

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜNEYDOĞU ANADOLU'DAKİ İŞİTME ENGELLİLERDE *GJB2*
MUTASYONLARININ SIKLIĞI

Bio. Doruk Taylan

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Mustafa TEKİN

2008-ANKARA

KABUL ONAY

ÖZET

Güneydoğu Anadolu'daki İşitme Engellilerde *GJB2* Mutasyonlarının Sıklığı

Yaklaşık olarak her 1000 çocuktan biri dil gelişimi öncesinde işitme kaybı ile karşılaşmaktadır. Gelişmiş ülkelerde prelingual (dil gelişimi öncesi) işitme kaybının %50'sinden fazlası genetik faktörlere bağlıdır; diğer bölümü ise çevresel nedenli oluşan işitme kayıplarıdır.

Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgular sendromik veya sendromik olmayan olarak ikiye ayrılırlar. Genetik sebepli işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini sendromik olmayan genetik nedenli işitme kayıpları oluşturur. Genetik işitme kaybının en yaygın formu otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybıdır. Sendromik olmayan işitme kayıpları ailesel veya sporadik olabilir. Birçok populasyonda *GJB2* genindeki mutasyonlar belirlenmiş ve 35delG beyaz ırkta en yaygın mutasyon olarak bulunmuştur. *GJB2* geni DFNB1 lokusunda kromozom 13q12'de lokalize olmuştur ve prelingual işitme kaybı için ana gendir.

Bu güne kadar Türkiye'de yapılan çalışmalarda işitme engelliler arasında *GJB2* mutasyon sıklığının bölgeler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmalarda Güneydoğu Anadolu bölgesinden köken alan işitme engelliler yeterince incelenememiştir. Bu çalışmada Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden köken alan ve birbiriyle akrabalığı olmayan sendromik olmayan doğuştan veya prelingual işitme kaybı olan 45 proband çalışılmıştır. *GJB2* geninin kodlayan ve kodlamayan eksonlarındaki mutasyonlar PCR-RFLP, PCR-SSCP ve DNA dizi analizi teknikleri ile araştırılmıştır. Toplam 7 ailede biallelik *GJB2* mutasyonları saptanmıştır (7/45=%15,5, %95 güvenirlilik aralığı, %5-%26).

Sonuçlar Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *GJB2* mutasyonlarının önemli bir işitme kaybı sebebi olduğunu ancak göreceli olarak Türkiye'deki diğer bölgelerden daha düşük bir oranda gözlemlendiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İşitme kaybı, otozomal resesif, sağırılık, *GJB2*, cx26

ABSTRACT

Frequency Of *GJB2* Mutations in a Hearing Impaired Population from Southeastern Anatolia

Prelingual deafness occurs with a frequency of approximately 1 in 1000 children. More than 50% of prelingual deafness is caused by genetic factors in developed countries, while remaining is environmentally caused.

Affected individuals who are classified certainly of the genetic cases are divided into syndromic and non-syndromic forms. 70% of these cases with genetic origin are referred to as having the non-syndromic form because of absent additional findings. The most common form of hereditary hearing loss is transmitted with autosomal recessive inheritance. Non-syndromic hearing loss may be familial or sporadic. Mutations in *GJB2* have been identified among the deaf living in many countries, 35delG being the most common mutation in Caucasoid populations. The *GJB2* gene is mapped to the DFNB1 locus at chromosome 13q12, is the main gene for prelingual hearing loss.

Previous studies completed in Turkey have determined that the mutation frequency of *GJB2* in the deaf population varies from region to region. In those studies, the number of included families from Southeast Anatolia was not sufficient. In this study, unrelated 45 probands, who originated from Southeast Anatolia, with non-syndromic congenital or prelingual onset sensorineural hearing loss have been studied. Mutations in the coding and not coding exons of the *GJB2* gene were screened with PCR-RFLP, PCR-SSCP and DNA sequencing methods. Biallelic *GJB2* mutations were detected in seven families (7/45=15.5% ; 95% confidence interval of 5% to 26%).

Our results show that *GJB2* mutations are an important cause of the hearing loss in Southeast Anatolia. However, they are relatively less common compared to those observed in other parts of Anatolia.

Keywords : Autosomal recessive, cx26, deafness, *GJB2*, hearing loss

ÖNSÖZ

Laboratuvardaki çalışmalarım sırasında desteğini ve bilgisini her zaman arkamda hissettiğim, beni her zaman yönlendiren ve bundan sonraki çalışma hayatım boyunca tecrübesi ve yardımına ihtiyaç duyacağım danışman hocam Doç.Dr.Mustafa TEKİN'e; çalışmalarım sırasında her türlü imkanı sağlayan, yardımını esirgemeyen hocam Prof.Dr.Nejat AKAR'a; ilgi ve sevgisini her zaman hissettiren Uzm.Bio.Ece AKAR'a; beraber çalıştığım bu tezi yaparken ve yazarken bana büyük destek ve yardımda bulunan çalışma arkadaşlarım Uzm.Bio.Duygu DUMAN, Uzm.Bio. Aslı SIRMACI, Uzm.Bio.İdil ASLAN, Uzm.Bio.Filiz Başak CENGİZ, Uzm.Bio Ayşenur ÖZTÜRK, Bio. Zehra VELİ, Dr. Erkan YILMAZ, Kadir SİPAHİ ve ismini saymadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine paylaşımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullanılan kan örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Yard.Doç.Dr.Hatice ÖZTÜRKMEN-AKAY'a teşekkür ederim. Bana verdikleri sonsuz sevgi, sabır, destek ve imkan için aileme çok teşekkür ederim.

Doruk Taylan

Ankara. Eylül 2008

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
DİZİLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. İşitme Kaybının Genetik Tarihi	2
1.1.2. İşitme Mekanizması	4
1.1.3. İşitme Kaybının Sınıflandırılması	8
1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı	10
1.1.5. Konneksin – Konnekson – Gap Junction.....	12
1.1.6. Gap Junction Beta 2 (<i>GJB2</i> ; Connexin 26) Geni.....	15
1.2. Moleküler Teknikler	17
1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
1.2.2. DNA'nın enzimatik kesimi.....	19
1.2.2.1. Restriksiyon Endonükleazlar.....	19
1.2.2.2. Restriksiyon Enzim Kesimleri.....	20
1.2.3. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi.....	20
1.2.4. DNA Dizi Analizi.....	21
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	23
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	23
2.2. Kullanılan Yöntemler.....	24
2.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	24
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
2.2.2.1. <i>GJB2</i> 35delG Mutasyon Taraması.....	25
2.2.2.2. PCR için Agaroz Jel Elektroforezi	28

2.2.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi.....	28
2.2.3.1. BseLI Restriksiyon Endonükleazı için Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
2.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	31
2.2.4.1. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	32
2.2.4.2. Gümüş Boyama.....	33
2.2.5. DNA Dizi Analizi.....	35
2.2.5.1. PCR ve Pürifikasyon İşlemleri.....	35
2.2.5.2. DNA Dizi Analizi.....	37
2.2.5.2.1. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu.....	37
2.2.5.2.2. Etanol Çöktürmesi.....	38
3. BULGULAR.....	39
4. TARTIŞMA.....	44
5. REFERANSLAR.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kulağın anatomik yapısı ve kohlea kanalı ile tüy hücrelerinin ayrıntılı şekli.....	6
Şekil 1.2. Kohleanın içindeki yapıları gösteren kesiti.....	7
Şekil 1.3. Konneksinlerin kohleadaki organizasyonu.....	14
Şekil 1.4. Gap Junction Protein Beta 2 Genin Şematik Yapısı.....	15
Şekil 2.1. <i>GJB2</i> 'deki 35delG mutasyonu için yapılan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....	27
Şekil 2.2. <i>GJB2</i> 35delG mutasyonunun BseLI restriksiyon endonükleazı ile kesimini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı.....	30
Şekil 2.3. Band farklılığı görülen bir SSCP jel görüntüsü.....	34
Şekil 2.4. <i>GJB2</i> 'nin birinci bölgesinin PCR ürünlerini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı.....	36
Şekil 2.5. <i>GJB2</i> 'nin ikinci bölgesinin PCR ürünlerini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı.....	36
Şekil 3.1. 35delG mutasyonunu heterozigot taşıyan probandlarda DNA dizi analizi ile ikinci mutasyonun belirlenmesi.	39
Şekil 3.2. SSCP'de band farklılığı görülen probandlarda DNA dizi analizi ile tespit edilen mutasyon ve polimorfizmler.....	40-41
Şekil 3.3. IVS1+1G>A mutasyonunun SSCP tekniğiyle taranmasını gösteren SSCP jel görüntüsü.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>GJB2</i> mutasyonları ile oluşan prelingual, senonöral sendromik olmayan sağır- lığın değişik toplumlardaki dağılımı.....	3
Tablo 1.2. Sendromik olmayan işitme kaybına sebep olan genler.....	11
Tablo 1.3. Konneksin Proteinlerinin isimlendirilmesi.....	12
Tablo 3.1. Araştırmada bulunan tüm <i>GJB2</i> mutasyonları ve polimorfizmlerinin listesi.....	43
Tablo 3.2. Aile geçmişine göre <i>GJB2</i> mutasyonlarının oranı.....	43
Tablo 4.1. Otozomola resesif işitme kaybındaki <i>GJB2</i> mutasyonlarının Türkiye Ortalama- ları.....	44
Tablo 4.2. Olgularda bulunan <i>GJB2</i> mutasyonlarının allelik sıklığı	46

DİZİLER DİZİNİ

Dizin 2.1. <i>GJB2</i> İkinci ekson dizisi ve PCR tekniğinde kullanılan primerleri.....	26
Dizin 2.2. <i>GJB2</i> 'nin iki eksonun dizini ve PCR-SSCP tekniğinde kullanılan primerler....	32

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikromolar
°C	Santigrat derece
A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Bç	Baz çifti
C	Sitozin
cAMP	Siklik Adenozinmonofosfat
Cx26	Konneksin 26 proteini
Cx32	Konneksin 32 proteini
Cx43	Konneksin 43 proteini
DFN	X'e bağlı kalıtım gösteren işitme kaybı lokusu
DFNA	Otozomal dominant kalıtım gösteren işitme kaybı lokusu
DFNB	Otozomal resesif kalıtım gösteren işitme kaybı lokusu
DFNB1	Otozomal resesif sendromik olmayan sağırılık lokusu
Da	Dalton
dB	Desibel
Dk	Dakika
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
dATP	Deoksiadenin trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfat
ddH ₂ O	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikası
G	Guanin
gr	Gram

<i>GJA1</i>	Gap Junction Alfa-1
<i>GJB1</i>	Gap Junction Beta 1 geni
<i>GJB2</i>	Gap Junction Beta 2 geni
<i>GJB3</i>	Gap Junction Beta 3 geni
<i>GJB6</i>	Gap Junction Beta 6 geni
HC1	Hidroklorik asit
Hz	Hertz
K ⁺	Potasyum iyonu
KCl	Potasyumklorür
kDa	Kilo dalton
q	Kromozomun uzun kolu
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
Mg ⁺⁺	Magnezyum iyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
OH	Hidroksil
³² P	Radyoaktif Fosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	bir çözeltilinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
pmol	pikamol
RE	Restriksiyon endonükleazı
RFLP	Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi
RBC	Kırmızı kan hücresi
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
Sn	Saniye
SSCP	Tek zincir Konformasyon Polimorfizmi
T	Timin
T _m	Bağlanma Sıcaklığı
T _s	Sıcaklık değeri
TBE	Tris-Borik asit-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TrisHCL	Tris Hidrasklorür
V	Volt
UV	Ultraviyole
χ^2	Kikare
YY1	Yin ve Yang 1

1. GİRİŞ

İşitme kaybı, neden olduğu bozukluklar bakımından, önemli bir rahatsızlıktır. Normal duyan bir bebek, doğduğu andan itibaren dinler; ses uyarılarını, gördüğü objelerle özdeşleştirir; kodlar ve kavram geliştirir; sonra konuşmaya başlar. Doğuştan, çevresel ses uyarılarını duyamayacak kadar oluşan bir işitme kaybı, kavram gelişimini de engeller.

İşitme kaybı en sık görülen duyuşal hastalıktır (Bitner and Glindzicz, 2002). İşitme kaybının nedenleri araştırılırken genetik formlar diğer sebeplerden ayrılmaya çalışılır. İşitme kaybı basit olarak iletim, sensorinöral, veya ikisinin birleşimi; sendromik veya sendromik olmayan; ve prelingual ve postlingual olarak sınıflandırılabilir.

Ortalama olarak bin çocuktan birinde ileri veya çok ileri işitme kaybı; doğum veya doğum sonrası gelişim döneminde görülmektedir. Prelingual işitme kaybı lisanın öğrenilmesinden önce doğuştan ya da daha sonra kazanılan işitme kaybıdır. İşitme kaybına birçok çevresel ve genetik faktörler sebep olabilmektedir. Genetik nedenler doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kaybıdır (Nance 2003). Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini otozomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır. Ayrıca otozomal dominant (%20) , X'e bağılı (%1) ve mitokondrial(<%1) formlar da tanımlanmıştır. Otozomal resesif formlar bu diğer tanımlanan formlara göre daha ağırdır ve genellikle doğrudan kohlea hasarıyla sonuçlanır (Petersen and Willems 2006).

Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının çok büyük bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır (Kelsell vd 1997). Konneksin 26(Cx26) proteinini kodlayan *GJB2* genindeki mutasyonlar kalıtsal , prelingual , sendromik olmayan işitme kaybının en sık nedenidir (Erbe vd 2004). Konneksinler, iyon ve moleküllerin hücreler arası geçişini sağlayan aralıklı bileşkelerin alt ünitelerini kodlayan bir gen ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan *GJB2* geni bir aralıklı bileşke proteini olan konneksin 26 proteinini kodlar.

Bugüne kadar Türkiye’de yapılan çalışmalarda işitme engelliler arasında *GJB2* mutasyon sıklığının bölgeler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır (Tekin vd 2003, Tekin vd 2005, Tekin ve Arıcı 2007). Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz’de bu gendeki en çok rastlanan mutasyon altılı guanin serisinden birinin delesyonuyla oluşan 35delG mutasyondur. 35delG mutasyonunun Batı Anadolu’da Doğu ve Güneydoğu Anadolu’dan daha sık olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nden köken alan işitme engelli sayısı yeterli değildir.

Daha önce az sayıda işitme engelli hastaya ve aileye dayanan verilerle yapılan çalışmalarla elde edilen veriler Türkiye’de *GJB2* mutasyonlarının sıklığının bölgeler arasında farklı olduğunu göstermişti. Bu çalışmanın amacı Türkiye’de işitme kaybı için temel gen olan *GJB2*’deki mutasyonların sıklığını Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde bularak Türkiye’deki bölgeler arasındaki farklılığın boyutunun anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.

GENEL BİLGİLER

1.1.1 İşitme Kaybının Genetik Tarihi

1994 yılında ilk otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı lokusu (DFNB1), prelingual ve çok ileri işitme kaybı bulunan iki büyük Tunuslu ailede tespit edilmiş ve bağlantı analizi ile kromozom 13q11’ye haritalanmıştır (Guilford vd 1994). Bu olayı takiben sendromik olmayan işitme kayıplı Yeni Zelanda/Avusturalya (Maw vd 1995) ve İspanyol/İtalyan (Gasparini vd 1997) ailelerde yapılan bağlantı çalışmalarında DFNB1’in bu toplumlarda prelingual işitme kaybına en büyük katkı yapan lokus olduğu kanısına varılmıştır.

Tablo 1.1. *GJB2* mutasyonları ile oluşan prelingual, sensorinöral sendromik olmayan işitme kaybının değişik toplumlarda dağılımı. NI; belirlenmedi, ND; tanımlanmadı. * Akrabalık göstermeyen biallelik *GJB2* mutasyonu taşıyan hastaların yüzdesi (Petersen and Willems 2006)

Ülke	Hastalar (n)	<i>GJB2</i> (%)*	35delG/35delG (%)
Avusturalya	74	13.5	4.1
Avusturya	43	23.3	18.6
Avusturya	69	18.8	10.1
Brezilya	62	12.9	9.7
Çin	118	16.1	0.0
Çek Cumhuriyeti	156	37.8	28.8
Danimarka	165	4.2	1.8
Mısır	111	14.4	9.0
Fransa	88	39.8	28.4
Almanya	342	6.4	3.8
Almanya	147	14.3	8.8
Almanya	228	16.7	8.3
Gana	365	15.6	0.0
Yunanistan	210	33.3	30.0
Hindistan	215	17.7	0.0
İran	83	10.8	4.8
İsrail	75	33.3	14.7
İtalya	155	27.1	21.9
İtalya	53	39.6	30.2
İtalya/İspanya	136	36.8	32.4
İtalya/İspanya	576	31.6	NI
Japonya	35	28.6	0.0
Japonya	50	10.0	0.0
Japonya	53	15.1	0.0
Ürdün	68	16.2	16.2
Kore	147	8.2	0.0
Kürt	86	15.1	8.1
Lübnan	48	33.3	31.3
Oman	51	0.0	0.0
Pakistan	196	6.1	0.0
Filistin	48	22.9	10.4
Sicilya	71	15.5	11.3
Slovakya	90	45.6	40.0
Slovakya	54	29.6	1.9
İspanya/Küba	422	30.6	NI
Tayvan	169	7.1	0.0
Tayland	166	7.2	0.0
Türkiye	60	31.7	21.7
Türkiye	235	ND	20.4
Türkiye	371	19.7	15.1
Birleşik Krallık	210	14.8	11.9
ABD	99	18.2	2.0
ABD	209	27.3	14.8
ABD	58	34.5	24.1

Kelsell *GJB2*'deki mutasyonların, otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olduğunu üç Pakistanlı ailede göstermiş ve immünokimyasal olarak insan koklea hücrelerinde "Gap Junction Beta 2" (*GJB2*; Connexin 26; Cx26) geninin yüksek düzeyde ekspresyonunu ortaya koymuştur (Kelsell vd 1997).

Rabionet 2000 yılında beyaz ırktan oluşan toplumlardaki 576 sporadik ve otozomal resesif işitme kayıplı ailede yaptığı çalışmada, hastaların %37'sinde *GJB2* mutasyonlarını gözlemlemiştir. Bulgularda 35delG %82'lik oranıyla *GJB2* işitme kaybı allellerinde en yaygın mutasyon olarak tespit edilmiştir.

Bu yılları takip eden çalışmalarda *GJB2* ve işitme kaybı arasındaki bağ iyi irdelenmiş ve birçok toplumda *GJB2*'deki mutasyonların genetik nedenli işitme kaybının %50' sini oluşturduğu ortaya çıkmıştır (Bitner and Glindzicz 2002). Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz'de bu gendeki en çok rastlanan mutasyon altılı guanin serisinden birinin delesyonuyla oluşan 35delG mutasyonudur (Tablo 1.1.). Türk işitme kayıplı bireylerde *GJB2* mutasyonlarının konjenital veya prelingual sendromik olmayan işitme kayıplı olguların yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Barış vd 2001, Tekin vd 2001, Uyguner vd 2003, Tekin vd 2003, Tekin vd 2005). İşitme kayıplı Japon ve Hintli ailelerde yapılan çalışmalarda bu mutasyona hiç rastlanmamıştır (Abe vd 2000, Mukherjee vd 2003).

1.1.2 İşitme Mekanizması

İnsan kulağı oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Duyma sistemini daha da karmaşıklaştıran ise iki kulaktan gelen verilerin çok karmaşık bir sinir ağı olan beyinde birleştirilmesidir. İşitme duyusunda reseptör organ olarak görev yapan kulak, ses dalgalarını önce mekanik bir uyarana dönüştürür, mekanik uyarı iç kulakta yerleşmiş olan reseptörler aracılığı ile sinir liflerinde aksiyon potansiyeline dönüştürülerek işitme siniri yolu ile (nervus vestibulocochlearis) temporal korteksteki işitme merkezine taşınır.

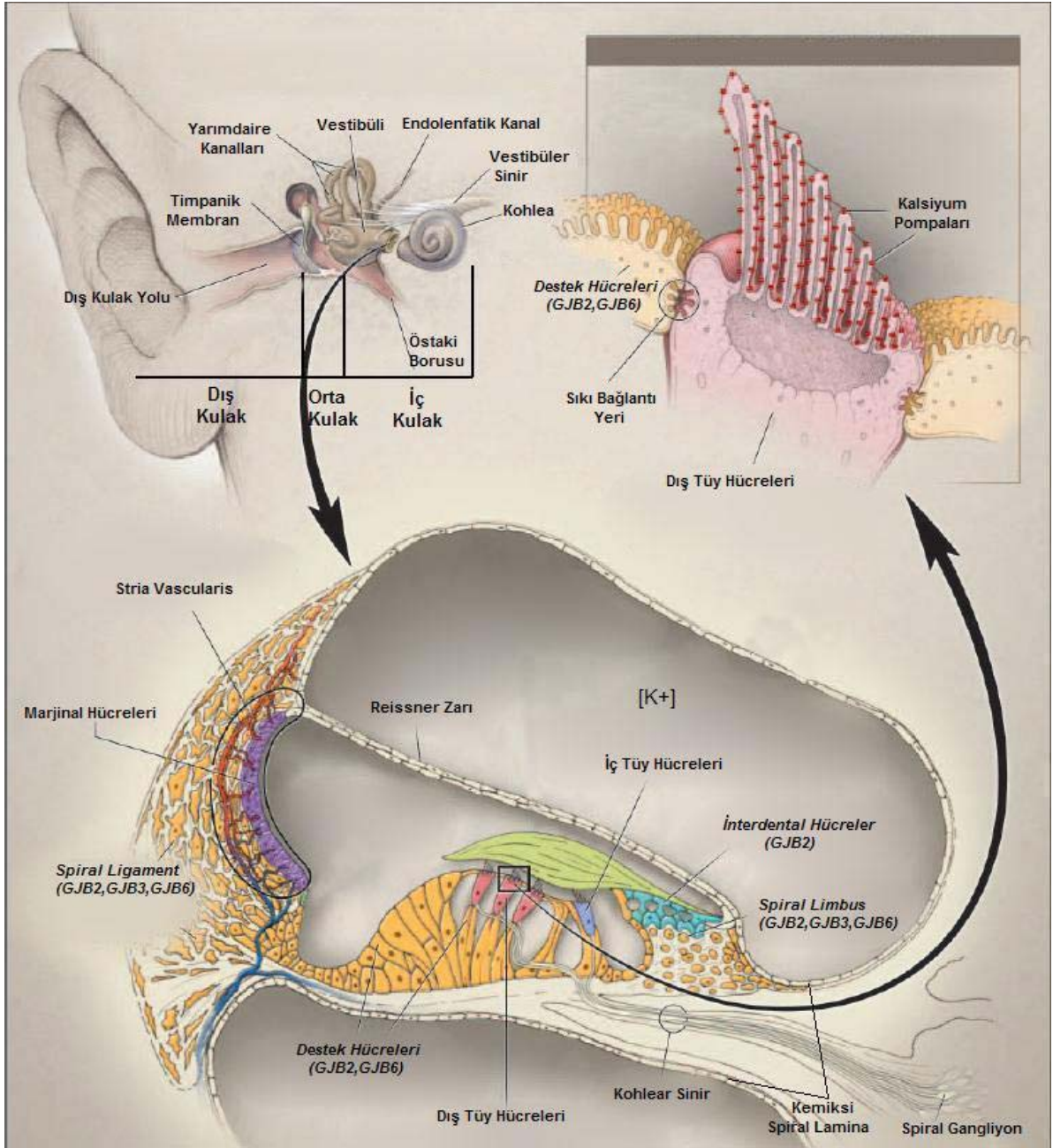
Kulağın anatomik yapısı; dış kulak, orta kulak, iç kulak olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 1.1.).

Dış kulakta kulak kepçesi her tarafından sıkıca yapışmış deri ile kaplı, düzensiz şekilli bir elastik kıkırdak tabakadan oluşur. Kulak kepçesi sadece memelilerde bulunur. Çok katlı yassı bir epitel dış kulak yolunu sarar, kıl folikülleri, sebace bezler ve bir tür modifiye ter bezi olan kulak kiri bezleri submukozada bulunur. Tüyler ve kulak kiri olasılıkla koruyucu görevi üstlenir. Dış kulak yolunun üçte bir dış kısmı elastik kıkırdak tarafından desteklenirken, kanalın iç kısmını temporal kemik destekler. Oval timpanik zar dış kulak yolunun en sonunda yer alır ve dış yüzeyi ince bir epidermisle, iç yüzeyi timpanik kavite ile devamlılık gösteren basit kuboidal epitel ile örtülmüştür. İki epitel örtü arasında kollajen elastik lifler ve fibroblastlardan oluşmuş sert bir bağ dokusu tabakası vardır. Timpanik membran ses titreşimlerini orta kulağın kemikçiklerine iletir (Raphael and Richard 2003).

Orta kulakta timpanik kavite, temporal kemiğin içinde, timpanik membran ve iç kulağın kemik kısmı arasında yer alan düzensiz bir boşluktur. Ön tarafta östaki borusu aracılığıyla farinksle, arkada temporal kemiğin mastoid çıkıntısının hava dolu boşlukları ile ilişkidir. Orta kulak periosta sıkıca yapışık ince lamina propria'nın üstünde yer alan tek katlı yassı epitel ile çevrilidir. Östaki borusunun yanında ve iç kısımlarında, orta kulağı çevreleyen tek katlı epitel yavaşça, titreşimli tüylü yalancı çok katlı silindirik epitele dönüşür. Östaki borusu yutkunma işlemi sırasında açılarak orta kulaktaki basıncı atmosfer basıncı ile dengeler. Orta kulağın medial kemikli duvarında oval ve yuvarlak pencere adı verilen iki adet zarla kaplı kemiksiz bölge bulunur. Timpanik membran oval pencereye 3 dizi küçük kemikçik ile bağlanır; orta kulak kemikçikleri; çekiç (malleus), örs (inkus), üzengi (stapes). Kemikçikler de tek katlı yassı epitel ile örtülmüştür ve malleus ile stapeşe yapışık iki küçük kas bulunur.

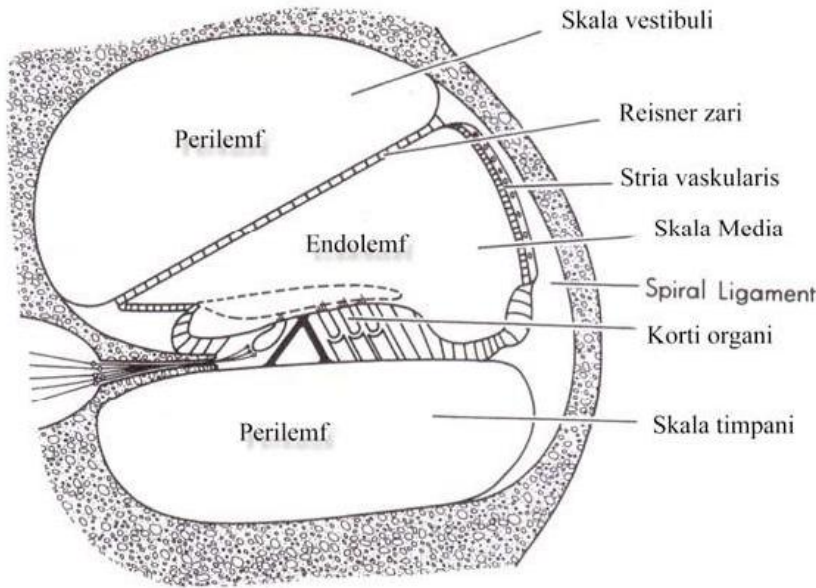
İç kulak, kemik ve membranöz labirentten oluşmuştur. Membranöz labirent ektodermal orijinli epitel kaplı devamlı bir dizi kaviteden oluşur. Embriyolojik gelişim esnasında epitel örtüsünden farklılaşarak utrikül ve sakkülün makulası, semisirküler duktusların kristası ve koklear kanalın Korti organı gibi özelleşmiş duysal yapılar gelişir.

Koklea yaklaşık 35mm uzunluğundadır ve modiulus adıyla bilinen kemik kaide etrafında 2.5 sarmal yapar. Modiolustan lateral olarak ince kemik yüzey- kemiksi spiral lamina uzanır. Bu yapı kokleadan bazale doğru uzanır (Şekil1.1). Koklea kanalı bir ses reseptörü olarak özelleşmiştir.



Şekil 1.1. Kulağın anatomik yapısı ve koklea kanalı ile tüy hücrelerinin ayrıntılı şekli. İşitme kaybına sebep olan Gap Junction Beta Genleri ve kodladıkları ürünlerin lokasyonları belirtilmiştir (Morton and Nance 2006)

Histolojik kesitlerde kokleanın 3 boşluğa ayrıldığı görülür; skala vestibüli(üstte), skala media ve altta skala timpani (Şekil1.2.). Skala vestibüli ve skala timpani perilemf içerir ve oval pencereden başlayıp yuvarlak pencerede sonlanan uzun birer borudurlar. Koklea kanalı üzerinde bulunan vestibüli, timpani ve media skalaları odyolojik fonksiyon için esas olan iyonca zengin sıvıları içerirler. Kokleanın tepesinde helikotrema adı verilen bir açıklıkla birbirleri ile ilişkidirler. Skala mediada endolenf bulunur ve skala mediada bulunan korti organı değişik ses frekanslarına cevap veren iç ve dış tüy hücreleri içermektedir.



Şekil1.2. Kokleanın içindeki yapıları gösteren kesiti (Jahn 1998)

Hem iç hem de dış tüy hücreleri motor sinir uçları içerir. Korti organının bipolar afferent nöronlarının hücre gövdeleri modioluta yer alır ve spiral ganglionu oluşturur. Vestibül ve yarım daire kanallarının kemik duvarları, bir model oluşturan çok sayıda yassı bağ doku hücre tabakaları ile kaplıdır. Bu tabakadan ince bir trabekül (ince fibriller ve fibroblastları içeren) utrikül, sakkül ve semisirküler duktuslara uzanarak, membranöz labirentin bu kısımlarını destekler. Kan damarları da bu bağ dokunun içinde bulunur. Kemik labirent ekstrasellüler sıvıların bileşimine benzer ama çok düşük protein içeren perilemf ile doludur (Şekil1.2). Membranöz labirentte ise endolenf bulunur.

Normal şartlarda skala mediadaki endolenfte yüksek konsantrasyonda potasyum ve düşük konsantrasyonda sodyum ve kalsiyum iyonları mevcutken skala vestibül ve timpanda durum tam tersinedir. Transdüksiyon sırasında tüy hücrelerinde perilenfe akan K^+ iyonları spiral ligament fibrositleri ve stria vaskularis epitel marjinal hücrelerindeki aralıklı bileşkeler tarafından endolenfe geri dönüştürülür. Ayrıca konneksonlar epitel hüclerlerinin skala yüzeyinde tek üniteler halinde bulunarak hücreler ve koklear sıvı arasında direkt K^+ değişim yolu oluştururlar. Bu da iyon değişim yolunu tamamlayıcı bir faktördür. Bu aşamalar kohleadaki dengeyi ve normal odyolojik fonksiyon için gerekli elektrolit dağılımını yürütürler (Lefebre and Van de Water 2000).

1.1.3 İşitme Kaybının Sınıflandırılması

İşitme kaybı çevresel nedenli ve genetik nedenli olmak üzere temel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Çevresel nedenli işitme kayıpları işitme kayıplarının yaklaşık %40-50'sini oluşturmaktadır. Bunlar rubella, sitomegalovirüs gibi teratolojik ajanlar, menenjit, kabakulak gibi enfeksiyonlar, ototoksik ilaçlar, akustik travma, erken doğum ve düşük doğum ağırlığı gibi genetik olmayan nedenlerdir (Tekin vd 2001, Bitner and Glindzicz 2002). Genetik nedenli işitme kayıpları ise işitme kayıplarını yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır.

İşitme kayıpları;

I. İşitme kaybının frekansına göre,

- Alçak (<500Hz),
- Orta (501-2000Hz),
- Yüksek (>2000Hz),

II. İşitme kaybı şiddetinin derecesine göre;

- Hafif (26-40 dB),
- Orta (41-55 dB),
- Orta İleri (56-70 dB),
- İleri (71-90 dB),
- Çok İleri (>90 dB),

III. İşitme kaybının fenotipe yansımalarına göre;

- Sendromik işitme kaybı,
- Sendromik olmayan işitme kaybı,

IV. İşitme kaybının kalıtım şekline göre;

- Tek genli kalıtım, Otosomal Dominant (%10-20), Otosomal Resesif (%77-88), X'e bağlı (%1-2), Mitokondrial (< %1),
- Çokgenli kalıtım, Kromozom anomalileri, Oligogenik kalıtım.

V. İşitme organı defektlerine göre;

- Dış veya orta kulak bozukluklarında iletim tipi işitme kaybı,
- İç kulaktan beyin kortikal işitsel merkezlerine kadar olan bölgede meydana gelen bozukluklarda sensörinöral tip işitme kaybı,
- Her iki tipin bulunduğu işitme kayıpları da karışık tip olarak,

VI. İşitme kaybının başlangıç yaşına göre;

- Doğuştan,
- Erken başlangıçlı (Prelingual),
- Geç başlangıçlı (Postlingual),

VII. İşitme kaybının progresyonuna göre;

- İlerleyici işitme kaybı,
- İlerleyici olmayan işitme kaybı,
- Değişken progresyon gösteren işitme kaybı olarak sınıflandırılabilir.

İşitme kaybına klinik olarak başka hiçbir bulgunun eşlik etmediği olgularda sendromik olmayan işitme kaybından söz edilir (Bitner and Glindzicz, 2002). Genetik işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kaybıdır (Nance 2003). Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini otosomal resesif işitme kayıpları oluşturmaktadır. Ayrıca işitme kayıplarının sendromik ve sendromik olmayan formlarıyla birlikte seyreden mitokondriyal gen değişimleri de bilinmektedir (Kenneson vd 2002).

1.1.4 Sendromik Olmayan İşitme Kaybı

Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini sendromik olmayan işitme kayıpları oluşturur (Van Camp vd 1997). Olgular ailesel veya sporadik olarak ortaya çıkabilir (Kenneson vd 2002). Sendromik olmayan işitme kaybı %10-20 otozomal dominant form (DFNA), %77-88 otozomal resesif form (DFNB) ve %1-2 X'e bağlı (DFN) formda kalıtım gösterir (Nance 2003).

Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen lokusları "DFN" şeklinde gösterilmektedir ve keşfine göre kronolojik olarak numaralandırılmıştır . DFNB otozomal resesif kalıtım gösteren lokusları belirtmektedir (Willems 2000). Sendromik olmayan işitme kaybı öyle yüksek genetik heterojenliğin bir parçasıdır ki günümüzde 27 DFNB genini de kapsayan 118 lokus haritalanmış ve 43 nükleer gen tanımlanmıştır (Hereditary Hearing Loss Homepage-webhost.ua.ac.be/hhh/ 2008).

Daha önce değinildiği gibi birçok toplumda sendromik olmayan işitme kaybının %50'sine sadece *GJB2*'deki mutasyonların sebep olması oldukça şaşırtıcıdır. Diğer vakalarda rastlanan genlerin çok az sayıda ailede işitme kaybına sebep olduğu tespit edilmiştir (Scott vd 1998, Zbar vd 1998) .

İç kulağın anatomik yapısının karmaşık olması ve işitme mekanizmasında bir çok proteinin görev alması nedeni ile işitme kaybına neden olan genler oldukça fazladır. Bugüne kadar *GJB2* dışında 21 tane otozomal dominant, 26 tane otozomal resesif ve 1 tane X'e bağlı kalıtılan genlerdeki mutasyonların sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2. Sendromik olmayan işitme kaybına sebep olan genler (Hereditary Hearing Loss Homepage <http://webh01.ua.ac.be/hhh/> 2008)

Lokus	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli
Yok	CRYM		Otozomal dominant
DFNA1	DIAPH1	5q31	Otozomal dominant
DFNA2	GJB3 (Cx31)	1p34	Otozomal dominant
DFNA2	KCNQ1	1p34	Otozomal dominant
DFNA3	GJB2(Cx26)	13q12	Otozomal dominant
DFNA3	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal dominant
DFNA4	MYH14	19q13	Otozomal dominant
DFNA5	DFNA5	7p15	Otozomal dominant
DFNA6/14	WFS1	4p16.3	Otozomal dominant
DFNA8/12	TECTA	11q22-24	Otozomal dominant
DFNA9	COCH	14q12-q13	Otozomal dominant
DFNA10	EYA4	6q22-q23	Otozomal dominant
DFNA11	MYO7A	11q12.3-q21	Otozomal dominant
DFNA13	COLL11A2	6p21	Otozomal dominant
DFNA15	POU3F4	5q31	Otozomal dominant
DFNA17	MYH9	22q	Otozomal dominant
DFNA20/26	ACTG1	17q25	Otozomal dominant
DFNA22	MYO6	6q13	Otozomal dominant
DFNA28	TFCP2L3	8q22	Otozomal dominant
DFNA36	TMC1	9q13-q21	Otozomal dominant
DFNA39	DSPP	4q21.3	Otozomal dominant
DFNA48	MYO1A	12q13-q14	Otozomal dominant
Yok	PRES (Prestin)	7q21.1	Otozomal resesif
DFNB1	GJB2 (Cx26)	13q11-q12	Otozomal resesif
DFNB1	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal resesif
DFNB2	MYO7A	11q	Otozomal resesif
DFNB3	MYO15A	17p11.2	Otozomal resesif
DFNB4	SLC26A4	7q31	Otozomal resesif
DFNB5	TMIE	3p21	Otozomal resesif
DFNB7/11	TMC1	9q13-q21	Otozomal resesif
DFNB8/10	TMPRSS3	21q22.3	Otozomal resesif
DFNB9	OTOF	2p23-p22	Otozomal resesif
DFNB12	CDH23	10q21-q22	Otozomal resesif
DFNB16	STRC	15q15	Otozomal resesif
DFNB18	USH1C	11p15.1	Otozomal resesif
DFNB21	TECTA	11q22-q24	Otozomal resesif
DFNB22	OTOA	16p12.2	Otozomal resesif
DFNB23	PCDH15	10q21-q22	Otozomal resesif
DFNB24	RDX	11q.23	Otozomal resesif
DFNB28	TRIOBP	22q13.1	Otozomal resesif
DFNB29	CLDN14	21q22.3	Otozomal resesif
DFNB30	MYO3A	10p11.1	Otozomal resesif
DFNB31	WHRN	9q32-q34	Otozomal resesif
DFNB35	ESRRB	14q24.3-q34.12	Otozomal resesif
DFNB36	ESPN	1p36.3-p36.1	Otozomal resesif
DFNB37	MYO6	6q13	Otozomal resesif
DFNB49	TRIC	5q12.3-q14.1	Otozomal resesif
DFNB53	COL11A2	6p21.3	Otozomal resesif
DFNB59	PJVK	2q31.1-q31.3	Otozomal resesif
DFNB67	TMHS	6p21.3	Otozomal resesif
DFN3	POU3F4		X'e bağlı

1.1.5 Konneksin – Konnekson – Gap Junction

Konneksinler, hücreler arasında kanallar aracılığı ile iletişimi sağlayan aralıklı bileşke(gap junction) isimli özelleşmiş yapıların alt birimlerini oluşturan temel proteinlerdir. Son zamanlarda konneksinleri kodlayan çoklu gen ailesini tanımlamada hızlı bir süreç gözlenmiştir. Adlandırma konneksin polipeptidinin moleküler ağırlığına ve nükleotidlerinin evrimsel sekans benzerliğine göre iki şekilde yapılmaktadır. Örneğin CX43, *GJA1*(Gap Junction Alfa-1) proteini olarak adlandırırken; CX32, *GJB1*(Gap Junction Beta-1) CX26 ise *GJB2*(Gap Junction Beta-2) olarak adlandırılır (Kumar 1996). Bu adlandırma CX32 ve CX26'nın, CX43'e göre birbirlerine daha fazla homolog olduğunu göstermektedir (Tablo1.3.).

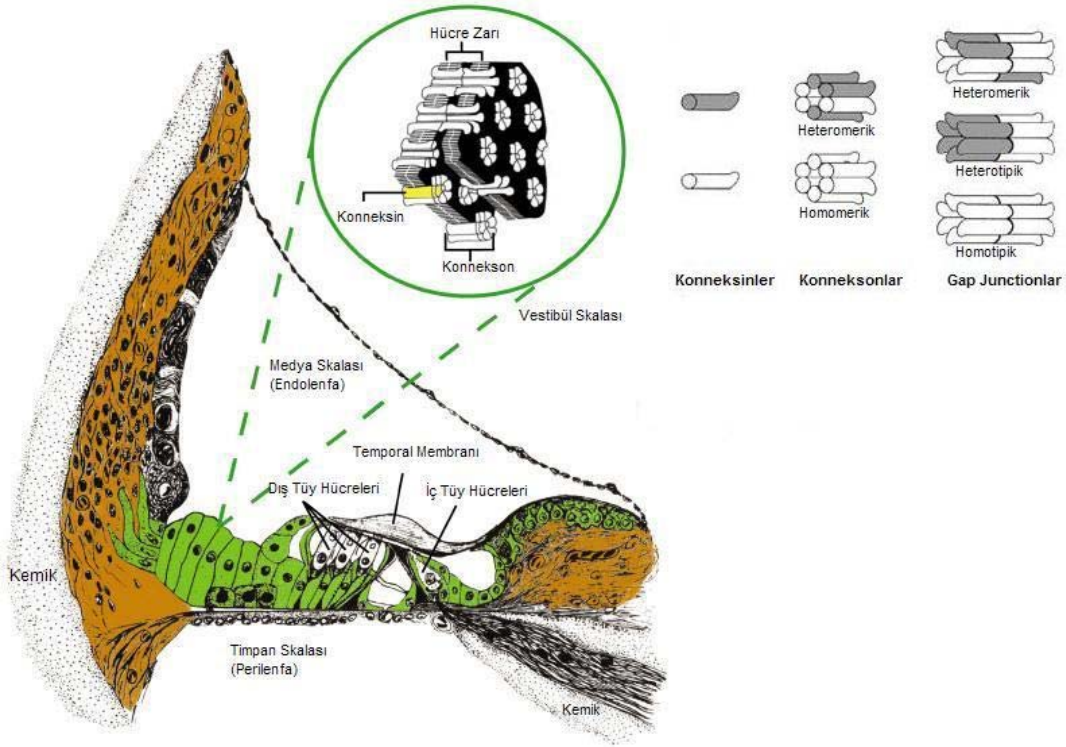
Tablo 1.3. Konneksin proteinlerinin isimlendirilmesi (Kumar 1996)

Evrimsel Sekans Benzerliğine Göre	Moleküler Ağırlığına Göre	Moleküler Ağırlık (kDa)	Eskpresse Edildiği Organ
$\alpha 1$	Cx43	43	Kalp
$\alpha 2$	Cx38	37.8	Embryo
$\alpha 4$	Cx37	37.6	Akciğer
$\beta 1$	Cx32	32	Karaciğer
$\beta 2$	Cx26	26.5	Karaciğer
$\beta 3$	Cx31	31	Deri
$\beta 5$	Cx30.3	30.3	Deri

Konneksin26 proteini, *GJB2* geninin ürünüdür ve 4 hidrofobik aminoasit alan, 2 ekstrasellüler bölge (loop), 1 amino uç, 1 intrasellüler bölge (loop) ve 1 karboksi uç'tan oluşur. Hidrofobik aminoasit alanlar, transmembran bölgelere karşılık gelir ve aralıklı bileşke kanallarının delik biçimi ve kanal geçirgenliği için önemlidirler. Ekstrasellüler bölgeler, konneksin uygunluğu için önemlidir. Amino ucu, voltaj kanal kapakları etrafındaki aminoasitlerde gap junction özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynar. İntrasellüler bölge ve karboksi uç, konneksinler arasında çok değişkendir (Chang vd 2003).

Altı konneksin alt ünitesi, konneksin denilen gap junction yapısının temeli olan hekzamer bir yapı oluşturmak için plazma membranında biraraya gelir. Her konneksin bitişik bir hücrede başka bir konneksinle birleşerek hücreler arası çoklu bir kanal oluşturarak özel bir membran bölgesinde gap junction şeklini almak için kümelenirler (Kumar 1996) (Şekil 1.3.). Konneksinler homomerik (sabit bir konneksin alt ünitesinden oluşur) veya heteromerik (farklı konneksin alt ünitesinden oluşur). Aynı veya farklı yapıdaki iki konneksin birleşebilir. Birleşen her iki konneksin aynı ise homotipik kanal, farklı ise heterotipik kanal oluşumundan bahsedilir (Holt and Corey 1999).

Gap junctionlar komşu hücreleri birbirlerine bağlayan kanallar içerirler. Diğer membran kanallarından farklı olarak iki hücre arasında bulunurlar ve molekül taşınması pasif difüzyonla gerçekleşir. Gap junction kanalları prensip olarak molekül ağırlığına göre geçirgenlik gösterir ve cAMP gibi 1000 Da'dan küçük moleküllerin geçişine izin verirler. Morfojen gibi küçük sinyal molekülleri direkt olarak gap junctionlar tarafından iletilir fakat protein ve nükleik asitlerin hareketine izin vermezler.

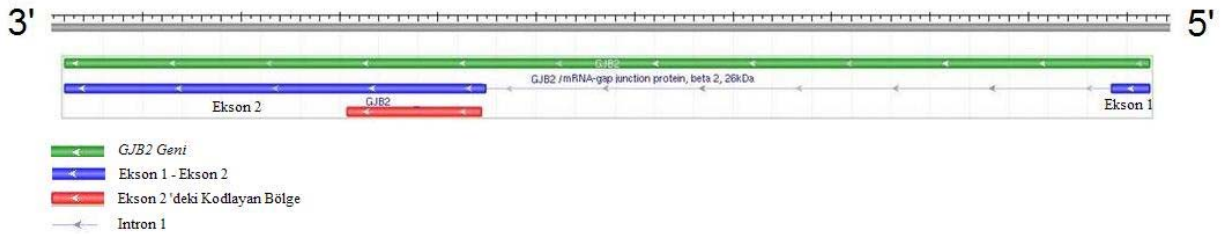


Şekil 1.3. Konneksinlerin kokleadaki organizasyonu (Hildebrand vd 2008)

Konneksinler ve gap junctionlar normal odyolojik fonksiyon için olmazsa olmazdır (Martin vd 1999). Kokleadaki epitel dokuda ve bağ dokusu hücrelerinde bol miktarda bulunur (Kammen-Jolly vd 2001, Sabag vd 2005). Gap junctionlar hücreler arası iyon değişimi kontrol ederek iç kulağın akıcılığında K^+ iyonlarının yeniden sirkulasyonu için temel bir yapı oluştururlar (Castillo vd 2003).

1.1.6. Gap Junction Beta 2 (*GJB2*; Connexin 26) Geni

Cx26 26 kDa'luk bir proteindir ve kokleada eksprese edilen konneksinler arasında en yaygın olanıdır. Birçok dokuda metabolik ve elektriksel bağlantılara aracılık ettiği gösterilmiştir (Wang vd 2003). Dış tüy hücrelerinin çevresindeki duyuşal olmayan epitel hücrelerinde, korti organının destek hücrelerinde, iç ve dış sulkus hücrelerinde ve spiral limbustaki dışlar arası hücrelerde tanımlanmıştır. Konneksin 26 ayrıca iç kulaktaki bağ dokuda, vestibüli skalalasındaki mezenkimal hücrelerinde ve spiral limbus ve ligamentteki fibrositlerde eksprese olur (Kikuchi vd 1995). Ayrıca iç kulaktan başka embriyonik epidermiste, palmoplantar epidermiste ve ter bezlerinde de *GJB2*'nin ekspresyonuna rastlanmıştır (Meyer vd 2002). Yapılan birçok klinik çalışmada Cx26 ekspresyonunu kodlayan *GJB2* geninde oluşan mutasyonların K^+ iyonlarının endolenfaya geri dönüşümünü bozduğu ve Korti organında ilerleyici zedelenmeyle sonuçlandığı görülmüştür (Lefebvre and Van de Water 2000). Bunların hücreşel fonksiyon bozukluğu ve sonunda hücre ölümüne yolaçtığı gözlenmiştir.



Şekil 1.4. *GJB2* geninin şematik olarak yapısı

Gap Junction Protein Beta 2 geni iki eksondan oluşan küçük bir genidir (Şekil 1.4.) ve transmembran "gap junction" protein ailesinin bir üyesi olan Cx26 proteinini kodlar (Yan vd 2003). Eksonlardan biri kodlama yapmazken diğeri 681 baz çiftlik bir bölgeyi kodlar (Kenneson vd 2002). İnsanda 13. kromozomun q11-12 bölgesinde lokalize olmuştur (Mignon vd 1996). Promotör bölgesi fare ve insanlarda yüksek düzeyde korunmuş ve altı GC kutusu, iki GT kutusu, bir TTAAAA kutusu, bir YY1 bağlanma bölgesi ve bir memeli salgı faktörü bağlanma bölgesi içerir (Kiang vd 1997).

Anormal Cx26 ekspresyonuna sebep olan ve işitme bozukluğuyla bağlantı kurulan yaklaşık 90 tane sendromik olmayan resesif *GJB2* mutasyonu belirlenmiştir (Azaiez vd 2004, Cryns vd 2004). Tek bir spesifik mutasyon, 35delG, beyaz ırk populasyonlarında gözlenen *GJB2* mutasyonlarında %85 gibi yüksek bir yüzdeyle gözlenir (Estivill vd 1998) ve şu ana kadar tanımlanmış en yüksek frekanslı hastalık mutasyonlarından biridir (Denoyelle vd 1997). Bu mutasyon Cx26 sekansında ard arda gelen altı guaninden birinin delesyona uğrayarak 38. nükleotidde çerçeve kayması ve dur kodonu oluşumuna öncülük etmesiyle oluşur (Zelante vd 1997, Denoyelle vd 1997). Avrupa ve Akdeniz'deki 35delG taşıyıcı sıklığı, kistik fibrozise sebep olan $\Delta F508$ mutasyonu sıklığından daha fazladır (Lucotte and Mercier 2001). Güney Avrupa'da %2.8 Kuzey Avrupa'da ise %1.3'lük taşıyıcı sıklığı gözlenmiştir (Gasparini vd 2000). 35delG dışında başka etnik gruplarda yüksek frekanslı *GJB2* mutasyonları da bulunmuştur. Bunlar Aşkenazi Yahudilerinde 167delT (Morell vd 1998), Japonlarda 235delC (Fuse vd 1999), Afrikalılarda R143W (Brobby vd 1998) mutasyonları olarak sıralanabilir.

GJB2 genindeki mutasyonlar aynı zamanda bazı sendromik işitme kayıplarında da tanımlanmıştır. Bunlar sensorinöral işitme kaybıyla beraber otozomal dominant keratoderma yani Vonwinkel Sendromu, diğer otozomal dominant işitme kaybıyla beraber palmoplantar keratoderma ve ektodermal displasia keratititis-ichtyosis-sağırılık sendromudur (Maestrini vd 1999, Kelsell vd 2001, Richard vd 2002). *GJB2* geni, *GJB3* ve *GJB6* genleri gibi sendromik olmayan işitme kaybıyla beraber jenodermatoz ile de bağlantısı olan bir konneksin genidir.

1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

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

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 zincirin uzaması (polimerizasyon)'dur. Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40'dır. Bir PCR işleminde "n" döngü sonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık 2^n kez çoğaltılmış olur .

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

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

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

Oligoprimelerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(\text{GC})+2(\text{AT})$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliğini arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılan oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur.

Oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri de rasgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermemeli ve guanin, sitozin nükleotidleri %50'yi geçmemelidir.

Kullanılan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan 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.

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

1.2.2. DNA'nın enzimatik kesimi

DNA'nın enzimatik kesimi Restriksiyon Endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılır.

1.2.2.1. Restriksiyon Endonükleazlar

PCR ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan birisi, PCR ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir (Sambrook vd 1989). RE'ler çift zincirli sarmal DNA moleküllerinde özel nükleotit dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini kesen enzimlerdir. Bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işlemini tanıma yerinde veya tanıma yerinin dışında başka bir özel dizide gerçekleştirirler. Kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur (Temizkan 1999).

RE enzimleri bakterilerden izole edilirler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği için bu ismi almışlardır (Öner 2002). Yabancı DNA girişine karşı ilgili DNA kesimlerinde metilasyon yapmak suretiyle bir savunma mekanizması olarak işlev yaparlar. Bugün için 400'den fazla RE tanımlanmıştır ve bunların 100 kadar tanıma bölgeleri bulunmaktadır (Temizkan 1999).

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Esas görevleri dışarıdan bakteriye giren bazı özel gen veya belirleyicileri taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır. Bu gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağını keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar. Bu enzimlerin bir çoğunun tanıdığı bölge palindromiktir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü olarak simetrikdir (Akar 1999).

Aynı DNA dizisini tanıyıp kesebilen farklı RE'ler de vardır ve bunlar izoşizomer olarak adlandırılır (Temizkan 1999).

1.2.2.2. Restriksiyon Enzim Kesimleri

DNA'daki gen değişimleri, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden oluyorsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. RE kesimlemesi ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment-Length polymorphisms; RFLP) olarak adlandırılır (Akar 1999).

1.2.3. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism)

PCR tekniği kullanılarak mutasyon saptama yöntemlerinden biri de tek zincir konformasyon polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism) tekniğidir.

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).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotid dizisine bağlı olarak belirli bir şekil alır. 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 ile çoğaltılır. Çoğaltılacak bölgenin baz içeriğine göre bir sıcaklık hesabı yapılır. PCR ürününün spesifikliğini arttırmak için belli oranda oligonükleotid ve formamid içeren yükleme boyası ile karıştırılır ve yüksek ısıda (99°C) tek zincirli hale getirilip, vertikal elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel hesaplanan sıcaklık değerinde belirli bir voltajda yürütülür. Göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Baz dizisi farklı olan DNA parçacığı normal DNA parçacığına göre bant kayması gösterir.

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

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

1.2.4. DNA Dizi Analizi

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

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif ³²P ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adım, her birinde bazlardan biri için kimyasal kesimin meydana geldiği dört ayrı reaksiyon karışımında gerçekleşir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış mo-

leküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır (Lüleci vd 2000). DNA parçacıklarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemiyle bantlar görüntülenir (Akar 1999, Öner 2002).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002). Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur.

PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda 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 lazer ışığı ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada Diyarbakır ve çevre illerinden köken alan; sendromik bulguları olmayan, sensörinöral ve doğuştan ya da prelingual işitme kaybı bulunan 45 proband (ailenin incelenmesine neden olan genetik değişikliğin ilk saptandığı birey) ve ailelerinin kan örnekleri temin edilmiştir. Tüm ailelerde en az iki etkilenmiş birey bulunmakta ve kalıtım otozomal resesif geçişe uymaktadır. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan formlar kullanılmıştır.

Sendromik olmayan kalıtsal işitme kaybının tanısı, otolojik, odyolojik, fizik muayane ve aile öyküsü ile konulmuştur. İşitme kaybı için belirgin bir çevresel nedeni olan veya sendromik bulguları olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. En az iki kardeşte işitme kaybı olan ve anne baba arasında akrabalık olan veya anne babanın aynı köyden köken aldığı aileler seçilmiştir. Sorgulama sırasında en az üç kuşağı içeren aile ağaçları çizilmiş ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden köken almayan aileler dahil edilmemiştir.

2.2 Kullanılan Yöntemler

2.2.1 DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmaya katılan bireylerden 1 ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikasil (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınmıştır. Bu kan örneği falkon tüpüne (50 mL) konur ve içerisinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 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 µl RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µl'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µl bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Soydam Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu 10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilir.

Ertesi gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'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.

Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µl %70'lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C 'de saklanabilmektedir.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada örnekler öncelikle *GJB2* geninde bildirilen 35delG mutasyonu için tarandı. PCR tekniği kullanılarak *GJB2*'de 35delG mutasyonunu kapsayan gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

2.2.2.1. *GJB2* 35delG Mutasyon Taraması

GJB2 35delG mutasyonunu saptamak için *GJB2*'nin ikinci eksonunun gen değişimini içeren bölgesi PCR tekniği ile çoğaltıldı. Yapılan PCR'da son konsantrasyonları 0,6 pikomol/µl olacak şekilde iki primer (Dizin 2.1.) kullanıldı:

F₄₈: 5' GGT GAG GTT GTG TAA GAG TTG G 3'

R₂₃₃: 5' CTG GTG GAG TGT TTG TTC CCA C 3'

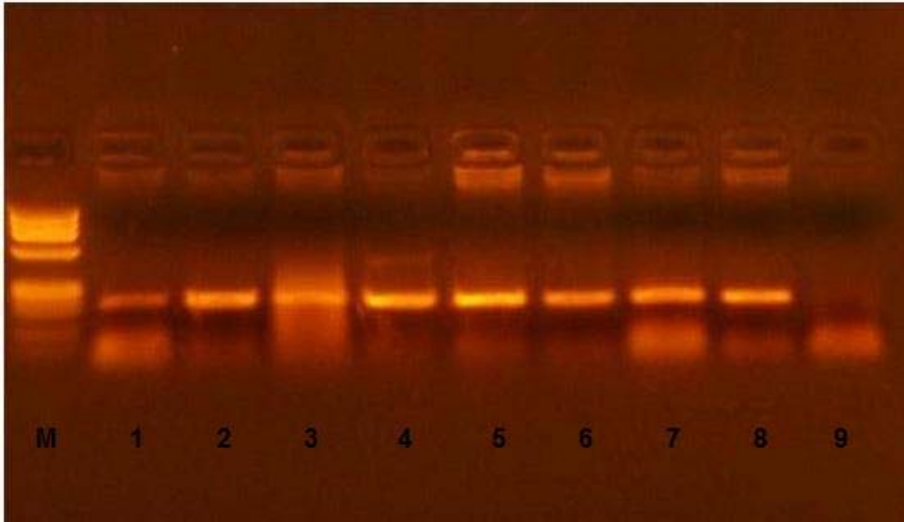
5'AGCGGTTGCCCGCCGCGTGGGTCTCGGGGAACCGGGGGCT
AATTACTCAGGTGAACAAGCTACTTTTTATCAGAGAACACCTAAAAACACGTTCAAGAGG
GTTTGGGAACTATACATTTAATCCTATGACAAAATAAGTTGGTTCTGTCTTCACCTGTTT
TGGTGAGGTTGTGTAAGAAGTTGGTGTCTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTCTTA
CCAGACTCAGAGAGTCTCCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATTCCTGTGTTGTGTGCATT
CGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGAT
CCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTT
CATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGC
CGACTTTGTCTGCAACACCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACCTGTGCTACCATCACTACTT
CCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCT
CCTAGTGCCATGCAGCTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGG
GGAGATAAAGAGTGAATTAAGGACATCGAGGAGATCAAACCCAGAAGGTCCGCATCGA
AGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTCCGGGTATCTTCGAAACCGG
TTCAATGTAGGCTTTTATGTATGTACGACGGCTTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTG
CAACGCCTGGCCTTGTCCAACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGAC
TGTCTTACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCAGTGA
ATTGTGTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAGCCAGTTTAACGCAT
TGCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGATGAGGGATGAGGGCAACCGTGT
CTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCA
TTTGAACCCCTGTAGGCCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGTCCCC
TAAAGCCTCAAAACAAAGCCTAATTTCTATGCCTGTCTTAATTTCTTCACTTAAGTTA
GTTCCACTGAGACCCAGGCTGTTAGGGGTATTGGTGTAAAGGTACTTTTCATATTTTAAA
CAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAGCCAGGTTCCACA
GAGGACACAGAGAAGGTTGGGTGTCTCCTGGGGTCTTTTTGCCAACTTTCCACAGT
TAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAA
AGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATA
GGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCT
CAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTC
TTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGATTCATTGTGGTC
ATAGCACCTAACAACTTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGAT
GGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTGTGTAAGAAATA
CAGACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCTGTCCAACACATCTCCCT
TTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGA
ATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGAGAAGT
TTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAGATGA
GCTTTGTCTACTTCAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAA
AATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATGAGCAGA
TCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTTCCAAAAATGG
TACTCCACATATTTAGTGAGGGTAAGTATTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAA
GCATTTTGTAAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAACTAAAATAATTTTGTAA
ATGTATCAAATACATTTAAACATTTAAATATAATCTCTATAATAATTTAAATCTAATA
TGGTTTTAATAGAACAGCAATTTAATTTTCATCTATCACT.....3'

Dizin 2.1. *GJB2* İkinci ekson dizisi ve primer 35delG taramasında kullanılan F48-R233, primer sekans 1.kısım PCR'ında kullanılan F4-R3, primer sekans 2.kısım PCR'ında kullanılan F7-R1 primerlerini belirtmektedir.

Reverse primer üzerinde, enzimle kesim işleminde mutasyonun saptanması amacı ile restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi oluşturulmuştur (site directed mutagenesis).

Diğer PCR bileşenleri; son konsantrasyon 0,2 mM olacak şekilde deoksिनükleotittrifosfatlar [dATP, dGTP, dCTP, dTTP (MBI Fermentas, Litvanya)], Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, Litvanya), 10 mM TrisHCl (25°C pH:8,8), 50 mM KCL %0,8 Nonidet P40 ve 15 mM MgCl₂'dir. Total hacim 25 µl'ye ddH₂O ile tamamlanılarak PCR gerçekleştirilmiştir.

GJB2 35delG mutasyonu için PCR sıcaklık koşulları, 95°C'de 5 dk denatürasyon; bunu izleyen 35 siklusa; 94°C'de 1 dk, 61°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk'dır. Son siklus 72°C'de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir (BioRad, A.B.D.). PCR sonunda 207 Bç. uzunluğunda ürün elde edilmiştir. PCR ürünleri %2'luk agaroz jelle 5 µl yüklenerek agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *GJB2*'deki 35delG mutasyonu için yapılan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker diğer örnekler ise (1-9) çoğaltılan gen bölgesine ait PCR ürünü olan 207 bç.'lik bandları göstermektedir. Son örnek DNA içermeyerek ddH₂O ile PCR reaksiyonuna sokulmuştur

2.2.2.2. PCR için Agaroz Jel Elektrofözezi

Agaroz (Sigma, ABD) jel, değerlendirilecek PCR örneğinin baz çifti uzunluğuna göre belirli konsantrasyonlarda hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirildi. Jel için 1 gr agaroz tartılıp ve TBE 1X solüsyonu ile 50 ml total hacme tamamlandı.

TBE 1X solüsyonu, stok olarak hazırlanan TBE 5X solüsyonundan deiyonize su (ddH₂O) ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlanır. TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, Ohio, ABD), 27,5 gr Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 mililitre 0,5 M EDTA (AppliChem, Almanya) ddH₂O ile 1 litre hacme tamamlanarak yapılır. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılır (Beko, Türkiye). Üzerine 2 µl Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya) ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra jel tabağına (Owl Scientific, ABD) dökülür. Agarozun donması için 25-30 dk beklenir. PCR ürünlerinden 5 µl Bromfenol mavisi (Merck, Almanya) ile muamele edilerek jele yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyon sonucu istenilen uzunluktaki doğru bölgenin çoğaltıldığının görülebilmesi için 18-20 µl kadar Marker (ΦX174 DNA/BsuRI(Hae III)) (MBI Fermentas, Litvanya) PCR ürünleri ile birlikte jele yüklenir. 90-100 V akımda 30-50 dk kadar yürütülür (SCIE-PLAS, İngiltere). Ultraviyole ışıkta (Light VUTM, Owl Scientific, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanır.

2.2.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi

PCR ürünlerinin agaroz jel elektrofözezinde yapılan kontrolünde, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görülmüşse restriksiyon endonükleaz ile kesimlemeye gidilir.

GJB2 35delG mutasyon taraması için kullanılan endonükleaz BseLI (BsiYI)'dir. PCR ürünleri BseLI (MBI Fermentas, Litvanya) enzimi ile kesilmiştir. PCR ürününde, BseLI enzimi için tek bir kesim noktası bulunmaktadır. BseLI enzimi mutanti tanıyan bir enzimdir. Kesim yeri 5'...CCN₅/N₂GG...3' ve 5'...GGN₂/N₅CC...3' dizileridir.

Kesim gerçekleşmişse 207 bç.'lik PCR ürünü, 186 bç.'lik ve 21 bç.'lik iki parçaya ayrılır. 21 bç.'lik ürün çok küçük olduğu için jelde görülmez. Bireyler 207 ve 186 bç.'lik bandlara göre değerlendirilir, %3'lük agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirilir (Storm vd 1999).

12,5 µl hacimdeki PCR ürünleri, 33 mM Tris-asetat, 10 mM Magnezyum asetat, 66 mM Potasyum asetat ve 0,1 mg/ml BSA (37°C, pH:7,9) içeren RE Tamponu ve her birey için 10 ünite/fil BseLI olacak şekilde hazırlanan tampon-enzim karışımı ile muamele edilmiştir. PCR ürünü-enzim-tampon karışımı, enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 55°C'de 14-16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

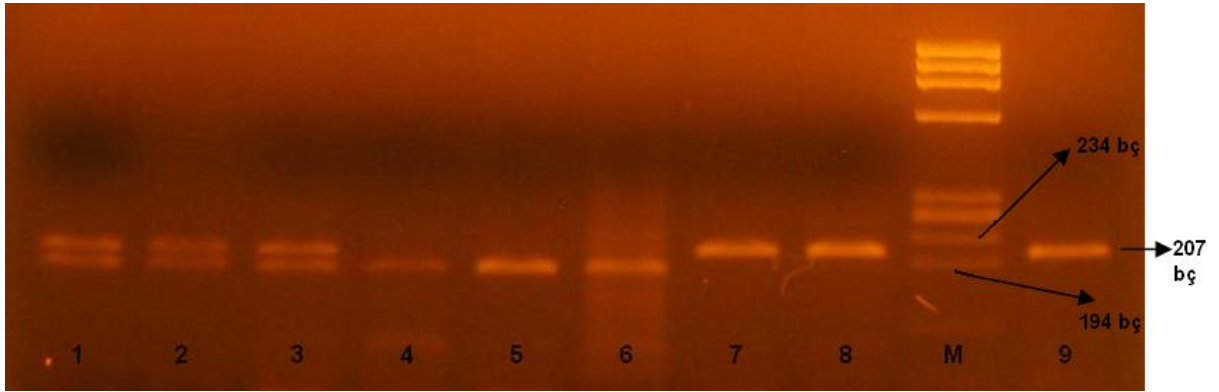
2.2.3.1. BseLI Restriksiyon Endonükleazi için Agaroz Jel Elektroforezi

RE kesim sonuçları %3'lük agaroz jelde değerlendirildi. Bu jel için de 1,5 gr agaroz tartılıp TBE 1X solüsyonu ile 50 ml total hacme tamamlanır. TBE 1X solüsyonu, stok olarak hazırlanan TBE 5X solüsyonundan ddH₂O ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlanır. TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 mililitre 0,5M EDTA (AppliChem, Almanya) ddH₂O ile 1 litre hacme tamamlanarak yapılır. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılır (Beko, Türkiye). Üzerine 2 µl Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya) ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra jel tabağına (SCIE-PLAS, İngiltere) dökülür. Agarozun donması için 25-30 dk beklenir.

BseLI enzimi ile kesim yapılmış PCR ürünlerine Brom-fenol mavisi (Merck, Almanya) ilave edilip yaklaşık 15-20 µl hacimdeki ürün jele yüklenir. Enzimle kesim ürünlerinin değerlendirilebilmesi için 18-20 µl kadar Marker (ΦX 174 DNA/BsuRI(Hae III), MBI Fermentas, Litvanya) kesilmemiş PCR ürünü (Uncut) ve kesimlenmiş örnekler ile birlikte jele yüklenir. 90-100 V akımda 30-50 dk kadar yürütülür (SCIE-PLAS, İngiltere).

Ultraviyole ışıkta (Light VU™, Owl Scientific, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanır.

%3'lük agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirildiğinde; her iki allelde bu mutasyonu taşımayan (negatif) bireylerde kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde tek bir band (207 bç./207 bç.), 35delG mutasyonunu tek allelde taşıyan (heterozigot) bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde diğeri onun altında iki band (207 bç./186 bç.), iki allelde de bu mutasyonu taşıyan (homozigot) bireylerde ise tek bir band (186 bç./186 bç.) olduğu görülmüştür (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. *GJB2* 35delG mutasyonunun BseLI restriksiyon endonükleazı ile kesimini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı. "M" marker; 1.örnek heterozigot, 4.örnek homozigot kontrolü; 9. örnek BseLI enzimi ile muamele edilmemiş PCR örneği (207 bç.); 2, 3. örnekler heterozigot olarak bu mutasyonu taşıyan bireyleri; 5, 6. örnekler homozigot olarak bu mutasyonu taşıyan bireyleri; 7, 8. örnekler normal bireyleri göstermektedir

2.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

GJB2 35delG mutasyon taramasında negatif sonuç veren probandlardan aile öyküsü olanlar seçilmiş ve *GJB2*, PCR-SSCP tekniği ile taranmıştır. PCR-SSCP için *GJB2*'nin kodlayan tek ekzonu 3 kısıma ayrılmıştır.

Birinci kısım 353 bç. olup,

F: 5'GCT TAC CCA GAC TCA GAG AAG 3'

R: 5'GGA CAC GAA GAT TCA GCT GCA GG 3',

ikinci kısım 308 bç. olup,

F: 5'CTG CAA GAA CGT GIG CTA CG 3'

R: 5'AGA AGC CGT CGT ACA TGA CA 3',

üçüncü kısım 347 bç. olup,

F: 5'GIG GAC CTA CAC AAG CAG CA 3'

R: 5' TGA GCA CGG GTT GCC TCA TC 3' primerleriyle (Dizin 2.2.) çoğaltılmış ve denatüre edici olmayan %7'lik vertikal poliakrilamid jele yüklenmiştir. Jel elektroforez sonrası gümüş boyama tekniği ile boyanmış band farklılığı sergileyen probandlara direkt DNA dizi analizi yapılmıştır.

Ayrıca *GJB2* geninin kodlamayan 1.eksonunda kırılma yeri(splice site) mutasyonu olan IVS1 + 1G > A (Denoyelle vd 1999), 35delG ve *GJB2* 2.ekson mutasyon taramasında negatif sonuç veren probandlarda araştırılmıştır. Bu bölge için primer baz çifti dizisileri (Dizin 2.2.): F: 5' CCG GGA AGC TCT GAG GAC 3', R: 5' GCA ACC GCT CTG GGC CTC 3' olarak kullanılmıştır.

Olgular bu primerlerle amplifiye edilmiş aynı teknikle poliakrilamid jele yüklenmiştir. Gümüş boyama tekniği sonrası band farklılığı sergileyen probandlara yine direkt DNA dizi analizi yapılmıştır.

5'GGGGTTCGCGGAC **CCGGGAAGCTCTGAGGAC** CCAGAGGCCGGGCGCGCT
 CCGCCCGCGCGCCCGCCCTCCGTAAC TTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGCGGGGTGT
GGGGTTCGGTTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACAGGTGTTGCGGCCCGCAGCGCCCGC
CGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCTCGGCGGCGCCGGCCAGGACCCGCTAGGAGC
GCAGGAGCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCGCCCGGCCCGCGGCTT
CCTCCCGACGCAGGTGAGCCCGCCGGCCCGGACTGCCCGCCAGGAACCTGGCGCGGG
 AGGGACCG **GAGACCCAGAGCGGTTGC** CCGGCCGCGTGGGTCTCGGGGAAC
 GAGAACACCTAAAAACGTTCAAGAGG
 GTTTGGGAAC TATAC **ATTTAATCCTATGACAACTAAGTTGGTTCTGTCTTACCTGTTT**
TGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTT **GCTTAC**
CCAGACTCAGAGAACTCTCCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATT
 CGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGAT
 CCTGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCTCTT
 CATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGAGATGAGCAGGC
 CGACTTTGTCTGCAACACCCCTGCAGCCAGG **CTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTT**
 CCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGC **CCTGCAGCTGATCTTCGTGTC**ACGCCAGCGCT
 CCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGG
 GGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAACCCAGAAGTCCGCATCGA
 AGGCTCCCTGTG **GTGGACCTACACAAGCAGCA** TCTTCTCCGGGT CATCTTGAAGCCGC
 CTTATGTACGTCTTCTA **TGTCATGTACGACGGCTTCT**CCATGCAGCGGCTGGTGAAGTG
 CAACGCCGTCCTGTCCAACTGTGGACTGCTTTGTGTCCGGCCACGGAGAAGAC
 TGTCTTCAAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGCTACTGA
 ATTGTGTTATTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAACGCAT
 TGCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGG **GATGAGGCAACCGGTGCTC** G
 CTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCA
 TTTGAAACCCCTGTAGGCCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGTCCCC
 TAAAGCCTCAAAACAAAGCCCTAATCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTCACTTAAGTTA
 GTTCCACTGAGACCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGAAGTACTTTTCAATTTTAAA
 CAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAGCCAGGTTCCACA
 GAGGACACAGAGAAGGTTGGGTGTCTCCTGGGGTCTTTTGGCAACTTTCCACGCT
 TAAAGGTGAACATTGGTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAA
 AGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTGGAAAGTGAACCTTTGTAGTATGATA
 GGTATTTTGTAGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCT
 CAGATTGTAATATGTAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTC
 TTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGATTTCATTGTGGTC
 ATAGCACCTAACAACTTTGAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGAT
 GGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATA
 CAGACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCTGTCCAACACATCTCCCT
 TTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGA
 ATTTTATGACACAGTACCATTAAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGT
 TTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGA
 GCTTTGTCTACTTCAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTCAGCCTCCAATTTTAAAGTGAA
 AATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGA
 TCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAATGG
 TACTCCACATATTTAGTGAGGGTAAGTATTTCTGTTGTCAAGAATAGCATGTAAAA
 GCATTTTGTAAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAAATTTTGT
 ATGTATCAAATACATTTAAACATTTAAATATAATCTCTATAATAATTTAAATCTAATA
 TGTTTTTAAAGAACAGCAAATTTAATTTTCACTATCTATCACTTTTATATAA.....3'

Dizin 2.2. *GJB2*'nin iki eksonun dizini ve PCR-SSCP tekniğinde kullanılan primerler. **Primer** *GJB2* 1.ekson için; **primer** *GJB2* SSCP 1. kısım için, **primer** *GJB2* SSCP 2. kısım için, **primer** *GJB2* SSCP 3. kısım için kullanılan forward ve reverse primerleri *GJB2* dizisi üzerinde belirtmektedir.

2.2.4.1. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

SSCP jelinin döküleceği camlar distile su ile yıkanıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1 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 gr Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözündürülür ve hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır (Sambrook vd 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr 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 gr 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 süzildükten 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. Jel polimerleştikten sonra 1 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

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

PCR örneklerinin içerdiği adenin ve sitozin nükleotid sayılarını baz alarak aşağıda belirtilen formül ile bir sıcaklık değeri (Ts) hesaplanmıştır ve örnek yüklenmeden önce jeller hesaplanan bu sıcaklık derecesine getirilmiştir (Li vd 2003). $T_s = [80XC/(A+1)] / \{2,71+[C/(A+1)]\}$

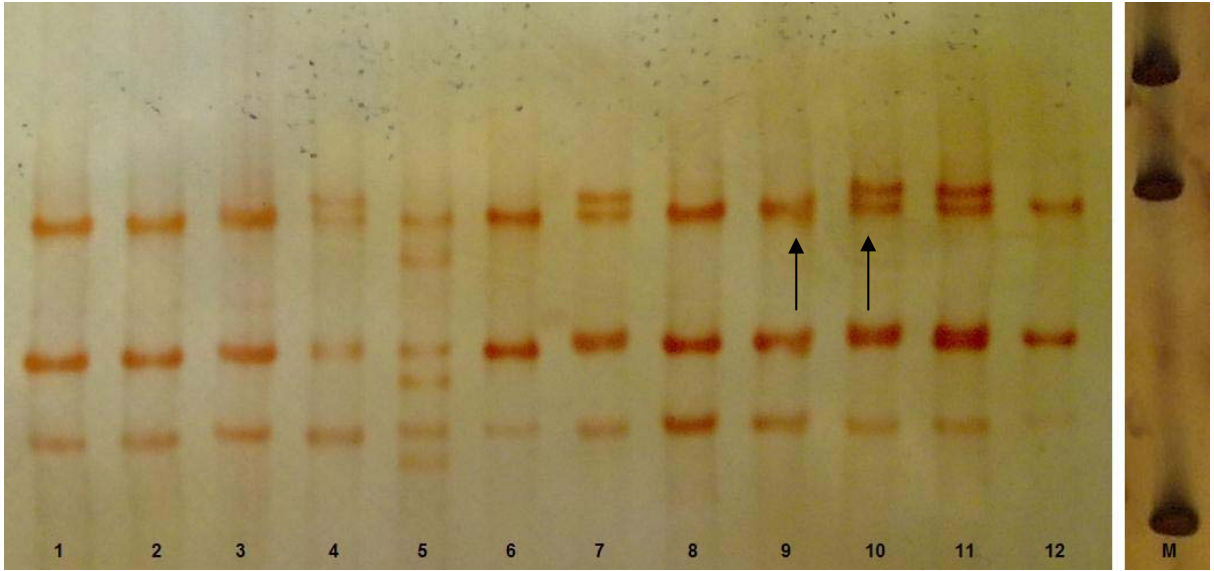
PCR ürünlerine spesifikliğı arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası ve oligonükleotid eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20mM EDTA, %0,05 Xyelene Cyanol, %0,05 Brom-fenol mavisi içermektedir. 2 µl PCR ürününe 7µl yükleme boyası, 1'er µl 3 pmol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

2.2.4.2. Gümüş Boyama

Gümüş boyama için %1'lik gümüş nitrat, %15'lik Sodyum Hidroksit (NaOH), %7,5'lik Sodyum Bikarbonat solüsyonları kullanılmıştır. Boyamanın yapılacağı kabın hacmine göre her üç solüsyon da 1:9 oranında ddH₂O ile seyreltilerek kullanılır. 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 (Şekil 2.3.) .



Şekil 2.3. Band farklılığı görülen bir SSCP jel görüntüsü. 3. örnek yabani tip için kontrol, 4. örnek V27I polimorfizmi için, 5. örnek ise M34T polimorfizmi için jele kontrol amaçlı yüklenmiştir. 7,10 ve 11. örnekler V27I polimorfizmini taşıyan bireyleri göstermektedir.

Bu aşamadan sonra band farklılığı gösteren örneklere DNA dizi analizi yapılmıştır.

2.2.5. DNA Dizi Analizi

2.2.5.1. PCR ve Pürifikasyon İşlemleri

GJB2 35delG mutasyonu için negatif olup PCR-SSCP tekniğinde farklı band sergileyen probandlara DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu nedenle *GJB2* iki kısma ayrılıp uygun primerler (Dizin 2.1.) kullanılarak kodlayan ekson çoğaltılmıştır.

Birinci kısım için;

F4: 5' GCT TAC CCA GAC TCA GAG AAG 3'

R3: 5' GCC GCC TTC ATG TAC GTC TTC 3',

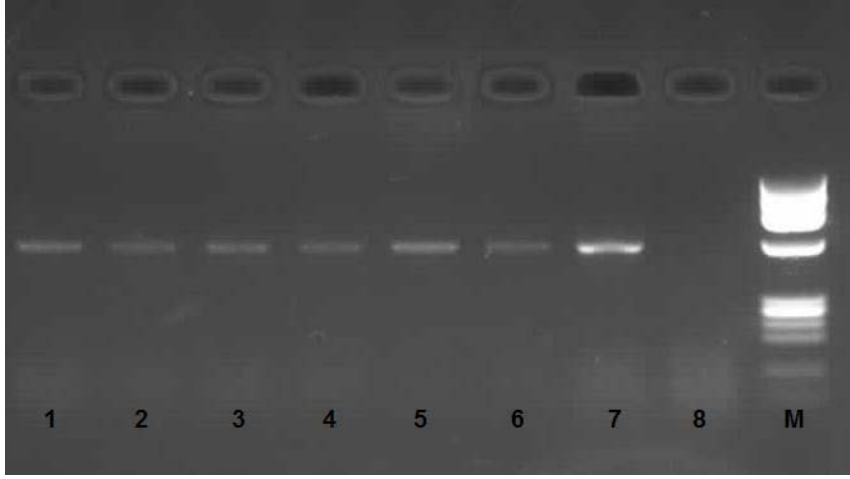
ikinci kısım için;

F7: 5' CTG CAA GAA CGT GTG CTA CG 3'

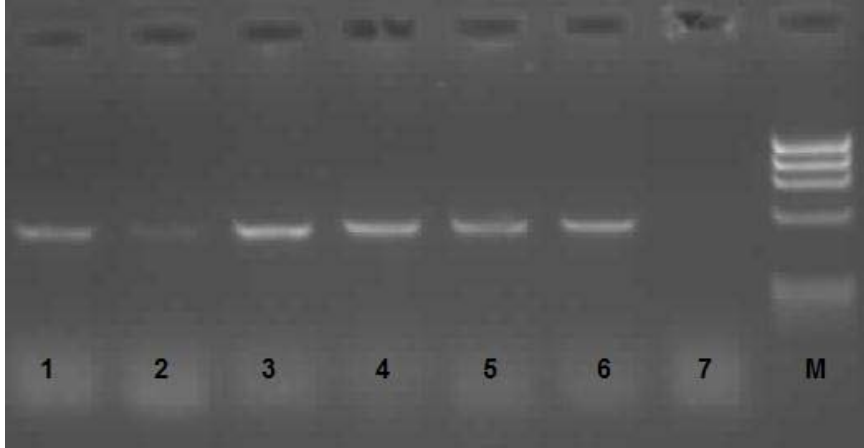
R1: 5' GAT GAG GCA ACC CGT GCT CA 3'

primerleri kullanılmıştır.

PCR reaksiyonundan sonra ürünler pürifikasyon işlemine sokulmuştur. Pürifikasyon sonrası temizlenen örnekler DNA dizi analizinde kullanılacak uygun miktarların belirlenmesi için agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Şekil 2.4., 2.5.).



Şekil 2.4. *GJB2*'nin birinci bölgesinin PCR ürünlerini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker, diğerleri birinci bölgeye ait F4 ve R3 primerleri ile çoğaltılmış PCR ürünlerini göstermektedir. 8. örnek DNA içermeyerek ddH₂O ile PCR reaksiyonuna sokulmuştur



Şekil 2.5. *GJB2*'nin ikinci bölgesinin PCR ürünlerini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker, diğerleri ikinci bölgeye ait F7 ve R1 primerleri ile çoğaltılmış PCR ürünlerini göstermektedir. 7. örnek DNA içermeyerek ddH₂O ile PCR reaksiyonuna sokulmuştur

2.2.5.2. DNA Dizi Analizi

Pürifikasyon işleminin ardından PCR ürünleri DNA dizi analizi için bir dizi işlemden geçirilir.

2.2.5.2.1. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

DNA dizi reaksiyonu temelde PCR ürünlerinin floresan işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesine dayanır. Bu amaçla ürünler cycle sequencing denilen yeni bir PCR döngüsüne sokulur. Cycle sequencingte PCR ürünleri kalıp DNA işlevini görür. DNA polimeraz varlığında primer yardımıyla floresan işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire girer ve reaksiyon normal PCR döngüsü gibi devam eder. Aradaki fark primerin uzaması sırasında işaretli ddNTP'lerin bağlanması ile zincirin sonlanmasıdır.

Bu çalışmada nükleotit dizinin saptanması için otomatik DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD). 0,5 ml'lik ependorf içine 12 µl premiks (her örnek için 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı(2 µl ddUTP, 2 µl ddGTP, 2 µl ddCTP, 2 µl ddATP ve 1 µl polimeraz enzimi), pürifiye edilmiş PCR ürünü (0,5-6 µl) ve primer (2 µl) koyulup toplam hacim dH₂O ile 20 µl'ye tamamlanır. Sıcaklık koşulları, denatürasyonu takiben 96 °C'de 20 sn, 50 °C'de 20 sn, 60 °C'de 4 dk'dır ve bu döngü 30 kez tekrarlanır.

2.2.5.2.2. Etanol Çöktürmesi

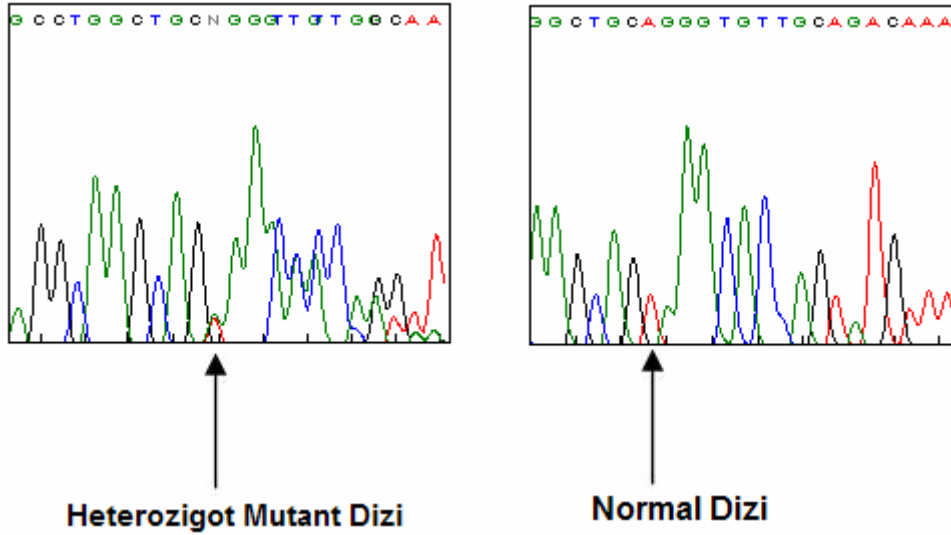
Cycle sequencing işleminin ardından reaksiyonun durdurulması için 2 µl NaOAc (1,5 M), 2 µl EDTA (50 mM) ve 1 µl glikojen (20 mg/mL) örnekler eklenir. 60 µl %95'lik soğuk etanol muamelesinden sonra +4 °C 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir (Beckman Coulter Mikrofuge 18, ABD). Ardından üst sıvı dökülüp iki kez 200 µl %70'lik soğuk etanol eklenerek +4 °C 14000 rpm'de 2 dk tekrar santrifüj edilir. Etanol çöktürmesinin ardından örnekler liyofilizatör (Christ, Almanya) cihazında yüksek vakum altında bırakılarak kurutulur.

Bu aşamadan sonra örnekler DNA dizi analizi cihazına yüklenir. Elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirilmiştir ve mutasyonlar için değerlendirilmiştir.

3.BULGULAR

Bu araştırma sendromik olmayan işitme kaybına sahip 45 proband ile yapılmıştır. Çalışma grubu ailesel (probanddan başka en az bir etkilenmiş olgunun bulunduğu) olgularla oluşturulmuştur. *GJB2* mutasyon taraması sonucu, 3 probandda homozigot, 2 probandda heterozigot olarak 35delG mutasyonu saptanmıştır. 40 proband 35delG mutasyonu için negatif sonuç vermiştir.

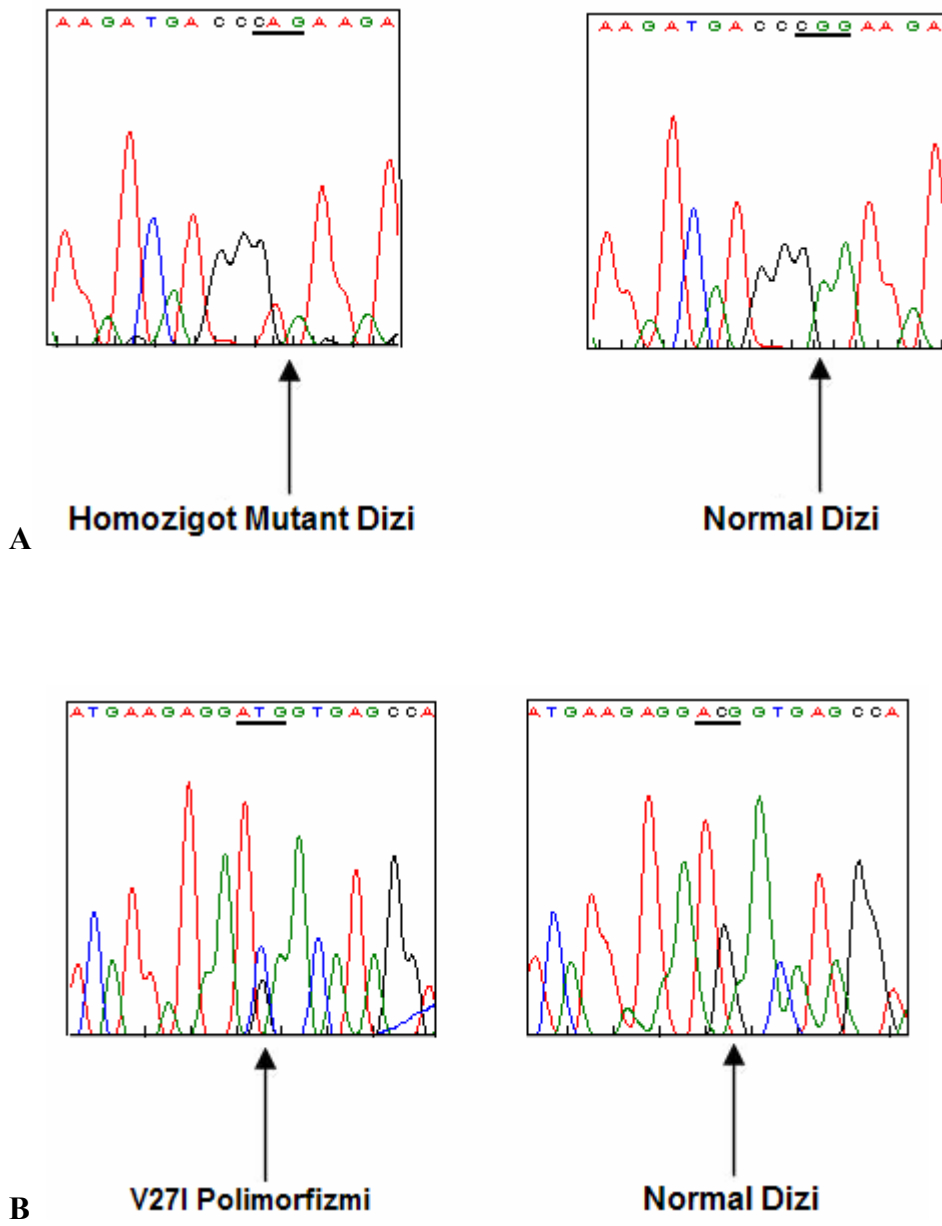
35delG mutasyonunu heterozigot taşıyan iki probandda *GJB2*'nin kodlayan eksonu için DNA dizi analizi yapılmıştır. Probandların bir tanesinde kodlayan bölgede işitme kaybı nedeni olarak ikinci bir mutasyon 167delT saptanmıştır (Şekil 3.1.).

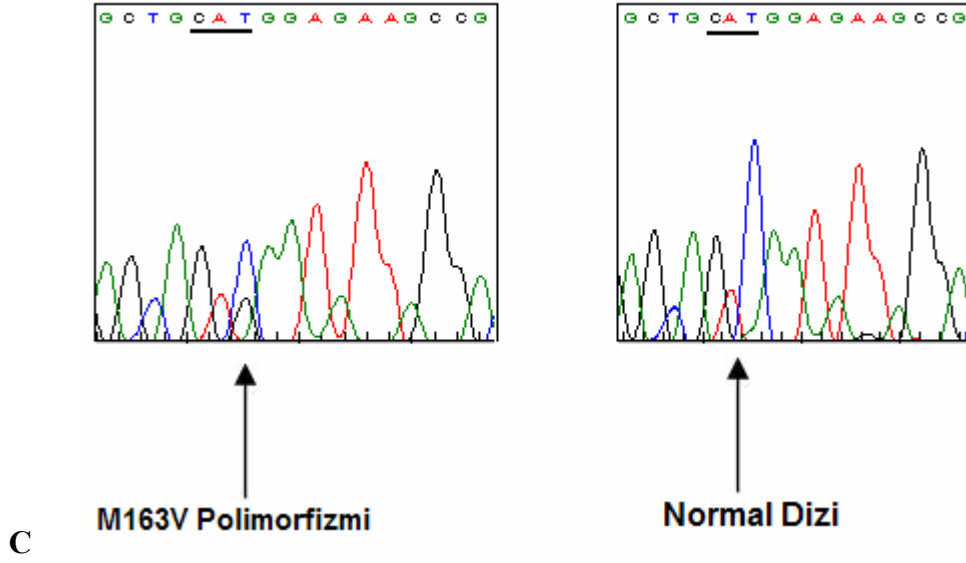


Şekil3.1. 35delG mutasyonunu heterozigot taşıyan probandlarda DNA dizi analizi ile ikinci mutasyonun (167delT) belirlenmesi

Bir sonraki aşamada 35delG mutasyonu için negatif sonuç veren 40 probanddan *GJB2*'nin kodlayan eksonu PCR-SSCP tekniği ile taranmıştır. SSCP taramasında band farklılığı gösteren probandlara DNA dizi analizi yapılmıştır.

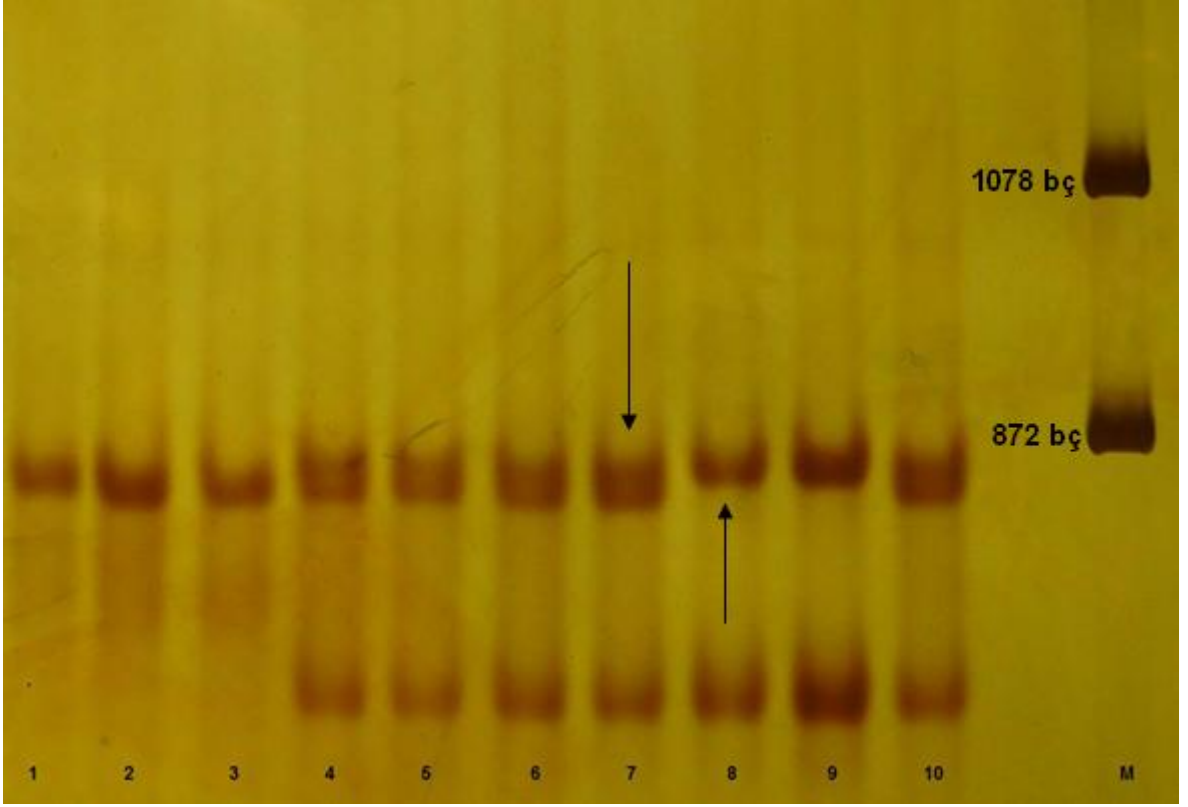
Yapılan değerlendirmede bir olguda R143W mutasyonu homozigot olarak (Şekil3.2.-A); V27I polimorfizmi bir probandda heterozigot olarak (Şekil3.2.-B); M163V polimorfizmi bir probandda heterozigot olarak (Şekil3.2.-C) olarak saptanmıştır.





Şekil3.2. SSCP'de band farklılığı görülen probandlarda DNA dizi analizi ile tespit edilen homozigot R143W mutasyonu (A). V27I polimorfizmi (B) ve M163V polimorfizmi (C)

35delG için heterozigot ve 35delG dahil diğer mutasyon taramalarında negatif sonuç veren probandlara *GJB2* geninin kodlamayan 1. eksonunda kırılma yeri(splice site) mutasyonu olan IVS1+1G>A için SSCP taraması yapılmıştır. 35delG mutasyonu heterozigot olan bir proband IVS1+1G>A için heterozigot sonuç verirken, bir probandda homozigot IVS1+1G>A mutasyonu saptanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. IVS1+1G>A mutasyonunun SSCP tekniğiyle tespit edilmesi. M marker, 9. kuyuya homozigot kontrol, 10. kuyuya heterozigot kontrol yüklenmiştir. 4,5,6 ve 7. örnekler heterozigot; 8. örnek homozigot; 1,2,3. örnekler ise normal bireyleri göstermektedir

Araştırma bulguları toplu halde Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de görülmektedir.

Cx26 Genotipi	Aile No	Memleket	İşitme Kayıplı Birey Sayısı	Protein Bölgesi
R143W / R143W	778	Urfa/Siverek	5	TM3
M163V/ wt	794	Diyarbakır/Çınar	3	EC2
V27I / wt	820	Mardin/Midyat	3	TM1/-
IVS1+1G>A / IVS1+1G>A	849	Mardin	2	yok(intronik)
35delG / IVS1 + 1G>A	848	Mardin	2	IC1/yok
35delG / 167delT	845	Mardin	2	IC1/EC1
35delG / 35delG	814	Diyarbakır/Lice	2	IC1/IC1
35delG] / 35delG	809	Diyarbakır/Hazro	6	IC1/IC1
35delG / 35delG	805	Diyarbakır/Eğil	3	IC1/IC1

Tablo 3.1. Bu araştırmada bulunan tüm *GJB2* mutasyonları ve polimorfizmlerinin listesi. TM1=1 numaralı transmembran bölge, TM3=3 numaralı transmembran bölge, EC1=1 numaralı ekstrasellüler bölge, EC2=2 numaralı ekstrasellüler bölge, IC1=1 numaralı intrasellüler bölge

	İşitme Kayıplı Proband Sayısı	<i>GJB2</i> Sonucu	
		+/+	-/-
HxH	43	6	37
DxH	1	1	0
DxD	1	0	1

Tablo 3.2. Aile geçmişine göre *GJB2* mutasyonlarının oranı. HxH duyan ebeveynleri, HxD duyan ve sağır ebeveynleri, DxD sağır ebeveynleri göstermektedir

4-TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki işitme engellilerde *GJB2* mutasyon sıklığının saptayarak, bu verilerle *GJB2* mutasyonlarının Türkiye'deki bölgeler arası farklılığını göstermektir. *GJB2* mutasyonlarının Cx26 bağlantılı, sendromik olmayan işitme kaybının patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir(Stacey vd 2007). Araştırmamızda elde edilen verilere göre Güneydoğu Anadolu'da otozomal resesif işitme engellilerde biallelik *GJB2* mutasyon sıklığı 7/45 (%15.5, %95 güvenirlilik aralığında, %5-26 arasında değişkenlikle) bulunmuştur. Bu rakam daha önce Türkiye'de yapılan çalışmalarda Türkiye geneli için tanımlanan rakamlara (Uyguner vd 2003, Tekin ve Arıcı 2007) göre değerlendirildiğinde düşüktür (Tablo 4.1). Bir kıyaslama yapılırsa daha önce Batı Anadolu'da bulunan otozomal resesif biallelik mutasyon sıklığı %31.4, İç Anadolu'da ise %34.3'tür (Tekin ve Arıcı 2007). Her iki rakam da Güneydoğu Anadolu'da saptadığımız rakamdan daha yüksektir (Ege ile Güneydoğu Anadolu arasındaki fark $p=0.038$, $\chi^2 = 4.759$. İç Anadolu ile Güneydoğu Anadolu arasındaki fark $p=0.031$, $\chi^2=4.838$).

Tablo 4.1. Otozomola resesif işitme kaybındaki *GJB2* mutasyonlarının Türkiye ortalamaları

	Taranan işitme engelli Sayısı	Biallelik Cx26 sıklığı (%)
Uyguner vd 2003	60	31.7
Tekin ve Arıcı 2007	214	23.4

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde işitme engelliler arasında *GJB2* mutasyonlarının oranının düşük olması, bu bölgede *GJB2* mutasyon sıklığının düşük olduğunu göstermeyebilir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde özellikle akraba evliliğinin daha yoğun yapılması genetik nedenli işitme kayıplarının sıklığını artırıyor olabilir. Bu durumda bu bölgede *GJB2* mutasyon sıklığı diğer bölgelerle aynı olmasına rağmen, görece daha düşük bulunuyor olabilir. Akraba evliliğinin *GJB2* mutasyon sıklığına etkisinin, daha nadir mutasyonlara bağlı diğer işitme kaybı genleri kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir (Tekin ve Arıcı 2007). Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *GJB2* mutasyonlarının sağlıklı bireylerdeki sıklığının çalışılması daha net bir sonuç elde edilmesini sağlayabilir.

35delG mutasyonu altı guanin nükleotidinin oluşturduğu seriden tek bir guaninin delesyona uğraması sonucu oluşur (Cohn vd 1999) ve çerçeve kaymasına neden olarak 13. pozisyonda dur kodonu (UGA) oluşur (Zelante vd 1997). Mutasyonun protein düzeyindeki sonucu; 226 aminoasitlik normal protein yerine, 12 aminoasitlik işlevsel olmayan bir Cx26 proteininin oluşumudur (Cohn vd 1999).

2001 yılında Belçika, İngiltere ve Amerika'daki beyaz ırkta, 35delG mutasyonunu çevreleyen dar bir bölgede aynı haplotipin gözlenmesi, bu mutasyonun çok eski dönemlerde ortaya çıkan ve ortak bir atadan türeyen atasal (founder) mutasyon olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Yapılan araştırmalarla, 35delG'nin yaklaşık olarak 500 kuşak önce oluşmuş ve 10.000 yaşında olan çok eski bir mutasyon olduğu saptanmıştır. Mutasyonun Orta Doğu'dan köken aldığı ve popülasyonların göçleriyle Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmüştür (Van Laer vd 2001). 35delG mutasyonu beyaz ırktan gelen toplumlarda en yaygın görülen mutasyondur (Gasparini vd 1999) ve beyaz ırkta tüm patolojik *GJB2* allellerinin yaklaşık %80'ini oluşturur (Yan vd 2003). Bu bilgilere paralel olarak araştırmamızda 35delG mutasyonunun allelik oranı, %15.5 ile Güneydoğu Anadolu'da en sık rastlanan *GJB2* mutasyonu olarak göze çarpmaktadır (Tablo 4.2.).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi Kuzey Mezopotamya'yı da içeren tarihteki en eski yerleşim bölgelerinden biridir. Bu durumda 10.000 yıl önce ortaya çıktığı düşünülen ve şu anda yüksek sıklığa sahip olduğu gösterilen bu bölge, mutasyonun ilk olarak ortaya çıktığı yer olabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Tablo 4.2. Olgularda bulunan *GJB2* mutasyonlarının allelik sıklığı

Mutasyon	Allelik Sıklığı (%)
35delG	15.5
IVS1 + 1G > A	6.6
R143W	4.4
167delT	1.1

IVS1+1G>A aynı zamanda -3170 G'den A'ya olarak da bilinir. İlk kez Denoyelle tarafından *GJB2*'nin kodlama yapmayan 1.eksonunda saptanmıştır. Bu mutasyon kırılma işlevini bozarak hastalığa sebep olmaktadır (Denoyelle vd 1999). Önceki yıllarda *GJB2* mutasyonları taramasında IVS1+1G>A mutasyonu tespiti laboratuvarında çok sık çalışılmazken, zamanla birçok toplumda tespit edilmiştir (Snoeckx vd 2005, Seeman and Sakmaryová 2006). Bu mutasyonun Mardin'den köken alan iki ailede tespit edilmesi dikkat çekicidir. IVS1+1G>A mutasyonunun Avrupa ve Asya için bir geçiş konumu oluşturmuş olan ülkemizdeki önemi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde elde etmiş olduğumuz bu sonuçla bir kez daha gösterilmiştir.

R143W mutasyonu, Brobby ve arkadaşları tarafından Ganalı ailelerde yapılan bir çalışmada tanımlanmıştır. Mutasyon, sitozinin timine dönüşmesi ile 143. kodonda arjinin triptofan değişimi ile sonuçlanır (Brobby vd 1998). Araştırmamızda bu mutasyon bir probandda homozigot olarak saptanmıştır.

167delT mutasyonu ilk kez Zelante ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tanımlanmıştır (Zelante vd 1997). Delesyon 56. kodonda çerçeve kaymasına yol açar ve ilk 55 aminoasidi sağlam olan fakat karboksi ucunda 25 yeni aminoasit içeren bir polipeptid oluşumuna neden olur (Kelley vd 1998). Aşkenazi Yahudi toplumuna bakıldığında 35delG mutasyonunun taşıyıcı sıklığı %0,73 iken bir başka *GJB2* mutasyonu olan 167delT'nin taşıyıcı sıklığının %4,03 olduğu görülmektedir (Morell vd 1998). 167delT mutasyonu için korunmuş bir haplotipin olması, bu mutasyonu taşıyan allelin tek bir kökenden ortaya çıktığını düşündürmektedir (Morell vd 1998). Bu çalışmada Aşkenazi Yahudi toplumunda sıkça rastlanan 167delT mutasyonu Mardin'den köken alan probandlardan birinde 35delG ile birlikte heterozigot olarak belirlenmiştir.

V27I polimorfizmi ilk kez Kelley tarafından tanımlanmıştır. Uzakdoğu'daki toplumlarda sık olarak rastlanmakta olan bu değişim (Fuse vd 1999, Abe vd 2000), 27. kodonda valin aminoasidinin izolösine dönüşümüne sebep olmaktadır (Kelley vd 1998). Bizim çalışmamızda, V27I bir olguda heterozigot olarak bulunmuştur.

M163V polimorfizmi ilk kez Marlin tarafından 487. bazda adeninin guanine dönüşmesi olarak tanımlanmıştır (Marlin vd 2001). Bu değişim metionin aminoasidinin valine dönüşümüyle sonuçlanmaktadır. Bizim çalışmamızda, M163V bir olguda heterozigot olarak sonuç vermiştir.

Genetik hastalıklar hakkında toplumsal bilincin daha fazla artmasıyla, işitme kayıplı bireyler ve ailelerinin odyolojik rahatsızlıklarının sebebini öğrenme ve genetik orijinleri için yapılan teşhisleri kabul etme ve onaylamaları daha da yaygınlaşmıştır. İşitme kaybının etiyojisininin soruşturulmasında ve genetik testlerle heterozigot ve homozigot bireylerin tanımlanmasında hızlı ve efektif tanı konabilmesi, hasta tabanlı genetik danışmanlık için son derece önemlidir. Ancak mutasyonların sıklığı ve dağılımı ülkemiz içinde bile farklılık gösterebilmektedir.

Türkiye'nin geneli üzerine yapılan araştırmalardan sonra bizim araştırmamızdaki gibi bölgesel mutasyon sıklıklarının saptanması, ailelere moleküler tanının bulunmasının kolaylaşmasını sağlayarak daha doğru klinik değerlendirme ve genetik danışmanlık yapılmasını sağlayacaktır.

REFERANSLAR

- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P. & Kimberling, W. 2000. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet.*, 37(1); 41-43.
- Akar, N. 1999. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, AÜTF Antip AŞ Yayınları, 508 sayfa, Ankara.
- Azaiez, H., Chamberlin, G.P., Fischer, S.M., Welp, C.L., Prasad, S.D. 2004. *GJB2*: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Hum Mutat.*, 24 (4); 305-311.
- Barış, I., Kilinc, M.O., Tolun, A. 2001. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet.*, 60(6); 452-455.
- Bitner-Glindzicz, M. 2002. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull.*, 63(1); 73-94.
- Broddy, G.W., Muller-Myhsok, B. & Horstmann, R.D. 1998. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med.*, 338(8); 548-550.
- Castillo, I., Moreno-Pelayo, M.A., del Castillo, F.J., Brownstein, Z., Marlin, S. 2003. Prevalence and evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the *DFNB1* locus in hearing impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet.*, 73(6); 1452-1458.
- Chang, E.H., Van Camp, G. & Smith, R.J.H. 2003. The Role of Connexins in Human Disease. *Ear Hear.*, 24(4); 314-323.
- Cohn, E.S., Kelley, P.M., Fowler, T., Gorga, M.P., Lefkowitz, D., Kuehn, H., Schaefer, G.B., Gobar, L.S., Hahn, F.J., Harris, D.J. & Kimberling, W.J. 1999. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2/DFNB1*). *Pediatrics* 103(3); 546-550.
- Cryns, K., Orzan, E., Murgia, A., Huygen, P.L., Moreno, F. 2004. A genotype phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *J Med Genet.*, 41(3); 147-154.
- Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M., Wilcox, S., Lench, S. 1997. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet.*, 6(12); 2173-2177.
- Erbe, C.B., Harris, K.C., Runge-Samuelson, C.L., Flanary, V.A. & Wackym, P.A. 2004. Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 114(4); 607-611.
- Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S. 1998. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet.*, 351(9100); 394-398.
- Fuse, Y., Doi, K., Hasegawa, T., Sugii A, Hibino H, Kubo T. 1999. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *NeuroReport.*, 10(9): 1853-1857.
- Gasparini, P., Estivill, X., Volpini, V., Totaro, A., Castellvi-Bel, S., Govea, N., Mila, M., Della Monica, M., Ventruto, V., De Benedetto, M., Stanziale, P., Zelante, L., Mansfield, E.S., Sandkuijl, L., Surrey, S., Fortina, P. 1997. Linkage of *DFNB1* to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet.*, 5(2); 83-88.

- Gasparini, P.; Rabionet, R. Barbujani, G. Melchionda, S. Petersen, M. Brondum-Nielsen, K. Metspalu, A. Oitmaa, E. Pisano, M. Fortina, P. Zelante, L. Estivill, X. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet.*, 8(1); 19 - 23.
- Guilford, P., S.B. Arab, S. Blanchard, J. Levilliers, J. Weissenbach, A. Belkahia, and Petit, C. 1994. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet.*, 6(1); 24-28.
- Hereditary Hearing Loss Homepage. 2008. <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>
- Hildebrand, M. S., Newton, S. S., Gubbels, S. P., Sheffield, A. M., Kochhar, A., de Silva, M. G., Dahl, H. H. M., Rose, S. D., Behlke, M. A., and Smith, R. J. H. 2008. Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol Ther*, 16(2); 224-236.
- Holt, J.R. Corey, D.P. Ion channel defects in hereditary hearing loss. 1999. *Neuron.*, 22(2); 217-219.
- Kammen-Jolly, K., Ichiki, H., Scholtz, A., Gsenger, M., Kreczy, A. 2001. Connexin 26 in human fetal development of the inner ear. *Hear Res.*, 160(1-2); 15-21.
- Kelley, P.M., Harris, D.J., Comer, B.C., Askew, J.W., Fowler, T. 1998. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet.*, 62(4); 792-799.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F. Leigh, I. M. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628); 80-83.
- Kelsell, D.P., Di, W.L. and Houseman, M.J. 2001. Connexin mutations in skin disease and hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 68(3); 559-568.
- Kenneson, A., Van Naarden Braun K., Boyle, C. 2002. *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet. Med.*, 4(4); 258-274.
- Kiang, D. T.; Jin, N.; Tu, Z.-J.; Lin, H. H. 1997. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene*, 199(1-2); 165-171
- Kikuchi, T., Kimura, R., Paul, D. & Adams, J. 1995. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol.*, 191(2); 101-118.
- Kumar, N.M., Gilula, N.B. The gap junction communication channel. 1996. *Cell*, 84(3); 381-388.
- Lefebvre, P.P. & Van De Water, T.R. 2000. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Brain Res Rev.*, 32(1); 159-62.
- Li, W., Gao, F., Liang, J., Li, C., Zhang, H., Tang, Z., Chen, L., Jin, Q. Tang, W. 2003. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single-strand conformation polymorphism by DNA base composition. *Electrophoresis*, 24(14); 2283-2289.
- Lucotte, G. Mercier, G. 2001. Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test.*, 5(2); 149-152.
- Lüleci, G. Sakızlı, M. Alper, Ö. 2000. *Renkli Genetik Atlası*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.
- Maestrini, E., Korge, B. P., Ocana-Sierra, J. 1999. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet.*, 8(7); 1237-1243.
- Marlin, S., Garabedian, E., Roger, G. & Moatti, L. 2001. Connexin 26 gene

- mutations in congenitally deaf children: Pitfalls for genetic counselling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 127(8); 927-936.
- Martin, P.E., Coleman, S.L., Casalotti, S.O., Forge, A. & Evans, W.H. 1999. Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with nonsyndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet.*, 8(13); 2369-2376.
- Maw, M.A. Allen-Powell, D.R. Goodey, R.J. Stewart, I.A. Nancarrow, D.J. Hayward, N.K. and Gardner, R.J.M. 1995 The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet.*, 57(3); 629-635.
- Meyer, C.G., Amedofu, G.K., Brandner, J.M., Pohland, D., Timmann, C. and Horstmann R.D. 2002. Selection for deafness. *Nat Med.*, 8(12); 1332-1333
- Mignon, C., Fromaget, C., Mattei, M. G., Gros, D., Yamasaki, H., and Mesnil, M. 1996. Assignment of connexin 26 (*GJB2*) and 46 (*GJA3*) genes to human chromosome 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*, 72(2-3); 185-186.
- Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, L.J., Goforth, L., Friderici, K., 1998. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med.*, 339(21); 1500-1505.
- Morton, C. C. and Nance, W. E. 2006. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med.*, 354(21); 2151-2164.
- Mukherjee, M, Phadke, S. R. Mittal, B. 2003. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Ind J Hum Genet.*, 9(2); 40-50
- Nance, Walter E. 2003. The Genetics of Deafness *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, 9(2); 109-119.
- Öner, C. 2002. *Genetik Kavramlar*. Ankara, Palme Yayıncılık.
- Petersen, MB. Willems, PJ. 2006. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet.*, 69(5); 371-392.
- Rabionet, R. Gasparini, P. & Estivill, X. 2000. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat.*, 16(3); 190-202.
- Raphael, Y. , Altschuler, Richard A. 2003. Structure and innervation of the cochlea *Brain Res Bull.*, 60(5-6); 397-422.
- Richard, G. Rouan, F. Willoughby, C.E. Brown, N., Chung, P. 2002. Missense mutations in *GJB2* encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet.*, 70(5); 1341-1348.
- Sabag, A.D., Dagan, O. & Avraham, K.B. 2005. Connexins in hearing loss: a comprehensive overview. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*, 16(2-3); 101-116.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. (2nd Ed.). Cold spring Harbor Laboratory Press, 253 sayfa, New York.
- Jahn, A.F., Santos-Sacchi, J. 1998. *Physiology of the Ear*. Raven Press, 689 sayfa, New York.
- Scott, D., Kraft, M., Carmi, R., Ramesh, A., Elbedour, K. 1998. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat.*, 11(5); 387-394.
- Seeman, P., Sakmaryová, I. 2006. High prevalence of the IVS 1 + 1 G to A/ *GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2*. *Clin Genet.*, 69(5); 410-413
- Snoeckx, R. L. Hassan, D. M. Kamal, N. M. Van Den Bogaert, K. Van Camp, G. 2005. Mutation analysis of the *GJB2* (connexin 26) gene in Egypt. *Hum Mutat.*, 26(1); 60-61.

- Stacey, A. Apps, Wayne, A. Rankin, Andrew, P. Kurmis. 2007. Connexin 26 mutations in autosomal recessive deafness disorders: A review. *Int J Audiol.*, 46(2); 75-81
- Storm, K; Willocx, S; Flothmann, K; Van Camp, G. 1999. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat.*, 14(3); 263-266.
- Tekin, M. Akar, N. Cin, Ş. Blanton, S.H. Xia, X.J. Liu, XZ. Nance, W.E. Pandya, A. 2001. Connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet.*, 108(5); 385-389.
- Tekin, M., T. Duman, Boğoçlu, G. Incesulu, A. Comak, E. Ilhan, I. Akar N. 2003. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat* 21(5); 552-553.
- Tekin, M. Bogoclu, G. Arıcan, S.T. Orman, M.N. Tastan, H. Elsobky, E. Elsayed, S. Akar, N. 2005. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the *GJB2* gene in Anatolia. *Clin Genet.*, 67(1); 31-37.
- Tekin, M. Arıcı, Z.S. 2007. Genetic Epidemiological Studies of Congenital/Prelingual Deafness in Turkey : Population Structure and Mating Type Are Major Determinants Of Mutation Identification. *Am J Med Genet A.*, 143A(14); 1583-1591.
- Temizkan, G. Yılmaz, S. Öztürk, M. Arı, Ş. Ertan, H. Topal, A. Arda, N. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler (genişletilmiş 2. Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, 345 sayfa, İstanbul
- Uyguner, O. Emiroglu, M. Uzumcu, A. Hafiz, G. Ghanbari, A. Baserer, N. Yuksel-Apak, M. Wollnik, B. 2003. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet.*, 64(1); 65-69.
- Van Camp, G. Willems, P.J. Smith, R.J.H. 1997. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet.*, 60(4); 758-764.
- Van Laer, L. Coucke, P. Mueller, R F. Caethoven, G. Flothmann, K. Prasad, S D. Chamberlin, G P. Houseman, M. Taylor, G R. Van de Heyning, C M. Fransen, E. Rowland, J. Cucci, R.A. Smith, R.J.H. Van Camp, G. 2001. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet.*, 38(8); 515-518.
- Wang, Hung-Li. Chang, Wen-Teng. Li, Allen H. Yeh, Tu-Hsueh. Wu, Ching-Yi. Chen, Mei-Shin. Huang, Pei-Chen. 2003. Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem*, 84(4); 735-742.
- Willems, PJ. 2000. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med.*, 342(15); 1101-1109.
- Yan, D. Park, H.J. Ouyang, X.M. Pandya, A. Doi, K. Erdenetungalag, R. Du, L.L. Matsushiro, N. Nance, W.E. Griffith, A.J. Liu, X.Z. 2003. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet.*, 114(1); 44-50.
- Zbar, R.I., Ramesh, A., Srisailapathy, C.R.S., Fukushima, K., Wayne, S. Smith, R.J.H. 1998 Passage to India: the search for genes causing autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 118(3 Pt 1); 333-337.
- Zelante, L. Gasparini, P. Estivill, X. Melchionda, S. D'Agruma, L. Govea, N. Milá, M.

Monica, M.D. Lutfi, J. Shohat, M. Mansfield, E. Delgrosso, K. Rappaport, E. Surrey, S. Fortina P. 1997. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.*, 6(9); 1605-1609.