

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SENDROMİK OLMAYAN OTOZOMAL RESESİF İŞİTME
KAYBI İLE İLGİLİ YENİ GENLERİN ORTAYA ÇIKARILMASI**

İdil ASLAN

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Mustafa TEKİN

2008-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 25/09/2008' dir.

Prof. Dr. Nejat AKAR

Prof. Dr. Ercan TUTAR

Prof. Dr. Levent SENNAROĞLU

Doç. Dr. Mustafa TEKİN

Doç. Dr. Figen DOĞU

ÖZET

Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı İle İlgili Yeni Genlerin Ortaya Çıkarılması

İşitme kaybı dünya genelinde en sık görülen duyuşsal bozukluktur. Doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan işitme kaybı yaklaşık her 1000 canlı doğumda 1-2 görölmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %30'una başka klinik bulgular eşlik etmekte olup bu olgular sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. Sendromik olmayan olguların yaklaşık %80'inde otozomal resesif kalıtım bulunmaktadır. Sendromik olmayan işitme kaybı yapan 27 tane gen bulunmaktadır.

Bu çalışmada insanda işitme kaybı nedeni olabilecek dört aday genin (*TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*) işitme engelli aileler taranarak, işitme kaybı geni olup olmadıklarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya anne baba arasında akrabalık olan ve etkilenmiş bireyde sendromik olmayan doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan toplam 97 aile dahil edilmiştir. Ailelerde *GJB2* geni mutasyonları daha önce taranmış ve negatif bulunmuştur. Ailelerden 66 tanesi mikrosatellit belirteçleriyle ve 51 tanesi mikrodizin analiz yöntemiyle taranmıştır.

TMHS geninde mikrodizin analizini takiben SSCP yapılmış ve herhangi bir değişim saptanamamıştır.

TRPA1 geninde p.Arg3Cys (c.7C>T) değişimi bulunmuştur. Bu değişimin daha önce bildirilmiş bir polimorfizm olduğu görölmüştür.

GJA7 geninde aralarında akrabalık olmayan iki ailede heterozigot p.Asp297Asn değişimi saptanmıştır. Bu değişim daha önce bildirilmemiş olmasına rağmen farklı türlerde korunmamış olması ve proteinin fonksiyonunu değiştirmemesi nedeniyle polimorfizm olduğu düşünölmüştür.

SLC12A2 geninde hiçbir DNA değişikliği saptanamamıştır.

Sonuç olarak *TMHS*, *TRPA*, *GJA7* ve *SLC12A2* genleri sensorinöral otozomal resesif işitme kaybının yaygın nedenleri arasında sayılamaz.

Anahtar Sözcükler: İşitme kaybı, *TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*, SNP, mikrosatellit, mikrodizin

ABSTRACT

Identifying Novel Genes for Non Syndromic Autosomal Recessive Deafness

Hearing loss is the most common sensorineural disorder. Congenital or prelingual hearing loss occurs approximately in one case per 1000 live births. Genetic causes account for 50% of cases. Additional findings are present in 30% of cases, which are referred to as having syndromic deafness. Autosomal recessive transmission occurs in 80% of hereditary deafness. To date, 27 genes, in which mutations are responsible for autosomal recessive deafness have been identified.

We aimed to identify novel genes for non-syndromic autosomal recessive deafness by searching four candidate genes (*TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*) in deaf families.

Ninety-seven families with parental consanguinity segregating autosomal recessive profound prelingual deafness were included in this study. Mutations in *GJB2* were screened and found to be negative in all families. Homozygous run flanking the four studied genes were evaluated with microsatellite and single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in 66 and 51 families respectively.

Microsatellite followed by SSCP and no change was found in *TMHS* gene. A homozygous p.Arg3Cys (c.7C>T) change was found in *TRPA1* gene. However it was assessed to be a polymorphism based on previously reported studies.

Heterozygous p.Asp297Asn (c.889G>A) was detected in *GJA7* gene in two unrelated families. Although this change has not been reported earlier, it was considered to be a polymorphism because this position is not conserved in different species and the amino acid change was not assessed to be not significant for the alteration of protein function.

No DNA sequence change was found in the *SLC12A2* gene.

In conclusion *TMHS*, *TRPA1*, *GJA7* and *SLC12A2* genes are not a common cause of autosomal recessive sensorineural hearing loss.

Key Words: Hearing loss, *TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2* SNP, microsatellites, microarray.

ÖNSÖZ

Danışman değişikliği ile laboratuara geldiğimde beni kabul eden, bilgisini her zaman paylaşan, tanıdığım en değerli bilim adamı olan danışman hocam Doç.Dr. Mustafa TEKİN'e, çalışmalarımız sırasında imkan sağlayan, tecrübelerini paylaşan ve insani vasıflara sahip olmanın hayatta herşeyden önemli olduğunu öğreten hocam Prof.Dr. Nejat AKAR'a, ilgi ve sevgisini her zaman hissettiğim Uzm. Bio. Ece AKAR'a, bu tezi yaparken ve yazarken büyük desteğini gördüğüm Dr. Erkan YILMAZ'a, çalışma arkadaşlarım; Uzm.Bio.Aslı SIRMACI, Uzm.Bio.Duygu DUMAN, Uzm.Bio.Filiz Başak CENGİZ, Uzm.Bio Ayşenur ÖZTÜRK, Tek. Kadir Sipahi ve ismini sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışmanın yapılmasında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında görevli Doç.Dr.Hilal Özdağ, Uzm.Bio.Seda YILMAZ'a ve bana verdikleri sonsuz sevgi, anlayış ve destek için aileme teşekkür ederim.

İdil ASLAN

Ankara, Eylül 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
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. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı.....	8
1.1.5.1. PRESTİN Geni	9
1.1.5.2. <i>GJB2</i> Geni	9
1.1.5.3. <i>GJB6</i> Geni	10
1.1.5.4. <i>MYO7A</i> Geni	10
1.1.5.5. <i>MYO15A</i> Geni	11
1.1.5.6. <i>SLC26A4</i> Geni	11
1.1.5.7. <i>TMIE</i> Geni	12
1.1.5.8. <i>TMCI</i> Geni	13
1.1.5.9. <i>TMPRSS3</i> Geni	13
1.1.5.10. <i>OTOF</i> Geni	14
1.1.5.11. <i>CDH23</i> Geni	14
1.1.5.12. <i>STRC</i> Geni	15
1.1.5.13. <i>USH1C</i> Geni	15
1.1.5.14. <i>TECTA</i> Geni	16
1.1.5.15. <i>OTOA</i> Geni	16
1.1.5.16. <i>PCDH15</i> Geni	17

1.1.5.17. <i>TRIOBP</i> Geni.....	17
1.1.5.18. <i>CLDN14</i> Geni.....	18
1.1.5.19. <i>MYO3A</i> Geni.....	18
1.1.5.20. <i>WHRN</i> Geni.....	19
1.1.5.21. <i>ESPN</i> Geni.....	19
1.1.5.22. <i>MYO6</i> Geni.....	20
1.1.5.23. <i>COL11A2</i> Geni.....	20
1.1.5.24. <i>PJVK</i> Geni.....	21
1.1.5.25. <i>TRIC</i> Geni.....	21
1.1.5.26. <i>ESRRB</i> Geni.....	22
1.1.5.27. <i>TMHS</i> Geni.....	22
1.1.6. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı İçin Bu Araştırmada Taranan Aday Genler.....	25
1.1.6.1. <i>TRPA1</i> Geni.....	26
1.1.6.1.1. <i>TRPA</i>	27
1.1.6.2. <i>GJA7</i> (Konneksinin 45- <i>GJA7</i>).....	29
1.1.6.3. <i>SLC12A2</i>	32
1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER.....	34
1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	34
1.2.2. Mikrodizin Analizi.....	36
1.2.3. Mikrosatellit Analizi.....	37
1.2.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).....	38
1.2.5. DNA Dizi Analizi.....	39
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	41
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	41
2.2. Yöntemler.....	41
2.2.1. DNA İzolasyonu.....	43
2.2.2. Mikrodizin analizi.....	44
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	46
2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	47
2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama.....	48
2.2.6. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	49
2.2.7. SSCP Jeli için Gümüş Boyama.....	50
2.2.8. DNA Dizi Analizi.....	52

3.BULGULAR	54
3.1. <i>TMHS</i> Geni	56
3.2. <i>TRPA1</i> Geni	56
3.3. <i>GJA7</i> Geni	61
3.4. <i>SLC12A2</i> Geni	67
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.1.	Kulağın Anatomik Yapısı	2
Şekil 1.2.	İç Kulağın Yapısı.....	4
Şekil 1.3.	TMHS geninde tanımlanmış mutasyonların tahmini topolojik Protein modellemesi	25
Şekil 1.4.	TRP kanalları filogenisi.....	27
Şekil 3.1.	TMHS geni için kullanılan D6S1875 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	54
Şekil 3.2.	a-061, b-675, c-714, d-717 numaralı ailelerin aile ağaçları ve mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizleri.	56
Şekil 3.3.	TRPA1 geni için kullanılan D6S1875 mikrosatellit belirteci ile Yapılmış jel görüntüsü	56
Şekil 3.4.	a.063, b.638 ve c.740 numaralı ailelerin aile ağaçları	58
Şekil 3.5.	564 numaralı ailenin aile ağacı.....	58
Şekil 3.6.	TRPA1 geni 1.eksonun SSCP jel görüntüsü.	60
Şekil 3.7.	a. 063-101 (normal) bireyde TRPA1 geni 1.ekzon DNA dizi analizi görüntüsü. b. 740-101(polimorfik) bireyde TRPA1 geni 1.ekzon DNA dizi analizi görüntüsü	61
Şekil 3.8.	GJA7 geni için kullanılan D17S934 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	61
Şekil 3.9.	435 numaralı ailenin aile ağacı ve mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçları	62
Şekil 3.10.	a.555 ve b.006-010 numaralı ailelerin aile ağaçları.....	63
Şekil 3.11.	651 numaralı ailenin aile ağacı.....	65
Şekil 3.12.	a. GJA7 geni altıncı amplikonda D297N heterozigot (c.889 G>A) değişimi taşıyan bireylerin DNA dizi analizi görüntüsü b. GJA7 geni altıncı amplikon normal bireyde DNA dizi analizi görüntüsü	67
Şekil 3.13.	D5S2078 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No:

Çizelge 1.1. Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı işitme kaybı yapan genler.....	8
Çizelge 2.1. Çalışmaya dahil edilen aileler, ailelerin etkilenmiş birey sayıları, memleketleri ve tarama yöntemi.....	42
Çizelge 2.2. <i>TMHS</i> , <i>TRPA1</i> , <i>GJA7</i> , <i>SLC12A2</i> genleri için kullanılan mikrosatellit belirteçleri.....	46
Çizelge 2.3. <i>TMHS</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.....	51
Çizelge 2.4. <i>TRPA1</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.	51
Çizelge 2.5. <i>GJA7</i> genin ampliconları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları	53
Çizelge 3.1. 564 numaralı ailede <i>TRPA1</i> geninin olduğu bölgenin mikrodizin analizi.....	59
Çizelge 3.2. 555, 006 ve 010 numaralı ailelerde 10K mikrodizin analizi	64
Çizelge 3.3. 651 numaralı ailede 50K mikrodizin analizi	66
Çizelge 4.1. 740-101 numaralı bireyde R3C değişimi için Conseq Server veri tabanı ile yapılan analiz	69
Çizelge 4.2. <i>GJA7</i> geni p.Asp297Asn değişimi için Conseq Server veri tabanı ile yapılan analiz.....	70

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 ⁺⁺	: Kalsiyum
cM	: Santimorgan
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dB	: Desibel
dCTP	: Deokisitozintrifosfat
ddATP	: Dideoksiadenintrifosfat
ddCTP	: Dideoksisitozintrifosfat
ddGTP	: Dideoksiguanintrifosfat
ddH ₂ O	: Didistile su
ddTTP	: Dideoksitimidintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanintrifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozid trifosfat
Ds	: Donör site (verici bölge)
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
G	: Guanin
G	: Gram

Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin
His	: Histidin
IHC	: İç tüy hücresi
Ile	: İzolösin
K ⁺	: Potasyum iyonu
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
Leu	: Lösin
Lys	: Lizin
Mg ⁺⁺	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Mikromolar
Na ⁺	: Sodyum iyonu
NaOAc	: Sodyum asetat
OHC	: Dış tüy hücresi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	: Fenilalanin
Pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
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

1.GİRİŞ

İşitme kaybı dünya genelinde en sık görülen duyuşal bozukluktur. Doğuştan veya dil gelişimi öncesi (prelingual) ortaya çıkan işitme kaybı kişilerin eğitim ve çevresiyle olan iletişimde zorluklara yol açarken daha sonra (postlingual) ortaya çıkan işitme kaybı kişilerin yaşam kalitesini düşürmektedir. Toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte doğuştan ortaya çıkan işitme kaybı yaklaşık olarak her 1000 canlı doğumda 1-2 görölmektedir (Nance 2003).

İşitme kaybı etiyoşojik olarak heterojen bir olgu olup birçok genetik ve çevresel faktör işitme kaybına neden olabilmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Kalıtım şekline veya işitme kaybının fenotipe yansımalarına göre sendromik işitme kaybı ve sendromik olmayan işitme kaybı olarak sınıflandırılabilir. Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kayıplarıdır. İşitme kayıplarının %80'ini ise otoşomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır (Morton ve Nance 2006).

Genetik nedenli işitme kayıpları içerisinde *GJB2* (connexin 26) mutasyonları beyaz ırkta en önemli yeri tutmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar genetik nedenlerin sıklığı ve dağılımının neredeyse her toplumda farklı olduğunu göstermektedir. Türkiye'de otoşomal resesif kalıtımın genetik nedenli işitme kayıplarının %90'dan fazlasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu genetik nedenler arasında *GJB2* mutasyonları yaklaşık %20'lik payla en büyük yeri tutmaktadır (Tekin ve Arici 2007). Bugüne kadar *GJB2* geni dışında sendromik olmayan otoşomal resesif işitme kaybına yol açan toplam 26 gen daha tanımlanmıştır.

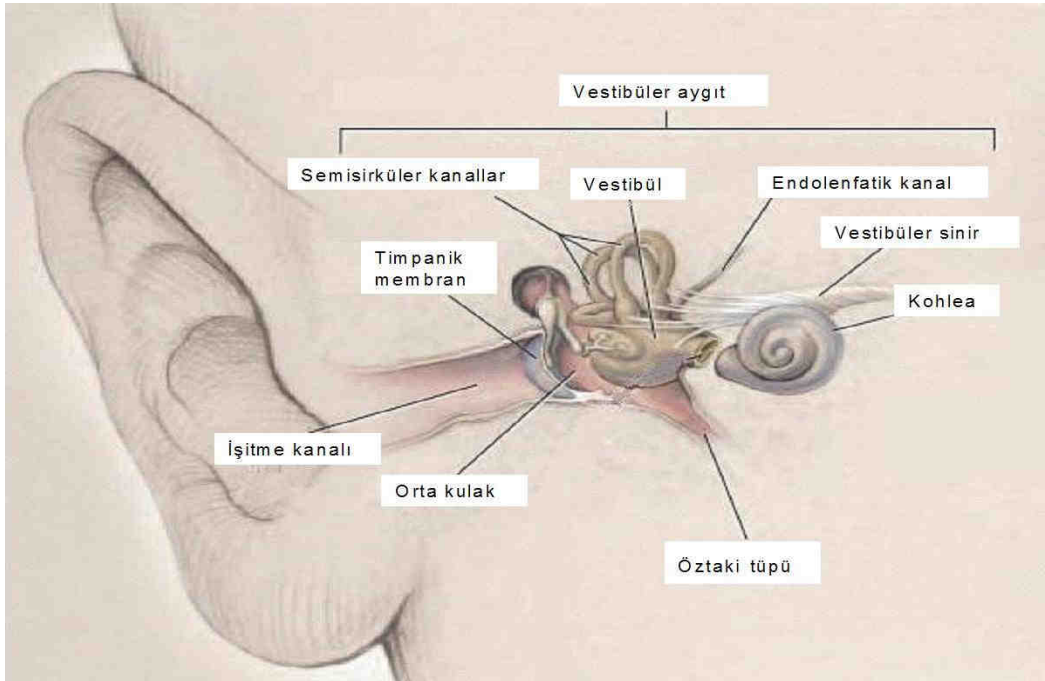
Bu çalışmada insanda işitme kaybı nedeni olabilecek dört aday genin (*TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*) işitme engelli aileler taranarak, otoşomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı geni olup olmadıklarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

1.1. 1. İşitme Mekanizması

İşitme ve denge işlevlerinden sorumlu olan kulak üç ana bölümden oluşmaktadır. Yapı ve görev bakımından birbirinden farklı olan bu bölümler dış kulak (auris externa), orta kulak (auris media) ve iç kulak (auris interna)tır. (Şekil 1.1)

Dış kulak; kulak kepçesi (auricula) ve dış kulak kanalından oluşur. Kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgaları işitme kanalından geçerek, dış işitme kanalı ile işitme kemiklerinin bulunduğu timpanik boşluğu birbirinden tamamen ayıran kulak zarına (timpanik zar) iletilir. Kulak zarı, ses dalgalarını değiştirmeden hava ile dolu olan orta kulağa iletir.



Şekil 1.1: Kulağın anatomik yapısı. (Morton ve Nance 2006)'dan değiştirilerek alınmıştır)

Orta kulak; çekiç (malleus), örs (incus), üzengi (stapes) adı verilen üç hareketli işitme kemikçığinden oluşur. Orta kulaktaki çekiç kemikçığinin tabanı kulak zarının iç yüzeyine, üzengi kemikçığinin tabanı oval pencereye bağlıdır. Örs kemikçığı hem

çekiç hem üzengiyle temas halindedir. Kemikler arasında eklem yerleri vardır. Bu üç kemik kulak zarından oval pencereye kadar bir zincir oluşturur. Bu kemikçikler zinciri, kulak zarının iç kulağa olan hareketlerini yöneten bir kaldıraç mekanizması oluşturur. Kulak zarında oluşan ses titreşimleri üzengi kemikçiğinin tabanına iletilir. Oval pencere bu sayede içe ve dışa doğru hareketler oluşturur. Böylece kulak zarı ve kemikleri havadaki titreşimleri iç kulağın sıvı ortamına taşıyan bir dönüştürme görevi yaparlar (Petit vd 2001).

İç kulak zarsı ve kemiksi labirent adı verilen içi sıvı dolu, iki yapıdan oluşur. Kemiksi labirent perilenf sıvısıyla, zarsı labirent ise endolenf sıvısıyla doludur. Kemiksi labirent; kohlea, yarım daire kanalları ve bu kanalların yapısında bulunan utrikul ile sakkulu içeren vestibül (denge organı) aygıtından oluşur Kohlea, 35 mm boyunda kıvrım yapan sarmal bir tüptür. Bağ dokusundan oluşan baziller membran ve ince zar şeklindeki Reissner membran kohleayı uzunluğu boyunca üç bölmeye ayırmaktadır. Ortadaki bölme “scala media” adını alır ve işitme reseptörü olan corti organını taşır. Skala medianın bir tarafında skala vestibuli diğer tarafında skala timpani bulunur. Skala media endolenfle, skala vestibuli ve skala timpani perilenfle doludur. Perilenf ve endolenfin iyonik kompozisyonu birbirinden farklıdır. Endolenf yüksek K^+ (150 mM), düşük Na^+ (1 mM), az miktarda Ca^{++} (0,02 mM) konsantrasyonuna sahiptir. Perilenf plazmaya benzer şekilde, düşük K^+ (3,5 mM), yüksek Na^+ (140 mM) ve endolenfden daha yüksek miktarda Ca^{++} (1 mM) konsantrasyonu içermektedir (Petit vd 2001). Endolenfin perilenfden farklı olan iyon konsantrasyonu kohlear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskülarisin marjinal hücreleri tarafından sağlanmaktadır (Şekil 1.2).

Normal işitmenin devamı için tüy hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşturan K^+ iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Hücrede kalsiyum miktarının artması, kalsiyuma duyarlı potasyum geçiş yollarını açar; potasyum iyonları hücreden dışarı çıkarlar (Noyan 1999). Bu geri dönü sırasında K^+ iyonları ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmındaki kanalı geçerler. Burada iyonların hücreler arası geçişi aralıklı birleşkeler (gap junction) ile sağlanır. Stria vaskularise gelen iyonlar voltaj kapılı 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 70 milyon insanı etkilediği bilinmektedir (Eisen ve Ryugo 2007).

İşitme kaybı çevresel veya genetik faktörlerin veya her ikisinin birlikte etkisi sonucu ortaya çıkabilir. Çevresel nedenli işitme kayıpları, toplam işitme kayıplarının %40-50' sini oluşturmaktadır. İşitme kaybına yol açan çevresel faktörler arasında, erken doğum, düşük doğum ağırlığı, farmakolojik ototoksisite, doğum öncesi geçirilmiş rubella veya sitomegalovirüs gibi enfeksiyonlar, kafa travmaları, doğum sonrası sepsis veya menenjit geçirilmesi ve subaraknoid kanama sayılabilir. (Tekin 2002; Morton ve Nance 2006).

Klinik olarak iki tip işitme kaybından söz edilmektedir. İletim tipi işitme kaybı işitme prosesinin mekanik kolundaki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişir. Bu tip işitme kaybına orta kulak patolojileri, timpanik membran perforasyonu, kemikçiklerin hastalıkları, orta kulak enfeksiyonları neden olabilir. Sensorinöral işitme kaybı ise elektrokimyasal koldaki fonksiyon bozuklukları olup; iç kulak, duyu sinirleri veya merkezi sinir sistemindeki hasarlar sonucu ortaya çıkar. Her iki tipin birlikte görüldüğü olgular ise karışık tip işitme kaybı olarak adlandırılır (Eisen ve Ryugo 2007).

Başlangıç yaşına göre işitme kayıpları; doğuştan (konjenital), erken başlangıçlı (prelingual) ve geç başlangıçlı (postlingual) işitme kaybı olmak üzere üç tiptir. Prelingual (dil gelişimi öncesi- 5 yaşına kadar) dönemde ortaya çıkan işitme kayıpları otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmekte fakat postlingual dönemde (dil gelişimi sonrası) ortaya çıkan işitme kayıpları genellikle otozomal dominant kalıtım göstermektedir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Odyolojik bulgularına göre beş tip işitme kaybından söz edilmektedir (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).

İşitme kayıpları progresyonuna göre; ilerleyici işitme kaybı, ilerleyici olmayan işitme kaybı ve değişken progresyon gösteren işitme kaybı olmak üzere 3 gruba ayrılır.

İşitme kayıpları kalıtım şekline göre; tek genli kalıtım, çok genli kalıtım olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tek genli kalıtım otozomal resesif (%77-88), otozomal dominant (%10-20), X'e bağlı (%1-2) ve mitokondrial (%0-20) olarak tanımlanmış olup mitokondrial kökenli işitme kayıplarının sıklığı toplumlara göre oldukça değişkendir (Nance 2003).

İşitme kaybı fenotipe yansımalarına göre sendromik (%30-40) ve sendromik olmayan (%60-70) işitme kaybı olarak ikiye ayrılmaktadır (Morton ve Nance 2006).

1.1.3. Sendromik İşitme Kaybı

İşitme kaybına başka patolojik organ veya laboratuvar bulgularının eşlik ettiği durumlarda sendromik işitme kaybından söz edilmektedir. İşitme kaybına böbrek, göz, pigment, sinir, iskelet anomalileri ve saç kaybı gibi bulguların eşlik ettiği 400'den fazla sendrom tanımlanmıştır (Nance 2003).

Sendromik işitme kayıpları otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmektedir. Birçok 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 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).

1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı

Sendromik olmayan işitme kayıplarına kulak ve vestibuler sistem hastalıkları dışında başka bir laboratuvar bulgusu veya klinik bulgu eşlik etmemektedir. Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen lokusları “DFN” şeklinde gösterilmektedir. DFNA otozomal dominant, DFNB otozomal resesif ve 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*, *TMCI*, *MYO6* sayılabilir (Petersen ve Willems 2006).

Bazı genlerdeki mutasyonlar ise hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına yol açabilmektedir. Bu genler arasında *MYO7A* (Usher 1B), *GJB2* (Vohwinkel Sendromu, Palmoplantar keratoderma- işitme kaybı, Keratitis-ichthyosis-işitme kaybı-KID), *CDH23* (Usher 1D), *MYO7A* (Usher 1B) ve *SLC26A4* (Pendred Sendromu), *GJB6* yer almaktadır.

Bugüne kadar sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olan 21 otozomal dominant, 27 otozomal resesif ve 1 X'e bağlı gen tanımlanmıştır. Bu genler Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1: Sendromik olmayan işitme kaybı yapan genler (www.webhost.ua.ac.be/hhh/)

Lokus adı	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli	Referans
Yok	CRYM		Otozomal dominant	(Abe vd 2003)
DFNA1	DIAPH1	5q31	Otozomal dominant	(Lynch vd 1997)
DFNA2	GJB3 (Cx31)	1p34	Otozomal dominant	(Xia vd 1998)
DFNA2	KCNQ1	1p34	Otozomal dominant	(Kubisch vd 1999)
DFNA3	GJB2(Cx26)	13q12	Otozomal dominant	(Kelsell vd 1997)
DFNA3	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal dominant	(Grifa vd 1999)
DFNA4	MYH14	19q13	Otozomal dominant	(Donaudy vd 2004)
DFNA5	DFNA5	7p15	Otozomal dominant	(Van Laer vd 1998)
DFNA6/14	WFS1	4p16.3	Otozomal dominant	(Bespalova vd 2001; Young vd 2001),
DFNA8/12	TECTA	11q22-24	Otozomal dominant	(Verhoeven vd 1998)
DFNA9	COCH	14q12-q13	Otozomal dominant	(Robertson vd 1998)
DFNA10	EYA4	6q22-q23	Otozomal dominant	(Wayne vd 2001)
DFNA11	MYO7A	11q12.3-q21	Otozomal dominant	(Liu vd 1997)
DFNA13	COLL11A2	6p21	Otozomal dominant	(McGuirt vd 1999)
DFNA15	POU3F4	5q31	Otozomal dominant	(Vahava vd 1998)
DFNA17	MYH9	22q	Otozomal dominant	(Lalwani vd 2000)
DFNA20/26	ACTG1	17q25	Otozomal dominant	(van Wijk vd 2003; Zhu vd 2003)
DFNA22	MYO6	6q13	Otozomal dominant	(Melchionda vd 2001)
DFNA28	TFCP2L3	8q22	Otozomal dominant	(Peters vd 2002)
DFNA36	TMC1	9q13-q21	Otozomal dominant	(Kurima vd 2002)
DFNA39	DSPP	4q21.3	Otozomal dominant	(Xiao vd 2001)
DFNA48	MYO1A	12q13-q14	Otozomal dominant	(Donaudy vd 2003)
Yok	PRES (Prestin)	7q21.1	Otozomal resesif	(Ahmed vd 2003)
DFNB1	GJB2 (Cx26)	13q11-q12	Otozomal resesif	(Kelsell vd 1997)
DFNB1	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal resesif	(del Castillo vd 2002)
DFNB2	MYO7A	11q	Otozomal resesif	(Liu vd 1997; Weil vd 1997)
DFNB3	MYO15A	17p11.2	Otozomal resesif	(Wang vd 1998)
DFNB4	SLC26A4	7q31	Otozomal resesif	(Robertson vd 1998)
DFNB5	TMIE	3p21	Otozomal resesif	(Naz vd 2002)
DFNB7/11	TMC1	9q13-q21	Otozomal resesif	(Kurima vd 2002)
DFNB8/10	TMPRSS3	21q22.3	Otozomal resesif	(Scott vd 2001)
DFNB9	OTOF	2p23-p22	Otozomal resesif	(Yasunaga vd 1999)
DFNB12	CDH23	10q21-q22	Otozomal resesif	(Bork vd 2001)
DFNB16	STRC	15q15	Otozomal resesif	(Verpy vd 2001)
DFNB18	USH1C	11p15.1	Otozomal resesif	(Ahmed vd 2002; Ouyang vd 2005)
DFNB21	TECTA	11q22-q24	Otozomal resesif	(Mustapha vd 1999)
DFNB22	OTOA	16p12.2	Otozomal resesif	(Zwaenepoel vd 2002)
DFNB23	PCDH15	10q21-q22	Otozomal resesif	(Ahmed vd 2003)
DFNB24	RDX	11q.23	Otozomal resesif	(Khan vd 2007)
DFNB28	TRIOBP	22q13.1	Otozomal resesif	(Riazuddin vd 2006; Shahin vd 2006)
DFNB29	CLDN14	21q22.3	Otozomal resesif	(Bork vd 2001)
DFNB30	MYO3A	10p11.1	Otozomal resesif	(Walsh vd 2002)
DFNB31	WHRN	9q32-q34	Otozomal resesif	(Mburu vd 2003)
DFNB35	ESRRB	14q24.3-q34.12	Otozomal resesif	(Collin 2008)
DFNB36	ESPN	1p36.3-p36.1	Otozomal resesif	(Naz vd 2004)
DFNB37	MYO6	6q13	Otozomal resesif	(Ahmed vd 2003)
DFNB49	TRIC	5q12.3-q14.1	Otozomal resesif	(Riazuddin vd 2006)
DFNB53	COL11A2	6p21.3	Otozomal resesif	(Riazuddin vd 2006)
DFNB59	PIVK	2q31.1-q31.3	Otozomal resesif	(Delmaghani vd 2006)
DFNB67	TMHS	6p21.3	Otozomal resesif	(Shabbir vd 2006)
DFN3	POU3F4	Xq21.1	X'e bağlı	(de Kok vd 1995)

1.1.5. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı

Bugüne kadar insanda otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş 27 gen tanımlanmıştır.

1.1.5.1. Prestin (SLC26A5) Geni

İnsan *SLC26A5* geni 7q22.1’de lokalize olup 21 ekson içermektedir. Prestin solüt taşıyıcı (SLC) gen ailesi 26’ya dahil olup anyon-transporter bağlantılı bir protein kodlamaktadır. Prestin kohlear dış tüy hücrelerinin motor proteinidir (Petersen ve Willems 2006).

Bugüne kadar yalnızca iki ailede mRNA’nın kırılmasını bozduğu düşünülen bir mutasyon tanımlanmıştır. Ancak bu mutasyonun heterozigotluk oranı %3 olduğundan patojenitesi kesinlik kazanamamıştır (Liu vd 2003).

1.1.5.2. GJB2 Geni

DFNB1 lokusu yapılan bağlantı analizleri sonucu anne ve babanın birbiri ile akraba olduğu, doğuştan ilerleyici işitme kayıplı iki Tunuslu ailede 1994 yılında 13q12 bölgesine haritalanmıştır. 1997 yılında da sorumlu gen olan gap-junction beta 2 (*GJB2*; konneksin 26 proteinini kodlar) işitme kayıplı üç Pakistanlı ailede tanımlanmıştır. *GJB2* geni kodlayan tek bir ekson içerir (Petersen ve Willems 2006).

Konneksinler integral membran proteinleri olup dört membran geçen bölge içeren “gap junction” kanallarıdır. Bu kanallar potasyum, kalsiyum ve küçük sinyal moleküllerinin geçişine olanak sağlarlar. *GJB2* gen ürünü olan konneksin 26 proteini (226 amino asitten oluşur), K^+ iyonunun tüy hücrelerinden stria vaskularise geri dönüşümünü sağlayan hücreler arası kanalları oluşturur ve bu sayede K^+ endolenfe geri pompalanabilir.

GJB2 gen mutasyonları sendromik olmayan otozomal resesif ve sporadik işitme kayıplarının en önemli nedenidir. Dünya genelinde doğuştan sendromik olmayan otozomal resesif işitme kayıplı bireylerin %20 kadarı bu gende mutasyon taşımakla birlikte bu oran Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Avustralya’da %50 lere çıkabilmektedir. İsrail, Asya ve Latin Amerika ülkelerinde ise *GJB2* geninde mutasyon sıklığı düşüktür (Finsterer ve Fellingner 2005). Türk toplumunda bu gen mutasyonları dünya geneline benzer bir şekilde yaklaşık %20’lik bir oran oluşturmaktadır (Tekin vd 2001; Tekin vd 2003; Tekin vd 2005). *GJB2* gen mutasyonlarının dağılımı etnik spesifiktir. 35delG mutasyonu Avrupa kökenli bireylerde en yaygın mutasyonken (%70), 167delT Aşkenazi Yahudilerinde ve 235delC mutasyonu Asya kökenli bireylerde yaygın olarak görülür. Sık olmamakla birlikte

bazı *GJB2* mutasyonları sendromik olmayan otozomal dominant (*DFNA3*) işitme kaybına yol açmaktadır (Finsterer ve Fellingner 2005).

Bu gende bugüne kadar 150'den fazla işlev bozucu mutasyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.3. *GJB6* Geni

GJB6 geni 13q12 kromozom bölgesine haritalanmış olup konneksin ailesinin diğer bir üyesi olan konneksin 30'u (261 amino asitten oluşur) kodlamaktadır. Konneksin 30, Cx26 ile %77 oranında amino asit benzerliği göstermektedir. Bu gendeki mutasyonlar *DFNA3*, *DFNB1* ve *GJB2* mutasyonları ile birlikte KID sendromuna neden olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan otozomal resesif işitme kaybı doğuştan olmakla beraber ilerleyici tipte de olabilir. *GJB6* geninde mutasyon taşıyan hastalarda herhangi bir radyolojik ve vestibüler bulgu tespit edilmemiştir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Farklı toplumlarda *GJB2* mutasyonu heterozigot olan işitme engellilerin %10-42'sinde *GJB6* genini içine alan heterozigot delesyonlar tanımlanmıştır (del Castillo vd 2002). Bu delesyonlar dışında bu gende tanımlanan bir yanlış anlamlı mutasyon otozomal dominant işitme kaybına neden olmaktadır (Grifa vd 1999).

1.1.5.4. *MYO7A* Geni

DFNB2 lokusu ilerleyici işitme kaybına sahip aralarında akraba evliliği olan Tunus'lu bir ailede 11q13.5'e haritalanmıştır. Aynı zamanda Usher Sendromu tip 1'in otozomal resesif formundan sorumlu olan ve bu bölgede haritalanan gen *MYO7A* olup bu gen kasa ait olmayan miyozin ağır zinciri 7A'yı kodlamaktadır. Bu protein 2215 amino asitten oluşur. Klasik olmayan miyozin yapısındadır. Bu genin kodlayan 48 eksonu olup en büyük transkripti 7.4kb büyüklüğündedir Tüm miyozinler ortak bir yapısal organizasyona sahip olup, korunmuş NH₂ terminal motor bölgesi onu takip eden çeşitli sayıda hafif zincir bağlama motifi(IQ) ve bir kuyruk içerirler. *MYO7A*'nın ekspresyonu insan ve farede retina ve kohleayı da içine alan pek çok dokuda tespit edilmiştir. Fare embriyosunda iç kulakta

yalnızca kohlear ve vestibüler tüy hücrelerinde eksprese olmaktadır (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende bugüne kadar 91 tane mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan 80 tanesi Usher sendromu 1b'ye, 4 tanesi sendromik olmayan otozomal dominant işitme kaybına, 4 tanesi sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybına yol açmaktadır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.5. *MYO15A* Geni

Bu gen büyük bir Pakistanlı ailede 17p11.2'e ve DFNB3 lokusunda haritalanmıştır. *MYO15A* geni 66 ekson içermekte olup miyozin-15A proteinini kodlamaktadır. *MYO15A*'nın iç kulakta ekspresyonu kutikular plak üzerinde yer alan tüy hücreleri ile sınırlı olup *MYO15A* tüy hücrelerinde aktin organizasyonu için gereklidir (Piatto vd 2005).

MYO15A genindeki mutasyonların Pakistan'da otozomal resesif işitme kaybının %5'inden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Petersen ve Willems 2006). Bu gende bugüne kadar 6 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 1 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.6. *SLC26A4* Geni

Bu gen 7q31 bölgesine haritalanmış olup trans-membran klor-iyon taşıyıcısı olan, böbrekler, tiroid ve iç kulakta eksprese olan pendrin proteinini kodlamaktadır. Bu protein 12 membran geçen bölgesi içermekte olup 780 amino asitten oluşur ve 86 kDa ağırlığındadır (Kopp 1999).

SLC26A4 kohleada temek olarak endolenf geri emiliminin olduğu bölgede eksprese olmaktadır. Buna bağlı olarak *SLC26A4* mutasyonlarının endolenf sıvı dengesini bozduğu tespit edilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar DFNB4 ve Pendred Sendromu'na yol açar (Mitchem, Hibbard et al. 2002).

Pendred Sendromu ilk olarak 1896 yılında tanımlanmış olup sensorinöral işitme kaybı ve guatr ile karakterizedir. Bu sendromun doğuştan işitme kayıplarının %1-8'inden sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Pendred Sendromu'nda işitme kaybı bilateral tipte olup bazı kohlear bozukluklar görülür. Bu bozukluklar genişlemiş vestibüler kanallar ve kohlear displazidir. (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/; Mitchem vd 2002)

Bugüne kadar bu gende 78 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 22 kırılma bölgesi, 16 delesyon ve 9 insersiyon mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan 69 tanesi Pendred sendromuna, 16 tanesi ise genişlemiş vestibüler kanala yol açmaktadır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.7. *TMIE* Geni

Bu gen insanda kromozom 3p ye haritalanmış olup DFNB6 bölgesinde lokalizedir ve 4 eksondan oluşup 156 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. Amino asit dizisi %92 oranında fare homologuna benzemektedir. Northern blot analizi bu genin birçok insan dokusunda ifade olduğunu ve yaklaşık 2.5 kb'lık transkripte sahip olduğunu göstermektedir. Sekans analizleri, hücre içi N-terminali, 2 transmembran bölgesinin hücre dışı ilmek ve hücre içi C-terminali ile ayrıldığını öngörmektedir.

TMIE (*Trans Membran Inner Ear expressed*) geni transmembran iç kulak proteini isimli bir protein üretmektedir. Bu proteinin tam işlevi henüz bilinmemektedir. Ancak normal duyma işleminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *TMIE*'nin birincil sekansı proteinin belirgin bir biyokimyasal işlevini göstermemektedir. Ancak bu gendeki işlev kaybeden mutasyonlar insanda ve farede işitme kaybına sebep olmaktadır. Etkilenmiş *spinner* faresindeki iç kulak patolojisi *TMIE*'nin normal bir doğum sonrası olgunlaşma sırasında kohleadaki duyuşal tüy hücrelerinin gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir (Mitchem vd 2002).

Bu gende 3 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 1 delesyon ve 1 insersiyon/delesyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.8. *TMCI* Geni

Bu gen insanda 9. kromozomda q13-q21 bölgesinde lokalizedir. Bu genin hem otozomal dominant (DFNA36) hem de otozomal resesif (DFNB7/DFNB11) işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bu gen 2,283 nükleotid içermektedir ve proteini 87-kD büyüklüğündedir. Bu gen ürünü olan protein çok geçişli bir transmembran proteinidir. Protein 6 transmembran bölgesi ve sitoplazmik yönelimli N ve C terminali içermektedir.

TMCI (TransMembrane Cochlear expressed gene) cDNA'sının genomik sekansı, bu genin ekzon 5'deki kodlayan metiyonin kodonunun üst kısmındaki 4 ekzonla birlikte en uzun mRNA'yı kodlayan 24 ekzonu olduğunu göstermektedir. İşlevi bilinmeyen bu protein yapısı bilinen hiçbir proteine benzerlik göstermemektedir. Proteindeki TMC bölgesi adı verilen ve işlevi bilinmeyen bölge tüm TMC'lerde benzerdir (Kurima vd 2002).

Resesif allellerdeki işlev bozucu *TMCI* mutasyonları dil gelişimi öncesi ve şiddetli DFNB7/B11 işitme kaybına neden olur (Kurima vd 2002; Kalay vd 2005). Aksine *TMCI* DFNA36 lokusunda sadece belirtilmiş bir ailede dil gelişimi öncesi ve dil gelişimi sonrasındaki ilk 10 yıllık dönemde çok ileri işitme kaybı yapan bir yanlış anlamlı mutasyonla birlikte seyretmektedir (Makishima vd 2004).

Bu gende 10 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon ve 3 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.9. *TMPRSS3* Geni

Bu gen 21q22.3 kromozom bölgesinde yer almakta olup bir trans-membran serin proteaz (*TMPRSS3*, *ECHOS1*) proteini kodlamaktadır. *TMPRSS3* Corti organının destek hücreleri ve stria vaskülariste eksprese olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar DFNB8/DFNB10 dan sorumludur. Bu gen 13 ekson içermektedir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Yapılan çalışmada, *TMPRSS3* mutasyonlarının 2 formda otozomal resesif işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bir Pakistanlı ailede çocukluk yaşta başlayan resesif işitme kaybı DFNB8 lokusunda gösterilmiştir ve 4. intronda bir kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır. Bir Filistinli ailede ise çocukluk yaşta başlayan resesif işitme kaybı

DFNB10 lokusunda gösterilmiştir ve 8 kb'lık bir delesyon ve 18 beta satelit tekrar monomer insersiyonu tanımlanmıştır (Scott vd 2001).

Bu gende 10 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 1 delesyon, 1 kırılma bölgesi ve 1 insersiyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.10. *OTOF* (otoferlin) Geni

Bu gen 2p23-22 kromozom bölgesi ve DFNB9 lokusuna haritalanmıştır. *OTOF* geni kodlayan 48 ekson içermekte olup 1997 amino asitlik otoferlin proteinini kodlamaktadır. Otoferlin, C terminalinde bir trans-membran bölgesi içerir. Proteinin geri kalanı stoplazmik lokalizasyonlu olup, Ca^{2+} iyonlarını bağlayan C2 bölgesi içerir. Yapılan çalışmalarda *OTOF*'un Corti organındaki iç tüy hücrelerinde utrikulus ve sakkulusta ifade olduğu gösterilmiştir.

OTOF mutasyonları sendromik olmayan, otozomal resesif işitsel nöropatili hastalarda da tanımlanmış olup işitme kaybı değişik düzeylerde olabilmektedir. Bu hastalar normal otoakustik emisyon gösterirler. (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende 13 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon ve 4 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.11. *CDH23* Geni

CDH23 geni DFNB12 lokusunda ve 10q21-22 kromozom bölgesine haritalanmıştır. Bu gen 70 ekson içermekte olup 3353 amino asitlik bir protein kodlar. Northern blot analizi bu genin retinada 9,5 kb'lı bir transkripti olduğunu ayrıca kohleada da ifadesi olduğunu göstermiştir (Bork vd 2001).

CDH23 geni hücreler arası adezyon proteinleri süper ailesine dahil olup geniş bir hücreler arası bölge, membran bölgesi ve sitoplazmik bölge içerir. Yapılan fare deneyleri *CDH23*, harmonin ve *MYO7A*'nın sterosilianın tüy hücreleri kohezyonunda birlikte görevli olduklarını göstermiştir.

CDH23 genindeki mutasyonlar aynı zamanda Usher Sendromu tip 1D ile ilişkilendirilmiş olup bu sendroma işitme kaybı ile birlikte retinitis pigmentosa bulgusu eşlik eder (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende 35 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 8 delesyon, 3 insersiyon ve 11 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır. Yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonların 15 tanesi, kırılma bölgesi mutasyonları, delesyon ve insersiyonların hepsi Usher Sendromu'na yol açmaktadır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.12. *STRC* Geni

Bu gen 15q21-22 kromozom bölgesine ve DFNB16 lokusuna haritalanmış olup 29 ekson içermektedir. *STRC* geni 1809 amino asit, varsayılan bir sinyal peptidi ve hidrofobik segmentler içeren stereocilin proteinini kodlamaktadır.

Farede yapılan immuno işaretleme çalışmaları stereocilin iç kulaktaki tüy hücrelerinde ifade olduğunu göstermiştir. Bu gendeki mutasyonlar sendromik olmayan işitme kaybına neden olmaktadır (Verpy vd 2001).

Bu gende 2 delesyon ve 1 insersiyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.13. *USH1C* Geni

USH1C geni 11p14-15.1 bölgesine haritalanmış olup 20 primer ve 8 alternatif ekson içerir. Gen bir çok dokuya spesifik izoformu olan harmonin adlı proteini kodlamaktadır. Harmonin proteininin fonksiyonu ve tüy hücrelerinde MYO7A, CDH23, F-aktin ile girdiği interaksiyon farede gösterilmiş olup insanda henüz gösterilememiştir (Petersen ve Willems 2006).

Bu gendeki mutasyonlar nadiren otozomal resesif işitme kaybına, aynı zamanda Usher Sendromu tip 1C'ye neden olmaktadır. Usher Sendromu tip 1C otozomal resesif işitme kaybı, vestibüler fonksiyon bozukluğu ve ilerlemiş retinitis pigmentosa ile karakterizedir.

Bu gende 1 yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon, 5 kırılma bölgesi ve 2 insersiyon tanımlanmıştır. Bunlardan IVS12+5G>C kırılma bölgesi mutasyonu dışındaki diğer mutasyonlar Usher Sendromu 1C'ye neden olmaktadır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.14. *TECTA* Geni

TECTA geni 11q23-q25 kromozom bölgesine haritalanmış olup 23 ekson içermektedir. Yapılan bağlantı analizleri sonucu Lübnanlı bir ailede otozomal resesif işitme kaybından sorumlu DFNB21 lokusu ile ilişkilendirilmiştir. Bunu takiben dominant *TECTA* yanlış anlamlı mutasyonları Avustralya, Belçika, Fransa ve İsveçli ailelerde DFNA8/DFNA12 lokusları ile de ilişkilendirilmiştir. Bu ailelerde bulunan yanlış anlamlı mutasyonlar muhtemelen dominant negatif etki göstermekte olup tektoryal membranların bütünlüğünü bozmaktadır. Bu gen α - tectorin adlı bir protein kodlamakta olup α - tectorin tektoryal membranların kollajen olmayan temel bileşenidir (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende 9 yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon, 1 kırılma bölgesi ve 1 insersiyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.15. *OTOA* (otoankorin) Geni

OTOA geni 28 ekson içermekte olup 16p12.2 kromozom bölgesinde haritalanmış ve DFNB22 lokusu ile ilişkilendirilmiştir. Bu gen glikosilofosfatidil-inositol-anchored protein otoankorini kodlamaktadır. Otoankorin 1088 amino asit içerir ve iç kulakta duyuşal epitelin apikal yüzeyinde yerleşmiştir. Kohleada otoankorin tektoryal membran temas zonunda yerleşmiştir. Vestibülde ise duyuşal nöron hücrelerinin apikal yüzeyinde yerleşmiştir (Finsterer ve Fellingner 2005).

Bu gende ekson 12 de 1 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmış olup işitme kaybının yaygın nedenleri arasında değildir (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.16. *PCDH15* Geni

Bu gen 10q21-22 kromozom bölgesine haritalanmış olup protocadherin-15 adlı proteini kodlamaktadır. Protocadherin-15, 11 ectodomain (ectodomainler cadherin tekrarları olup kalsiyum bağımlı hücrelerin adezyonunda görevlidir), bir transmembran bölgesi ve sitoplazmik karboksi bölgesi içermektedir. Protocadherin-15 karboksi ucunda korunmuş sınıf-1 PDZ bölgesi içerir.

PCDH15 iç ve dış tüy hücrelerinde ve diğer bir çok dokuda gelişmenin başlangıcından erişkinliğe kadar geniş oranda eksprese olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar Usher Sendromu tip 1F'ye neden olmakta olup Amerika Birleşik Devletleri'nde Usher Sendromu'nun en yaygın ikinci nedenidir. *PCDH15* mutasyona uğradığında işitme kaybına neden olan ikinci cadherin-benzeri proteindir. Bu gendeki mutasyonlar aynı zamanda DFNB23' e yol açar (Finsterer ve Fellingner 2005).

Bu gende 8 yanlış anlamlı/anlamsız, 1 kırılma bölgesi ve 5 delesyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.17. *TRIOBP* Geni

TRIOBP geni 22q13 kromozom bölgesine haritalanmış olup 23 eksona sahiptir ve sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı lokusu olan DFNB28 ile ilişkilendirilmiştir. *TRIOBP* aynı zamanda TARA olarak isimlendirilmekte olup N-terminal pleckstrin homoloji bölgesi ve C-terminal coiled-coil bölgesi içermektedir. *TRIOBP*, filamentöz F-aktin bağlayan proteindir.

Bu genin esas transkripti 2.8 kb, en küçük transkripti ise 2.0-4.4 kb büyüklüğündedir ve birçok dokuda bulunmaktadır. Hem Shahin ve ark. hem de Riazuddin ve ark. bu genin alternatif kırılma formlarını tanımlamışlardır. Bu genin en uzun izoformu 2,365 amino asittir. Shahin ve ark. yaptıkları çalışmada bu genin en uzun izoformunun fetal beyin, retina ve kohleada ifade bulunduğunu göstermişlerdir (Riazuddin vd 2006; Shahin vd 2006).

Bu gende 4 yanlış anlamlı/anlamsız, 2 çerçeve kayması mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.18. *CLDN14* Geni

CLDN14 geni 21q22.1 kromozom bölgesine haritalanmıştır ve 7 eksonu vardır. Bu genin kodladığı protein olan claudin 239 amino asit içermekte olup tight junctionların bir parçasıdır. Bu gendeki mutasyonlar DFNB29 dan sorumludur.

Claudin proteinleri, 24 üyeli CLDN gen ailesi tarafından kodlanan 20-27 kDa ağırlığında olan proteinlerdir. Yalnızca sıkı bağlantı fibrillerinin oluşumundan sorumlu olan protein ailesi benzer membran topolojisi göstermektedir. Birçok dokuda birbirleriyle homofilik ve heterofilik şekilde etkileşim gösteren farklı claudin proteinleri sentezlenmektedir. Bu proteinler hücreler arası molekül ve iyonların serbest geçişini önleyen sıkı bağlantıların yapısal proteinidir.

Farede yapılan immuno-işaretleme çalışmaları *CLDN14*'ün dördüncü embriyonik günde Corti organının iç ve dış tüy hücrelerinde ve vestibüler organların duyuşal epitelyum hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir. Claudin 14 knock-out fareler normal endokohlaer fonksiyon göstermekle birlikte sağırdır.

İnsanda bu gende 2 yanlış anlamlı/anlamsız ve 2 delesyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.19. *MYO3A* Geni

MYO3A geni 10p12.1 bölgesine haritalanmıştır ve sınıf III miyozin proteinini kodlamaktadır. Sınıf III miyozinler; N-terminal kinaz bölgesi, yüksek düzeyde korunmuş baş ve boyun bölgesi ve sınıf III spesifik kuyruk bölgesi içerirler. *MYO3A*'nın ekspresyonu oldukça sınırlı olup en güçlü ekspresyona retina ve kohleada rastlanmıştır (Piatto vd 2005).

MYO3A geni DFNB30 bölgesine haritalanmış olup bu tip işitme kaybı hayatın ikinci on yılında başlayıp yüksek frekansta devam eder (Willems 2000).

Bu gende 1 yanlış anlamlı/anlamsız ve 2 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.20. *WHRN* Geni

WHRN geni 9q32-34 bölgesinde haritalanmış olup 12 ekson içermekte ve 465 amino asitten oluşan whirlin adlı proteini kodlamaktadır. Bu protein iç ve dış tüy hücrelerinin stereociliasında uzama ve devamlılığın sağlanmasından sorumludur.

İnsanda *WHRN* geni üç PZD domaini ve prolince zengin bir bölge içermekte olup harmonin ile %95 oranında homoloji gösterir. Bu gendeki mutasyonlar dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ve ilerleyici işitme kaybına yol açan DFNB31'den sorumludur (Petersen ve Willems 2006).

Farede yapılan immuno- işaretleme çalışmaları whirlinin aktin polimerizasyonu ve stereosilianın membran büyümesinden sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (Finsterer ve Fellingner 2005).

Bu gende 1 yanlış anlamlı/anlamsız, 1 kırılma mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.21. *ESPN* Geni

ESPN geni 1 p36.3-36.6 kromozom bölgesinde bulunmakta olup 13 ekson içerir ve 854 amino asitlik espin proteinini kodlamaktadır. Espin proteini sekiz ankyrin tekrarı, iki prolince zengin bölge, bir aktin bağlayan WH2 bölgesi ve aktin bağlanmasında görevli coiled coil bölgesi içerir.

Espinler aktin bağlayan proteinlerdir. Farede espin iç kulakta en çok stereociliada lokalize olmuştur. *ESPN* knock-out farelerde stereociliada duyuşal tüy hücreleri tamamen eksiktir (Willems 2000).

İnsanda bu gendeki mutasyonlar DFNB36 ile ilişkilendirilmiş olup bu gende bugüne kadar 2 delesyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.22. MYO6 Geni

MYO6 geni 6q13 kromozom bölgesinde lokalize olup 32 eksona sahiptir. Bu gen 1262 amino asit içeren ve klasik olmayan miyozinler grubunda bulunan aktin temelli moleküler motor proteini Miyozin VI'yı kodlamaktadır. Bu protein hücre içi vezikül ve organel taşınmasında görev almaktadır (Hasson ve Mooseker 1994; Rock vd 2001).

Miyozin VI'nın insan fetal kohleasında sentezlendiğini ve bu proteinin iç kulak fizyolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Avraham vd 1995).

MYO6 genindeki mutasyonlar otozomal resesif işitme kaybı lokusu DFNB37'ye neden olmaktadır. İşitme kaybına vestibüler fonksiyon bozuklukları da eşlik etmektedir. Bu gendeki mutasyonlar aynı zamanda otozomal dominant sensörinöral işitme kaybı DFNA22'ye neden olmaktadır (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende 4 yanlış anlamlı/anlamsız, 1 insersiyon mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.23. COL11A2 Geni

COL11A2 geni 6p21.3 kromozom bölgesinde bulunmakta olup dil gelişimi öncesi ortaya çıkan otozomal resesif ilerleyici tipte işitme kaybı DFNB53' e sebep olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar bir Amerikalı bir de Alman ailede otozomal dominant işitme kaybı DFNA13 ile de ilişkilendirilmiştir (Petersen ve Willems 2006).

Bu gen 66 ekson içermekte olup genin kodladığı protein collagen11 α 2'dir. Kollajenlerin amino propeptidi genellikle 5-8 ekzon tarafından kodlanmaktadır. Bu gen diğer kollajenlerden amino propeptidinin 14 ekzon tarafından kodlanmasıyla ayrılır (Lui vd 1996).

Bazı otozomal resesif mutasyonları otospondylomegaepiphyseal dysplasia (OSMED), bazı dominant mutasyonlar ise yine işitme kaybı ile birlikte seyreden Stickler Sendromuna sebep olmaktadır (Petersen ve Willems 2006).

Bu gende 14 yanlış anlamlı/anlamsız, 4 kırılma bölgesi, 1 insersiyon, 3 delesyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.24. *PJVK* Geni

PJVK geni DFNB59 lokusunda ve 2q31.1-31.3 kromozom bölgesine lokalize olmuştur. Gen 7 ekson içermekte olup pejvakin proteinini kodlamaktadır. Bu protein 352 amino asit içerir ve DFNA5 ile özellikle N-terminal ucunda önemli derecede benzerlik göstermekte olup 250 ortak amino asit taşır (Delmaghani 2006).

Yapılan immuno-işaretleme çalışmaları ile pejvakin proteini; tüy hücrelerinde, destekleyici hücrelerde, spiral gangliyon hücrelerinde tespit edilmiştir (Delmaghani vd 2006).

Bu gende bugüne 2 yanlış anlamlı/anlamsız mutasyon ve 2 delesyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.5.25. *TRIC* (Tricellulin) Geni

TRIC geni 5q12.3-q14.1 kromozomal bölgesinde ve DFNB49 lokusundadır. Bu gen tricellulin proteinini kodlamaktadır. Bu protein hücreler arası sıkı bağlantı proteindir. Bu protein birçok dokudaki epitel hücrelerinin temasına yapı ve fonksiyon olarak katılmaktadır. İç kulakta ise tricellulin kohlear ve vestibüler epitelde yer alır.

Bu gendeki 4 farklı resesif mutasyonun sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bu protein iç kulaktaki kohlear triselular sıkı bağlantı bölgelerinde ve vestibüler epitelde bulunmaktadır.

Aynı zamanda işitme kaybına eşlik eden alternatif kırılma formları tanımlanmıştır (Riazuddin vd 2006).

1.1.1.26. *ESRRB* (Estrogen-related receptor beta)

ESRRB geni 14q24.3-q34.12 kromozom bölgesi ve DFNB35 lokusunda bulunmaktadır. Bu gen iç kulak gelişimi sırasında eksprese olmakta ve kodladığı protein olan ESRRB doğum sonrası dönemde kohleada bulunmakta olup iç kulağın gelişimi ve fonksiyonunda görevlidir.

Bu gendeki ilk mutasyon Türk kökenli bir ailede tanımlanan 1018_1024dupGAGTTTTG mutasyonudur. Bu mutasyon okuma çerçevesini değiştirerek (V342GfsX44) proteinin erken sonlanmasına neden olur. Bu mutasyonu takiben Pakistanlı bir ailede 329C>T değişimi sonra da 1024G>T değişimi bulunmuştur (Collin vd 2008).

1.1.5.27. *TMHS* (LHFPL5) Geni

İnsanda işitme kaybı yapan genlerin ortaya çıkarılması ve işitme kaybının altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında işitme kayıplı fare mutantları, önemli birer model oluşturmaktadır. Jackson laboratuvarlarında spontan olarak ortaya çıkan fare mutantına kendi etrafında yaptığı dönme hareketi, denge problemleri ve düzenli olarak her iki yana başını sallaması nedeni ile “hurry-scurry” (hscy) adı verilmiştir. Bu mutant fareler aynı zamanda doğuştan işitme kayıplıdır.

Pozisyonel olarak klonlanmış hscy; 1,160 F2 fare hibritleri C57Bl/6-hscy ile CAST/EiJ F1 hibritlerinin çaprazlanması ile oluşturulmuştur. Buna bağlı olarak mutasyonun kromozom 17’de 182-bb bölgesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Farede tespit edilmiş olan yanlış anlamlı (missense) mutasyon sisteni fenilalanine dönüştürmektedir.

Tmhs geninin dört transmembran helikası ile birlikte bir integral membran proteinini kodladığı düşünülmektedir. Gen ürünü olduğu düşünülen proteinden sentetik bir peptit dizayn edilmiş ve bu protein özel poliklonal antikorların hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu antikorlara karşı yeni doğan +/+ kontrol, +/-hscy heterozigotlarda kohleadaki iç ve dış tüy hücrelerinde güçlü bir immunoreaksiyon görülürken; hscy/hscy mutantlarında herhangi bir reaksiyona rastlanmamıştır. Buna bağlı olarak gene, tüy hücreleri stereociliası tetraspan membran proteini (tetraspan membran protein of hair cell stereocilia)’nin baş harfleri ile *Tmhs* adı verilmiştir. Farede bu proteine %60’dan fazla benzerlik gösteren iki protein

(LHFL3, LHFL4) daha tespit edilmiş olup bu proteinler farede beş ve altıncı kromozom üzerinde lokalize genler tarafından kodlanmaktadır. Bu iki protein TMHS ile birlikte tetraspan super ailesine dahildir. Memelilerde bu ailenin üç üyesi de başlıca beyin, spinal kord, retina gibi nöral dokularda eksprese olurlar. *hscy* fare mutantları ile yapılan çalışmalar sonucu TMHS fonksiyonu için iç kulağın primer bölge olduğu gösterilmiştir. TMHS apikal membran ve tüy hücreleri sterosiliasında lokalize olduğu bilinen tek tetraspan proteini olup, tüy hücrelerinin morfogenezinde görevli olduğu düşünülmektedir (Longo-Guess vd 2005).

2005 yılında henüz insan hastalıkları ile ilişkilendirilmeden önce *Tmhs* geninin *hscy* mutant farelerde işitme kaybı ve denge problemlerinin altında yatan temel neden olduğu ve insanda da işitme kaybı için aday gen olabileceği Longo-Guess ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Buna göre;

- 1- *hscy* aday gen bölgesi yalnızca 182kb uzunluğunda olup *Tmhs* genini de içine almaktadır.
- 2- Test edilen tüm farelerde *Tmhs* genotipi (DNA dizi analizi ile tespit edilen 482G>T yanlış anlamlı mutasyonu) *hscy* fenotipi ile uyumludur.
- 3- *hscy* mutasyonunun yapısı, *Tmhs* 482G>T yanlış anlamlı mutasyonunun polimorfizm olma olasılığını elimine etmektedir.
- 4- *hscy* mutantlarında değişikliğe uğramış olan TMHS proteinin sistein rezidüsü kemirgenlerden *Caenorhabditis elegans*'a kadar diğer türlerdeki ortologlarında korunmuştur.
- 5- *hscy/hscy* farelerde iç kulakta TMHS proteini yokluğu *hscy* fenotipi ile *Tmhs* gen ürünü arasındaki bağlantıyı açıklamaktadır (Longo-Guess vd 2005).

TMHS geni, *hscy* farelerde ortoloğu olan *Tmhs* geninde de işitme kaybı ve vestibüler fonksiyon bozukluğu bildirildiği günden beri DFNB67 için aday bir gen olup bu gen altıncı kromozomda 6p21.1-p22.3 bölgesinde lokalizedir. *TMHS* geni dört ekson (NM_182548) içermekte olup, 2162-bp bir mRNA kodlamaktadır. Genin protein ürünü ise 219 amino asit ve dört transmembran helikazı içermektedir.

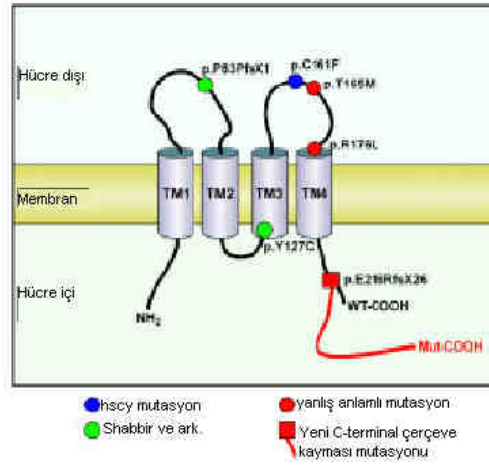
TMHS geni tarafından kodlanan protein; claudin tight junction proteinleri, gap junction proteinleri, periferik myelin proteinleri, epiteliyal membran proteinleri, ve kalsiyum kanalı

benzeri proteinlerini de içine alan tetraspan proteinleri üst ailesine dahildir. Bu üst aileye ait genlerden pek çoğunun insan veya farelerde işitme için gerekli olduğu bildirilmiştir. *TMHS*'nin öngörülen yapısı iki ekstraselüler loop ile birlikte dört transmembran helikazı içermektedir. *hscy* farelerde tespit edilen 482G>T yanlış anlamlı mutasyonunun ikinci ekstraselüler loop'ta disülfid bağlarının bütünlüğünü bozmak sureti ile ikincil yapının stabilizasyonunu bozduğu bildirilmiştir.

Shabbir ve arkadaşları tarafından insanda kromozom 6p21.1-p22.3 bölgesinde yaklaşık 28.51 cM uzunluğunda sendromik olayan işitme kaybına yol açan yeni bir lokus (*DFNB67*) haritalanmıştır. Bu bölge *TMHS* genini içine almaktadır. *DFNB67* ile segrasyon gösteren, aralarında akraba evliliği olan, sendromik olmayan ilerleyici tip işitme kayıplı vestibüler fonksiyon bozukluğu göstermeyen iki Pakistanlı ailede *TMHS* geninin protein kodlayan dizileri, intronik dizileri 5'-3' UTR'leri (protein kodlamayan) DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. İlk ailenin tüm etkilenmiş bireylerinde *TMHS* geninin birinci eksonunda homozigot c.246delC delesyonu saptanmış olup, bu mutant alelin çerçeve kaymasına (frameshift) ve dolayısı ile 84'üncü pozisyonda (p83fsX84) amino asit sonlanması nedeni ile kısalmış proteine neden olduğu düşünülmektedir. İkinci ailenin tüm etkilenmiş bireylerinde yanlış anlamlı homozigot c.380A>G baz değişimi saptanmış olup bu alel 127'inci pozisyonda korunmuş olan tirozinin sisteine (p.Y127C) dönüşümü ile sonuçlanmaktadır. Her iki mutasyon da normal işiten 200 sağlıklı kontrolde tespit edilememiştir (Shabbir vd 2006).

İnsanda *TMHS* geninin işitme kaybı nedeni olarak bildirilmesinden kısa bir süre sonra farklı bir araştırmacı grubu tarafından yapılan genom boyunca bağlantı analizi sonucunda işitme kayıplı ve aralarında akraba evliliği olan üç ailede bu gene bağlantı tespit edilmiş ardından *TMHS* geninin protein kodlayan ilk üç ekzonuna DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda, Doğu Karadeniz kökenli iki ailenin tüm etkilenmiş bireylerinde *TMHS* geninin ikinci eksonunda bir baz çiftlik homozigot c.649delG delesyonu tespit edilmiştir. c.649delG nükleotidi ekzon ikinin son nükleotidi olup ekzon ikinin yarılma bölgesi donör sitesinde GT-motifi tarafından takip edilmektedir. c.649delG mutasyonunun amino asit pozisyonu 216'da çerçeve kaymasına neden olduğu ve *TMHS* proteinin C- terminal bölgesini 25 amino asit sonra (p.Glu216ArgfsX26) sonlandırdığı tahmin edilmektedir. Bu iki aile arasında akrabalık bildirilmemiş olmasına rağmen yapılan haplotip analizleri c.649delG mutasyonunun her iki ailede de aynı haplotipte yer aldığını

ve bu mutasyonun “founder” mutasyon olduğunu göstermektedir. Yapılan kontrol taramaları sırasında Hollandalı bir hastada sporadik c.572G>T değişimi tespit edilmiş olup 176’ncı pozisyonda yüksek düzeyde korunmuş olan arjinin amino asidi lösün (p.Arg176Leu) ile yer değiştirmiştir. Arg 176’nın transmembran bölgesi üç ile iki arasındaki ikincil ekstraselüler loop’un son amino asidi olduğu tahmin edilmektedir (Kalay vd 2006). Şekil 1.3’te *TMHS* geninde bugün’e kadar tanımlanmış mutasyonların tahmini topolojik protein modellemesi görülmektedir.



Şekil 1.3: *TMHS* geninde tanımlanmış mutasyonların tahmini topolojik protein modellemesi

1.1.6. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı İçin Bu Araştırmada Taranan Aday Genler

Bu çalışmanın başlangıcında hayvan modellerinde işitme kaybı nedeni olduğu gösterilen 2 gen (*TMHS* VE *SLC12A2*) ve işlevleri nedeni ile seçilen 2 gen (*TRPA1* ve *GJA7*)’in işitme engelli aileler taranarak, insanda otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olup olamayacaklarının ortaya konulması planlanmıştır. Tez çalışması başladıktan sonra *TMHS* geninde iki farklı araştırmacı grubu tarafından insanda işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş dört mutasyon bildirilmiştir (Kalay vd 2006; Shabbir vd 2006).

1.1.6.1. TRPA1 Geni

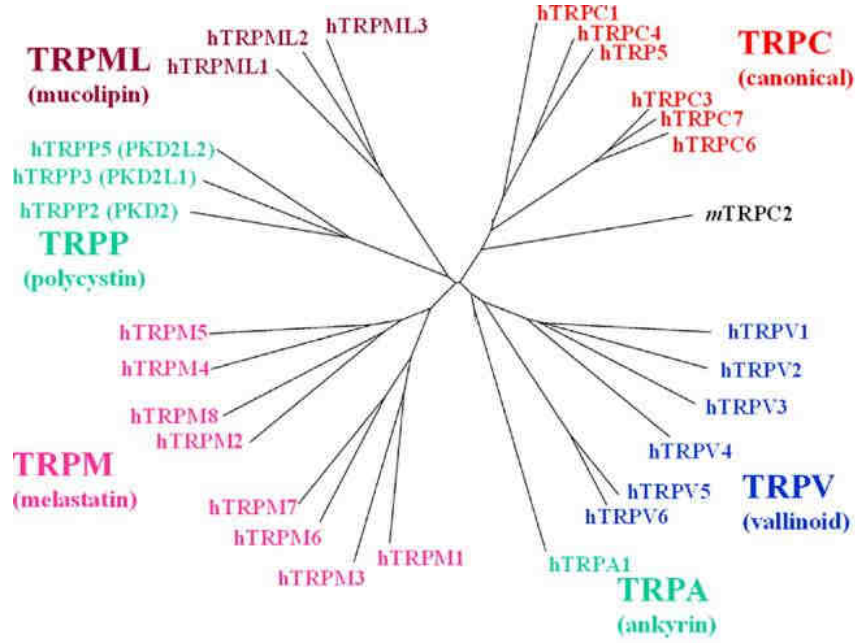
İnsan genomu yüzlerce iyon kanalını kodlamakta olup bu kanallar yüklü iyonların geçirgen olmayan lipid zarlardan geçişine imkan sağlarlar. Lipid zarları oluşturan fosfolipit çift tabakası Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Cl^- gibi küçük yüklü iyonlara karşı geçirgen değildir. Konsantrasyon gradienti ve yük farkı membranları geçebilmek için gerekli olup, iyon kanalları depo edilmiş enerjiyi kullanarak buna olanak sağlarlar. Küçük konformasyonel değişiklikler kanalların açılmasına neden olurken, her saniye yüzlerce iyon kanallar içerisine akar. Ca^{2+} iyonları hücrel homeostaz ve aktivitede oldukça önemli olup tüm hücrelerin yüzeylerinde yüzlerce kanal yer alır. Bu kanallar Ca^{2+} un hücre içine girişini ve bu girişin zamanlamasını kontrol eder (Xu vd 2005).

TRP (Transient reseptor potential= geçici reseptör potansiyeli olan) proteinlerinin varlığı ilk defa 1969 yılında parlak ışık uyarısına karşı geçici bir reseptör potansiyeli verdiği düşünülen *Drosophila* mutantında tanımlanmıştır. 20 yıl sonra *Trp* geni klonlanmış olup bu genin Ca^{2+} iyonları geçiren bir katyon kanalını kodladığı bulunmuştur. Bundan hemen sonra *Drosophila*'da TRP kanallarının iki homoloğu TRPL (TRP benzeri) ve TRP ϕ tespit edilmiş olup her üç proteinin de *Drosophila*'da fotoreseptör hücrelerde, geçici reseptör cevabı verdiği belirlenmiştir. *Drosophila*'da TRP kanalları reseptör opere kanallar olarak iş görmekte olup fosfatidil inositol 4,5-bifosfat (PIP_2)'ın hidrolizi ile aktive edilirler (Xu vd 2005).

TRP kanalları depo-opere-kanallar (store-opened channels-socs) olarak adlandırılmakta olup bu teorik bir tanımlamadır. TRP kanallarının fonksiyonu canlı türleri arasında farklılıklar göstermektedir. Maya TRP kanallarını yüksek osmotik basıncı algılamak ve cevap vermekte, nematodlar TRP kanallarını zararlı kimyasaları tespit etmek ve kaçınmakta (burun içinde nöral dentritlerin tepesinde), erkek fareler feromon algılamasında, insanlar ise TRP kanallarını tatlı, ekşi tatların algılanması ve sıcak, soğuk, ılık ayırt etmede kullanır (Xu vd 2005). Bugüne kadar farede 28, insanda 27, *C. elegans*'ta 17 ve *Drosophila*'da 13 TRP bağımlı gen bulunmuştur (Voets vd 2005).

Memeli TRP kanalları birbirlerine %20'den daha düşük oranda benzerlik göstermekte olup tüm TRP kanalları birbirine benzer 4 alt ünite ve 6 transmembran bölgesi (TM1-TM6) içerirler. Genel olarak bu üniteler benzersiz şekilde eksprese olurlar ve yarılama bölgesi varyantları mevcuttur. Memeli TRP kanalları 6 alt ailede incelenebilir. Bunlar TRPC,

TRPV, TRPM, TRPP, TRML ve TRPA'dır. Şekilde bu kanallar filogenik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.4: TRP kanalları filogenisi

1.1.6.1.1. TRPA

TRPA alt ailesi membran geçen bölge 1 içeren ankyrin benzeri proteinler (ANKTM1 veya TRPA1)'i içerir. TRPA1 amino ucunda 14 ankyrin tekrarı içeren, seçici olmayan bir Ca^{2+} kanalıdır. Bu kanal ilk olarak 1999 yılında insan fibroblastlarında transmembran bölgesi içeren, ankyrin benzeri protein olarak bulunmuştur. İnsanda TRPA1 geni sekizinci kromozomun uzun kolunda (8q13) bulunup 1119 amino asit kodlamaktadır (Calixto vd 2005).

TRPA1'in büyümenin kontrolünde direkt veya indirekt herhangi bir rolü tespit edilememiş olup aşırı ekspresyonu normal büyüme ile sonuçlanır. Daha sonra TRPA1'in dorsal root ganglionlarında eksprese olan bir termosensör olduğu ve soğuk ile aktive olduğu tespit edilmiştir (Obata vd 2005).

Tüm fare modellerinde iç kulaktaki TRP'ler TRPA1'in ekspresyonunda rol oynarlar. Bu kanal hardal, tarçın yağı ve soğuk ile aktive edilir. TRPA1 mRNA'sı mekanik transdüksiyon sırasında iç kulakta rasgele dağılmış olup TRPA1 antikoru transdüksiyon aparatında lokalize olmuştur. Zebra balığı ve farede TRPA1'in bütünlüğünün bozulması tüy hücreleri transdüksiyonunu inhibe eder. TRPA1 proteinin transdüksiyon kanalının kendisinin bir alt ünitesi olduğu düşünülmektedir.

Farelerde TRPA1 eğer tüy hücreleri transdüksiyonuna katılıyor ise mRNA'sının tüy hücreleri mekanik olarak duyarlı hale gelmeden hemen önce ortaya çıkması gerekir. Fare utriküler tüy hücrelerinin ilk dalgası 12.-13. embriyonik günlerde, fonksiyonel transdüksiyon ise 17. günde görülür. Corey ve arkadaşları gelişim sırasında fare utrikülünde *in situ* hibridizasyon yaptıkları çalışmada TRPA1 mesajını ilk olarak 15.günde tespit etmiş olup mesaj 17. günde pik yapmıştır. Mesaj seviyesi 18. günde düşmüş, 19. günde tekrar pik yapmıştır. (Corey vd 2004).

TRPA1'in lokalizasyonunu tespit etmek amacı ile Corey ve arkadaşları radyoaktif işaretli TRPA1 antikoru kullanmıştır. TRPA1 antikoru stereosilia'nın distal yarısında kinosilium boyunca yerleşmiştir. Sterocilianın proksimalinde bulunamamıştır. Fare vestibüler sistem stereosiliasındaki tüy hücreleri daha zayıf işaretlenmişken semisirküler kanal kinosiliası boyunca yer alan tüy hücreleri ise kuvvetli işaretlenmişlerdir. En güçlü işaretlenen ise fare kohleasının apikal bölgesinde yer alan iç ve dış tüy hücreleridir.

Corey ve arkadaşları cadherin 23 tip link proteinlerinin retinal fotoreseptör hücrelerde bulunmasına dayanarak TRPA1'in de fotoreseptörlerde bulunup bulunmayacağını sorgulamışlardır. Yapılan immuno işaretleme çalışmaları TRPA1'nin bullfrog fotoreseptörlerinin iç ve dış segmentinde tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu TRPA1 ekspresyonunun inhibe edilmesinin transdüksiyon kanal fonksiyonunu azaltıp azaltmayacağını merak etmiş ve bu amaçla zebra balığına morpholino oligonükleotitlerini enjekte etmişlerdir. Buna bağlı olarak TRPA1 protein düzeyinin morph1 ve morph3 enjekte edilen embriyolarda düştüğünü göstermişlerdir (Lin ve Corey 2005).

Tarçın yağı, hardal, zencefil, *Pyrola elliptica* (zambak), karanfil TRPA1'i aktive eden maddeler arasında yer alırlar. Cinamaldehit tarçın yağının temel bileşeni olup (~%70), besinler, sakızlar ve diş macunlarında aroma verici olarak kullanılır. Hardal yağı (Allyl isotiyosiyanat) Japon turbu ve *Eutrema wasabi* (hardal)'nin aktif içeriklerinden biridir.

Metil salisilat (*Pyrola elliptica*) ağız yıkama ürünlerinde ve topikal anestetik olarak kullanılmaktadır (Story vd 2003).

Cinamaldehit insanda oral yolla alındığında, dilde yanma ve batma hissi yaratır. Mikromolar miktarda cinamaldehit mTRPA1-CHO hücreleri aktive eder. Farelerde cinamaldehitin ayak tabanına enjeksiyonu ağrılı ateş benzeri duyarlılığa neden olur (Story vd 2003).

Zebra balığı ve faredeki rolünün incelenmesine bağlı olarak, TRPA1'in yalnız ağrı verici soğğun ve bazı kimyasalların algılanmasında değil aynı zamanda memelilerde işitmede görevli tüy hücrelerinin mekanik duyarlılığında da görevli oldukları düşünülmüştür (Voets vd 2005).

İnsanda *TRPA1* geni 8q13 de lokalize olup TRPA1 proteini 1119-amino asit içermektedir ve proteinin hesaplanan ağırlığı 127.4 kD'dur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim>). İnsanda işitme kaybı nedeni olan birçok geninin önce farede tanımlanmış olması bu geni işitme kaybı için aday yapmaktadır.

1.1.6.2. GJA7 (Konneksin 45-Cx45)

Birçok epitel hücresi hücreler arası kanallar topluluğu olan ve iyonlar, metabolitler ve ikincil mesajcılar gibi 1,200Da'dan küçük moleküllerin pasif geçişini sağlayan gap junction'lar (GJ) aracılığı ile haberleşirler. GJ'ler aracılığı ile komşu hücreler arasında sağlanan haberleşme ilk olarak 1959 yılında tanımlanmıştır (Furshpan ve Potter 1959). "Gap junction" terimi 1968 yılında Revel tarafından sinaps ve nöromusküler junctionlar arasındaki hücreler arası haberleşmeden ayırt etmek için kullanılmıştır. Gap junction kanallarının voltaj ve artmış Ca^{2+}/H^+ ile açıldıkları bilinmekle birlikte, moleküler mekanizma aydınlatılamamıştır (Chanson vd 2007).

GJ'ler plazma membranı komşu hücreleri üzerinde yerleşmiş olmuş iki hemikanalın birleşmesi ile oluşurlar. Bu hemikanallar konneksin hegzamerlerinden yapılmıştır. GJ'lerin yapısal üniteleri konneksonlar olup konneksonlar hidrofilik bir kanal içeren proteinöz silindirlerdir. Konneksonlar, konneksin adı verilen proteinleri içerirler ki memelilerde konneksin ailesinin üyeleri büyüklüklerine göre isim alır.

Bugüne kadar insan ve kemirgenlerde konneksin ailesinin 21 farklı üyesi tespit edilmiştir. Konneksin ailesinin bu farklı üyeleri farklı ekspresyon modeli gösterirler. Her bir konneksinin kendine özel, iletkenlik, geçirgenlik, elektriksel veya kimyasal sinyal iletim özelliği vardır. Konneksin genlerindeki hastalık yapıcı mutasyonların tespitine bağlı olarak bazı konneksinlerin fizyolojik rolleri aydınlatılmıştır. *Cx26*, *Cx30* ve *Cx31* genlerindeki mutasyonların insan ve farede işitme kaybına yol açtıkları dolayısıyla da işitsel fonksiyonları tespit edilmiştir (Cohen-Salmon vd 2004; Cina vd 2007).

İç kulakta GJ'ler aracılığı ile sağlanan iki farklı iletişim ağı tespit edilmiş olup bunlar; epiteliyal iletişim ağı ve bağlayıcı doku iletişim ağıdır. Fare kohleasında epiteliyal iletişim ağı 16. embriyolojik gün (E16) şekillenip duyuşal epitelin tüm destekleyici hücrelerini ve komşu epiteliyal hücreleri birbirine bağlar. Bağlayıcı doku iletişim ağı doğumla birlikte gelişmeye başlar. Bu iletişim ağı fibrositleri ve kohleada stria vaskülarisin bazal ve orta düzey hücrelerini (intermediate) içerir. Bu iki iletişim ağının fizyolojik rolü tam olarak aydınlatılamamış olup, iyon dengesinin sağlanmasında görevli oldukları düşünülmektedir. Farede yapılan gen inaktivasyon çalışmaları *Cx26*, *Cx30*'un her iki iletişim ağında da büyük oranda ekspre olduğunu ve bu rollerinin iç kulak morfogenezi, vestibüler fonksiyonların sağlanması için gerekli olduğunu; kohlear duyuşal epitelyum hücrelerinin devamlılığın sağlanmasındaki rollerinin ise vazgeçilemez olduğunu ortaya koymuştur. *Cx26*, *Cx30*'un her ikisinin birden iç kulak epiteliyal iletişim ağında yokluğu, corti organının postnatal dejenerasyonu dolayısıyla da işitme kaybına yol açar.

Yapılan RT-PCR ve cDNA analizleri iç kulakta *Cx26* ve *Cx30*'a ilave olarak *Cx29*, *Cx31*, *Cx32*, *Cx36*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43*, *Cx45*, *Cx46*, *Cx47*, *Cx50*, *Cx57*'nin de eksprese olduğunu göstermekle birlikte bu konneksinlerin gelişmekte olan ve olgun iç kulaktaki dağılımları tam olarak aydınlatılamamıştır. Farede yapılan immunohisto- kimyasal analizlere bağlı olarak *Cx31* postnatal dönemde 12. günde kohlear fibrositlerde tespit edilmişken *Cx43*, duyuşal olmayan epitelyum ve fibrositlerde tespit edilmiştir. *Cx43*'ün muhtemelen doku hazırlanmasında rolü vardır (Cohen-Salmon vd 2004).

Cohen-Salmon ve arkadaşları *Cx43* ve *Cx45*'in gelişmekte olan ve olgun iç kulaktaki rolünü tespit etmek amacı ile *Cx43* ve *Cx45* knock-out farede bu genlerin yerine *lacZ* raportör genini koyarak ekspresyon çalışması yapmışlardır. *lacZ* aktivitesi endojen *Cx43* ve *Cx45* ekspresyonuna ışık tutmuştur.

Cx45 +/- fareler E17.5'te tespit edilmeye başlanmış olup E18.5'te tüy hücreleri hariç tüm hücreler zayıf bir şekilde işaretlenmiştir. Kohlea da ise membranöz kanal, fibrositler ve spiral gangliyon hücreleri işaretlenmiştir. Baziller membran altındaki mezanşimal hücreler kuvvetli işaretlenmiş olup bazı kapillerler de işaretlenmiştir. Son olarak scala vestibüliye komşu olan mezanşimal hücreler de işaretlenmiştir. P1'de spiral gangliyon hücreleri işaretlenmişken P4'te kohlear ve vestibüler kapillerlerin işaretlenmesi artmıştır. Corti organı olgunlaşınca duyuşal epitelin işaretlenmesi dereceli olarak azalmıştır. P30'da kohlea da yalnızca "larger vessel" işaretlenmiş olup vestibül de kapillerler ve bağlayıcı doku işaretlenmiştir.

Cx45'in (*GJA7*) iç kulakta ekspresyonu farede 17. embriyonik günde (E17.5) başlar. Embriyonik gelişim sırasında *GJA7* epiteliyal ve bağlayıcı dokularda zayıf bir şekilde eksprese olurken doğumu takiben kapillerlerde eksprese olmaya başlar. Bu ekspresyon olgun iç kulağın bütünlüğünü sağlamak için gereklidir. Buna bağılı olarak Cx45 içeren GJ'lerin gelişmekte olan ve olgun iç kulakta farklı rollerinin olduğunu söylemek mümkündür.

Cohen-Salmon ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmalar Cx45'in iç kulak vasküler gelişiminde rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Cx45 stria vaskularisin kapillerlerinde eksprese olduğu gösterilen ilk konneksindir (Cohen-Salmon vd 2004).

Erişkin memelilerde nöronların GJ'lerle birlikteliğine oldukça nadir rastlanmaktadır. Gelişme sırasında ise nöronlar diğere hücre tipleri ile birlikte görülebilirler. Cx26, Cx30, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx47' gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde tespit edilmiştir. Fonksiyonel hücreler arası eşleşme konneksin ekspresyonu sinirsel göç ve serebrokortikal gelişimde önemli rol oynar.

Embriyonik dönemde farede beyinde, protein ekspresyonuna transle edilen çeşitli konneksin transkriptlerinin tespiti amacı ile Cina ve arkadaşları farede E14, E16 ve E18 dönemlerde serebral korteks'ten izole edilen protein ile immunoblot analizi yapmışlardır. Fare neokorteksinde Cx45 RNA ve proteinleri her üç embriyonik dönemde de tespit edilmiş olup Cx45'in dağılım modeli E14'te E18'e artış göstermiştir. Cx45'in fare neokorteksinde 18. embriyonik günde artış göstermesi oligodendrit gelişimine bağlanmış olup oligodendritler yüksek düzeyde Cx45 eksprese ederler (Cina vd 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Cx37*, *Cx40*, *Cx43* ve *Cx45*'in kardiyovasküler sistemde de eksprese olduğunu ortaya koymuştur. Vasküler duvarlarda konneksinlerin ekspresyon modelleri damar ve doku tipine göre değişkenlik gösterir. Genel olarak *Cx37* ve *Cx40* endotelial hücrelerde eksprese olurken *Cx43* ve *Cx45* düz kaslarda eksprese olur. Kardiyovasküler sistemde eksprese olduğu bilinen konneksinleri çıkarılmış farelerde öldürücü olan bazı delesyonlar (*Cx43*) konneksinlerin embriyogenez ve gelişmedeki rolünü ortaya koymaktadır. Farelerde *Cx45* çıkarılması öldürücü olmayıp, embriyonik gelişim sırasında bazı vasküler anomalilere yol açmaktadır (Louault vd 2008).

İnsanda *GJA7* 17q21.31'e haritalanmış olup 27 ekson içermektedir. Bu gen 396 amino asitlik bir protein kodlamakta olup bu protein 45.5 kD ağırlığındadır. İnsanda CX45 faredekine 97%, tavuktakine ise %84 oranında benzerlik göstermektedir ((<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/disposim>)). Konneksinlerin insanda işitme kaybında daha önce gösterilen rolleri nedeniyle iç kulakta ekspresyonu olduğu gösterilen her konneksinin "işitme kaybı geni" olmaya adaydır. Konneksin 45 proteinini kodlayan gendeki bir mutasyon bugüne değin insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmemiştir.

1.1.6.3.SLC12A2

Normal işitmenin sağlanabilmesi endolenfteki çok yüksek potasyum konsantrasyonunun devam ettirilmesine bağlıdır. Mememlilerde tüy hücresi içine girerek depolarizasyona neden olan potasyum, tüy hücresini bazolateral kısmında yer alan potasyum kanallarını kullanarak terk eder. Bu proteinlerden *KCNQ4*'ü kodlayan gendeki mutasyonların insanda dominant işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir (Kubisch vd 1999). Potasyum daha sonra destek hücreleri arasındaki "gap junction" kanallarını kullanarak stria vaskularise gelmektedir. Bu "gap junction" kanallarından konneksin 26, konneksin 30 ve konneksin 31 proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların insanda hem dominant hem de resesif sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir (Kelsell vd 1997). Stria vaskularise gelen potasyum *KCNJ10*, *SLC12A2*, *ATP1A1* ve *B2* ile *KCNQ1/KCNE1* kanallarını kullanarak tekrar endolenfe pompalanır. *KCNQ1* ve *KCNE1* proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların insanda otozomal resesif kalıtılan uzun QT ile birlikte giden işitme kaybına neden oldukları gösterilmiştir (Neyroud vd 1997).

Günümüze kadar Na-K-Cl birlikte taşıyıcısının iki izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi olan *slc12a2* birçok epiteliyal ve epiteliyal olmayan hücrenin bazolateral membranında bulunmuştur. İkinci Na-K-Cl ko-taşıyıcı izoformu *Slc12a1* yalnızca epiteliyal hücrelerin apikal membranında bulunmuştur İnsan *SLC12A2*'si fare *slc12a2*'sine %93 benzerlik göstermektedir (Vanden Heuvel vd 2006).

Sy (shaker with syndactylism) radyasyon ile oluşturulmuş fare mutanı olup işitme kaybı ve yapışık parmak ile karakterizedir. *Sy* homozigot fareler vestibüler fonksiyon bozuklukları sonucu başlarını her iki yana sallamakta ve sürekli olarak kendi etraflarında dönmektedir. *sy* kromozom 18 de haritalanmış olup bu bölge *slc12a2* genini içine almaktadır. Yapılan mutasyon analizi sonucu bu genin 21. eksonunda nt2955ins(A) mutasyonu saptanmış olup bu mutasyon bir çerçeve kayması mutasyonu olup 13 amino asit ilerde sonlanma kodonuna sebep olmaktadır (Dixon vd 1999).

Heuvel ve arkadaşları yaptıkları *in situ* hibridizasyon çalışması ile farede embriyonik gelişim esnasında *slc12a2*'nin ekspresyonunu üç farklı embriyonik dönemde (E13.5, E14.5 ve E16.5) incelemişlerdir. Buna göre E13.5'te en kuvvetli işaretlenen bölümler embriyonik böbrek, akciğer, diş tomurcuğu ve burun epiteli olmuşken daha zayıf *slc12a2* ekspresyonu mide bağırsak sistemi ve gelişmekte olan merkezi sinir sisteminin ventriküler bölümünde tespit edilmiştir. Farede E14.5'te benzer bir ekspresyon modeli görülmekle birlikte farklı olarak bu dönemde mide bağırsak sisteminde *slc12a2* ekspresyonu önemli ölçüde artış göstermiştir. E16.5'te ise mide bağırsak sisteminde *slc12a2* ekspresyonu azalmıştır (Vanden Heuvel vd 2006).

“Alman waltzing quinea pig”(gw) tanımlanmamış mutasyonları taşıyan, otozomal resesif olarak kalıtılan kohleovestibüler noksanlık ile karakterize hayvan modelidir. Histolojik çalışmalar gelişmekte olan stria vaskularis ile birlikte Reissner membranında da ilerleyici bozukluk olduğunu ortaya koymaktadır. gw/gw homozigot hayvanlarda yapılan histolojik incelemeler sonucu iç kulakta stria vaskularis malformasyonu ve scala media kompartımanlarının yokluğu gözlenmiştir. Bu belirtiler kohleasakküler veya Sheibe displazisinin temel karakteristikleridir. Bu bulgular, gw/gw homozigot bireylerde kohlear akış ve iyon dengesinin bozulduğunu ortaya koymaktadır (Jin vd 2008).

İnsanda *SLC12A2* geni 5q23.3'e haritalanmış olup 27 ekson içermektedir. Bugüne kadar insanda bu gende işitme kaybına yol açan bir mutasyon bildirilmemiştir. *sy* ve *gw* mutant hayvan türleri insanda iç kulak iyon dengesinin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkabilecek işitme kaybı için iyi birer model oluşturmaktadır.

1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), özgül DNA dizilerinin invitro ortamda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntem olup bir polimeraz enzimi ile gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem, az miktarda DNA örneği ile çalışma avantajı sağlamaktadır ve bu avantajı sayesinde moleküler biyoloji, adli tıp, evrim çalışmaları ve pek çok alanda tercih edilen önemli bir teknik olmuştur (Akar 1999).

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), son olarak da zincirin uzaması (polimerizasyon)'dur. Bu 3 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.

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincir haline getirilir. Bu genomik DNA; kurumuş kan ya da semen gibi adli tıp örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler ve tek bir saç teli gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar $90-95^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 5 dakika süreyle ısıtılır. Sıcaklık $50-70^{\circ}\text{C}$ arasında bir değere düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Reaksiyon karışımına DNA polimeraz enziminin eklenmesiyle $70-75^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkları arasında DNA sentezi gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug 2000).

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.

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli

faktörlerdendir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8.4 tepkime karışımında son değişimi 10mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde K⁺ bulunmasının, çoğaltılmayı önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100µg/ml jelatin bulunmasının da benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl₂) konsantrasyonunun azaltılması ile Taq polimeraz doğruluğu artırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg⁺² iyonuna bağlandıkları için her PCR protokolünde Mg⁺² konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg⁺², enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999).

Oligoprimelerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca Tm: 4(GC)+2(AT) formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmekte olup hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliğini arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılacak oligonükleotidlerin seçimi PCR işleminin 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 bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak yada uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'in olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri de rastgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermemelidir. Oligonükleotidlerin nükleotid içeriklerinde guanin ve sitozin nükleotidlerinin %50 'yi geçmemesi gerekmektedir.

Kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); son konsantrasyonları 2mM olacak şekilde ayarlanmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'lerin bulunması gereklidir. Kullanılacak her bir deoksinükleotid trifosfatın (dNTP) 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 (Akar 1999).

1.2.2. Mikrodizin Analizi

Mikrodizin yöntemi 1995 yılında Schena tarafından geliştirilmiş olup ilk olarak genlerin ekspresyon düzeylerini ölçmek üzere dizayn edilmiştir (Schena vd 1995). Biochip, DNA chip ve gene array terimleri bu yöntemi belirtmek için kullanılan terimlerdir.

Bir array, nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak bilinmeyen DNA ların tanımlanabilmesi için kullanılır. Mikrodizin yönteminde örnek çapı 200 mikrondan küçüktür. Bu nedenle bir array üzerinde binlerce örnek bulunabilir. Microarray çalışmalarında özel robotlara ve görüntüleme donanımlarına ihtiyaç vardır.

20-80 baz çifti uzunluğundaki oligonükleotit veya peptit nükleik asit (PNA) probalar sentezlenerek dizilirler. Array, işaretli DNA ile hibridizasyona sokularak komplementer dizi varlığı/miktarı tanımlanır. Bu yöntem fotolitografik ürünler üreterek satan Affymetrix firması tarafından geliştirilmiştir. Proba bağlanmış olan florasan işaretli moleküller lazer ile uyarıldıklarında ışımaya yaparlar. Array tarayıcının amacı, komplementer noktalara bağlanan probun yaydığı ışını tespit etmektir.

Affymetrix 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. Genome Wide Human SNP Array 6.0 ile 906.600 SNP ve kopya sayısı varyasyonlarının tespitinde 946.000 probu tarama imkanı sağlanmıştır (<http://www.affymetrix.com>).

Günümüzde bu yöntem; bağlantı analizlerinde, kanser araştırmalarında kromozomal amplifikasyon, delesyon tespiti ve genotipleme çalışmalarında, popülasyon genetiği çalışmalarında yüzlerce marker yolu ile allel frekanslarının ölçümü amacı ile kullanılmaktadır.

1.2.3. Mikrosatellit Analizi

Mikrosatellitler birçok ökaryotik genomda bulunan basit tekrar dizileridir. Bunlar arka arkaya ve rastgele tekrarlar oluştururlar. Genellikle 100bp'dan kısa ve benzersiz dizi olduklarından kolaylıkla amplifiye edilirler. Klonlanmaları kolaydır. Bazı tekraralarda polimorfik özellik taşırlar. Bu özelliklerinden dolayı mikrosatellitler yaygın olarak görülen kalıtsal hastalıklarda yüksek çözünürlükte genetik haritaların oluşturulmasında önem taşırlar (Akar 1999).

Minisatellitler 10-100 baz çifti uzunluğundaki DNA dizilerinin çoklu kopyalarının ardarda 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 ile 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 bireydeki iki homolog kromozom arasında da farklılık gösterebilmektedir (Nussbaum 2005).

Yapılan hesaplamalara göre insanda mikrosatellitler tüm genomda her 6bp'lik bir ortalama ile görülmekte ve genomun 745kbp'ını kapsamaktadır. Bunlar genellikle DNA'nın intron bölgelerinde bulunurlar ve çok polimorfiklerdir. İnsanda tekrarlama motifleri A, AC, AAN, AAN ve AG şeklindedir. AC tekrarları hemen her 30kbp'da bir oluşur ki en sık kullanılan mikrosatellit tipidir. Bir ailede hastalığa sebep olan genin lokalizasyonu, belirlenen kromozomal bölgede var olan mutant bir genin kalıtımının aile bireyleri arasında karşılaştırılmasıyla elde edilir (Akar 1999).

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 jelinden daha hassastır ve daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Böylece bireylerdeki mikrosatellit bölgelerinin tekrar sayıları rahatlıkla belirlenebilmektedir.

1.2.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiş olmakla birlikte en sık kullanılan yöntemlerden biri 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 belirlenmesini sağlar. Bu yöntem ile nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişikliklerini, delesyon ve insersiyonları belirlemeyi mümkün kılar (Akar 1999).

Aynı boyuttaki tek zincirli DNA parçacıkları(ssDNA) kendilerindeki değişikliklere bağlı olarak jelde farklı pozisyonlarda yürürler. Komplementer iplikçikler ve tek baz değişikliği gösteren DNA parçacıkları ise değişik migrasyon gösterirler.. DNA'daki herhangi bir değişiklik DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner 2002).

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde, mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR yöntemi ile çoğaltılır. Çoğaltılacak bölgenin baz içeriğine göre geliştirilmiş bir formül ($T_s = [80XC/(A+1)] / \{2,71+[C/(A+1)]\}$) kullanılarak 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.

SSCP tekniğinin en büyük avantajı kısa sürede çok sayıda örnekte mutasyon tarama imkanı sağlamasıdır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bazçiftini geçmemesi önerilmektedir (Akar 1999). Bu yöntemle 200 bazçiftlik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400 bazçiftlik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80 dir.

1.2.5. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da “Sequencing” DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmekte olup bu amaçla iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degregasyon yöntemi ile Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir (Akar 1999).

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 ³²P ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adımda ise dört ayrı tüpte DNA örneğine, zinciri belirli nükleotidlerden kıran dört ayrı kimyasal reaksiyon uygulanır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. DNA'nın kırıldığı dört farklı reaksiyonda guaninden(G>A), adeninden(A>G), yalnız sitozinden(C) ve sitozin timinden (C+T) kırılma olur. Bu reaksiyonlarda, pürinlerin kırılmasında dimetilsülfat kullanılır. Bu reaktif, adenine göre guanini daha etkin olarak metiller ve ısı uygulandığında zincir metilenmiş bölgeden kırılır. Bu durumda daha çok guaninden zincir kırılması gerçekleşir (G>A). Asit ortamında ise bunun aksine adeninden kırılan zincirler daha fazladır(A>G). Primidinlerin kırılma reaksiyonlarında hidrazin kullanılır. Hidrazin DNA'yı hem sitozin hem de timinden kırar. Ancak yüksek tuz derişiminde (2M NaCl) yalnız sitozin reaksiyona girer. Böylece reaksiyondan biri sitozini(C), diğeri sitozin ve timini (C+T) belirlemektedir.

Dört reaksiyon setinden elde edilen her biri hedef bazdan kırılmış farklı uzunluktaki parçalar, elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır. DNA parçacıklarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemiyle bantlar görüntülenir (Akar 1999).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002). Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecek olan maddeler bulunur. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla 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 edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir 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 boyalar kullanılmaktadır (Öner 2002). Sistem, üzerindeki laser 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, Klinik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışma 105S464 nolu “Otozomal Resesif Sensorinöral İşitme Kaybı Yapan Gen Değişimlerinin Ortaya Çıkarılması” başlıklı TÜBİTAK projesiyle desteklenmiştir.

Çalışmaya 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 aileler dahil edilmiştir. Ailelerde *GJB2* geninde ve mitokondrial DNA A1555G mutasyonlarının olmadığı gösterilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formları alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan formlar kullanılmıştır (Tarih:30.01.2006, Karar no: 85-2215).

2.2. Yöntemler

Bu çalışmaya toplam 97 aile dahil edilmiş olup bunlardan 51 tane otozomal resesif işitme kaybı olan aile tüm genom boyunca tek nokta polimorfizmi ile 66 aile ise mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genotiplendirilmiştir. (23 aile her iki yöntemle taranmıştır). Bu analizler sonucunda polimorfik belirteç genotipleriyle fenotipin birlikte kalıtıldığı düşünülüyor ailelerde ilgili gende SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.1’de çalışmaya dahil edilen aileler, ailelerdeki etkilenmiş birey sayıları, ailelerin memleketleri ve tarama yöntemi belirtilmiştir.

Çizelge 2.1: Çalışmaya dahil edilen aileler, ailelerin etkilenmiş birey sayıları, memleketleri ve tarama yöntemi

Aile No:	Etkilenmiş Birey	Memleket	Tarama Yöntemi	
006-010	7	Ankara	-	+
007	2	Erzincan	+	-
013	5	Ankara	-	+
034	4	Çankırı	+	+
042	2	Konya	+	-
045	4	Yozgat	+	+
052	3	Amasya	+	+
061	4	Amasya	+	-
063	2	Amasya	+	-
094	4	Amasya	+	+
098	3	Kırşehir	+	-
102	2	Karabük	+	-
115	2	Amasya	+	-
232	7	Afyon	+	-
303	2	Ankara	+	-
338	4	Bayburt	+	+
344	3	Samsun	+	+
347	7	Gaziantep	+	+
393	2	Ankara	+	-
418	5	Çorum	+	+
432	3	Şanlıurfa	+	-
435	2	Trabzon	+	-
438	10	Konya	+	+
448	2	Rize	+	-
472	2	Kırıkkale	+	-
516	2	Ankara	+	-
543	2	Ağrı	+	-
544	2	Bayburt	+	-
546	2	Eskişehir	+	-
547	2	Hatay	+	-
550	6	Konya	-	+
551	5	Konya	+	-
552	2	Konya	+	-
553	7	Adana	+	+
554	3	Şanlıurfa	+	+
555	4	Mardin	+	+
559	7	Şanlıurfa	-	+
560	4	Mardin	+	+
561	8	Van	-	+
562	3	Şanlıurfa	+	+
563	3	Kilis	+	+
564	4	Konya	+	+
635	2	Konya	+	-
636	2	Şanlıurfa	+	-
637	2	Konya	+	-
638	2	Konya	+	-
643	3	Konya	+	+
644	3	Konya	+	+
645	3	Bursa	+	+
647	4	Van	-	+
651	7	Van	+	+
656	8	Antakya	+	-
660	3	Antakya	+	-
661	2	Antakya	+	-
662	2	Antakya	+	-
663	4	Antakya	+	+
664	4	Antakya	+	+
670	3	Ankara	+	+
674	2	Bolu	+	-
675	2	Sivas	+	-
679	5	Sivas	-	+
681	4	Malatya	-	+
682	4	Eskişehir	-	+
685	2	Konya	+	-
686	2	Ağrı	+	-
691	2	Eskişehir	+	-
695	2	Ankara	+	-
714	2	Van	+	-
716	2	Kayseri	+	-
717	2	Osmaniye	+	-
719	7	İçel	-	+
720	5	İçel	-	+
723	2	Şanlıurfa	+	-
724	5	Kayseri	-	+
725	2	Kayseri	+	-

726	2	Kayseri	+	-
728	10	Kayseri	-	+
734	7	Sivas	-	+
739	2	Afyon	+	-
740	2	Kırkkale	+	-
766	12	Siirt	+	-
780	7	Diyarbakır	+	-
784	11	Diyarbakır	+	-
789	12	Batman	+	-
790	5	Batman	+	-
791	4	Mardin	+	-
794	7	Diyarbakır	+	-
796	5	Diyarbakır	+	-
801	3	Mardin	+	-
807	4	Diyarbakır	+	-
808	4	Diyarbakır	+	-
811	5	Diyarbakır	+	-
815	5	Diyarbakır	+	-

2.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bireylerden, 1 mL 0,5 M Etilendiamintetraasetik asit içeren (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 mL kan örneği alınır. EDTA Mg^{+2} iyon tutucusu ve kuvvetli bir DNAaz inhibitörüdür. Ortamda EDTA'nın bulunması Mg^{+2} iyonu'nun sebep olduğu nükleik asitlerin birbirleriyle ve proteinlerle agrege olarak pıhtı oluşumunu engeller. Alınan kan örneği falkon tüpüne (50 mL) konur ve içerisinde 25 mL RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] ilave edilir. Örnekler çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletir. $+4^{\circ}C$, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki pellet üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 μ L RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 μ L 'si ependorf tüpüne alınarak $-20^{\circ}C$ 'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 μ L bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 μ g/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Soydum 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 $56^{\circ}C$ 'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilir.

Safılaştırmanın ikinci basamağı proteinlerin parçalanmış hücre çözeltilisinden uzaklaştırılması olup bu işleme “deproteinizasyon” adı verilmektedir. Bu amaçla ertesı gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzoamilalkol (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’u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95’lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C’de bir gece bekletilir.

DNA safılaştırmasının üçüncü basamağı iki amaca hizmet etmektedir. Birincisi yüksek moleköl ağırlıklı DNA’yı deproteinizasyon çözeltilerinden konsantre eder. İkincisi hücrenin kırılmasından sonra çözeltide kalan nükleotid, amino asit ve düşük moleköl ağırlıklı kirlilikleri uzaklaştırır. Bu amaçla üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürölür. Süpernatant kısmı dökölerek tüpe 500 µL %70’lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm’de 20dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökölür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde bir gece boyunca kurumaya bırakılır.

Ertesi gün kurutulan tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C’de bir gece bekletilerek DNA’nın çözümlenmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C 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 sağlanır. Bu işlemden sonra fragmentasyon ve işaretleme işlemleri yapılır ve örnekler çipe yüklenir.

Bu yöntem her 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 ddH₂O, 2,5 μl buffer tango (10X) ve 1,25 μL Xba I (20 U/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 etüvde 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 16 °C'de 120 dk, 70 °C'de 20 dk bekletilir. Bu işlemden sonra 25 μL ligasyonlu örnek 75 μL ddH₂O ile sulandırılır.

Bu aşamadan sonra PCR aşaması gelmektedir. Her birey için gerekli olan örnek miktarını elde etmek amacıyla 5 adet PCR yapılmaktadır. Her PCR reaksiyonu için 10 μL PCR Buffer, 10 μL dNTP (herbiri 2,5 mM), 10 μL MgCl₂ (25 mM), 7,5 μL PCR Primer,001, 2 μL Taq polimeraz (5u/μL) 50,5 μL ddH₂O 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 15 s, 72°C 7 dk ve 4°C bitiş programına tabi tutulmaktadır.

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 nedeniyle geriye kalan pürifikasyon, fragmentasyon, labeling, hibridizasyon, yıkama, boyama ve tarama işlemleri için örnekler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına gönderilmiştir.

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarından gelen ailelere ait genetik veriler Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Daha sonra SNP'lerin kromozomal ve nükleotid lokalizasyonlarına göre sıralaması yapılmıştır. Araştırmada taranan 4 geninin genomik lokalizasyonu ensembl (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.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Toplam 66 aileye her 4 gen için genlerin içinde veya çok yakınında bulunan mikrosatellit belirteçleri yardımıyla genotipleme yapılmıştır. Tüm 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 MgCl₂ ve toplam hacmi 25µL'ye tamamlayacak miktarda ddH₂O kullanılmıştır.

Tüm mikrosatellit belirteçleri “Mammalian Genotyping Service” (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>) veri tabanından seçilmiştir. Dört gen içinde kullanılan mikrosatellit belirteçlerinin isimleri, dizileri, boyları, kromozomal lokalizasyonları ve kullanılan PCR programları Çizelge: 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.2: TMHS, TRPA1, GJA7, SLC12A2 genleri için kullanılan mikrosatellit belirteçleri

Gen	Kr. No	Kromozomal lokalizasyon	Mikrosatellit belirteci	Oligonükleotid dizisi	Boyutu (bp)	PCR programı
TMHS	6	35,909,873 - 35,910,105	D6S2425	F:5'CCCTGCTTTCATGTACAGCT3' R:5'GCAGCAGAGAAATGGCTAATC3'	228	Program 1
TMHS	6	35,909,544 - 35,909,894	D6S1875	F:5'AAGATTAGCCATTCTCTGTCTGC3' R:5'TAGCCTCACTGGTGGCTTG 3'	345-346	Program 1
TMHS	6	35,480,617 - 35,480,848	D6S1611	F:5'GAGCAAGACTCCATCTCAAA3' R:5'ACCTAAGTCTCTGAAGGGC3'	222-240	Program 2
TMHS	6	35,870,778- 35,870,920	D6S2128	F:5'GAAAACAGATATGCTGGTCAAGG3' R:5'GTGGACGCTCCAAGCAGT3'	141	Program 2
TRPA1	8	72,917,740 - 72,917,900	D8S570	F:5'CTTCTTCCTGGACTTTGCC3' R:5'GTTCTACTTGGAGCTTGA3'	153-167	Program 3
TRPA1	8	72,739,333 - 72,739,465	D8S530	F:5'TCACTGCCAGAGAGAGAGAG3' R:AGAGGCTGACAATATCACA	143	Program 3
TRPA1	8	73,667,189 - 73,667,413	D8S1776	F:5'TTCCAGCAGTGGCATC3' R:5'AGACTTGGGGTTAAAAACAG3'	225-235	Program 1
TRPA1	8	72,712,060 - 72,712,291	D8S1807	F:5'CCAAAACATTGCTCCC3' R:CGCCTGTCCCTAGTTC	226-240	Program 3
TRPA1	8	73,150,567 - 73,150,809	D8S279	F:5'AAACACAGGTCTGTAGGATTTAGTA3' R:5'GTGTCAGTCCGGGTG3'	239	Program 3
GJA7	17	40,162,539 - 40,162,644	D17S1861	F:5'AGGGGCAGCAGTCTGTGA3' R:5'ACATCATCTGAAATCTAATGGG3'	94-116	Program 2
GJA7	17	39,089,824 - 39,090,123	D17S965	F:5'GAAGTGCCAAAGGCCAGGAACC3' R:5'CTGCACTTCATTCAGCCTGGGTG3'	185	Program 2
GJA7	17	40,413,206 - 40,413,336	D17S934	F:5'GAAGTGCCAAAGGCCAGGAACC3' R:5'CTGCACTTCATTCAGCCTGGGTG3'	185	Program 2
CX45	17	40,078,993 - 40,079,096	D17S930	F:5'GCTACTTATCGATTTTAGGCG3' R:GTAGGGGATGTTTATCAGTGA	139	Program 2
SLC12A2	5	128,966,377 - 128,966,475	D5S809	F:5'AAATTAGGGAAACACATTTTG3' R:5'TGGCTTAAAGTGTTAAACAGTG3'	89-107	Program 2
SLC12A2	5	128,191,570 - 128,191,768	D5S2078	F:5'TTCAATGTTGCCAGGATGT3' R:5'AATCAAAAAATGCCATTCAAAGA3'	169-209	Program 2
SLC12A2	5	126,870,641 - 126,870,734	D5S490	F:5'GCAAACACTGCACTATCCTTTC3' R:5'AAAGTGAGGAGTCAAGGAGG3'	125	Program 2
SLC12A2	5	125,191,192 - 125,191,538	D5S615	F:5'AACCTCAAGCAGTCTAGG3' R:5'TACACCATCATCTCTCTGG3'	359	Program 2

Program 1; 95°C'de 5 dk ardından 35 döngü 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1dk, 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, 65°C'de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C'de 1 dk, 20 döngü 94°C'de 1 dk, 55°C'da 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 3; 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 4; 95°C'de 5 dk ardından 35 döngü 94°C'de 1 dk, 52°C'de 1dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Tüm ailelerde öncelikle hasta bireylere, hasta bireylerin homozigot bulunduğu ailelerde anne ve babaya da PCR yapılarak, bölge için homozigot ve heterozigot bireyler belirlenmiştir.

2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Bu çalışma %6'lık poliakrilamid jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jelin yapımında %40'lık 19:1 oranında hazırlanan akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bu amaçla 190 g akrilamid (Merck,Almanya) ve 10 g N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C'de ısıtılarak kimyasalların çözünmesi sağlanmış ve hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu; 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 temizlendikten sonra jelin cama yapışmaması için her iki camın jel dökülecek olan yüzeyi bir miktar SigmaCode (Amersham, İsveç) ile silinmiştir. Ardında camlar arasına 0.8 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilerek sabitlenmiştir. 62.49 g üre, 13 mL TBE 5X, 19.5 mL %40 (19:1) akrilamid/bisakrilamid solüsyonu yaklaşık 20 mL distile suda 37 °C'de

eritilmiştir. Ardından toplam hacim distile su ile 130 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan jel içeriği 0.22 µm filtreden süzöldükten sonra 10 dk vakum pompası yardımıyla havası alınmıştır.

Jelin polimerizasyonunu sağlamak amacıyla %25'lik amonyum persölfat (APS) solösyonu ve TEMED kullanılmıştır. Kullanılan %25'lik Amonyum Persölfat solösyonu için 2.5 g Amonyum Persölfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 ml'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır. Jel içeriğine 50µL %25'lik taze hazırlanmış olan amonyum persölfat solösyonu ve 50µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenmiş ve sabitlenen jel düzeneğindeki camlar arasına dökölmüştür. Jel dököldükten sonra 0,8 mm'lik tarak camlar arasına takılarak örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmış ve jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra camlar vertikal jel elektroforez sistemine (GibcoBRL S2, ABD) yerleştirilmiştir. Sisteme tampon olarak TBE 0.5 X solösyonu konulmuştur. 80 watta yaklaşık 1 saat ön ısıtma yapılmıştır.

25 µL PCR ürünlerine 10 µL denatüre edici özelliğe sahip yükleme boyası eklenerek 95°C'de 8 dk denatüre edilip, jele 5-7 µL örnek yüklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20mM EDTA, %0,05 Xylene Cyanol, %0,05 Brom-fenol mavisi içermektedir.

Örnekler 60 watt akım altında, yaklaşık 50-52°C 'de baz çifti uzunluklarına bağılı olarak 2-4 saat yürütölüp elektroforez sonrası bantları görünür hale getirmek amacı ile jel gümüş boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama

Elektroforez sonrası bantları görünür hale getirmek amacı ile yapılan gümüş boyamada 3 farklı solösyon kullanılmaktadır. 1. solösyon %0.15 oranında gümüş nitrat içermektedir. Bu solösyon için %1'lik stok gümüşden 150 mL alınarak 900 mL distile su ile karıştırılır. Jel yürüme işlemi bittikten sonra camlardan ayrılarak bu solösyonda yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Ardında gümüş solösyonundan iyice temizlenmesi amacıyla jel distile sudan geçirip, 2. solösyona tabi tutulmuştur. Bu solösyon 150 mL %15'lik NaOH, 6 mL formaldehit ve 1350 mL distile su kullanılarak hazırlanıp, jel bu solösyonda bantlar

görünür hale gelene kadar boyanmıştır. Ardında bu solüsyon dökülerek jel 3. solüsyonda bekletilmiştir. Bu solüsyon, %7.5'luk Na_2CO_3 stok solüsyonu 10 kez seyretilmesiyle hazırlanır ve boyama reaksiyonunu durdurmak amacıyla kullanılmaktadır. Boyama işlemi tamamlanan jeller asetat kağıtlar içerisine alınmıştır. Polimorfik belirteçler ile ilgili gende düşünülen aileler SSCP ve/veya DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır.

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 çözdürülür ve hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır (Sambrook vd., 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 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.

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

Jel; 12,34 mL %40'luk akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, 14 mL TBE 5X solüsyonu, 40,16 mL distile su ve 3.5 mL gliserol 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 μl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökülmüştür. Daha sonra 1,5 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

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

PCR örneklerinin içerdiği adenin ve sitozin nükleotid sayıları baz alarak aşağıda belirtilen formül ile bir sıcaklık değeri (Ts) hesaplanmıştır ve örnek yüklenmeden önce jeller hesaplanan bu sıcaklık derecesine getirilmiştir (Li vd 2003).

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

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

Sistemde tampon olarak TBE 1X solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler 130 volt akım altında, belirlenen sıcaklıkta baz çifti uzunluklarına göre 10-14 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. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenmiştir.

Bu yöntemle taranan *TMHS* ve *TRPA1* genlerinin ekzon sayısı, ekzonlara özgü oligonükleotid dizileri, ekzon boyutları, Ts değerleri ve oligonükleotidlerin optimize olduğu PCR koşulları Çizelge: 2.3 ve 2.4 'de verilmiştir.

Çizelge 2.3: *TMHS* geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon boyutu (bp)
Ekzon 1	F: 5' GCCTCCATCCACAAAGCTAC3'	R: 5' GAAGGCTCTAGAGGGGATGG3'	Program 1	349
Ekzon 2	F: 5' GGAGAAGGGAGGTGACAACA3'	R: 5' GGACACCATTGTGGAGTTGG3'	Program 1	365
Ekzon 3	F: 5' TGGAGATGGAGTAGTGTGCAG3'	R: 5' CAAGCAGCATCACAGCCTTA3'	Program 1	230

Program 1: 95°C'de 5 dk ardından 20 döngü 94°C'de 1 dk, 68°C'de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C'de 1 dk, 20 döngü 94°C'de 1 dk, 58°C'da 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Techne, Almanya).

Çizelge 2.4: *TRPA1* geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon boyutu (bp)	Ts değerleri
Ekzon 1	F:5AAGGAGCTCCGCGTTTCTAC3'	R:5CACGCTTTCICCAAACCAAG3'	Program 1	346	26,613
Ekzon 2	F:5TTTTCATAIGCTIGTTGG3'	R:5TGGGATGAATGATTCTGGA 3'	Program 2	246	11,073
Ekzon 3	F:5AATACAGICTAAGCAAAATTAATCCA3'	R:5TTTGGAGCCGCCAGTAG3'	Program 1	248	14,251
Ekzon 4	F:5CATGGTCCCTGGTATTGAA 3'	R: 5TGAAAAGATAAAGAAGCAGACAGA 3'	Program 1	250	13,324
Ekzon 5	F: 5' TTGCGATTGGGGTTAACT 3'	R: 5'TCAAATTAATAGCATCCACAAAA 3'	Program 1	228	11,81
Ekzon 6	F:5TTTGTTAATGTTAATGTTATTCTIC3'	R: 5TTGGGATATCTCTGTGTTCTGC 3'	Program 1	334	12,368
Ekzon 7	F:5TTCTTTCATTGAGATTTAAACATTGA 3'	R: 5TTCACATGAAGATGAAAAATCTG 3'	Program 1	240	16,876
Ekzon 8	F:5TTCACCTTCCGAATATAGTAGCTTT 3'	R: 5TTGTTTCATTTTIGAAAATCCATA 3'	Program 1	231	9,463
Ekzon 9	F:5TTTCTAAGCCTTTGTTGAATGG3'	R:5AGATGGTGGCACACAATGAA3'	Program 1	240	16,409
Ekzon 10	F:5TGAAAATCCACGTAACATTGC3'	R:5CAACTCAGTTAATGGCAATCCA 3'	Program 1	206	9,199
Ekzon 11	F:5AAACCATCATATTAGCATAATAGCAGA3'	R:5GGTTTCATAATTTCAAGGCAAA 3'	Program 1	300	13,113
Ekzon 12	F:5TTTGCTTGAATAATGAAACC-3'	R:5TGAAAAGATAGCCTGAAAATGG 3'	Program 1	267	12,047
Ekzon 13	F:5CATCCCGCATTTTCATCTGTT 3'	R:5GAGTTTTCTGGCAATGTTGGA 3'	Program 1	244	19,65
Ekzon 14	F:5TCACCACGTTTCTGTGTC3'	R:5GAACACTAAATGACAGTGGACAGG 3'	Program 1	238	22,648
Ekzon 15	F:5CAGAAGGATGAAGACCTGTGC 3'	R:5CCCGGAAGAATTTGTGTTT 3'	Program 1	172	12,64
Ekzon 16	F:5GCCCAATATCTTAGCTGGTT 3'	R:5CACTGACAGTACAGATCAA3'	Program 1	197	13,181
Ekzon 17	F:5TTGGGATTCATCTACTGACTAACTG3'	R:5TGTGCACATGACCTAAACTT 3'	Program 1	245	13,283
Ekzon 18	F:5CCAAACACAGTTATAAAACCAGACA 3'	R:5TTGAAGGCTTTGTAATAGATCAA 3'	Program 1	231	11,059
Ekzon 19	F:5TGACTCAATCTGGTTTGCTT 3'	R:5TGATATGTCAGATTTATTATGGGTTT 3'	Program 1	288	12,352
Ekzon 20	F:5TGAAAATTATGAAATGTTAAAGTGT 3'	R:5TCTGCATATGAAAATATGTGCAAC 3'	Program 1	211	9,340
Ekzon 21	F:5TTGATTACGGGGTCAATG3'	R:5AAAATGCTTAAAGGATGIGGAAA-3'	Program 1	295	14,81
Ekzon 22	F:5TTGTCACTGAATGAATACACTTTGA 3'	R:5TTCCATAAATTCACAGGCACAA 3'	Program 1	243	12,132
Ekzon 23	F:5TGCATTTTCAATTTGACCTACC3'	R:5TGTTCAAAATGATCAACAAACAGA3'	Program 1	264	20,59
Ekzon 24	F:5TGCATTTTAGGTTGACCAATT 3'	R:5AAATGCCCATTTTGTACTTG 3'	Program 2	215	14,25
Ekzon 25	F:5ATGATTGCCTCTGTGCCATA 3'	R:5TGAATGAATGTCAAACAGTGTCA 3'	Program 1	247	10,86
Ekzon 26	F:5TTGAATTTGGCACATGCTT 3'	R:5GATTGTGCATTATTATTATGAGTTT 3'	Program 1	239	9,23
Ekzon 27	F:5GAAGGGCTAAAAGAAGAACTGAAA 3'	R:5CCCCATTAGAAGCCTCAC3'	Program 1	300	11,85

Program1: 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk, 65°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C’de 1 dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk, 55°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program2: 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).

2.2.8. DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada istenen DNA parçacığının nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger’in dideoksi-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 C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/mL’lik Glikojen) ve 60 µL %95’lik soğuk etanol eklenerek +4°C’de 14000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir (Hettich, Almanya). Üstteki kısım dökülerek %70’lik alkolden 200 µL eklenmiş, +4°C’de 14000 rpm’de 5 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.

GJA7 geninde mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre 438 numaralı ailede etkilenmiş bireylerden birine doğrudan DNA dizi analizi yapılmıştır.

Çizelge 2.5: *GJA7* genin amplikonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları

Amplikon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Amplikon boyutu (bp)
Amplikon 1	F: 5'TCAAGTATTCAAAGCAGTAGTTCCT 3'	R: 5' CGGCTGTTCTGTGTTGCAC 3'	Program 1	296
Amplikon 2	F: 5'GGGGAAGATCTGGCTCACT 3'	R: 5' GCCTTCTTGCTGCTTCACC 3'	Program 1	273
Amplikon 3	F: 5' AGATTGCCAAAATGGAGCAC3'	R: 5'GAAAACCCACCTCAAACAGG 3'	Program 1	282
Amplikon4	F: 5' CTGCAAGGACCGT 3'	R: 5' GGATCCTCCAAGTTC 3'	Program 2	269
Amplikon5	F: 5' CCACTGAAAAGACCATCTTCC 3'	R: 5' GCCTTGTTTGGCTGTAGGC	Program 1	274
Amplikon6	F: 5' CCCCTGGCTATAACATTGCT	R: 5' TTTGCTACTGGCAGTGCTTT 3'	Program 1	299
Amplikon7	F: 5' TCAGGCCTACAGTCACCAAA 3'	R: 5' AGAGTCCCCTGAGCTTGAT 3'	Program 1	274

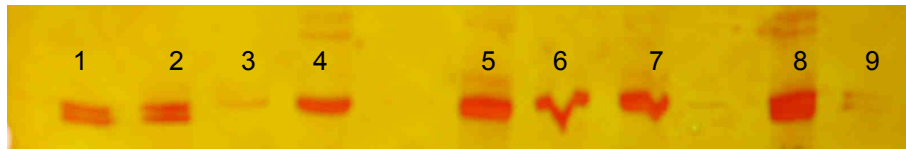
Program1: 95°C'de 5 dk ardından 20 döngü 94°C'de 1dk, 65°C'de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde, 72°C'de 1 dk, 20 döngü 94°C'de 1 dk, 55°C'da 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program2: 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).

3.BULGULAR

3.1. *TMHS* Geni

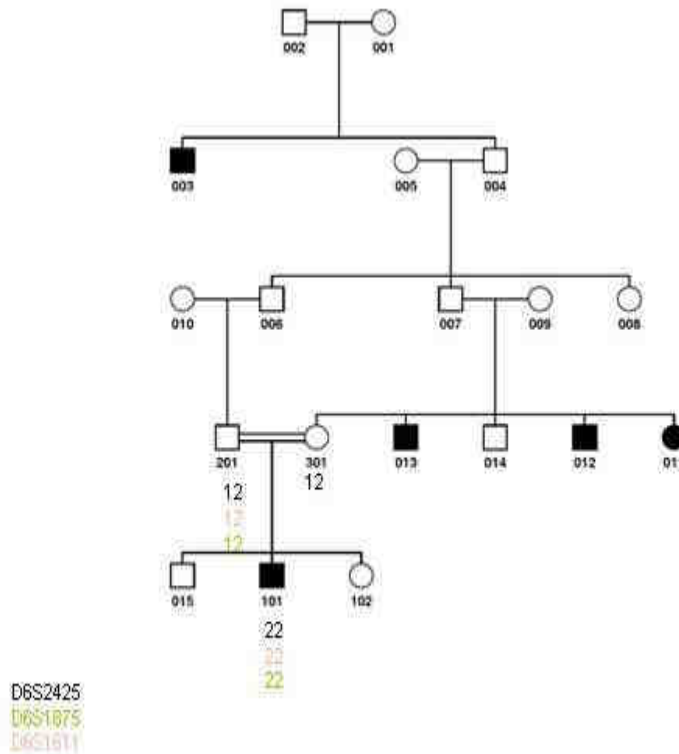
D6S2425, D6S1875, D6S1611 ve D6S2128 mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre toplam 4 ailenin (061, 675, 714, 717 no'lu aileler) etkilenmiş bireylerinin aynı alel için homozigot olduğu gösterilmiştir.



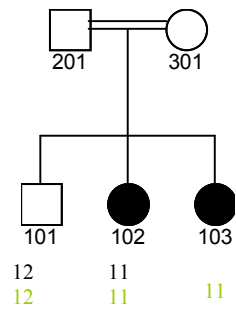
Şekil 3.1. *TMHS* geni için kullanılan D6S1875 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 2, 5, 8, 9 numaralı bireyler heterozigot; 3, 4, 6, 7 numaralı bireyler homozigot olarak tespit edilmiştir.

TMHS geninde mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonucunda SSCP yöntemi ile mutasyon analizi için seçilen ailelerin aile ağaçları ve genotipleme analizi sonuçları Şekil 3.2'de verilmiştir.

a.

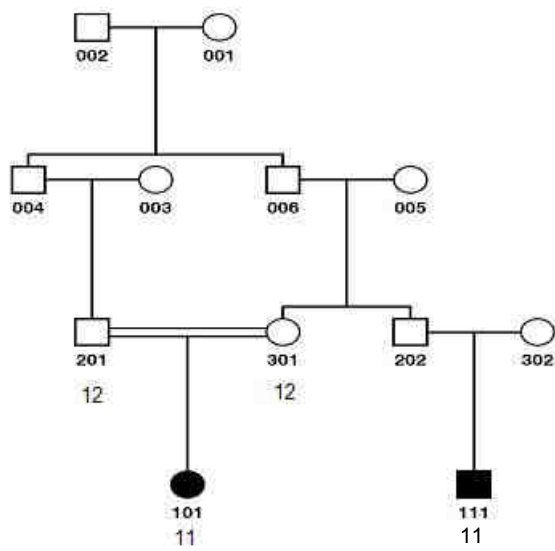


b.



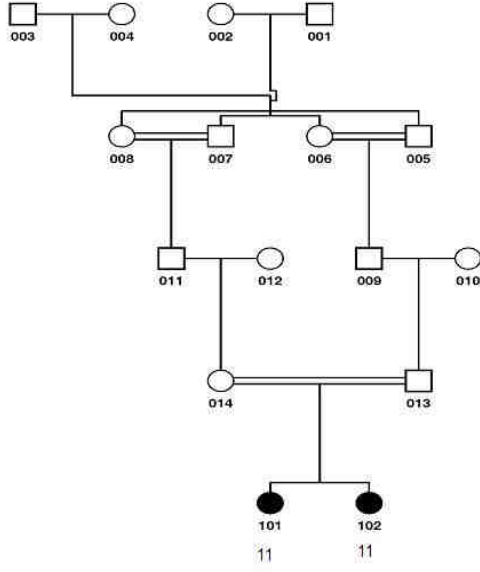
D6S2425
D6S1875

c.



D6S2425

d.



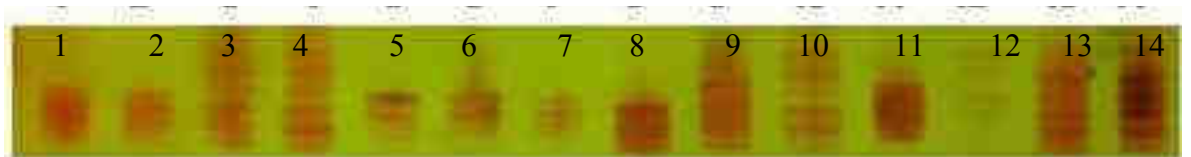
D6S2425

Şekil 3.2: a-061, b-675, c-714, d-717 numaralı ailelerin aile ağaçları ve mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizleri.

Bu mikrosatellit verileri doğrultusunda 4 ailenin (061, 675, 714, 717 no'lu aileler) etkilenmiş bireylerine SSCP analizi yapılmış fakat bant farklılığı gösteren birey tespit edilememiştir.

3.2. *TRPA1* Geni

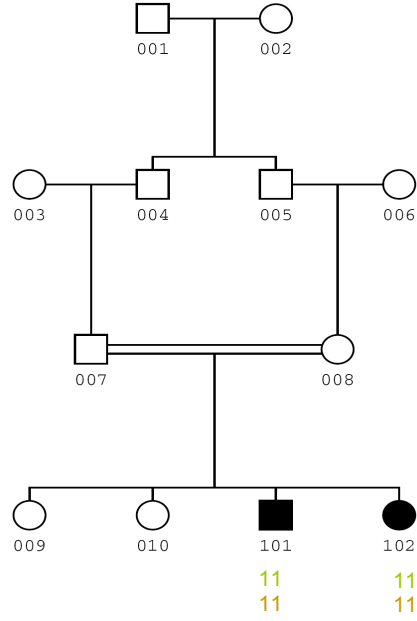
TRPA1 geninde D8S530, D8S1776, D8S1807 ve D8S279 mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre 063, 638 ve 740 numaralı ailelerin etkilenmiş bireyleri kullanılan belirteçler için homozigot olarak tespit edilmiştir.



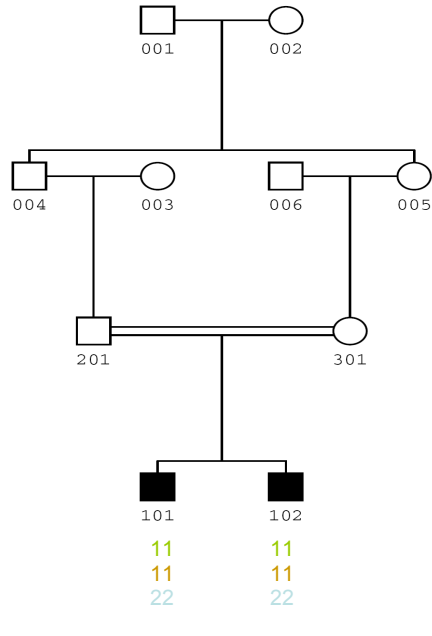
Şekil 3.3. *TRPA1* geni için kullanılan D6S1875 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 2, 5, 6, 7, 11 numaralı bireyler homozigot; 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14 numaralı bireyler heterozigot olarak tespit edilmiştir.

TRPA1 geninde mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonucunda SSCP ile mutasyon taramasına kalan ailelerin aile ağaçları aşağıda verilmiştir.

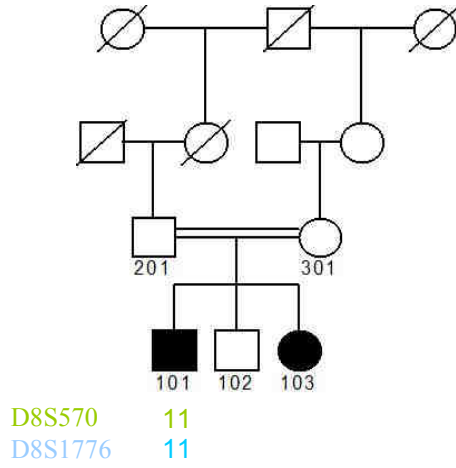
a.



b.

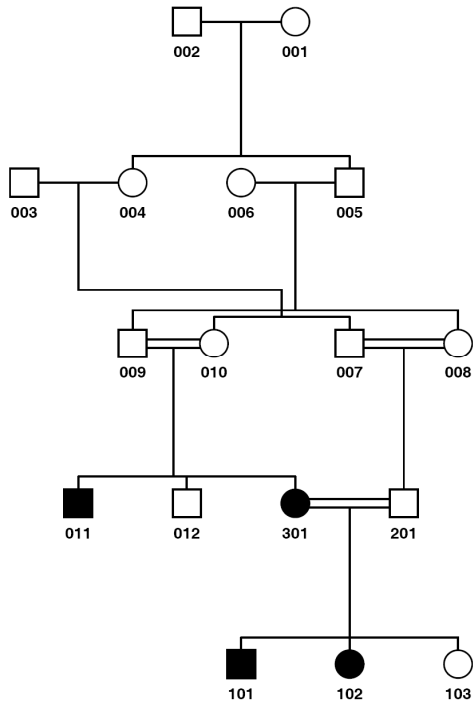


c.



Şekil 3.4. a.063, b.638 ve c.740 numaralı ailelerin aile ağaçları

Yapılan 10K mikrodizin analizi sonuçlarına göre ise 564 numaralı ailede *TRPA1* genini içine alan bölgede homozigot bloklar tespit edilmiştir. 564 numaralı ailenin aile ağacı şekil 3.5'te ve bu ailenin mikrodizin analizi verileri çizelge 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5. 564 numaralı ailenin aile ağacı

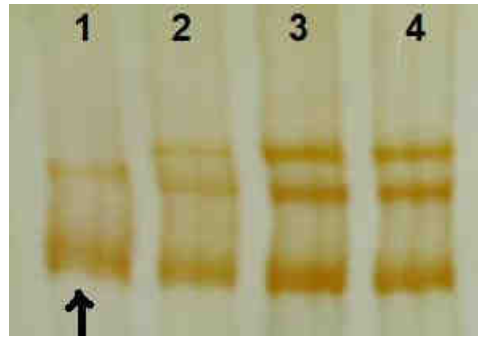
Çizelge 3.1: 564 numaralı ailede TRPA1 geninin olduğu bölgenin 10K mikrodizin analizi

SNP No	Kromozom No	Lokalizasyon	564-101	564-102
SNP-A-1518181	8	64607420	BB	BB
SNP-A-1514650	8	64703039	BB	BB
SNP-A-1511121	8	64881386	BB	BB
SNP-A-1511174	8	64881497	BB	BB
SNP-A-1514677	8	65188320	BB	BB
SNP-A-1508364	8	65377940	NoCall	NoCall
SNP-A-1517927	8	65530781	AA	AA
SNP-A-1510010	8	67096174	BB	BB
SNP-A-1512644	8	67387124	AA	AA
SNP-A-1512053	8	67387437	AA	AA
SNP-A-1511226	8	68812139	BB	BB
SNP-A-1519728	8	69712752	AA	AA
SNP-A-1513987	8	70070765	BB	BB
SNP-A-1516245	8	70313106	AA	AA
SNP-A-1508672	8	70314439	AA	AA
SNP-A-1512960	8	70314606	AA	AA
SNP-A-1509415	8	70628049	BB	BB
SNP-A-1509707	8	70795945	AA	AA
SNP-A-1515904	8	70887465	AA	AA
SNP-A-1508583	8	71089232	BB	BB
SNP-A-1508946	8	71089425	BB	BB
SNP-A-1515200	8	71398521	BB	BB
SNP-A-1509866	8	72019074	BB	BB
SNP-A-1509308	8	72063328	AA	AA
SNP-A-1514184	8	72131984	BB	BB
SNP-A-1514088	8	72139601	BB	BB
SNP-A-1518058	8	72728710	BB	BB
SNP-A-1518008	8	72728798	AA	AA
SNP-A-1512048	8	72973875	BB	BB
SNP-A-1517535	8	72974133	BB	BB
SNP-A-1509924	8	72978711	AA	AA
trpa1	8	73096040		
SNP-A-1508633	8	73120270	BB	BB
SNP-A-1510583	8	73275673	BB	BB
SNP-A-1509319	8	73530548	AA	AA
SNP-A-1519656	8	73847644	NoCall	NoCall
SNP-A-1512945	8	74252292	BB	BB
SNP-A-1516711	8	75170824	AA	AA
SNP-A-1508518	8	75985406	BB	BB
SNP-A-1516707	8	76200122	BB	BB
SNP-A-1519215	8	76930031	AA	AA
SNP-A-1515355	8	76930139	AA	AA
SNP-A-1511862	8	77094719	BB	BB
SNP-A-1519747	8	77949261	BB	BB
SNP-A-1511516	8	77982412	BB	BB
SNP-A-1512119	8	77983105	BB	BB
SNP-A-1508727	8	78662620	BB	BB
SNP-A-1516867	8	78714257	AA	AA
SNP-A-1518096	8	78820682	AA	AA
SNP-A-1514301	8	78855942	AA	AA
SNP-A-1514214	8	78856091	BB	BB
SNP-A-1517846	8	78930729	BB	BB
SNP-A-1511031	8	79737728	BB	BB
SNP-A-1510772	8	81209405	BB	BB
SNP-A-1511289	8	81209532	BB	BB
SNP-A-1509475	8	81210174	AA	AA

SNP-A-1507360	8	82281514	BB	BB
SNP-A-1514963	8	82634163	AA	AA
SNP-A-1510617	8	82936427	NoCall	BB
SNP-A-1511650	8	83110505	AA	AA
SNP-A-1512577	8	83607159	BB	BB
SNP-A-1515203	8	83850716	BB	BB
SNP-A-1515118	8	83850934	AA	AA
SNP-A-1509898	8	84082659	NoCall	NoCall
SNP-A-1516272	8	84263681	AA	AA
SNP-A-1511392	8	84442439	BB	BB
SNP-A-1512206	8	84487931	AA	AA
SNP-A-1514220	8	85231420	AA	AA
SNP-A-1510045	8	85990298	AA	AA
SNP-A-1509597	8	86454138	AA	AA
SNP-A-1511440	8	87218471	AA	AA
SNP-A-1518377	8	87218622	AA	AA
SNP-A-1519507	8	88238813	AA	AA
SNP-A-1510663	8	88858271	BB	BB
SNP-A-1510302	8	89227035	BB	AB

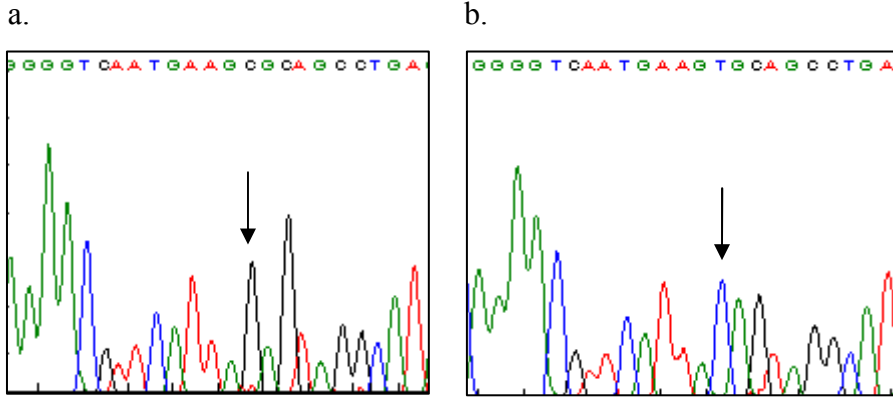
564 numaralı ailede *TRPA1* genini içine alan bölgede mikrodizin analizi sonucunda homozigot blok tespit edilmesi üzerine bu ailenin etkilenmiş bireyleri; D8S530, D8S1776, D8S1807 ve D8S279 mikrosatellit belirteçleri ile taranmış fakat *TRPA1* genine bağlantı tespit edilememiştir.

Mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre 063, 638 ve 740 numaralı ailelerin homozigot olarak tespit edilen etkilenmiş bireylerinde *TRPA1* geninin 27 ekzonu SSCP yöntemi ile taranmıştır. 740 numaralı ailenin etkilenmiş bireyinde 1. ekzonda bant farklılığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.6: *TRPA1* geni 1.eksonun SSCP jel görüntüsü. Okla işaretlenen 740 numaralı ailenin hasta bireyi.

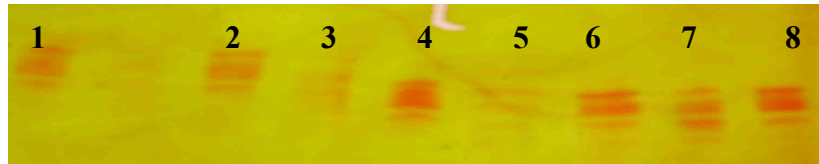
Bu gende SSCP ile tarama sonucunda birinci ekzonda bant farklılığı tespit edilen bireye (740-101) DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda p.Arg3Cys (c.7C>T)değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.7: a. 063-101 (normal) bireyde *TRPA1* geni 1.ekzon DNA dizi analizi görüntüsü.
b. 740-101(polimorfik) bireyde *TRPA1* geni 1.ekzon DNA dizi analizi görüntüsü

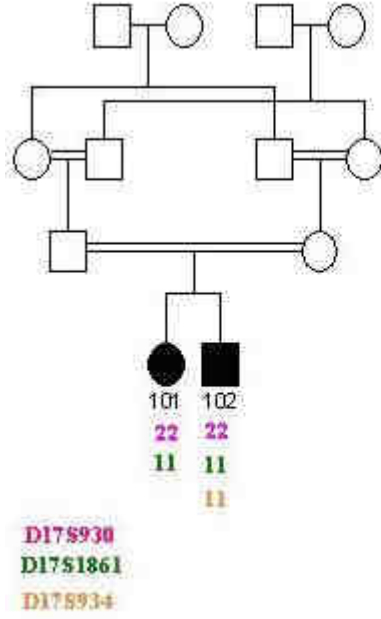
3.3 *GJA7* Geni

Toplam 66 aile *GJA7* geni için D17S1861, D17S930, D17S934 ve D17S965 mikrosatellit belirteçleri ile taranmış ve 1 ailede (435) iki etkilenmiş bireyin aynı alel için homozigot, sağlıklı bireylerin ise heterozigot veya diğer alellere homozigot olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.8: *GJA7* geni için kullanılan D17S934 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 5,6,8 numaralı bireyler homozigot, 1, 2,3,4 ve 7 numaralı bireyler heterozigot olarak bulunmuştur.

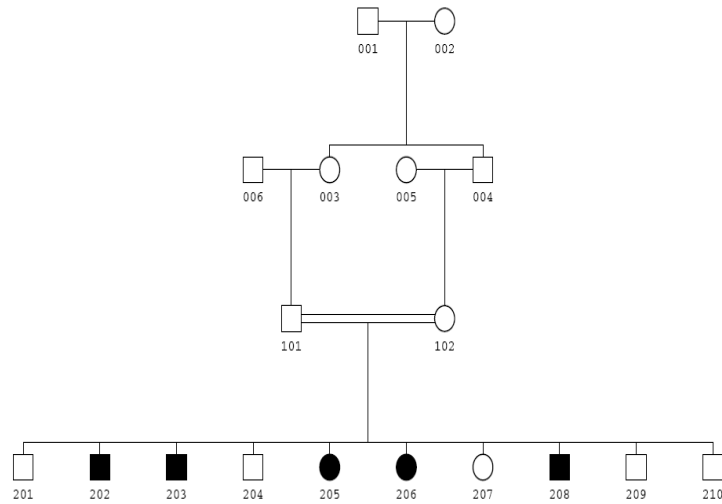
GJA7 geninde mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçlarına göre mutasyon taramasına kalan 435 numaralı ailenin aile ağacı aşağıda verilmiştir.



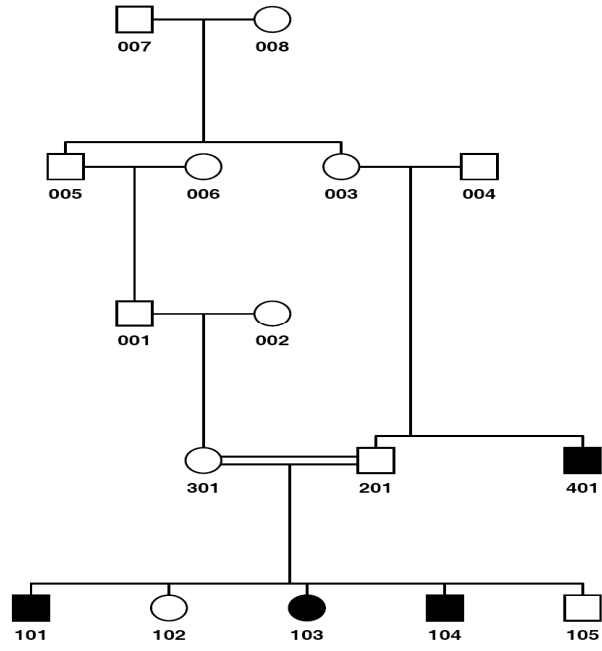
Şekil 3.9: 435 numaralı ailenin aile ağacı ve mikrosatellit belirteçleri ile yapılan genotipleme analizi sonuçları

Kullanılan tüm mikrosatellit belirteçleri için homozigot olduğu tespit edilen 435 numaralı ailede etkilenmiş bireylerden birine genin kodlayan tek ekzonu (7 amplikonu) olması nedeni ile doğrudan dizi analizi yapılmış olup herhangi bir değişim saptanamamıştır. 10K mikrodizin analizi çalışmalarında *GJA7* geni çevresinde homozigot blok saptanan ailelerin aile ağaçları şekil 3.10 ve mikrodizin analizi verileri çizelge 3.2’de verilmiştir.

a.



b.

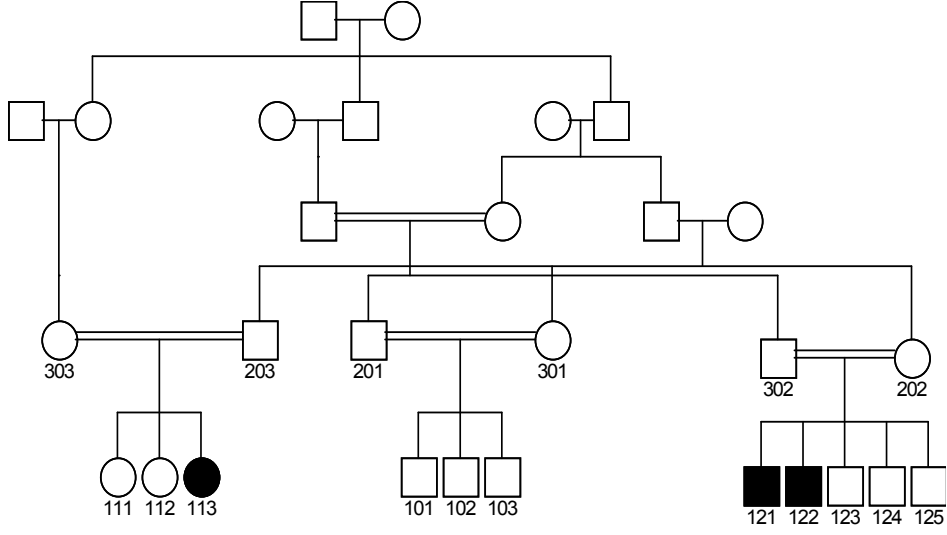


Şekil 3.10: a.555 ve b.006-010 numaralı ailelerin aile ağaçları

Çizelge 3.2: 555, 006 ve 010 numaralı ailelerde 10K mikrodizin analizi sonuçları

SNP No	Kromozom No	Lokalizasyon	555-205	555-206		006-101	006-102	010-103	010-104
SNP-A-1514843	17	22760442	AA	AA		BB	AB	AB	AA
SNP-A-1517957	17	22802254	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1516484	17	22839015	NoCall	NoCall		NoCall	AA	AB	BB
SNP-A-1509106	17	23026451	BB	BB		AB	AB	AB	BB
SNP-A-1519570	17	23092869	BB	BB		AB	AB	AB	BB
SNP-A-1519629	17	23092917	BB	BB		AB	AB	AB	BB
SNP-A-1511117	17	24488142	BB	BB		AB	BB	AB	BB
SNP-A-1514918	17	25122345	AA	AA		AB	BB	AB	BB
SNP-A-1518339	17	25755541	AA	AA		AB	BB	AB	BB
SNP-A-1509158	17	26887999	BB	BB		AB	AB	AB	AA
SNP-A-1508697	17	26955730	BB	BB		AA	AB	AA	AA
SNP-A-1511792	17	27014232	AA	AA		BB	AB	BB	BB
SNP-A-1510018	17	28713731	AA	AA		AA	AB	AA	AA
SNP-A-1509973	17	28813156	AA	AA		AA	AA	AB	BB
SNP-A-1511086	17	28813215	BB	BB		AB	AA	BB	BB
SNP-A-1514742	17	28942170	AA	AA		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1514696	17	28942222	BB	BB		NoCall	AA	NoCall	AA
SNP-A-1511630	17	29183029	BB	BB		BB	BB	AB	AA
SNP-A-1514598	17	29615779	BB	BB		AB	AB	AB	BB
SNP-A-1509571	17	29706619	AA	AA		AB	AB	AB	AA
SNP-A-1511602	17	30539277	AA	AA		AA	AA	AA	AA
SNP-A-1512952	17	30711529	BB	BB		BB	BB	AB	AB
SNP-A-1508646	17	30770914	BB	BB		AA	AA	AB	AB
SNP-A-1512165	17	31041457	AA	AA		NoCall	BB	NoCall	AB
SNP-A-1514548	17	32663038	AA	AA		AA	AA	AA	AA
SNP-A-1510500	17	33248878	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1517714	17	34169959	BB	BB		AB	AB	BB	BB
SNP-A-1519053	17	34693022	BB	BB		AB	AB	AB	AB
SNP-A-1510501	17	36182069	BB	BB		AB	AB	AB	AB
SNP-A-1512602	17	36518826	BB	BB		AA	AA	AA	AA
SNP-A-1517295	17	36815436	BB	BB		AA	AA	AB	AB
SNP-A-1510482	17	36902470	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1514279	17	39115918	AA	AA		BB	BB	BB	BB
GJA7	17	40231342							
SNP-A-1517162	17	40352675	AA	AA		AA	AA	AA	AA
SNP-A-1509246	17	40668676	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1512253	17	41412603	AA	AA		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1512303	17	41412669	AA	AA		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1516464	17	42522367	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1518359	17	43381030	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1518025	17	44162133	AA	AA		AA	AA	AB	AA
SNP-A-1518631	17	45647724	AA	AA		BB	BB	AB	AB
SNP-A-1508286	17	47396100	AA	AA		AB	AB	AA	AA
SNP-A-1507604	17	47542451	AA	AA		AB	AB	AB	BB
SNP-A-1518872	17	47810325	BB	BB		AB	AB	BB	BB
SNP-A-1516550	17	47925935	BB	BB		BB	BB	AB	BB
SNP-A-1512133	17	47934288	AA	AA		AB	AB	AA	AA
SNP-A-1514050	17	48020820	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1518441	17	48076070	AA	AA		AA	AA	AA	AA
SNP-A-1510210	17	48168557	BB	BB		BB	BB	AB	BB
SNP-A-1515285	17	48416713	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1517420	17	48497919	BB	BB		AB	AB	BB	BB
SNP-A-1517479	17	48498517	AA	AA		AB	AB	AA	AA
SNP-A-1510277	17	48561694	NoCall	BB		AB	AB	NoCall	BB
SNP-A-1514837	17	48608529	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1510428	17	48608764	BB	BB		AB	AB	BB	BB
SNP-A-1516160	17	48730410	AA	AA		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1509607	17	49029601	BB	BB		BB	BB	BB	BB
SNP-A-1516050	17	49253291	AA	AA		AB	AB	BB	BB
SNP-A-1517754	17	49427482	BB	BB		AB	AB	AA	AB
SNP-A-1517744	17	49668269	AA	AA		AB	AB	AA	AB
SNP-A-1519754	17	50007384	AA	AA		BB	BB	AB	AB
SNP-A-1513862	17	50052312	BB	BB		BB	BB	AB	BB
SNP-A-1513976	17	50052572	AA	AA		AB	AB	AA	AA
SNP-A-1514705	17	50112164	AA	AA		AB	AB	AA	AB

Aynı gen için 50K mikrodizin analizi yapılan 651 numaralı ailenin aile ağacı şekil 3.11 ve 50K mikrodizin analizi sonuçları çizelge 3.3'te verilmiştir.



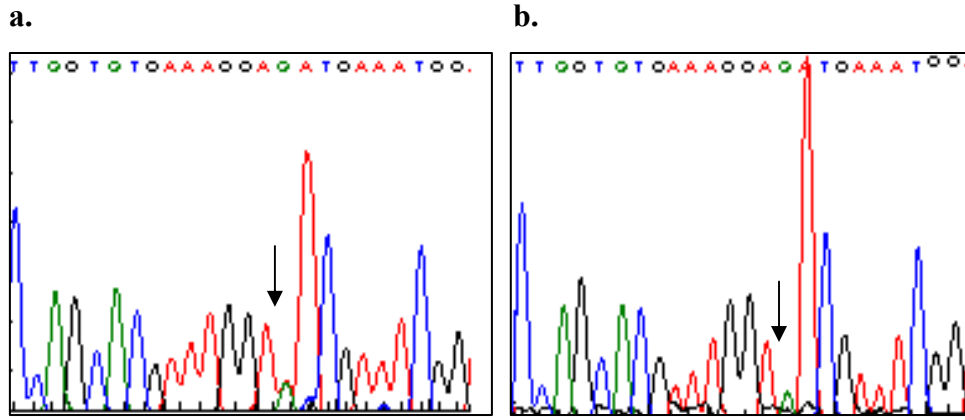
Şekil 3.11: 651 numaralı ailenin aile ağacı

Çizelge 3.3: 651 numaralı ailede 50K mikrodizin analizi sonuçları

SNP No	Kromozom No	Lokalizasyon	651-122	651-113	651-112	651-121	
SNP-A-1746885	17	36741043	BB	AB	BB	BB	
SNP-A-1701579	17	36815436	AA	BB	AA	AA	
SNP-A-1683002	17	36892433	BB	NoCall	BB	BB	
SNP-A-1648922	17	36893129	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1754640	17	36902470	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1710736	17	36964372	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1702629	17	38035609	AA	AA	AB	AA	
SNP-A-1672638	17	38399053	AB	AA	AB	AB	
SNP-A-1746751	17	39007602	AB	BB	BB	AB	
SNP-A-1757956	17	39115918	AA	NoCall	AB	AA	
SNP-A-1707267	17	39171292	AA	BB	AA	AA	
SNP-A-1711800	17	39224665	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1642975	17	39462291	AB	AB	BB	AB	
SNP-A-1729944	17	39463877	AB	AB	AA	AB	
SNP-A-1674823	17	40203620	AB	BB	BB	AB	
GJA7	17	40231342	40,231,342 - 40,263,133				
SNP-A-1673024	17	41065198	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1706257	17	41085215	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1658840	17	41089766	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1671704	17	41090087	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1664764	17	41128323	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1715435	17	41128868	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1694345	17	41128907	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1713738	17	41129031	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1732165	17	41157478	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1675481	17	41158754	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1730200	17	41388634	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1709519	17	41388781	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1735242	17	41391205	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1715381	17	41391544	AA	AA	NoCall	AA	
SNP-A-1655555	17	41406176	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1698781	17	41412603	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1732478	17	41419081	NoCall	AA	AA	AA	
SNP-A-1665942	17	41419230	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1657710	17	41420045	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1675427	17	41472797	AA	NoCall	AA	AA	
SNP-A-1655227	17	41473244	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1653680	17	41474846	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1668891	17	41475485	NoCall	AA	AA	AA	
SNP-A-1756935	17	41491195	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1712011	17	41539399	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1736709	17	41562424	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1690575	17	41563664	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1752147	17	41578112	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1657435	17	41704075	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1712697	17	42155230	BB	BB	BB	BB	
SNP-A-1671088	17	42233432	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1703045	17	42342260	AA	NoCall	AA	AA	
SNP-A-1740111	17	42345644	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1668166	17	42450677	BB	NoCall	BB	BB	
SNP-A-1684178	17	42457412	NoCall	AA	NoCall	AA	
SNP-A-1647184	17	42521055	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1710918	17	42521125	AA	AA	NoCall	AA	
SNP-A-1744881	17	42619379	AA	AA	AA	AA	
SNP-A-1671738	17	42697128	NoCall	AB	AB	AB	

Mikrodizin analizi sonucu homozigot blok tespit edilen ailelerde (006-010, 555 ve 651) hasta bireylere doğrudan DNA dizi analizi yapılmış olup 651-122 ve 555-208 numaralı etkilenmiş bireylerde 6. amplikonda p.Asp297Asn heterozigot (c.889 G>A) değişimi

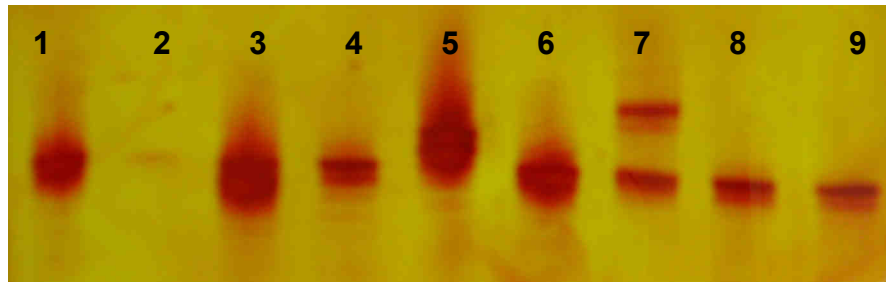
saptanmıştır. Bu heterozigot değişim aspartik asidi asparajine dönüştürmektedir. 006-10 numaralı ailede ise yapılan DNA dizi analizi sonucu herhangi bir değişim saptanamamıştır.



Şekil 3.12: a. *GJA7* geni altıncı amplikonda p.Asp297Asn heterozigot (c.889 G>A) değişimi taşıyan bireylerin DNA dizi analizi görüntüsü b. *GJA7* geni altıncı amplikon normal bireyde DNA dizi analizi görüntüsü

3.4. *SLC12A2* Geni

Toplam 66 aile *SLC12A2* geni için D5S490, D5S615, D5S809, D5S2078 mikrosatellit belirteçleri ile taranmış ve etkilenmiş tüm bireylerin aynı allel için homozigot olduğu bir aile tespit edilememiştir. Mikrodizin analizi yapılan ailelerde de bu gen çevresinde homozigot blok oluşturan aile de bulunamamıştır.



Şekil 3.13. D5S2078 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 2, 4, 6, 8 ve 9 numaralı bireyler homozigot; 3, 5 ve 7 numaralı bireyler heterozigot olarak tespit edilmiştir

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı; otozomal resesif sendromik olmayan işitme engelli aileler taranarak insanda işitme kaybı nedeni olabilecek dört aday genin (*TMHS*, *TRPA1*, *GJA7*, *SLC12A2*) işitme kaybı geni olup olmadıklarının ortaya konulması olmuştur. Bu amaçla toplam 66 aile mikrosatellit belirteçleri ile genotiplenmiş, üç veya daha fazla etkilenmiş bireye sahip 51 aile mikrodizin analizi yöntemi ile taranmış, 23 aile ise her iki yöntemle birden taranmıştır.

Bu tarama yönteminin seçilme nedeni araştırmaya dahil edilen 97 ailenin hepsinde anne baba arasında akrabalık olması ve en az 2 çocuk etkilenmiş olduğu için ortak atadan kalıtılmış olan mutasyonun homozigot olma olasılığının yüksek olmasıdır. Böylece hasta bireylerde homozigot bölgeler taranarak mutasyonun nerede olduğu hakkında bilgi edinilmektedir. “Homozigotluk haritalaması” denen bu yöntem bugüne kadar işitme kaybı genlerinin çoğunun bulunmasını sağlamıştır. Bu yöntem sayesinde 97 ailenin hepsinde aday genlerin doğrudan taranması yerine ön tarama yapılmış ve gen lokusu ile birlikte segregasyon gösteren ailelerde tarama yapılmıştır. Ancak mümkün olduğu kadar çok sayıda aileyi taramaya alabilmek için klasik bağlantı analizi yöntemleri kullanılmamış, bunun yerine etkilenmiş bireylerde belirteçlerin homozigot olması taramaya alınma için yeterli bir kriter olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle bazı ailelerde polimorfik belirteçler homozigot olduğu halde mutasyon bulunamaması, mutasyonları tarama yöntemi ile gözden kaçırdığımızdan çok ailede o gende mutasyon olmadığına işaret etmektedir. Doğaldır ki bu yöntemle otozomal dominant kalıtılabilecek mutasyonlar saptanamaz. Ayrıca birleşik heterozigot olarak kalıtılan otozomal resesif mutasyonlar da homozigotluk tarama yöntemi ile gözden kaçabilir. Uygulanan tarama yönteminde mikrodizin analizi ile genom ancak belli aralıklarla tarandığından, homozigot blokların küçük olması halinde o gende mutasyon olduğu halde yakalanamaz.

TMHS geni bu çalışmada henüz taranmaya başlamadan önce Shabbir ve arkadaşları (Shabbir vd 2006) tarafından bu gende işitme kaybına neden olan 2 farklı mutasyon bildirilmesi *TMHS* geninin aday olarak seçilmesindeki isabeti desteklemektedir.

TRPA1 geninde 740 numaralı ailede yapılan DNA dizi analizi sonucunda p.Arg3Cys (c.7C>T) değişimi homozigot olarak tespit edilmiştir. Bu değişimin bir mutasyon olup olmadığını tespit etmek için öncelikle “www.ensembl.org” internet sitesinden genin

SNP'leri de içeren transkript dizisine ulaşılmış ve bu değişimin daha önce tanımlanmış bir polimorfizm olduğu görülmüştür. Doğrulama amacı ile Conseq Server adı verilen internet tabanlı bir program kullanılmıştır (<http://conseq.tau.ac.il>). Bu programa proteinin amino asit dizisi "Fasta" formatında girilmekte, program her amino asit için bu bölgenin evrim boyunca korunmuşluğu ve proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak 1-9 arasında bir profil skoru hesaplamakta ve amino asidin hangi amino aside değişebileceğini göstermektedir. Dokuza yaklaşan değerler korunmuşluğun yüksek olduğunu göstermektedir. Bu program tarafından p.Arg3Cys değişimi için profil skoru 3 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. 740-101 numaralı bireyde p.Arg3Cys değişimi için Conseq Server veri tabanı ile yapılan analiz

Pozisyon	Amino asit	Profil Skoru	Rezidü Çeşidi
1	M	6	M
2	K	5	K,L
3	R	3	C,H,R
4	S	4	G,L,S
5	L	5	A,L
6	R	5	A,R
7	K	5	K,R
8	M	2	E,I,M,V
9	W	3	G,L,W
10	R	5	H,L,R

Aynı veri tabanında yapılan hizalama analizi sonucu değişimin olduğu bölgenin evrim boyunca korunmadığı da görülmüştür.

Mikrodizin analizi verileri incelendiğinde toplam üç ailede (006-010, 555 ve 651) *GJA7* geninin bulunduğu bölgede homozigot bloklar tespit edilmiş ve buna bağlı olarak her aileden bir etkilenmiş bireyde *GJA7* geni DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır, 651-122 ve 555-208 numaralı etkilenmiş bireylerde 6. amplikonda p.Asp297Asn (c.889G>A) heterozigot değişimi saptanmıştır. Bizi bu ailelerde *GJA7* geninde mutasyon olabileceğine yönelten homozigot bölgeler olduğu için, heterozigot bir değişimin işitme kaybından sorumlu olamayacağı düşünülmüştür. Daha önce bildirilmemiş olan bu heterozigot değişim

aspartik asidi asparajine dönüştürmektedir. 006-10 numaralı ailede ise yapılan DNA dizi analizi sonucu herhangi bir değişim saptanamamıştır. Bu heterozigot değişim öncelikle “www.ensembl.org” internet sitesinden genin SNP’leri de içeren transkript dizisinden taranmış ve daha önce bildirilmemiş olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda değişimin daha önce bildirilmemiş bir polimorfizm olduğu düşünülmüştür. Doğrulama amacı ile yine Conseq Server adı verilen internet tabanlı program kullanılmıştır (<http://conseq.tau.ac.il>). Program bu değişim için profil skorunu 1 olarak hesaplamış ve çok düşük olan bu değer değişimin olduğu bu bölgede aspartik asit yerine her amino asidin gelebilme ihtimali olduğunu göstermektedir. Yine aynı program tarafından yapılan hizalama sonucu o bölgenin evrim boyunca korunmadığı da anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2: *GJA7* geni p.Asp297Asn değişimi için Conseq Server veri tabanı ile yapılan analiz

Pozisyon	Amino asit dizisi	Profil Skoru	Rezidü Çeşidi
290	Y	3	E,F,K,Q,V,Y
291	N	5	D,H,K,N,Q,S,T
292	I	2	I,K,L,P,Q,T
293	A	5	A,C,G,P,S,V
294	V	3	F,I,L,T,V,Y
295	K	2	A,E,G,I,K,P,R
296	P	3	A,K,N,P,S,Y
297	D	1	D,E,K,P,S,V
298	O	1	D,G,L,M,N,Q,R
299	I	2	A,E,G,I,M,N,S
300	Q	2	D,K,L,N,P,Q,R

SLC12A2 geninin D5S490, D5S615, D5S809, D5S2078 mikrosatellit belirteçleri ile taranması sonucu etkilenmiş tüm bireylerin aynı alel için homozigot olduğu bir aile tespit edilememiştir.

Sonuç olarak *TRPA1*, *GJA7* ve *SLC12A2* genlerindeki mutasyonların sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı nedeni olma olasılığının düşük olduğu kanısına varılmıştır. *TMHS* genindeki mutasyonların ise Türk toplumunda yaygın olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abe, S., T. Katagiri, A. Saito-Hisaminato, S. Usami, Y. Inoue, T. Tsunoda and Y. Nakamura. 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., S. Riazuddin, J. Ahmad, S. L. Bernstein, Y. Guo, M. F. Sabar, P. Sieving, A. J. Griffith, T. B. Friedman, I. A. Belyantseva and E. R. Wilcox. 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., T. N. Smith, S. Riazuddin, T. Makishima, M. Ghosh, S. Bokhari, P. S. Menon, D. Deshmukh, A. J. Griffith, T. B. Friedman and E. R. Wilcox. 2002. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet*, 110(6); 527-31.
- Akar, N. 1999. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, AÜTF Antip AŞ Yayınları.
- Avraham, K. B., T. Hasson, K. P. Steel, D. M. Kingsley, L. B. Russell, M. S. Mooseker, N. G. Copeland and N. A. Jenkins. 1995. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet*, 11(4); 369-75.
- Bespalova, I. N., G. Van Camp, S. J. Bom, D. J. Brown, K. Cryns, A. T. DeWan, A. E. Erson, K. Flothmann, H. P. Kunst, P. Kurnool, T. A. Sivakumaran, C. W. Cremers, S. M. Leal, M. Burmeister and M. M. Lesperance. 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., L. M. Peters, S. Riazuddin, S. L. Bernstein, Z. M. Ahmed, S. L. Ness, R. Polomeno, A. Ramesh, M. Schloss, C. R. Srisailpathy, S. Wayne, S. Bellman, D. Desmukh, Z. Ahmed, S. N. Khan, V. M. Kaloustian, X. C. Li, A. Lalwani, M. Bitner-Glindzicz, W. E. Nance, X. Z. Liu, G. Wistow, R. J. Smith, A. J. Griffith, E. R. Wilcox, T. B. Friedman and R. J. Morell. 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.
- Calixto, J. B., C. A. Kassuya, E. Andre and J. Ferreira. 2005. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther*, 106(2); 179-208.

- Chanson, M., B. A. Kotsias, C. Peracchia and S. M. O'Grady. 2007. Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Prog Biophys Mol Biol*, 94(1-2); 233-44.
- Cina, C., J. F. Bechberger, M. A. Ozog and C. C. Naus. 2007. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J Comp Neurol*, 504(3); 298-313.
- Cohen-Salmon, M., S. Maxeiner, O. Kruger, M. Theis, K. Willecke and C. Petit. 2004. Expression of the connexin43- and connexin45-encoding genes in the developing and mature mouse inner ear. *Cell Tissue Res*, 316(1); 15-22.
- Collin, R. W., E. Kalay, M. Tariq, T. Peters, B. van der Zwaag, H. Venselaar, J. Oostrik, K. Lee, Z. M. Ahmed, R. Caylan, Y. Li, H. A. Spierenburg, E. Eyupoglu, A. Heister, S. Riazuddin, E. Bahat, M. Ansar, S. Arslan, B. Wollnik, H. G. Brunner, C. W. Cremers, A. Karaguzel, W. Ahmad, F. P. Cremers, G. Vriend, T. B. Friedman, S. M. Leal and H. Kremer. 2008. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am J Hum Genet*, 82(1); 125-38.
- Corey, D. P., J. Garcia-Anoveros, J. R. Holt, K. Y. Kwan, S. Y. Lin, M. A. Vollrath, A. Amalfitano, E. L. Cheung, B. H. Derfler, A. Duggan, G. S. Geleoc, P. A. Gray, M. P. Hoffman, H. L. Rehm, D. Tamasauskas and D. S. Zhang. 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, 432(7018); 723-30.
- de Kok, Y. J., S. M. van der Maarel, M. Bitner-Glindzicz, I. Huber, A. P. Monaco, S. Malcolm, M. E. Pembrey, H. H. Ropers and F. P. Cremers. 1995. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, 267(5198); 685-8.
- del Castillo, I., M. Villamar, M. A. Moreno-Pelayo, F. J. del Castillo, A. Alvarez, D. Telleria, I. Menendez and F. Moreno. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346(4); 243-9.
- Delmaghani, S., F. J. del Castillo, V. Michel, M. Leibovici, A. Aghaie, U. Ron, L. Van Laer, N. Ben-Tal, G. Van Camp, D. Weil, F. Langa, M. Lathrop, P. Avan and C. Petit. 2006. Mutations in the gene encoding pejkakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet*, 38(7); 770-8.
- Dixon, M. J., J. Gazzard, S. S. Chaudhry, N. Sampson, B. A. Schulte and K. P. Steel. 1999. Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum Mol Genet*, 8(8); 1579-84.

- Donaudy, F., A. Ferrara, L. Esposito, R. Hertzano, O. Ben-David, R. E. Bell, S. Melchionda, L. Zelante, K. B. Avraham and P. Gasparini. 2003. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, 72(6); 1571-7.
- Donaudy, F., R. Snoeckx, M. Pfister, H. P. Zenner, N. Blin, M. Di Stazio, A. Ferrara, C. Lanzara, R. Ficarella, F. Declau, C. M. Pusch, P. Nurnberg, S. Melchionda, L. Zelante, E. Ballana, X. Estivill, G. Van Camp, P. Gasparini and A. Savoia. 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.
- Eisen, M. D. and D. K. Ryugo. 2007. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. *Cell Mol Life Sci*, 64(5); 566-80.
- Finsterer, J. and J. Fellingner. 2005. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69(5); 621-47.
- Furshpan, E. J. and D. D. Potter. 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol*, 145(2); 289-325.
- Grifa, A., C. A. Wagner, L. D'Ambrosio, S. Melchionda, F. Bernardi, N. Lopez-Bigas, R. Rabionet, M. Arbones, M. D. Monica, X. Estivill, L. Zelante, F. Lang and P. Gasparini. 1999. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*, 23(1); 16-8.
- Hasson, T. and M. S. Mooseker. 1994. Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. *J Cell Biol*, 127(2); 425-40.
- <http://conseq.tau.ac.il>.
- <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>.
- <http://www.affymetrix.com>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim>.
- Jin, Z., M. Ulfendahl and L. Jarlebark. 2008. Spatiotemporal loss of K⁺ transport proteins in the developing cochlear lateral wall of guinea pigs with hereditary deafness. *Eur J Neurosci*, 27(1); 145-54.
- Kalay, E., A. Karaguzel, R. Caylan, A. Heister, F. P. Cremers, C. W. Cremers, H. G. Brunner, A. P. de Brouwer and H. Kremer. 2005. Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*, 26(6); 591.

- Kalay, E., Y. Li, A. Uzumcu, O. Uyguner, R. W. Collin, R. Caylan, M. Ulubil-Emiroglu, F. F. Kersten, G. Hafiz, E. van Wijk, H. Kayserili, E. Rohmann, J. Wagenstaller, L. H. Hoefsloot, T. M. Strom, G. Nurnberg, N. Baserer, A. I. den Hollander, F. P. Cremers, C. W. Cremers, C. Becker, H. G. Brunner, P. Nurnberg, A. Karaguzel, S. Basaran, C. Kubisch, H. Kremer and B. Wollnik. 2006. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*, 27(7); 633-9.
- Kelsell, D. P., J. Dunlop, H. P. Stevens, N. J. Lench, J. N. Liang, G. Parry, R. F. Mueller and I. M. Leigh. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628); 80-3.
- Khan, S. Y., Z. M. Ahmed, M. I. Shabbir, S. Kitajiri, S. Kalsoom, S. Tasneem, S. Shayiq, A. Ramesh, S. Srisailpathy, S. N. Khan, R. J. Smith, S. Riazuddin and T. B. Friedman. 2007. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat*, 28(5); 417-23.
- Klug, W., Cummings, Mr. 2000, *Genetik Kavramlar*, 6. Baskı. USA: Prentice Hall (Türkçe Çeviri: Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara). 2000. *Genetik Kavramlar*.
- Kokotas, H., M. B. Petersen and P. J. Willems. 2007. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71(5); 379-91.
- Kopp, P. 1999. Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid*, 9(1); 65-9.
- Kubisch, C., B. C. Schroeder, T. Friedrich, B. Lutjohann, A. El-Amraoui, S. Marlin, C. Petit and T. J. Jentsch. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96(3); 437-46.
- Kurima, K., L. M. Peters, Y. Yang, S. Riazuddin, Z. M. Ahmed, S. Naz, D. Arnaud, S. Drury, J. Mo, T. Makishima, M. Ghosh, P. S. Menon, D. Deshmukh, C. Oddoux, H. Ostrer, S. Khan, P. L. Deininger, L. L. Hampton, S. L. Sullivan, J. F. Battey, Jr., B. J. Keats, E. R. Wilcox, T. B. Friedman and A. J. Griffith. 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., J. A. Goldstein, M. J. Kelley, W. Luxford, C. M. Castelein and A. N. Mhatre. 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet*, 67(5); 1121-8.

- Li, W., F. Gao, J. Liang, C. Li, H. Zhang, Z. Tang, L. Chen, Q. Jin and W. Tang. 2003. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single-strand conformation polymorphism by DNA base composition. *Electrophoresis*, 24(14); 2283-9.
- Lin, S. Y. and D. P. Corey. 2005. TRP channels in mechanosensation. *Curr Opin Neurobiol*, 15(3); 350-7.
- Liu, X. Z., X. M. Ouyang, X. J. Xia, J. Zheng, A. Pandya, F. Li, L. L. Du, K. O. Welch, C. Petit, R. J. Smith, B. T. Webb, D. Yan, K. S. Arnos, D. Corey, P. Dallos, W. E. Nance and Z. Y. Chen. 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet*, 12(10); 1155-62.
- Liu, X. Z., J. Walsh, Y. Tamagawa, K. Kitamura, M. Nishizawa, K. P. Steel and S. D. Brown. 1997. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*, 17(3); 268-9.
- Longo-Guess, C. M., L. H. Gagnon, S. A. Cook, J. Wu, Q. Y. Zheng and K. R. Johnson. 2005. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22); 7894-9.
- Louault, C., N. Benamer, J. F. Faivre, D. Potreau and J. Bescond. 2008. Implication of connexins 40 and 43 in functional coupling between mouse cardiac fibroblasts in primary culture. *Biochim Biophys Acta*.
- Lui, V. C., L. J. Ng, E. W. Sat and K. S. Cheah. 1996. The human alpha 2(XI) collagen gene (*COL11A2*): completion of coding information, identification of the promoter sequence, and precise localization within the major histocompatibility complex reveal overlap with the *KE5* gene. *Genomics*, 32(3); 401-12.
- Lynch, E. D., M. K. Lee, J. E. Morrow, P. L. Welsh, P. E. Leon and M. C. King. 1997. Nonsyndromic deafness *DFNA1* associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science*, 278(5341); 1315-8.
- Makishima, T., K. Kurima, C. C. Brewer and A. J. Griffith. 2004. Early onset and rapid progression of dominant nonsyndromic *DFNA36* hearing loss. *Otol Neurotol*, 25(5); 714-9.
- Mburu, P., M. Mustapha, A. Varela, D. Weil, A. El-Amraoui, R. H. Holme, A. Rump, R. E. Hardisty, S. Blanchard, R. S. Coimbra, I. Perfettini, N. Parkinson, A. M. Mallon, P. Glenister, M. J. Rogers, A. J. Paige, L. Moir, J. Clay, A. Rosenthal, X. Z. Liu, G. Blanco, K. P. Steel, C. Petit and S. D. Brown. 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., S. D. Prasad, A. J. Griffith, H. P. Kunst, G. E. Green, K. B. Shpargel, C. Runge, C. Huybrechts, R. F. Mueller, E. Lynch, M. C. King, H. G. Brunner, C. W. Cremers, M. Takanosu, S. W. Li, M. Arita, R. Mayne, D. J. Prockop, G. Van Camp and R. J. Smith. 1999. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet*, 23(4); 413-9.
- Melchionda, S., N. Ahituv, L. Bisceglia, T. Sobe, F. Glaser, R. Rabionet, M. L. Arbones, A. Notarangelo, E. Di Iorio, M. Carella, L. Zelante, X. Estivill, K. B. Avraham and P. Gasparini. 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.
- Mitchem, K. L., E. Hibbard, L. A. Beyer, K. Bosom, G. A. Dootz, D. F. Dolan, K. R. Johnson, Y. Raphael and D. C. Kohrman. 2002. Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6. *Hum Mol Genet*, 11(16); 1887-98.
- Morton, C. C. and W. E. Nance. 2006. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med*, 354(20); 2151-64.
- Mustapha, M., D. Weil, S. Chardenoux, S. Elias, E. El-Zir, J. S. Beckmann, J. Loiselet and C. Petit. 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.
- Nance, W. E. 2003. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9(2); 109-19.
- Naz, S., C. M. Giguere, D. C. Kohrman, K. L. Mitchem, S. Riazuddin, R. J. Morell, A. Ramesh, S. Srisailpathy, D. Deshmukh, A. J. Griffith, T. B. Friedman, R. J. Smith and E. R. Wilcox. 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., A. J. Griffith, S. Riazuddin, L. L. Hampton, J. F. Battey, Jr., S. N. Khan, S. Riazuddin, E. R. Wilcox and T. B. Friedman. 2004. Mutations of *ESPN* cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet*, 41(8); 591-5.
- Neyroud, N., F. Tesson, I. Denjoy, M. Leibovici, C. Donger, J. Barhanin, S. Faure, F. Gary, P. Coumel, C. Petit, K. Schwartz and P. Guicheney. 1997. A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet*, 15(2); 186-9.
- Noyan, A. 1999. *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Ankara, Meteksan.

- Nussbaum, R. L. 2005. What is special about the "human" in "human genetics"? *Am J Hum Genet*, 76(2); 198-202.
- Obata, K., H. Katsura, T. Mizushima, H. Yamanaka, K. Kobayashi, Y. Dai, T. Fukuoka, A. Tokunaga, M. Tominaga and K. Noguchi. 2005. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*, 115(9); 2393-401.
- Ouyang, X. M., D. Yan, L. L. Du, J. F. Hejtmancik, S. G. Jacobson, W. E. Nance, A. R. Li, S. Angeli, M. Kaiser, V. Newton, S. D. Brown, T. Balkany and X. Z. Liu. 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., D. W. Anderson, A. J. Griffith, K. M. Grundfast, T. B. San Agustin, A. C. Madeo, T. B. Friedman and R. J. Morell. 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 P. J. Willems. 2006. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet*, 69(5); 371-92.
- Petit, C. 2006. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med*, 12(2); 57-64.
- Petit, C., J. Levilliers and J. P. Hardelin. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*, 35; 589-646.
- Piatto, V. B., E. C. Nascimento, F. Alexandrino, C. A. Oliveira, A. C. Lopes, E. L. Sartorato and J. V. Maniglia. 2005. Molecular genetics of non-syndromic deafness. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)*, 71(2); 216-23.
- Riazuddin, S., Z. M. Ahmed, A. S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, S. N. Khan, P. Chattaraj, P. L. Friedman, J. M. Anderson, I. A. Belyantseva, A. Forge and T. B. Friedman. 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79(6); 1040-51.
- Riazuddin, S., S. N. Khan, Z. M. Ahmed, M. Ghosh, K. Caution, S. Nazli, M. Kabra, A. U. Zafar, K. Chen, S. Naz, A. Antonellis, W. J. Pavan, E. D. Green, E. R. Wilcox, P. L. Friedman, R. J. Morell and T. B. Friedman. 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.

- Robertson, N. G., L. Lu, S. Heller, S. N. Merchant, R. D. Eavey, M. McKenna, J. B. Nadol, Jr., R. T. Miyamoto, F. H. Linthicum, Jr., J. F. Lubianca Neto, A. J. Hudspeth, C. E. Seidman, C. C. Morton and J. G. Seidman. 1998. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet*, 20(3); 299-303.
- Rock, R. S., S. E. Rice, A. L. Wells, T. J. Purcell, J. A. Spudich and H. L. Sweeney. 2001. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24); 13655-9.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235); 467-70.
- Scott, H. S., J. Kudoh, M. Wattenhofer, K. Shibuya, A. Berry, R. Chrast, M. Guipponi, J. Wang, K. Kawasaki, S. Asakawa, S. Minoshima, F. Younus, S. Q. Mehdi, U. Radhakrishna, M. P. Papasavvas, C. Gehrig, C. Rossier, M. Korostishevsky, A. Gal, N. Shimizu, B. Bonne-Tamir and S. E. Antonarakis. 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.
- Shabbir, M. I., Z. M. Ahmed, S. Y. Khan, S. Riazuddin, A. M. Waryah, S. N. Khan, R. D. Camps, M. Ghosh, M. Kabra, I. A. Belyantseva and T. B. Friedman. 2006. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 43(8); 634-40.
- Shahin, H., T. Walsh, T. Sobe, J. Abu Sa'ed, A. Abu Rayan, E. D. Lynch, M. K. Lee, K. B. Avraham, M. C. King and M. Kanaan. 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.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan and A. Patapoutian. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6); 819-29.
- Tekin, M. and Z. S. Arici. 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 A*, 143A(14); 1583-91.
- Tekin, M., K. S. Arnos and A. Pandya. 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.
- Vahava, O., R. Morell, E. D. Lynch, S. Weiss, M. E. Kagan, N. Ahituv, J. E. Morrow, M. K. Lee, A. B. Skvorak, C. C. Morton, A. Blumenfeld, M. Frydman, T. B. Friedman, M. C. King and K. B. Avraham. 1998. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*, 279(5358); 1950-4.
- Van Laer, L., E. H. Huizing, M. Verstreken, D. van Zuijlen, J. G. Wauters, P. J. Bossuyt, P. Van de Heyning, W. T. McGuirt, R. J. Smith, P. J. Willems, P. K. Legan, G. P. Richardson and G. Van Camp. 1998. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet*, 20(2); 194-7.
- van Wijk, E., E. Krieger, M. H. Kemperman, E. M. De Leenheer, P. L. Huygen, C. W. Cremers, F. P. Cremers and H. Kremer. 2003. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J Med Genet*, 40(12); 879-84.
- Vanden Heuvel, G. B., J. A. Payne, P. Igarashi and B. Forbush, 3rd. 2006. Expression of the basolateral Na-K-Cl cotransporter during mouse nephrogenesis and embryonic development. *Gene Expr Patterns*, 6(8); 1000-6.
- Verhoeven, K., L. Van Laer, K. Kirschhofer, P. K. Legan, D. C. Hughes, I. Schatteman, M. Verstreken, P. Van Hauwe, P. Coucke, A. Chen, R. J. Smith, T. Somers, F. E. Offeciers, P. Van de Heyning, G. P. Richardson, F. Wachtler, W. J. Kimberling, P. J. Willems, P. J. Govaerts and G. Van Camp. 1998. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 19(1); 60-2.
- Verpy, E., S. Masmoudi, I. Zwaenepoel, M. Leibovici, T. P. Hutchin, I. Del Castillo, S. Nouaille, S. Blanchard, S. Laine, J. L. Popot, F. Moreno, R. F. Mueller and C. Petit. 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.
- Voets, T., K. Talavera, G. Owsianik and B. Nilius. 2005. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol*, 1(2); 85-92.
- Walsh, T., V. Walsh, S. Vreugde, R. Hertzano, H. Shahin, S. Haika, M. K. Lee, M. Kanaan, M. C. King and K. B. Avraham. 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., Y. Liang, R. A. Fridell, F. J. Probst, E. R. Wilcox, J. W. Touchman, C. C. Morton, R. J. Morell, K. Noben-Trauth, S. A. Camper and T. B. Friedman. 1998. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 280(5368); 1447-51.
- Wayne, S., N. G. Robertson, F. DeClau, N. Chen, K. Verhoeven, S. Prasad, L. Tranebjarg, C. C. Morton, A. F. Ryan, G. Van Camp and R. J. Smith. 2001. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, 10(3); 195-200.
- Weil, D., P. Kussel, S. Blanchard, G. Levy, F. Levi-Acobas, M. Drira, H. Ayadi and C. Petit. 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.
- Willems, P. J. 2000. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*, 342(15); 1101-9.
- www.ensembl.org.
- www.hgmd.cf.ac.uk/ac/.
- www.webhost.ua.ac.be/hhh/.
- Xia, J. H., C. Y. Liu, B. S. Tang, Q. Pan, L. Huang, H. P. Dai, B. R. Zhang, W. Xie, D. X. Hu, D. Zheng, X. L. Shi, D. A. Wang, K. Xia, K. P. Yu, X. D. Liao, Y. Feng, Y. F. Yang, J. Y. Xiao, D. H. Xie and J. Z. Huang. 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., C. Yu, X. Chou, W. Yuan, Y. Wang, L. Bu, G. Fu, M. Qian, J. Yang, Y. Shi, L. Hu, B. Han, Z. Wang, W. Huang, J. Liu, Z. Chen, G. Zhao and X. Kong. 2001. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet*, 27(2); 201-4.
- Xu, H., N. T. Blair and D. E. Clapham. 2005. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci*, 25(39); 8924-37.
- Yasunaga, S., M. Grati, M. Cohen-Salmon, A. El-Amraoui, M. Mustapha, N. Salem, E. El-Zir, J. Loiselet and C. Petit. 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., E. Ives, E. Lynch, R. Person, S. Snook, L. MacLaren, T. Cater, A. Griffin, B. Fernandez, M. K. Lee and M. C. King. 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., T. Yang, S. Wei, A. T. DeWan, R. J. Morell, J. L. Elfenbein, R. A. Fisher, S. M. Leal, R. J. Smith and K. H. Friderici. 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., M. Mustapha, M. Leibovici, E. Verpy, R. Goodyear, X. Z. Liu, S. Nouaille, W. E. Nance, M. Kanaan, K. B. Avraham, F. Tekaia, J. Loiselet, M. Lathrop, G. Richardson and C. Petit. 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.

ÖZGEÇMİŞ

1- KİŞİSEL BİLGİLER

Ad-Soyad: İdil Aslan

Doğum Yeri-Tarihi: Samsun/30.05.1973

Uyruğu: TC+KKTC

İletişim Adresi: İdilerish@hotmail.com

2-EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise: Bahçelievler Deneme Lisesi: (1987-1990)

Üniversite: Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (1991-1995)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.B.D.(1999-2002)

3- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

- **Bulunduğu Projeler:** Otozomal Resesif Sensorinöral İşitme Kaybı İle Yapan Değişimlerinin Ortaya Çıkarılması (Tübitak Projesi) 2006

- **Yayımları:**

1- Tekin M, Hişmi BO, Fitoz S, Ozdağ H, Cengiz FB, Sirmaci A, Aslan I, Inceoğlu B, Yüksel-Konuk EB, Yılmaz ST, Yasun O, Akar N. 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 Feb;80(2):338-44.