SNP tarama imkanı sağlanmıştır.

### 1.2.2. 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 uzaması (polimerizasyon)'dur. 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).

Oligoprimerlerin 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).

### **1.2.3. Mikrosatellit Analizi**

Restriksiyon enzimleri, DNA'daki dizileri özgül olarak tanırlar. Bir restriksiyon enziminin tanıma bölgesindeki kayıp ya da kazançtan dolayı RFLP'ler yer polimorfizmi adını da almaktadır. Genellikle iki alternatif parça uzunluğuna sahiptir ve bu polimorfizmler tekrarlayan dizi sayısının büyüklüğüne göre mikrosatellitler ve minisatellitler olarak iki grup altında toplanır.

Minisatellitler 10-100 bç uzunluğundaki DNA dizilerinin çoklu kopyalarının ardı ardına olacak şekilde iki restriksiyon bölgesi arasındaki DNA'ya insersiyonu, bir özgül sınıf polimorfizmi meydana getirir. RFLP'nin bu sınıfı VNTR polimorfizmi olarak bilinir ve birçok allel karakterize edilir.

Mikrosatellitler minisatellit lokuslarından daha sık ve polimorfiklerdir. 2-4 nükleotidlik tekrar dizileri olup DNA'ya yayılmışlardır. Herhangi bir mikrosatellite bulunan tekrar dizilerinin sayısı popülasyondaki bireyler arasında ve bireylerdeki iki homolog kromozom arasında da farklılık gösterebilmektedir. Mikrosatellitler tüm genoma dağılmış olup en sık tekrarlar (A)<sub>n</sub> veya (CA)<sub>n</sub> şeklindedir. Bunlar genellikle DNA'nın intron bölgelerinde bulunurlar ve çok polimorfiktirler. Bir ailede hastalığa sebep olan genin lokalizasyonu, belirlenen kromozomal bölgede var olan mutant bir genin kalıtımının aile bireyleri arasında karşılaştırılması ile elde edilir (Robert L. Nussbaum 2005).

Bu yöntemde bölgeye özgü oligonükleotidler kullanılarak DNA bölgesi PCR ile çoğaltılır. PCR ürünü DNA'nın tek zincir halinde yürümesi için formamid içeren yükleme boyası ile belli bir oranda karıştırılır ve yüksek ısıda (95°C) denatüre edilip, vertikal jel elektroforezinde yürütülür.

Poliakrilamid jel denatüre edici özelliğe sahip olup DNA'nın tek iplik şeklinde yürümesini sağlar. Bu yöntem jelin içerdiği üre ve akrilamid/bisakrilamid oranına bağlı olarak SSCP jelden daha hassastır ve daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Böylece bireyde mikrosatellit bölgelerinin tekrar sayıları rahatlıkla belirlenebilmektedir.

#### **1.2.4. 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 2000).

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 2000).

SSCP tekniği birçoğ öreğe aynı anda mutasyon taramasını yapabilmeyi sağladığı için moleküler teknik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi Şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bç'ni 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 2000).

### **1.2.5. 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 işaretili 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 M 2000). DNA parçacıklarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemi ile bantlar görüntülenir (Akar 1999, Öner 2000).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmiştir (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 parçası elde edilir. Denede, 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 YÖNTEMLER

### 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 sendromik olmayan doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan 104 aile araştırmaya dahil edilmiştir. Bu ailelerin fenotipik/odyolojik özellikleri belirlenmiş ve sendromik bulgulara veya çevresel işitme kaybı nedenlerine rastlanmamıştır. Böylece tüm ailelerde otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı olduğu düşünülmüştür. 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

Çalışmanın desteklendiği proje kapsamında mikrodizin analizi ile anne baba arasında akrabalık olan ve en az iki etkilenmiş bireyde sendromik olmayan doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan 52 aile taranmıştır. Bu ailelerde tüm genom boyunca tek nokta polimorfizmleri genotiplendirilmiştir. İşitme engelli bireylerden elde edilen genotip verilerinde otozigoziteye bağlı, *MYO15A* geninin genomik bölgesini içine alan ve aynı aileden gelen işitme engelli bireylerin paylaştığı homozigot bloklar aranmıştır. Ayrıca yine bu proje kapsamında mikrodizin analizi yapılmayan 52 aileye mikrosatellit belirteçleri ile sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı yaptığı bilinen veya işlevleri nedeniyle işitme kaybı geni olabileceği düşünülen, *MYO15A* geninin de içinde bulunduğu 12 gen (*TMCI*, *MYO3A*, *TECTA*, *OTOF*, *SLC26A4*, *CDH23*, *MYO7A*, *TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*) taranarak bağlantı analizi yapılmış ardından ilgili genlerde mutasyon analizi yapılmıştır. Mikrodizin analizi ile birlikte kalıtım gösteren ve mikrosatellit genotipleriyle

fenotipin birlikte kalıtıldığı gösterilen 10 ailede ilgili gende SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Bu tezin konusunu yalnızca *MYO15A* geni ile ilgili çalışmalar oluşturmaktadır.

### 2.2.1. 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 (Rd 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.

Ertesi gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzamilalkol (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 toplam 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.

### 2.2.2. 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. 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.

Bu işlemin ardından ligasyon işlemine geçilir. 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.

Ardından PCR aşaması gelmektedir. 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.

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).

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

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarından gelen ailelere ait genetik veriler Microsoft Excel programına aktarılmış, SNP'lerin kromozomal ve DNA lokalizasyonlarına göre sıralaması yapılmıştır. Bugüne kadar tanımlanmış 31 otozomal resesif işitme kaybı geninin genomik lokalizasyonu ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) 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.

Yapılan mikrodizin analizi sonuçlarına göre *MYO15A* gen bölgesine bağlantı gösteren 6 (550, 553, 555, 679, 719, 780 nolu aileler) aile saptanmıştır.

### **2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Mikrodizin analizi yapılmayan diğer 52 aileye *MYO15A* geni için geninin çok yakınında bulunan iki mikrosatellit belirteci kullanılmıştır (D17S2196 ve D17S1857). Bu mikrosatellit belirteçleri ile yapılan PCR reaksiyonunda son konsantrasyonu 0,6 pmol olacak şekilde oligonükleotid çiftleri, 10 mM Tris- HCl, 50 mM KCl, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 ünite Taq polimeraz, 15 mM MgCl<sub>2</sub> ve toplam hacmi 25 µL'ye tamamlayacak miktarda ddH<sub>2</sub>O kullanılmıştır.

SSCP sonuçlarına göre mutasyon bulamadığımız iki aileye yukarıda belirtilen koşullarda D17S620, D17S805 ve D17S689 mikrosatellit belirteçleri için uygun primerlerle PCR yapılmıştır.

Kullanılan mikrosatellit belirteçleri “Mammalian Genotyping Service” (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>) veri tabanında kayıtlı bulunmaktadır.

Kullanılan mikrosatellit belirteçlerinin isimleri, dizileri, boyutları, lokalizasyonları ve PCR programları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** *MYO15A* geni için kullanılan mikrosatellit belirteçleri.

Belirtecin Adı	Kromozomal Lokalizasyon	Nükleotid Dizisi	Boyutu (bp)	PCR Programı
D17S2196	17,205,118-17,205,398	F: 5'-CCAACATCTAGAATTAATCAGAATC-3' R: 5'-ATATTTCAATATTGTAACCAGTCCC-3'	139-163	Program 1
D17S1857	16,355,942-16,356,318	F: 5'-TGCACAGGCCAATTCCTTAC-3' R: 5'-TGCCTAAACTGCTTTCAGGTGAG-3'	177-187	Program 2
D17S620	17,520,397-17,520,859	F: 5'-GGGAAGGTGTCTGAAACCCAAGG-3' R: 5'-CCCACCACTACCTATTGTTCTATAC-3'	143-144	Program 1
D17S805	19,216,034-19,416,333	F: 5'-ATCACTTGAACCTGAGGGG-3' R: 5'-AATGAGATACCGATCCATGC-3'	216-228	Program 1
D17S689	20,903,392-20,903,684	F: 5'-TGCACCCAGCAATGGTGTCTTT-3' R: 5'-TCTAGCCTGGGTGACAGAGTGAA-3'	146	Program 1

Program 1; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk, 60°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C’de 1 dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk, 50°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 2; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk, 70°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C’de 1 dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk, 60°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Her ailedeki hasta ve sağlam bireylere PCR yapılarak bölge için homozigot ve heterozigot bireyler belirlenmiştir.

#### **2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı**

Bu çalışma %6’lık poliakrilamid jel kullanılarak yapılmıştır. Jelin yapımında %40’lık 19:1 oranında hazırlanan akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 190 g akrilamid (Merck, Almanya) ve 10 g N,N’-metilen-bis-akrilamidin (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37 °C’de ısıtılarak çözünmesi sağlanmış ve hacim distile su ile 500 µL’ye tamamlanmıştır. Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu için; 54 g Tris

(Amresco, 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.

Mikrosatellit jelinin döküleceği camlar öncelikle distile su ile yıkanıp alkolle temizlenmiştir. Sonra jelin cama yapışmamasını sağlamak için her iki cam bir miktar SigmaCode (Amersham, İsveç) ile silinmiştir. Ardından camlar arasına 0.8 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilerek sabitlenmiştir. 62,49 g üre (Merck, Almanya), 13 mL TBE 5X, 19,5 mL %40 (19:1) akrilamid/bisakrilamid solüsyonu yaklaşık 20 mL distile suda 37 °C'de eritilmiştir. Ardından hacim distile su ile 130 mL'ye tamamlanmış ve jel içeriği 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra 10 dk vakum pompası yardımıyla havası alınmıştır.

Jelin polimerizasyonunu sağlamak amacıyla %25'lik amonyum persülfat (APS) solüsyonu ve TEMED kullanılmıştır. Kullanılan %25'lik Amonyum Persülfat solüsyonu için 2,5 g Amonyum persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 mL'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır. Jel içeriğine 50 µL %25'lik taze hazırlanmış olan Amonyum Persülfat solüsyonu ve 50 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenmiş ve sabitlenen jel düzeneğindeki camlar arasına dökülmüştür. Jel dököldükten sonra 0,8 mm'lik tarak camlar arasına takılarak örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır ve jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra camlar jel elektroforez sistemine (GibcoBRL S2, ABD) yerleştirilmiştir. Sisteme tampon olarak TBE 0,5 X solüsyonu konulmuş ve 80 watta yaklaşık 1 saat ön ısıtma yapılmıştır.

25 µL olan PCR ürünlerine 10 µL denatüre edici özelliğe sahip yükleme boyası eklenerek 95°C'de 8 dk denatüre edilip, jele 3-5 µL yüklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20 mM EDTA, %0,05 Xyelene Cyanol (AppliChem, Almanya), %0,05 Brom-fenol mavisi (Merck, Almanya) içermektedir.

Örnekler 60 watt akım altında, yaklaşık 50 °C'de baz çifti uzunluklarına bağlı olarak 2-6 saat yürütölüp elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

### **2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama**

Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. 1. solüsyon %0,15 oranında gümüş nitrat (Merck, Almanya) içermektedir. Bu solüsyon için %1'lik stok gümüşten 150 mL alınarak 900 mL distile su ile karıştırılır. Jel yürüme işlemi bittikten sonra camlardan

ayrılarak bu solüsyonda yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Ardından gümüş solüsyonundan iyice temizlenmesi amacıyla jel distile sudan geçirilip, 2. solüsyona tabi tutulmuştur. Bu solüsyon 150 mL %15'lik NaOH (Merck, Almanya), 6 mL formaldehit ve 1350 mL distile su kullanılarak hazırlanıp, jel bu solüsyonda bantlar görünür hale gelene kadar boyanmıştır. Ardından bu solüsyon dökülerek jel 3. solüsyonda bekletilmiştir. Bu solüsyon, %7,5'lük Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Almanya) stok solüsyonu 10 kez seyreltilmesiyle hazırlanır ve boyama reaksiyonunu durdurmak amacıyla kullanılmaktadır.

Jel sonuçlarına göre D17S2196 ve D17S1857 mikrosatellit belirleyicilerine göre 9 aile (550, 553, 555, 679, 686, 719, 739, 747, 762 nolu aileler) *MYO15A* gen bölgesine bağlantı göstermektedir.

Bu aşamadan sonra *MYO15A* genine bağlantı bulunan ailelere mutasyon analizi yapılmıştır. Bunun için SSCP yöntemi kullanılmıştır.

#### **2.2.6. SSCP için 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'luk, 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; 1g 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 dökülmüştür. 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 formül ile bir sıcaklık değeri (Ts) hesaplanmıştır ve örnek yüklenmeden önce jeller hesaplanan bu sıcaklık derecesine getirilmiştir (Li vd 2003).

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

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 Xyeline Cyanol (AppliChem, Almanya), %0,05 Bromfenol 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 yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

### **2.2.7. SSCP Jeli için 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 *MYO15A* geninin ekzon sayısı, ekzonlara özgü oligonükleotid dizileri, ekzon boyutları, Ts değerleri ve oligonükleotidlerin optimize olduğu PCR koşulları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu genlerdeki bant farklılığına sahip bireyler DNA dizi analizi ile taranmıştır.

**Çizelge 2.2. MYO15A** geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.

Ekzon	İleri	Geri	PCR programı	PCR ürünü (bp)	Ts
1	TTTTGAGATGGATGCAGCAG	CATCACACCCTCACAGATG	Program 1	496	28.89
2A	TCCCCATCCTGGTAAACAAC	TGAGCTTTGACGTGGACTTG	Program 1	526	26.75
2B	TTCTGGGGCCTCCACACC	AGCCCGTACAGCGACTTG	Program 1	500	32.93
2C	CTGGGCTTCTGCCTTC	TAGGGGACGGTGTAGTGGAC	Program 1	533	33.59
2D	CCCATACCACACTCCCTACG	AGCTCCTCCTGTCTCTTTC	Program 1	483	32.87
2E	GCCCCATCGTCTGAGGAG	CCAAGGGTGAGCAGTAGCC	Program 1	506	52.65
2F	GGAGGCGAGCTTGGTCAC	CACAGTCCAGGGCGTCTC	Program 1	470	48.24
2G	ACCTCCAAGGATGTCACTC	ACCTCCGTGTAATCTGTGC	Program 1	539	32.05
3	TGAGGGTATGCGTGTGTCTC	GGTGGGGCTAGGATTTGAAC	Program 1	485	27.12
4	TGGTTGGTGTGAGAAACAGG	CAGCTGCCTTCTGACCTA	Program 1	242	24.29
5	ATCTGTCCGGATGGAACAG	CTGCCTTAAGCTCCCACAC	Program 1	519	26.09
6	CTGTCTTCAGACCAGGATG	GAGTGAGCTCAACCTTTCG	Program 1	423	24.68
7	GTTGGCCACCGTACATATC	TGGGAGAGATGGGATGACTC	Program 1	501	27.35
8	ACAGACTGGGGTGTGAGAGG	GTCTGGGTCTGTGGTCTGG	Program 1	237	19.14
9	AAGGCTCATGTCTGGGTGTC	GGCCAGGCTCTGAGTATCTG	Program 1	462	31.28
10	AAGGGTATGGGACAGTG	GGCCAGGCTCTGAGTATCTG	Program 1	266	30.55
11	GCTCAGCCATCAAGAAGCTC	AAACTCACCTCCCAAATC	Program 1	599	27.33
12	AGGCCACCACACTACTGGTC	GAAACAGAGAAGGCTTTGGA	Program 1	333	30.52
13	GACTACTGGCATGAGCCACA	CACTGACCGTCAACGATT	Program 1	516	27.67
14	ATGCTACTCAAGGGTGTGTC	CATACAAGACCTTGGCGATG	Program 1	202	31.98
15	GATCTTCACGCCCTAACTG	ACAAGGGAGATGGTGACAGG	Program 1	403	36.83
16	GCTGAGTCCAGCTTTTTGA	CTCTGAGCACAGCACCTCAG	Program 1	396	21.08
17	ACAGGGTATGGGAGGTTGAG	TGAGGACATGAGGCTGAGAG	Program 1	235	27.15
18	GAGCAGTCGGGGATAGTGAG	GCATGGAATCCTAGCCTGAG	Program 1	562	24.49
19	TGGGGACCATAGAAGTGAGG	GAACAGGCTGGCAAGAAGC	Program 1	540	35.46
20	CAGAGAGAACAGGGGTCCAG	AGGCCTCAGCTCTCACTCAC	Program 1	466	33.61
21	TGGTGGAAAAGATGGAGAGG	TTGGGCAGGGATTTGTAGAG	Program 1	543	26.85
22	TGGTGGAAAAGATGGAGAGG	GCCTGGGTGTGTATTCTCTG	Program 1	576	27.14
23	ACTAATTTGGGCCCTTAC	CTGGGATGGCAGTCTTAGC	Program 1	239	24.87
24	CCAGCATCCTCTCTTCAACC	GGGCATCAAAAAGCAGAGAC	Program 1	506	31.33
25	ACCCAAAAGTGAGATGTGG	TGGTGGCTAGTTTGATGAC	Program 1	556	25.82
26-27	TCCAGAAAATCCTCCTTGTG	TGTGGAAGAGGAGGGAATG	Program 1	637	36.51
28	CCTTAGGAGCTGAGCAAGC	GGCTCTCAGCTGATCCAG	Program 1	474	28.57
29	GTCAGCCAGCTCTGATTTT	GCCAGGGGCTAAGAATTAGAA	Program 1	374	33.38
30	CATGAGAGGGATGCATGTTG	CCTTAAAGACCTGCCTTGG	Program 1	395	25.55
31	GGGACCCTTTCAGTTTAGCC	CCCACACACAGACTTTCAGC	Program 1	599	30.88
32	GCTCTGCGTGAAAGTCTGTG	CATGCACAGGAATGGAAATG	Program 1	422	25.02
33	CAGGATCTCCCAGGTAGTG	ACATGTCTCATCCGAGTCC	Program 1	561	24.14
34	CACTGAATACCAGGGTGCAG	ACAGCACAGGGTCAAAGAGG	Program 1	537	21.28
35	GGAGCCTTAGAGGCTGTGTG	CTTCCAGATCAGCCAAGAG	Program 1	369	22.53
36	GATCTCAGGAGACCCTCAG	TCTAGCACACCAGCAAGTGG	Program 1	530	25.11
37-38	TTGTGGTGTGCTAGAATGG	TGTGGAGAACAGGAGCTGAG	Program 1	516	31.01
39	TTGCTTGGAGACACAAGCTG	AGCGTAGAGTACCGGACCAG	Program 1	486	34.29
40	TCACGTCCTGTCTTCCACAG	CGCTTCAACCCAGTAAGCTG	Program 1	525	36.36
41	GGACTTCAGGCCAGTCTCTG	CACTCCACCGACACACTCAC	Program 1	570	20.02
42	AGTACTCCAATGCCACAGG	CACTCCACCGACACACTCAC	Program 1	442	23.69
43	AGGTGCTTCTCTCTGACT	CCCAAGCTTCAAGCCCTCT	Program 1	248	30.07
44	GCCTCATCAATCCCAACTTC	CTCTGGGCCATGTCTAGCTC	Program 1	588	25.09
45	GAGCTAGACATGGCCCAGAG	GCTTGTGAGCCTCAGTCTCC	Program 1	445	23.26
46	GGGAGACTGAGGCTGACAAG	ACGTGGGACACAGTAGGAG	Program 1	534	31.56
47	GTCCAGAGGATTCAGGGATG	AGCTGCATCAGGATTTGGTC	Program 1	487	25.56
48	AGGGGAAGCAGGAAGCTTAG	TGGCAAAGGTTTCTGAAGG	Program 1	486	25.12
49	CCTAGGGCAGGTCATCTCTG	CCAGGTACACCACCTTCTCTG	Program 1	533	30.46
50	GAATGCCCTCCCTCTTCTC	ACGGCTGGACCTTAGGAGAC	Program 1	551	30.71
51	TCCTGTTTGCCTCAGACCTT	ATCCTTCCCTACCCATTTG	Program 1	442	28.83
52	TTGCGTTGTCAAGTTTGACC	TGTCCTCAAGTTCTGGAC	Program 1	535	30.19
53	AGAGACCACCCAGGTGTGAG	CTGTCCCTGAGTTTCGATGAG	Program 1	563	30.64
54	ACCTTGAGGACATGCTTTG	TGAAGATCAGGGAGGAGTGG	Program 1	471	33.24
55	GTCCCTTTCTGTCTGACG	TTCCCAACCCTAATGTCCTG	Program 1	559	29.01
56	CCTTCTCTGCTGTGGTTC	ATAATCCAGGAGGGTCCAGG	Program 1	413	27.22
57	GCTGCTGAGAGTTGGAATC	CCCACCTCCTCTTCTTCC	Program 1	559	24.03
58	TTTCCAGGCGTATAGGTTGC	GCCTCCCATTCATTTGAAC	Program 1	416	23.73
59	ATCCTTTGGCTTGGGAACCT	CCTCAGCCCTTTCACAAAAG	Program 1	497	23.48
60	CTTTGTGAAGAGGGCTGAGG	TCCTCACATTGACATGTCC	Program 1	481	30.13
61	CATAGGACACCCCATTCGAC	AGGGCCTGAATCATGAACAC	Program 1	459	28.24
62	AGCCACATCTACACAAGG	GACAGCCCTTCCAGATAG	Program 1	519	33.37
63	AGGACCTTTTCCCTTCTCT	CATACCCATCTCCATGACC	Program 1	237	27.87
64	AGCCACAGAGAAGCTATGCAG	TATGGCAGCCTAAGCACACA	Program 1	501	30.18
65	TCAGGGCACCAATACCTCTC	ATGCACTGGCCTGGATACTC	Program 1	544	25.65
66	TGATGGTTCACCTATCTC	TCCTGAGAGGTTCAAGTATT	Program 1	288	29.05

Program 1; 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 1dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk, 55°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

### **2.2.8. DNA Dizi Analizi**

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. BULGULAR**

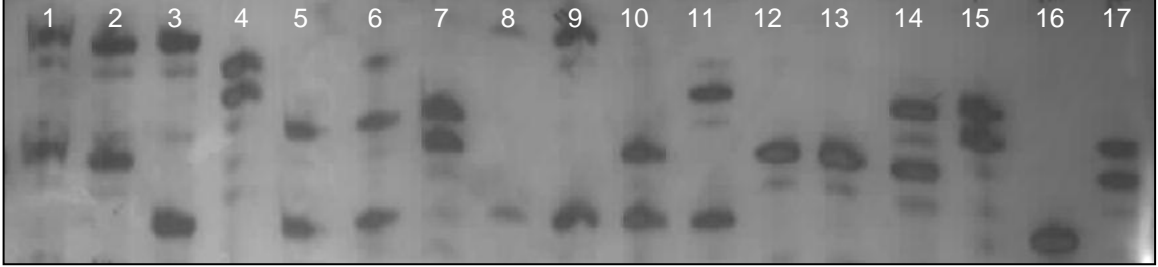
#### **3.1. Otozigozite Haritalaması**

Çalışmaya alınan ailelerden 6 tanesinde *MYO15A* genindeki mutasyonların sorumlu olabileceği mikrodizin analizleriyle tahmin edilmiştir. Yapılan mikrodizin analizi sonuçlarına göre 550, 553, 555, 679, 719, 780 numaralı ailelerde *MYO15A* genini içine alan bölgede homozigot bloklar tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

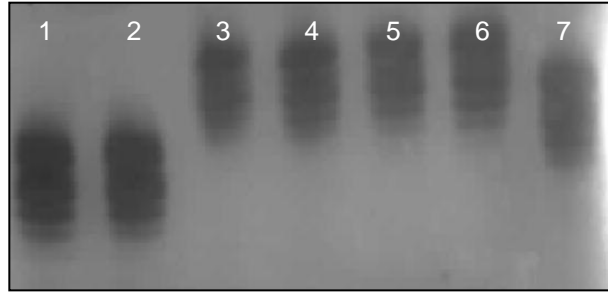
**Çizelge 3.1.** 550, 553, 555, 679, 719, 780 numaralı ailelerde *MYO15A* geninin olduğu bölgenin 10K mikrodizin analizi.

SNP ID	Physical Position	dbSNP ID	550-107	550-105	550-101	550-102	550-104	553-502	553-505	555-205	555-206	679-102	679-103	719-101	719-102	719-104	719-311	719-401	780-101	780-102	780-403	780-404	780-501
SNP_A-1514461	14304430	rs2022251	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	AB	AA	AA	AA	BB	AB	AA	AA	AB	AB	AA
SNP_A-1516149	14432937	rs718994	AA	AA	AA	AA	AA	NoCall	NoCall	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NoCall	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1516102	14433113	rs718993	AB	AB	BB	AB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508161	14515369	rs1019156	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1515822	14691500	rs2323499	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518150	15045841	rs1019134	BB	BB	NoCall	NoCall	NoCall	NoCall	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509008	15053487	rs230991	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1513908	15108700	rs55568	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1510069	15186911	rs1380182	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NoCall	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1516803	15237661	rs2323659	BB	BB	AB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1513108	15618609	rs1971159	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1510467	17350285	rs7946	AA	AA	AA	NoCall	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
<b>myo15a</b>	<b>17952745</b>	<b>MYO15A</b>																					
SNP_A-1510679	20147237	rs1373147	AA	AA	NoCall	AA	NoCall	AA	NoCall	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511477	22436842	rs1589464	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1514901	22760245	rs1382048	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514843	22760442	rs1382047	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1517957	22802254	rs1403322	NoCall	BB	NoCall	NoCall	NoCall	BB	NoCall	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1516484	22839015	rs953113	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NoCall	NoCall	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509106	23026451	rs747959	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519570	23092869	rs953527	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1519629	23092917	rs953528	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511117	24488142	rs1388175	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514918	25122345	rs2127001	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518339	25755541	rs719601	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB

D17S2196 ve D17S1857 mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre 9 ailenin (550, 553, 555, 679, 686, 719, 739, 747, 762 numaralı aileler) etkilenmiş bireylerinin aynı alel için homozigot olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



**Şekil 3.1.** *MYO15A* geni için kullanılan D17S1857 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 numaralı bireyler heterozigot; 12, 13, 16 numaralı bireyler homozigot olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.2.** *MYO15A* geni için kullanılan D17S2196 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı bireyler homozigot olarak tespit edilmiştir.

Yapılan mikrodizin ve mikrosatellit analizi sonuçlarına göre, *MYO15A*'yı çevreleyen genotipler ile birlikte kalıtım gösteren toplam 10 ailede mutasyon taraması yapılmıştır.

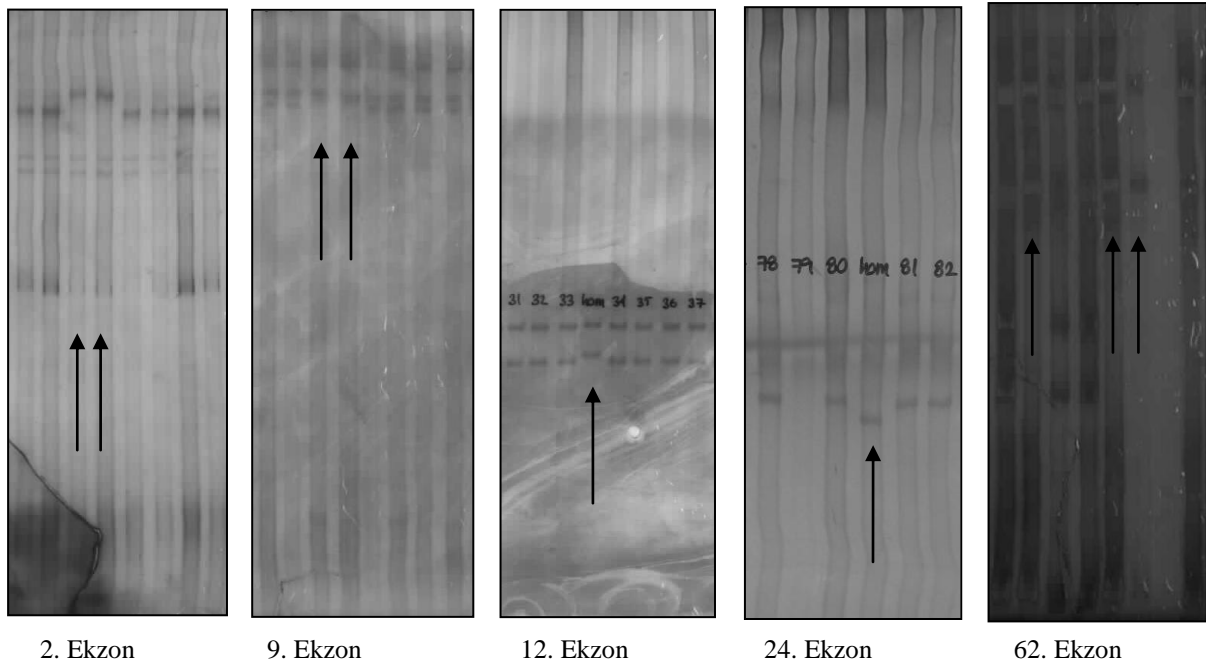
### 3.2. Mutasyon Analizi

Mutasyon analizi yapılan 10 ailenin 8 tanesinde işitme engellilerde beş farklı homozigot mutasyon bulunmuştur (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** *MYO15A* geninde bu çalışmada bulunan mutasyonlar.

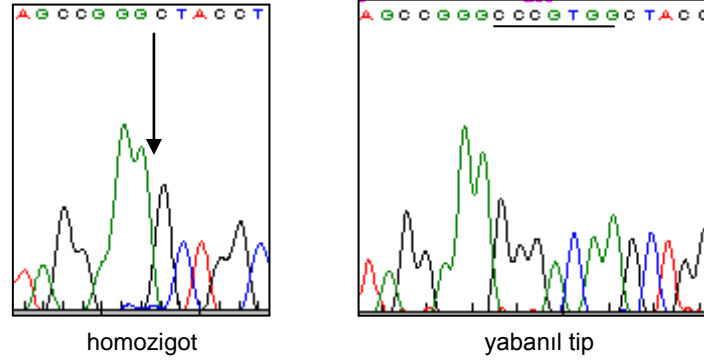
Aile Numarası	Mutasyon	Miyozin-XVa bölgeleri
555	c.867C>G (p.Y289X)	N-terminal domain
739	c.4198G>A (p.V1400M)	Motor domain
686	c.4441T>C (p.S1481P)	Motor domain
679, 747, 762	c.5807_5813delCCCGTGG (p. R1937TfsX10)	Motor domain
553,719	c.10002_10003dupCCGGCCC (p.S3335TfsX119)	FERM domain

*MYO15A* geninde 555 nolu ailede 2. ekzonda, 739 nolu ailede 9. ekzonda, 686 nolu ailede 12. ekzonda, 679, 747, 762 nolu ailelerde 24. ekzonda ve 553 ve 719 nolu ailelerde 62. ekzonda etkilenmiş bireylerde SSCP yöntemiyle bant farklılığı saptanmıştır (Şekil 3.3). Ardından etkilenmiş bireylere genin bu ekzonlarına DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır.



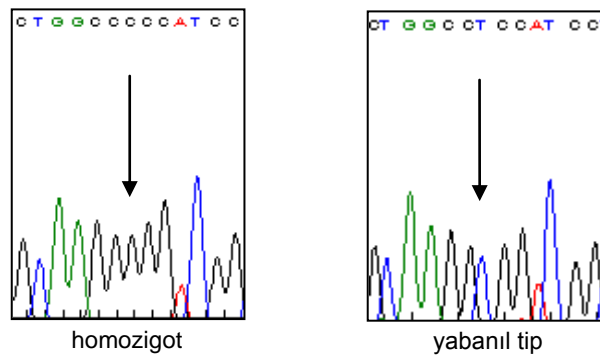
**Şekil 3.3.** *MYO15* geninde bant farklılığı saptanan ekzonların SSCP jel görüntüsü.

Bu gende SSCP ile tarama sonucunda 24. ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireylere (679-101, 747-101) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.5807\_5813delCCCGTGG (p. R1937TfsX10) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Bu mutasyona 82 sağlıklı kontrolde rastlanmamıştır.



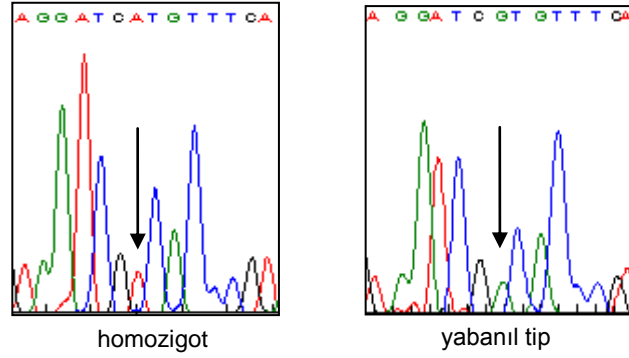
**Şekil 3.4.** *MYO15A* geninin 24. ekzonundaki c.5807\_5813delCCCGTGG (p. R1937TfsX10) değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan yabanıl tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.

Yapılan SSCP taraması sonucunda 12. ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireye (686-101) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.4441T>C (p.S1481P) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Bu mutasyona 95 sağlıklı kontrolde rastlanmamıştır.



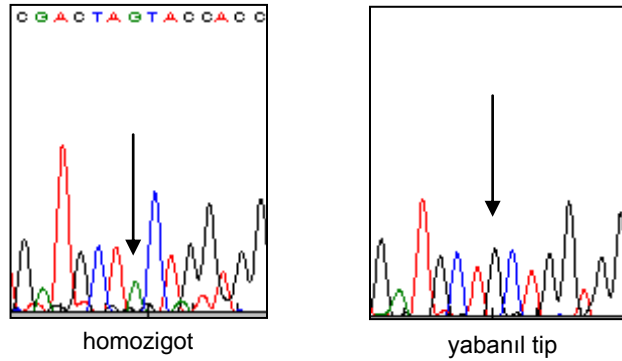
**Şekil 3.5.** *MYO15* geninin 12. ekzonundaki c.4441T>C (p.S1481P) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabanıl tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.

SSCP ile tarama sonucunda 9. ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireylere (739-102) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.4198G>A (p.V1400M) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.6). Bu mutasyona 86 sağlıklı kontrolde rastlanmamıştır.



**Şekil 3.6.** *MYO15* geninin 9. ekzonundaki c.4198G>A (p.V1400M) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabanıl tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.

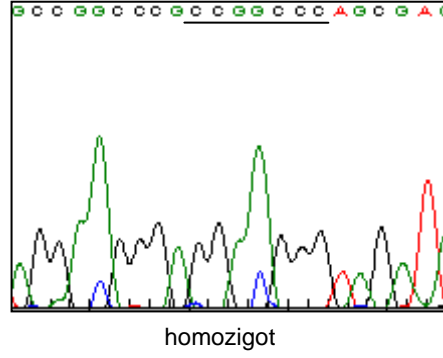
SSCP ile tarama sonucunda 2. ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireylere (555-203, 555-206) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.867C>G (p.Y289X) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.7). Bu mutasyona 142 sağlıklı kontrolde rastlanmamıştır.



**Şekil 3.7.** *MYO15* geninin 2. ekzonundaki c.867C>G (p.Y289X) değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan yabanıl tip ve homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.

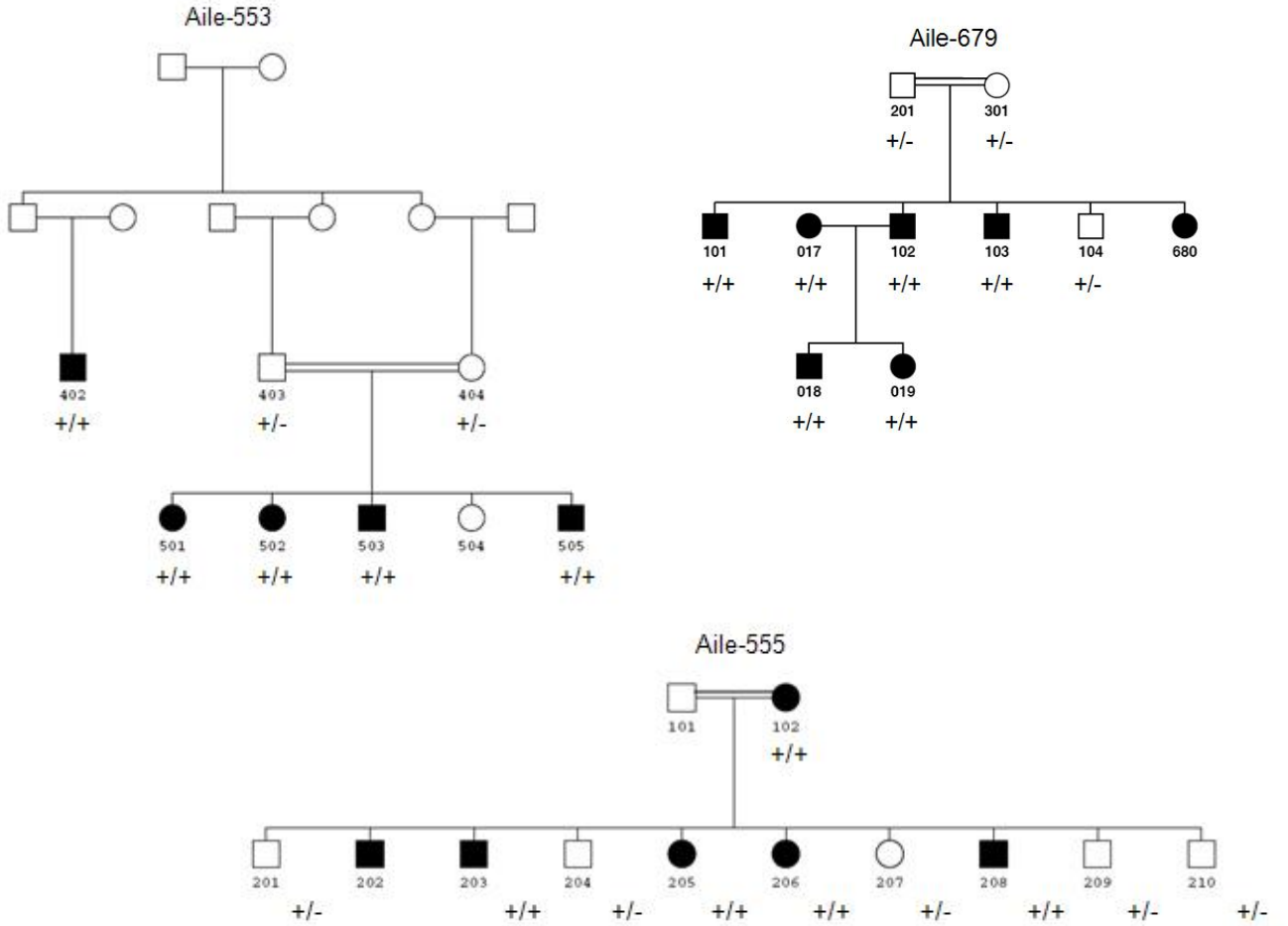
SSCP ile tarama sonucunda 62. ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireylere (553-501) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda c.10002\_10003dupCCGGCCC

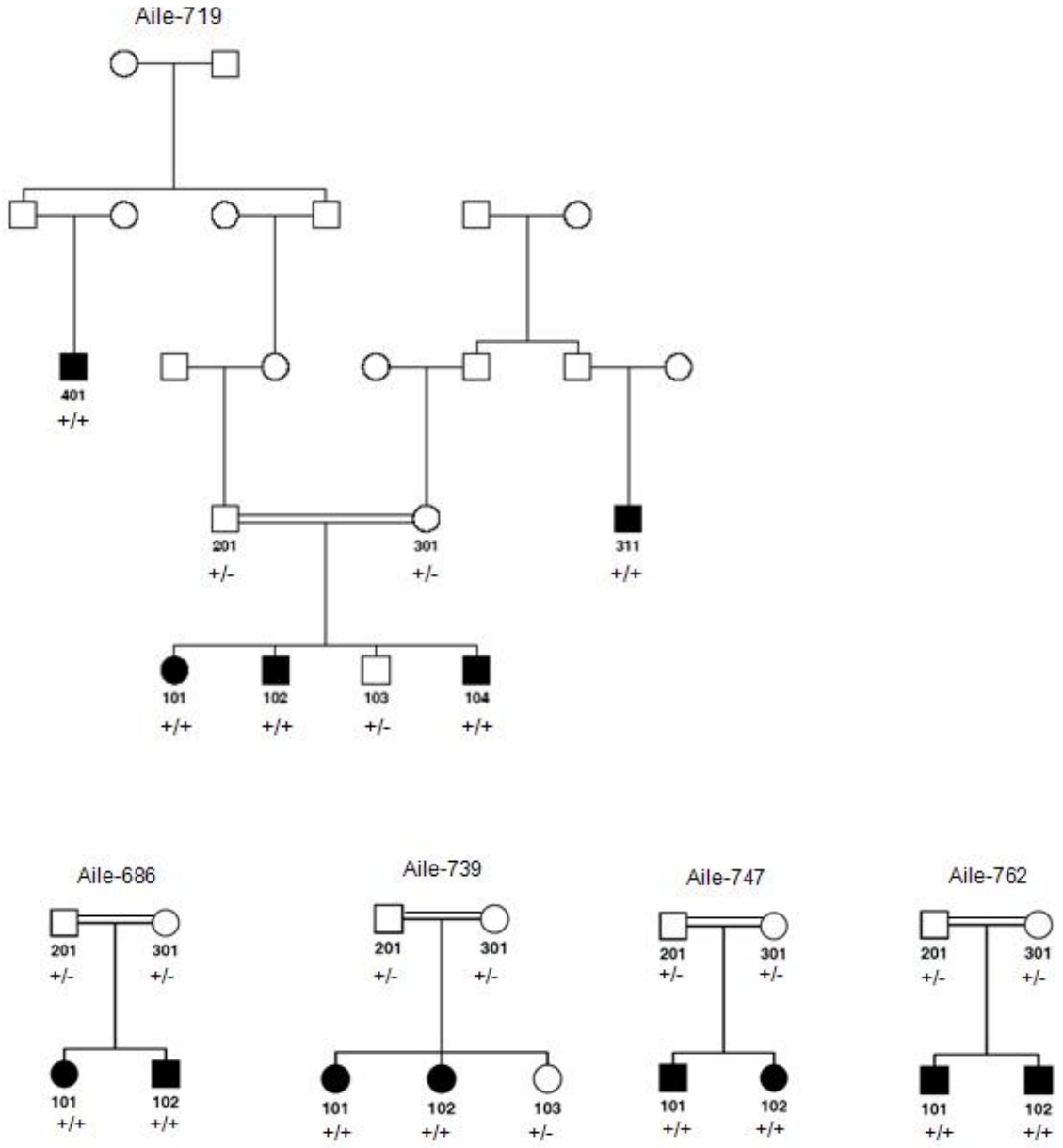
(p.S3335TfsX119) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8). Bu mutasyona 115 sağlıklı kontrolde rastlanmamıştır.



**Şekil 3.8.** *MYO15A* geninin 62. ekzonundaki c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335TfsX119) değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü.

Bu mutasyonların ailelerde fenotiple birlikte dağıldığı gösterilmiştir (Şekil 3.9).



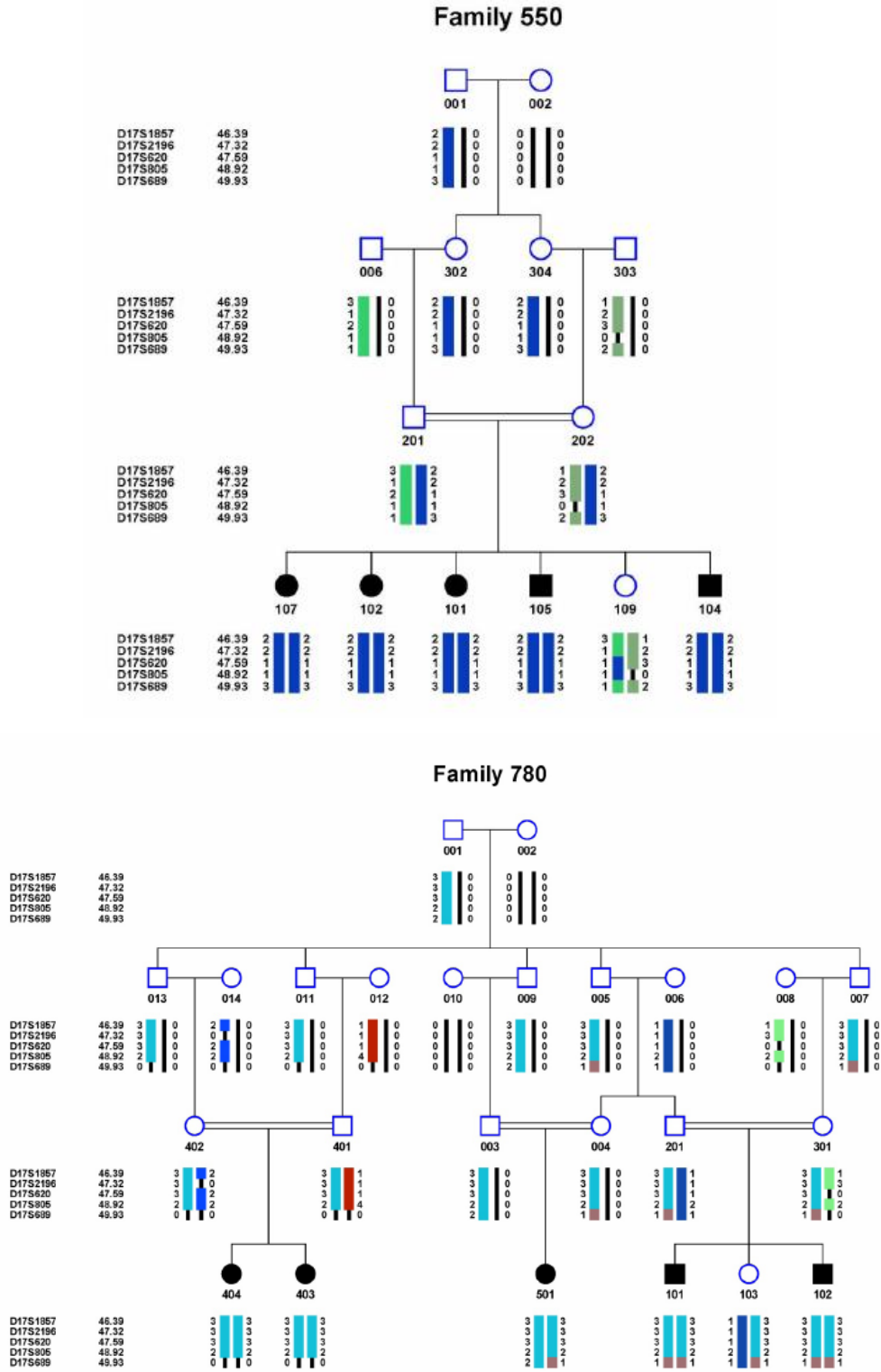


**Şekil 3.9.** Bulunan *MYO15A* mutasyonlarının ailelerde dağılımı (+ mutasyon; - yabani tip)

Bu çalışmada yapılan mikrodizin analizi ve mikrosatellit analizi sonucunda DFNB3 bölgesinde homozigot bölgeler tespit edilen ancak SSCP ile mutasyon taraması yapılmış mutasyon bulunamayan 2 aile (550 ve 780 numaralı aileler) bulunmaktadır. 550 ve 780 numaralı ailelerde mikrodizin analizi ile DFNB3 bölgesinde D17S620, D17S805 ve D17S689 belirteçleri kullanılarak mikrosatellit analizi yapılmış ve hasta bireylerin bu



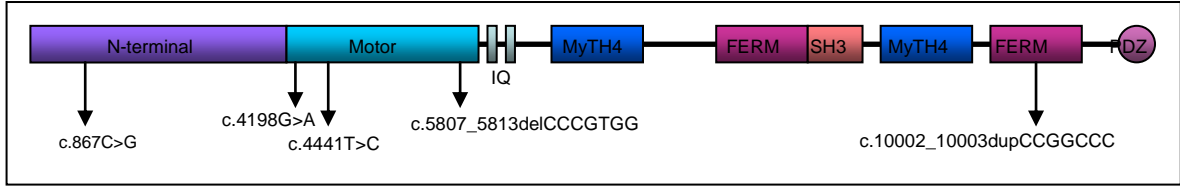
bölge için homozigot oldukları gösterilmiştir, ayrıca yapılan mikrodizin analizi sonuçlarına göre de oldukça büyük bir homozigot blok tespit edilmiştir (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** 550 ve 780 numaralı ailelerin aile ağaçları ve D17S1857, D17S2196, D17S620, D17S805 ve D17S689 mikrosatellit belirteçleri ile oluşturulmuş haplotipleri.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

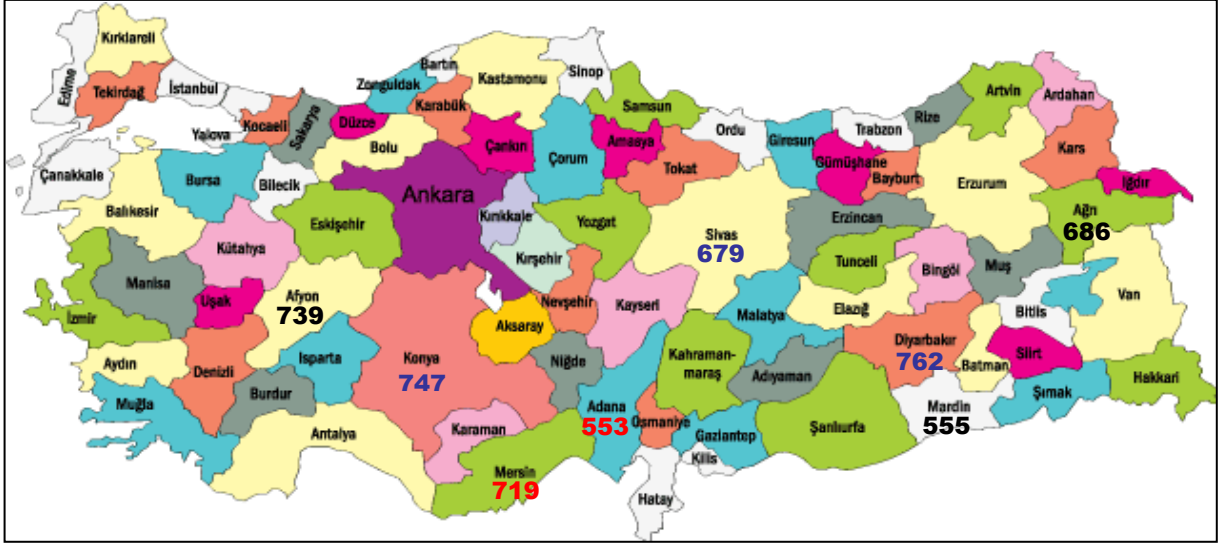
Bu çalışmada; iki yanlış anlamlı, bir anlamsız mutasyon, bir delesyon ve bir duplikasyon olmak üzere beş yeni *MYO15A* mutasyonu tanımlanmıştır (Şekil 4.1). Bütün mutasyonlar sendromik olmayan sensorinöral işitme kaybı bulunan sekiz ailede gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** MiyozinXVa proteininin yapısal bölgeleri ve bu çalışmada gösterilen mutasyonlar.

679, 747 ve 762 nolu ailelerde *MYO15A* geninin 24. ekzonunda etkilenmiş bireylerde c.5807\_5813delCCCGTGGG (p.R1937fsX10) değişimi homozigot olarak bulunmuştur. Sağlıklı kontrolde bu değişime rastlanmamıştır. Bu değişim proteinin 1937. kodonundan itibaren çerçeve kaymasına neden olur ve 1947. kodonda dur kodonu oluşur. Böylece 3530 aminoasitlik proteinin yalnızca 1946 aminoasidi oluşmaktadır ve protein görevini büyük olasılıkla yapamamaktadır.

c.5807\_5813delCCCGTGGG (p.R1937fsX10) değişimi MiyozinXVa proteinin motor bölgesinde yer almaktadır ve birbiri ile akraba olmayan üç farklı Türk ailede gösterilmiştir. Bu üç aile Türkiye'nin farklı şehirlerinden gelmektedirler (Şekil 4.2). Bu ailelerde *MYO15A* geninin etrafında yer alan mikrosatellit belirteçlerine göre korunmuş bir haplotip bulunmakta ve bu veriler değerlendirildiğinde bu mutasyonun kurucu etkisi olduğunu düşündürmektedir (Ek 1).



**Şekil 4.2.** *MYO15A* geninde bulunan mutasyonların illere göre dağılımı. (555 nolu ailede c.867C>G (p.Y289X), 739 nolu ailede c.4198G>A (p.V1400M), 686 nolu ailede c.4441T>C (p.S1481P), 679, 747 ve 762 nolu ailelerde c.5807\_5813delCCCGTGGG (p.R1937fsX10), 553 ve 719 nolu ailelerde c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335fsX119) değişimi saptanmıştır.)

553 ve 719 nolu ailelerde *MYO15A* geninin 62. ekzonunda etkilenmiş bireylerde c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335fsX119) değişimi homozigot olarak bulunmuştur. 115 sağlıklı bireyde bu değişim görülmemiştir.

c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335fsX119) değişimi MiyozinXVa proteininin FERM bölgesinde yer almaktadır. FERM bölgeleri transmembran proteinlerinin sitoplazmik bölgelerinin hücre iskeleti proteinlerine bağlanmasında görev yaparlar. Bu bölge MiyozinXVa proteininin boyun bölgesinde yer almaktadır (Garcia-Alvarez vd 2003). Bazı çalışmalarda MyTH4/FERM bölgelerinin MiyozinXVa proteininin stereosillerin uçlarındaki lokalizasyonunda görevli olabileceği gösterilmiştir fakat görevi tam olarak açıklanamamıştır (Belyantseva vd 2005, Shearer vd 2009). Bu çalışmada bulunan değişim bu bölgede tanımlanan üçüncü mutasyondur. Bu mutasyon birbiri ile akraba olmayan iki Türk ailede gösterilmiştir (Şekil 4.2).

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. Son 50 yıldır şehirlere göç olmasına rağmen akraba evliliği hala sürmektedir ve evliliklerin yaklaşık %20-25’inde

akraba evliliği görülmektedir (Tunçbilek 2001). Küçük ve izole bir populasyon göç aldığı veya bu popülasyonda yeni bir işitme kaybı mutasyonu ortaya çıktığında, genetik sürüklenme ile ardarda gelen kuşaklarda bu mutasyonun sıklığı artabilir. Küçük topluluklar veya akraba evliliği aynı mutasyonu taşıyan kişilerin evlenmesi olasılığını artıracığından işitme engelli kişilerde tespit edilen mutasyonlar çok geniş bir yelpazedir. Bunun yanında yukarıda açıklandığı gibi Anadolu'daki toplumsal yapı kurucu etkisi olan mutasyonların ortaya çıkışı ve yayılması için de uygundur. Bu durum bulduğumuz c.5807\_5813delCCCGTGGG (p.R1937fsX10) ve c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335fsX119) değişimlerinin de bu şekilde kurucu etkisi ile ortaya çıkmış olduğunu desteklemektedir.

739 nolu ailede *MYO15A* geninin 9. ekzonunda etkilenmiş bireylerde c.4198G>A (p.V1400M) değişimi homozigot olarak bulunmuştur. Proteinin bu bölgesinin evrimsel olarak korunmuş olması ve ailede fenotiple tam dağılım göstermesi bu değişikliğin mutasyon olduğunu düşündürmektedir (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** *MYO15A* genindeki Homo sapiens'te 1400. pozisyondaki valin (V) amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi.

Homo sapiens	...EGGVISGAITSQYLLEKSRIVFQAKNERNYHIFYELLAGLP...
Mus musculus	...EGGVICGAITSQYLLEKSRIVFQAKNERNYHIFYELLAGLP...
Rattus norvegicus	...EGGVICGAITSQYLLEKSRIVFQAKNERNYHIFYELLAGLP...
Bos taurus	...EGGMISGAITSQYLLEKSRIVFQARNERNYHIFYELLAGLP...
Canis lupus familiaris	...GMISGAITSQYLLEKSRIVFQAKNERNYHIFYELLAGLP...
Gallus gallus	...EDGLICGAITSQYLLEKSRIVFQAKSERNYHIFYEMLVGLP...
Danio rerio	...EEGVISGAITSQYLLEKSRIVFQAKDERNYHIFYEMLAGLP...
Tetraodon nigroviridis	...EDGVISGAITSQYLLEKSRIVFQANNERNYHIFYEMLAGLP...
Acyrtosiphon pisum	...GVILGAKVTEYLLEKSRIVTQAPEERNYHVFYELLAGL...
Nasonia vitripennis	...GIVVGRVTQYLLEKSRIVTQATDERNYHVFYELLAGL...
Taeniopygia guttata	...GIVVGTISQYLLEKSRIVFQAHGERNYHVFYELLAGLP...
Trichoplax adhaerens	...GIEGAHVEQYLLEKSRIVNQMKDERNYHIFYRMLAGLP...
Branchiostoma floridae	...GVITGAKTTDYLLEKSRIVSQAPYERNYHIFYEMLAGM...

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.4198G>A (p.V1400M) değişimi için bu değer “8” 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 yürütölmektedir. (<http://sift.jcvi.org/>). c.4198G>A (p.V1400M) değişimi için bu programda proteinin fonksiyonunu bozduğu ve tolere edilemeyeceği öngörölmüştür. Ayrıca c.4198G>A (p.V1400M) değişimi 86 sağlıklı kontrolde taranmış fakat bu değişime rastlanmamıştır. İnternet tabanlı programlardan elde edilen bilgiler, proteinin bu bölgesinin evrim boyunca korunmuş olması ve sağlıklı kontrollerde bu değişime rastlanmamış olması değişimin bir mutasyon olma ihtimalini arttırmaktadır.

686 nolu ailede *MYO15A* geninin 12. ekzonunda etkilenmiş bireylerde c.4441T>C (p.S1481P) değişimi homozigot olarak bulunmuştur. ConSeq programına göre c.4441T>C (p.S1481P) değişimi için bu değer “5” olarak hesaplanmıştır. SIFT adlı internet tabanlı programda ise c.4441T>C (p.S1481P) değişimi için proteinin fonksiyonunu bozduğu ve tolere edilemeyeceği öngörölmüştür. Bu değişim 95 sağlıklı kontrolde taranmış fakat hiçbirinde gösterilememiştir. Bu değişimin ailede tam dağılım göstermesi, sağlıklı kontrollerde gösterilmemiş olması değişimin mutasyon olduğunu düşündürmektedir ve internet tabanlı programlarda elde edilen sonuçlar da bu görüşü desteklemektedir.

Çizelge 4.2. *MYO15A* genindeki *Homo sapiens*'te 1481. pozisyondaki serin (S) amino asidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi.

<i>Homo sapiens</i>	...MEVLGFSSSEDQDSIFRILASILHLGNVYFEKYETDAQEVAS...
<i>Mus musculus</i>	...MEVLGFTSEDQDSIFRILASILHLGNVYFEKHETDAQEVAS...
<i>Rattus norvegicus</i>	...MEVLGFTSEDQDSIFRILASILHLGNVYFEKHETDAQEVAS...
<i>Bos taurus</i>	...MEVLGFSAEDQDSIFRILASILHLGNVYFEKDETDAQEVAS...
<i>Canis lupus familiaris</i>	...MEVLGFSGEDQDSIFRILASILHLGNVYFEKYETDAQETAS...
<i>Gallus gallus</i>	...EVLGFSVDEQNSIFRILSSVLHLGNVYFEKYETDCQEIAT...
<i>Danio rerio</i>	...MEILHFAEDQSGIFRVLSSILHLGNVFFERYETESQEVAS...
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	...MENLRFSAEDQSAIFRVLSSILHLGNVYFQSHEADGQEVAS...
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	...MQVLGFTSEEQDTIFRILASVLHLGNVYFHRKQ...
<i>Pediculus humanus corporis</i>	...MQVLGFTNEEQDTIFRILASVLHLGNVYFHRKQ...
<i>Nasonia vitripennis</i>	...MQVLGFTSEEQDTIFKILSSVLHLGNVYFHRKQ...
<i>Arabidopsis thaliana</i>	...MDVVGISSEEQDAIFRVVASILHLGNIEFAK...

c.4198G>A (p.V1400M) ve c.4441T>C (p.S1481P) değişimleri Miyozin XVa proteininin motor bölgesinde yer alırlar. Bu bölge miyozin ailelerinin çeşitliliği için önemli bir bölgedir (Probst vd 1998, Mermall vd 1998, Liang vd 1999) ve korunmuş olan yapısal elementler içermektedir (Friedman vd 1999, Krendel vd 2005). Bu nedenle *MYO15A* geninde bu bölgede sensorinöral işitme kayıplı ailelerde, birçok yanlış anlamlı mutasyon gösterilmiştir (Garcia-Alvarez vd 2003, Nal vd 2007).

555 nolu ailede *MYO15A* geninin 2. ekzonunda etkilenmiş bireylerde c.867C>G (p.Y289X) homozigot olarak bulunmuştur. Bu değişim proteinin 289. aminoasitte sonlanmasına ve proteinin güdük kalmasına, dolayısıyla fonksiyonunu yerine getirememesine neden olmaktadır.

c.867C>G (p.Y289X) değişimi proteinin N-terminal bölgesinde yer alan ve prolince zengin bir bölgeyi kodlayan 2. ekzonunda yer almaktadır, bu bölge diğer miyozin proteinlerinde yer almayan bir bölgedir (Sellers 2000). Yapılan son çalışmalar N-terminal bölgesinin normal işitme fonksiyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (García-Alvarez vd 2003).

Bu çalışmada *MYO15A* genini de içine alan DFNB3 lokusunun bulunduğu bölgede mikrodizin analizine göre büyük bir homozigot blok bulunan fakat *MYO15A* geninde yapılan tarama sonucunda mutasyon bulamadığımız iki aile (550 ve 780) vardır. Bu iki ailedeki durumu açıklamak için dört ihtimal bulunmaktadır:

1. *MYO15A* geni büyük olduğu için SSCP metoduyla taranmıştır ve bu metodun güvenilirliğinin yaklaşık olarak %80 olması nedeniyle bu ailelerdeki mutasyonlar tespit edilememiş olabilir,
2. *MYO15A* geni etrafında 3' ve 5' ucunda bulunan regülatör elemanlarda veya intronlarda mutasyon olabilir,
3. Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi DFNB3 lokusunda *MYO15A* geninden başka bir sendromik olmayan otozomal resesif sağırılık geni daha bulunabilir (Belguith vd 2009, Shahin vd 2009).
4. Ailelerde tespit edilen otozigozite yalnızca şans sonucu olabilir ve bu ailelerde başka bir bölgede mutasyon bulunabilir.

Sonuç olarak *MYO15A* geninde 8 ailede bulduğumuz 5 değişiklik de ilk defa bu çalışma ile gösterilmiş ve bu ailelerde sendromik olmayan işitme kaybından *MYO15A* genindeki mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda Türkiye'deki ailelerde *GJB2* genindeki mutasyon sıklığı 0.189 olarak gösterilmiştir (Tekin ve Arıcı 2007). Bu çalışmada ise Türkiye'deki otozomal resesif sendromik olmayan işitme kayıplarında *GJB2* geni dışlandığında *MYO15A* genindeki mutasyon sıklığı 0.098 olarak bulunmuştur. Böylece Türkiye'deki otozomal resesif sendromik olmayan işitme kayıplarında *MYO15A* genindeki mutasyon sıklığı

0.062'dir (%95 güvenlik aralığı 0.020-0.105). İşitme kabı genlerindeki heterojenlik göz önünde tutulduğu zaman bu gendeki mutasyon sıklığı oldukça önemli olmaktadır. Bu nedenle bu çalışma ile bulunan mutasyonlar Türk toplumu için önem taşımaktadır. Bundan sonra özellikle c.5807\_5813delCCCGTGGG (p.R1937fsX10) ve c.10002\_10003dupCCGGCCC (p.S3335fsX119) mutasyonları otozomal resesif sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybı olduğu düşünülen kişilerde *GJB2* geninin ardından öncelikle taranarak işitme kaybına neden olan genin bulunması yoluna gidilebilir. Daha ilerideki çalışmalar ile işitme kaybı açısından Türkiye için önemli olan diğer genler ve bu genlerdeki mutasyonlar gösterilerek bir tanı metodu oluşturulabilir.

## 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.
- 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); 527-31.
- 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. 2003. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet*, 72(5);1315-22.
- 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. 2003. 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); 3215-23.
- 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); 1335-40.
- Akar, N. (1999). *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Ankara, AÜTF Antıp AŞ Yayınları.
- Anderson, D. W., Probst, F. J., Belyantseva, I. A., Fridell, R. A., Beyer, L., Martin, D. M., Wu, D., Kachar, B., Friedman, T. B., Raphael, Y., Camper, S. A. 2000. The motor and tail regions of myosin XV are critical for normal structure and function of auditory and vestibular hair cells. *Hum Mol Genet*, 9(12); 1729-38.
- Avraham, K. B., Hasson, T., Sobe, T., Balsara, B., Testa, J. R., Skvorak, A. B., Morton, C. C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. 1997. Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum Mol Genet*, 6(8); 1225-31.
- Belguith, H., Aifa-Hmani, M., Dhouib, H., Said, M. B., Mosrati, M. A., Lahmar, I., Moalla, J., Charfedine, I., Driss, N., Arab, S. B., Ghorbel, A., Ayadi, H., Masmoudi, S. 2009. Screening of the DFNB3 locus: identification of three novel mutations of MYO15A associated with hearing loss and further suggestion for two distinctive genes on this locus. *Genet Test Mol Biomarkers*, 13(1);147-51.
- Belyantseva, I. A., Boger, E. T., Naz, S., Frolenkov, G. I., Sellers, J. R., Ahmed, Z. M., Griffith, A. J., Friedman, T. B. 2005. Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol*, 7(2); 148-56.



- 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); 2501-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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); 319-20.
- 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); 685-8.
- 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); 243-9.
- 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); 770-8.
- 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); 1571-7.

- 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); 770-6.
- Dror, A. A., Avraham, K. B. 2009. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet*, 43; 411-37.
- Eisen, M. D. and Ryugo D. K. 2007. Hearing molecules; contributions from genetic deafness. *Cell Mol Life Sci*, 64(5); 566-80.
- Finsterer, J. and 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);147-57.
- García-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A., Ulmer, T. S., Critchley, D., Campbell, I. D., Ginsberg, M. H., Liddington, R. C. 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell*, 11(1); 49-58.
- Gibbs, J. R., Singleton, A. 2006. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genet*, 2(10); 150.
- 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); 16-8.
- 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); 80-3.
- 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); 417-23.
- Kokotas, H., Petersen, M. B., Willems, P.J. 2007. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71(5); 379-91.
- Krendel, M., Mooseker, M. S. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*, 20; 239-51.
- 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); 437-46.

- 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); 277-84.
- 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); 1121-8.
- Lander, E. S., Botstein, D. 1987. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236(4808); 1567-70.
- Lezirovitz, K., Pardono, E., de Mello Auricchio, M. T., de Carvalho E Silva, F. L., Lopes, J. J., Abreu-Silva, R. S., Romanos, J., Batissoco, A. C., Mingroni-Netto, R. C. 2008. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *Eur J Hum Genet*, 16(1); 89-96.
- 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); 2283-9.
- 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); 215-7.
- Liang, Y., Wang, A., Belyantseva, I. A., Anderson, D. W., Probst, F. J., Barber, T. D., Miller, W., Touchman, J. W., Jin, L., Sullivan, S. L., Sellers, J. R., Camper, S. A., Lloyd, R. V., Kachar, B., Friedman, T. B., Fridell, R. A. 1999. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics*, 61(3); 243-58.
- Liburd, N., Ghosh, M., Riazuddin, S., Naz, S., Khan, S., Ahmed, Z., Riazuddin, S., Liang, Y., Menon, P. S., Smith, T., Smith, A. C., Chen, K. S., Lupski, J. R., Wilcox, E. R., Potocki, L., Friedman, T. B. 2001. Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet*, 109(5); 535-41.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P. Brown, S. D. 1997. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*, 17 (3); 268-9.
- 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); 1155-62.
- Lüleci M, S. M., Alper Ö. (2000). *Renkli Genetik Atlası*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.
- Lynch, E. D., Lee, M. K., Morrow, J. E., Welch, 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); 1315-8.

- 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); 421-8.
- 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); 413-9.
- 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); 635-40.
- Mermall, V., Post, P. L., Mooseker, M. S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 279(5350); 527-33.
- 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); 409-12.
- Nal, N., Ahmed, Z. M., Erkal, E., Alper, O. M., Lüleci, G., Dinç, O., Waryah, A. M., Ain, Q., Tasneem, S., Husnain, T., Chattaraj, P., Riazuddin, S., Boger, E., Ghosh, M., Kabra, M., Riazuddin, S., Morell, R. J., Friedman, T. B. 2007. Mutational spectrum of MYO15A: the large N-terminal extension of myosin XVA is required for hearing. *Hum Mutat*, 28(10); 1014-9.
- Nance, W. E. 2003. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9(2); 109-19.
- 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); 632-6.
- 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); 591-5.
- Noyan, A. (1999). *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Ankara, Meteksan.
- Ouyang, X. M., Yan, D., Du, L. L., Hejtmancik, J. F., Jacobson, S. G., Nance, W. E., Li, A. R., Angeli, S., Kaiser, M., Newton, V., Brown, S. D., Balkany, T. Liu, X. Z. 2005. Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Hum Genet*, 116 (4); 292-9.
- Öner, C. (2002). *Genetik Kavramlar*. Ankara, Palme Yayıncılık.

- 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); 2877-85.
- Petersen, M. B. and Willems P. J. 2006. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet*, 69(5); 371-92.
- Petit, C., Levilliers J., Hardelin J. P. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*, 35; 589-646.
- Petit, C. 2006. From deafness genes to hearing mechanisms; harmony and counterpoint. *Trends Mol Med*, 12(2); 57-64.
- Probst, F. J., Fridell, R. A., Raphael, Y., Saunders, T. L., Wang, A., Liang, Y., Morell, R. J., Touchman, J. W., Lyons, R. H., Noben-Trauth, K., Friedman, T. B., Camper, S. A. 1998. Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science*, 280(5368); 1444-7.
- Redowicz, M. J. 1999. Myosins and deafness. *J Muscle Res Cell Motil*, 20(3); 241-8.
- 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. 2006. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet*, 78 (1); 137-43.
- Riazuddin, S., Nazli, S., Ahmed, Z. M., Yang, Y., Zulfiqar, F., Shaikh, R. S., Zafar, A. U., Khan, S. N., Sabar, F., Javid, F. T., Wilcox, E. R., Tsilou, E., Boger, E. T., Sellers, J. R., Belyantseva, I. A., Riazuddin, S., Friedman, T. B. 2008. Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum Mutat*, 29(4); 502-11.
- Robert, L., Nussbaum R., Huntington, R. M., Willard, F. 2005. Thompson and Thompson *Tıbbi Genetik, Güneş Kitapevi (türkçe çeviri)*.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (2<sup>nd</sup> Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.

- 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); 634-40.
- 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); 144-52.
- Shahin, H., Walsh, T., Rayyan, A. A., Lee, M. K., Higgins, J., Dickel, D., Lewis, K., Thompson, J., Baker, C., Nord, A. S., Stray, S., Gurwitz, D., Avraham, K. B., King, M. C., Kanaan, M. 2009. Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Eur J Hum Genet*, (Baskıda).
- Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., Webster, J. A., Kahrizi, K., Meyer, N. C., Jalalvand, K., Arzhanginy, S., Kimberling, W. J., Stephan, D., Bahlo, M., Smith, R. J., Najmabadi, H. 2009. Mutations in the first MyTH4 domain of MYO15A are a common cause of DFNB3 hearing loss. *Laryngoscope*, 119(4); 727-33.
- Stepanyan, R., Frolenkov, G. I. 2009. Fast adaptation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the mechanotransducer require myosin-XVa in inner but not outer cochlear hair cells. *J Neurosci*. 29(13); 4023-34.
- Tekin, M., Arnos K. S., Pandya A. 2001. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358 (9287); 1082-90.
- Tekin, M., Cin, Ş 2002. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 55(3); 211-216.
- 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); 1583-91.
- Tunçbilek, E. 2001. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr*, 43; 277-279.
- 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); 1950-4.
- 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); 194-7.
- 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); 879-84.

- 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., Offeciens, 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); 60-2.
- 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); 345-9.
- 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 U S A*, 99(11); 7518-23.
- 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); 1447-51.
- 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., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., Weston, M. D. 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 374(6517); 60-1.
- 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); 191-3.
- 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); 165-72.
- Willems, P. J. 2000. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*, 342(15); 1101-9.
- [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).
- [www.webhost.ua.ac.be/hhh/](http://www.webhost.ua.ac.be/hhh/).
- 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); 370-3.
- 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); 201-4.

- 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); 363-9.
- 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); 2509-14.
- 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); 1082-91.
- 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 U S A*, 99 (9); 6240-5.



**EK**

c.5807\_5813delCCCGTGG ve c.10002\_10003dupCCGGCCC değişimleri için korunmuş haplotipler.

Markerlar	Kromozomal Lokalizasyon	679	747	762	553	719
rs2323659	15,237,661	AA	-	-	AA	BB
rs1971159	15,618,609	BB	-	-	BB	BB
D17S1857	16,355,942-16,356,318	177	177	177	-	-
D17S2196	17,205,118-17,205,398	134	134	134	142	142
rs7946	17,350,285	BB	-	-	BB	BB
<i>MYO15A</i>	17,962,621-18,023,841	c.5807_5813delCCCGTGG			c.10002_10003dupCCGGCCC	
rs1373147	20,147,237	AA	-	-	AA	AA
rs1589464	22,436,842	BB	-	-	BB	BB
rs1382048	22,760,245	BB	-	-	AA	AA
rs1382047	22,760,442	AA	-	-	BB	BB
rs1403322	22,802,254	BB	-	-	BB	BB
rs953113	22,839,015	AA	-	-	AA	AA
rs747959	23,026,451	BB	-	-	AA	AA
rs953527	23,092,869	AA	-	-	BB	BB
rs953528	23,092,917	AA	-	-	BB	BB
rs1388175	24,488,142	AA	-	-	AA	AA
rs2127001	25,122,345	AA	-	-	AA	AA
rs719601	25,755,541	-	-	-	BB	BB
rs1551359	26,887,999	-	-	-	AA	AA
rs223138	26,955,730	-	-	-	BB	BB
rs952581	27,014,232	-	-	-	BB	AA

Filiz Başak CENGİZ  
Doğanbahçe sok. No:57/5 Demirlibaççe 06340 ANKARA  
E-mail: [fbasak@yahoo.com](mailto:fbasak@yahoo.com) 0(532)6938389

### I- Kişisel Bilgiler:

Doğum Yeri: Ankara  
Doğum Tarihi: 24/09/1981  
Medeni Durumu: Bekar

### II- Eğitim Bilgileri:

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Doktora (2006-Halen)  
Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans (2004-2006)  
Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (1999-2004)  
Ankara Başkent Lisesi (1995-1999)

### III- Bilimsel İlgi Alanları:

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

1. Ozcakar ZB, **Cengiz FB**, Cakar N, Uncu N, Kara N, Acar B, Yuksel S, Ekim M, Tekin M, Yalcinkaya F. Analysis of NPHS2 mutations in Turkish steroid-resistant nephrotic syndrome patients. *Pediatr Nephrol.*2006;21: 1093-6.
2. Fitoz S, Sennaroglu L, Incesulu A, **Cengiz FB**, Koc Y, Tekin M. SLC26A4 mutations are associated with a specific inner ear malformation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.*2007;71:479-86.
3. Tekin M, Hismi BO, Fitoz S, Ozdag H, **Cengiz FB**, Sirmaci A, Aslan I, Inceoglu B, Yuksel-Konuk B, Tasir-Yilmaz S, Yasun O, Akar A. 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.*2007;80: 338-44.
4. Tekin M, **Cengiz FB**, Ayberkin E, Kendirli T, Fitoz S, Tutar E, Ciftci E, Conba A. Familial neonatal Marfan syndrome due to parental mosaicism of a missense mutation in the FBN1 gene. *Am J Med Genet A.* 2007;143: 875-80.
5. Akcaboy MI, **Cengiz FB**, Inceoglu B, Ucar T, Atalay S, Tutar E, Tekin M. The Effect of p.Arg25Cys Alteration in NKX2-5 on Conotruncal Heart Anomalies: Mutation or Polymorphism? *Pediatr Cardiol.* 2008; 29:126-9
6. Tekin M, Ozturkmen Akay H, Fitoz S, Birnbaum S, **Cengiz FB**, Sennaroglu L, Incesulu A, Yuksel 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.
7. Sirmacı A, Duman D, Ozturkmen-Akay H, Erbek S, Incesulu A, Ozturk-Hişmi B, Arici ZS, Yuksel-Konuk EB, Taşir-Yilmaz S, Tokgöz-Yilmaz S, **Cengiz FB**, Aslan

I, Yildirim M, Hasanefendioğlu-Bayrak A, Ayçiçek A, Yılmaz I, Fitoz S, Altın 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;73(5):699-705.

8. Ramsebner R, Ludwig M, Parzefall T, Lucas T, Baumgartner WD, Bodamer O, **Cengiz FB**, Schoefer C, Tekin M, Frei K. A FGF3 mutation associated with differential inner ear malformation, microtia, and microdontia. *Laryngoscope.* 2010;120(2):359-64.
9. Tekin M, Xia XJ, Erdenetungalag R, **Cengiz FB**, White TW, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Tastan H, Nance WE, Pandya A. GJB2 Mutations in Mongolia: Complex Alleles, Low Frequency, and Reduced Fitness of the Deaf. *Ann Hum Genet.* 2010 (Baskıda).

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

1. Ozcakar B, **Cengiz B**, Cakar N, Uncu N, Kara N, Acar B, Yuksel S, Ekim M, Tekin M, Yalcinkaya F. NPHS2 mutations in familial and sporadic steroid resistant nephrotic syndrome in Turkish patients. 39th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology, September 2005, İstanbul, Turkey (özet)
2. Ucar T, **Cengiz FB**, Atalay S, Tekin M, Tutar E. PTPN11 mutations in Turkish children with Noonan syndrome. 41st Annual meeting of the Association for European Paediatric Cardiology. May 2006. Basel
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).

#### **C. Ulusal kongrelerde bildiriler:**

1. İleri-Akçaboy M, **Cengiz FB**, Uçar T, Atalay S, Tutar E, Tekin M. Doğumsal kalp hastalıklarında NKX2-5 geninde mutasyon taraması. 42.Milli Pediatri Kongresi, Mayıs 2006, Antalya
2. Comba A, **Cengiz FB**, Kendirli T, Ayberkin E, Fitoz S, Tutar E, Çiftçi E, Deda G, Akar N, Tekin M. Tekrarlayan neonatal Marfan sendromu: FBN1 geninde heterozigot p.Cys1086Tyr mutasyonu. 42.Milli Pediatri Kongresi, Mayıs 2006, Antalya
3. Yüksel-Konuk EB, **Cengiz FB**, Fitoz S, Tekin M. Kampomelik displazi ile ilişkili yeni bir SOX9 mutasyonu. VIIIth Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Mayıs 2008.

#### **Posterleri:**

- T. Uçar, F.B. Cengiz, S. Atalay, M. Tekin, E. Tutar PTPN11 Mutations in Turkish Children with Noonan Syndrome, 41st Annual Meeting of The Association for European Pediatric Cardiology 24-27 May 2006, Basel/Switzerland

- Z. B. Özçakar, B. Cengiz, N. Çakar, N. Uncu, N. Kara, B. Acar, S. Yüksel, M. Ekim, M. Tekin, F. Yalçinkaya NPHS2 mutations in familial and sporadic steroid nephrotic syndrome in Turkish patients, 39th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology 10-13 Eylül 2005, İstanbul

- F.Cengiz, T. Uçar, S. Atalay, E. Tutar, M. Tekin Noonan sendomlu Türk hastalarda PTPN11 mutasyonları, 41. Türk Pediatri Kongresi 22-25 Haziran 2005, Ankara

#### **IV- Diğer Bilgiler:**

Eğitim pogramı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri:

- Ankara Üviversitesi Biyoeknoloji Enstitüsü\_Ankara 5. Biyoteknoloji Güneri (15-17 Kasım 2006, Ankara)

- Ankara Üviversitesi Biyoeknoloji Enstitüsü\_Ankara 4. Biyoteknoloji Güneri (15-19 Kasım 2005, Ankara)

- ANKÜSEM Laboratuar Güvenliğı Katılım Belgesi (Haziran 2005, Ankara)

- 41. Türk Pediatri Kongresi (22-25 Haziran 2005, Ankara)

- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü\_Ankara 3. Biyoteknoloji Günleri (Kasım 2004, Ankara)