

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SENDROMİK OLMAYAN OTOZOMAL RESESİF İŞİTME KAYBI
OLAN BEŞ AİLEDE GENOM BOYUNCA GENOTİPLEME ANALİZİ**

Aslı SIRMACI

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Mustafa TEKİN

2008-ANKARA

ÖNSÖZ

Laboratuvara başladığım ilk günden beri benden desteğini ve bilgisini hiç esirgemeyen, beni her zaman yönlendiren ve bundan sonraki çalışma hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Doç.Dr.Mustafa TEKİN'e; çalışmalarım sırasında her türlü imkanı sağlayan, yardım ve tecrübesini 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 destekte bulunan çalışma arkadaşlarım Uzm.Bio.Duygu DUMAN, Uzm.Bio.İdil ASLAN, Uzm.Bio.Filiz Başak CENGİZ, Uzm.Bio Ayşenur ÖZTÜRK, Dr. Erkan Yılmaz ve ismini sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim. Bu çalışmanın yapılmasına destek olan Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında görevli Doç.Dr.Hilal Özdağ ve Uzm.Bio.Seda YILMAZ'a teşekkür ederim. Bana verdikleri sonsuz sevgi, sabır, destek ve imkan için annem ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. GENEL BİLGİLER	2
1.1.1. İşitme Mekanizması	2
1.1.2. İşitme Kaybının Sınıflandırılması	4
1.1.3. Sendromik İşitme Kaybı	6
1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı	6
1.1.5. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı Genleri	8
1.1.1.1. PRESTİN Geni	8
1.1.1.2. <i>GJB2</i> Geni	8
1.1.1.3. <i>GJB6</i> Geni	9
1.1.1.4. <i>MYO7A</i> Geni	9
1.1.1.5. <i>MYO15A</i> Geni	10
1.1.1.6. <i>SLC26A4</i> Geni	10
1.1.1.7. <i>TMIE</i> Geni	11
1.1.1.8. <i>TMC1</i> Geni	12
1.1.1.9. <i>TMPRSS3</i> Geni	12
1.1.1.10. <i>OTOF</i> Geni	13
1.1.1.11. <i>CDH23</i> Geni	14
1.1.1.12. <i>STRC</i> Geni	15
1.1.1.13. <i>USH1C</i> Geni	15
1.1.1.14. <i>TECTA</i> Geni	16
1.1.1.15. <i>OTOA</i> Geni	16
1.1.1.16. <i>PCDH15</i> Geni	16
1.1.1.17. <i>TRIOBP</i> Geni	17
1.1.1.18. <i>CLDN14</i> Geni	17
1.1.1.19. <i>MYO3A</i> Geni	18
1.1.1.20. <i>WHRN</i> Geni	18
1.1.1.21. <i>ESPN</i> Geni	19
1.1.1.22. <i>MYO6</i> Geni	19
1.1.1.23. <i>COL11A2</i> Geni	20
1.1.1.24. <i>PJVK</i> Geni	21
1.1.1.25. <i>TMHS</i> Geni	21
1.1.1.26. <i>TRIC</i> Geni	21
1.1.1.27. <i>RDX</i> Geni	22
1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER	23
1.2.1. Mikrodizin Analizi	23
1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	23
1.2.3. Mikrosatellit Analizi	25
1.2.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation	

Polymorfizm, SSCP)	26
1.2.5. DNA Dizi Analizi	27
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	29
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	29
2.2. Yöntemler	29
2.2.1. DNA İzolasyonu	30
2.2.2. Mikrodizin analizi	31
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	34
2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama	35
2.2.6. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	36
2.2.7. SSCP Jeli için Gümüş Boyama	37
2.2.8. DNA Dizi Analizi	42
3.BULGULAR	44
3.1. 559 Numaralı Aile	44
3.2. 551, 647, 734 Numaralı Aileler	47
3.3. 561 Numaralı Aile	54
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kulağın Anatomik Yapısı.	2
Şekil 1.2. İç Kulağın Yapısı.	3
Şekil 3.1.a. <i>TMIE</i> geni için kullanılan D3S1289 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. b. <i>TMIE</i> geni için kullanılan D3S1767 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	46
Şekil 3.2. 559 nolu ailenin mikrosatelit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi.	46
Şekil 3.3. <i>TMIE</i> geninin 250. pozisyondaki C-T değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan DNA dizi analizi görüntüsü.	47
Şekil 3.4.a. <i>TMCI</i> geni için kullanılan D9S1806 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. b. <i>TMCI</i> geni için kullanılan D9S1837 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	49
Şekil 3.5. 647 nolu ailenin aile ağacı.	50
Şekil 3.6. Genin 16. ekzonunda 647-101 ve 104 nolu etkilenmiş bireylerin SSCP jel görüntüsü. b. <i>TMCI</i> geninin 16. ekzonunun aile bireylerindeki SSCP görüntüsü. c. <i>TMCI</i> geninin 1333. pozisyonundaki C-T değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot DNA dizi analizi görüntüsü.	50
Şekil 3.7. 734 nolu ailenin mikrosatelit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi.	51
Şekil 3.8.a. Genin 6. ekzonunda 734-302 ve 304 etkilenmiş bireylerin SSCP jel görüntüsü. b. <i>TMCI</i> geninin 6. ekzonunun aile bireylerindeki SSCP görüntüsü. c. <i>TMCI</i> geninin 6. intronunun 2. bazındaki A-T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot DNA dizi analizi görüntüsü. d. <i>TMCI</i> geninin 6. intronunun 2. bazındaki A-T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan heterozigot DNA dizi analizi görüntüsü.	52
Şekil 3.9. 551 nolu ailenin mikrosatelit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi.	53
Şekil 3.10.a. <i>TMCI</i> geninin 18. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. b. <i>TMCI</i> geninin 19. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. c. <i>TMCI</i> geninin 20. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. d. <i>TMCI</i> geninin 21. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. e. <i>TMCI</i> geninin 22. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. f. <i>TMCI</i> geninin 23. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. g. <i>TMCI</i> geninin 24. ekzonunun agaroz jel görüntüsü.	53
Şekil 3.11. <i>CDH23</i> geni için kullanılan D10S1650 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü.	55
Şekil 3.12. 561 nolu ailenin mikrosatelit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi.	55
Şekil 3.13.a. Genin 28. intronundaki c.3595-13C>T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan normal DNA dizi analizi görüntüsü. b. Genin 28. intronundaki c.3595-13C>T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü. c. Genin 29. ekzonun aile bireylerindeki SSCP jel görüntüsü.	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Sendromik olmayan otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı işitme kaybı yapan genler.	7
Çizelge 2.1. <i>TMIE</i> , <i>TMCI</i> , <i>CDH23</i> genleri için kullanılan mikrosatellit belirteçleri.	33
Çizelge 2.2. <i>TMIE</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.	38
Çizelge 2.3. <i>TMCI</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.	39
Çizelge 2.4. <i>CDH23</i> geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.	40
Çizelge 3.1. Bu çalışmadaki beş ailenin mikrodizin sonuçları.	44
Çizelge 3.2. 559 nolu ailenin <i>TMIE</i> genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.	45
Çizelge 3.3. 551, 647 ve 734 nolu ailelerin <i>TMCI</i> genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.	48
Çizelge 3.4. 561 nolu ailenin <i>CDH23</i> genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.	54
Çizelge 4.1. <i>TMCI</i> geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar.	57
Çizelge 4.2. <i>TMCI</i> geninde tanımlanmış kırılma bölgesi mutasyonları.	58
Çizelge 4.3. <i>TMCI</i> geninde tanımlanmış delesyon mutasyonları.	58
Çizelge 4.4. <i>TMCI</i> genindeki homosapiens'te 445. pozisyondaki arjinin amino asidinin diğer türlerdeki amino asit dizisi.	59
Çizelge 4.5. <i>TMCI</i> genindeki homosapiens'te 84. pozisyondaki arjinin amino asidinin diğer türlerdeki amino asit dizisi.	60
Çizelge 4.6. <i>TMIE</i> geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar.	60
Çizelge 4.7. <i>TMIE</i> geninde tanımlanmış insersiyon mutasyonu.	60
Çizelge 4.8. <i>TMIE</i> geninde tanımlanan insersiyon-delesyon mutasyonu.	60
Çizelge 4.19. <i>CDH23</i> geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonu.	62
Çizelge 4.10. <i>CDH23</i> geninde tanımlanmış kırılma bölgesi mutasyonları.	62
Çizelge 4.11. <i>CDH23</i> geninde tanımlanmış delesyon mutasyonları.	63
Çizelge 4.12. <i>CDH23</i> geninde tanımlanmış insersiyon mutasyonları.	63

SİMGELER DİZİNİ

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

Na ⁺	: Sodyum iyonu
NaOAc	: Sodyum asetat
OHC	: Dış tüy hücresi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	: Fenilalanin
Pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
Ser	: Serin
sn	: Saniye
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	: Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
T	: Timin
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
TE	: Tris EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
Term	: Terminasyon
Thr	: Treonin
Tyr	: Tirozin

1. GİRİŞ

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

İşitme kaybına birçok çevresel ve genetik 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.

Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının çok büyük bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır (Kelsell 1997). *GJB2* geni dışında bugüne kadar otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı yapan 26 gen tanımlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı bulunan ailelerde genom boyunca SNP analizi ile sorumlu genlerin tespit edilebileceğinin gösterilmesidir.

1.1 GENEL BİLGİLER

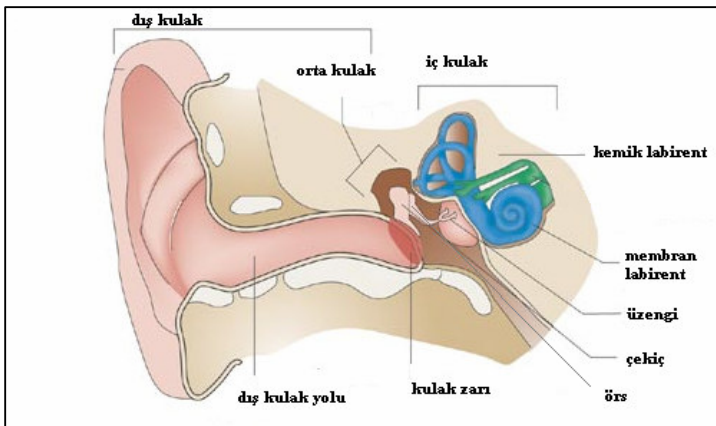
1.1.1 İşitme Mekanizması

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

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

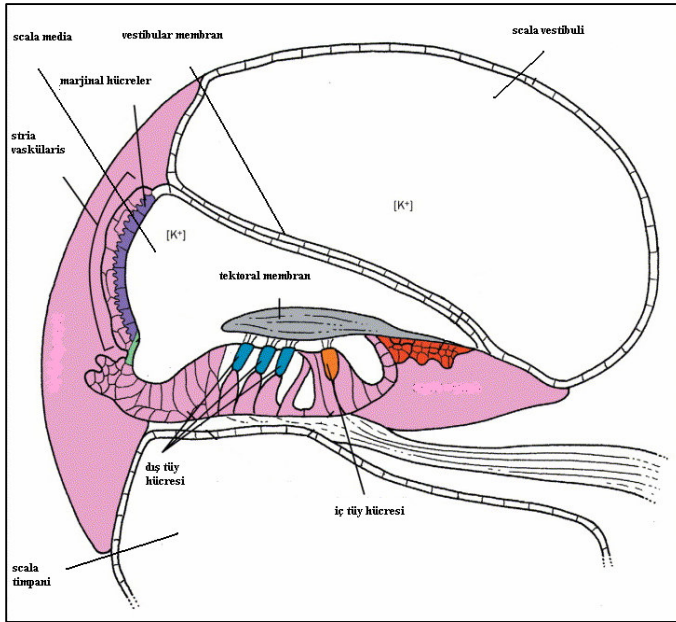
Orta kulak; çekiç (malleus), örs (inkus), özengi (stapes) adı verilen üç hareketli işitme kemikçığınden oluşur. İçi hava dolu olan bu yapı kulak zarından gelen titreşimleri toplayıp iç kulağın oval penceresine iletilir (Petit 2001).

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



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

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



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

Kohlea'da işitmeden sorumlu yapı, bazal membran üzerinde bulunan korti organıdır. Korti organı işitme sisteminin en önemli elemanıdır ve reseptörlere sahip tüy hücreleri içermektedir. Bu tüy hücreleri iki tip olup, iç tüy hücresi (IHC) ve dış tüy hücresi (OHC) olarak adlandırılır (Petit 2001). Tüy hücreleri mekanik uyarıların elektriksel uyarılara dönüşümüne neden olurlar. Bir sıra halinde bulunan iç tüy hücreleri akustik sinire ve işitme korteksine sinyaller ileten reseptör hücrelerdir. Üç sıra halinde bulunan dış tüy hücreleri hem sensorinöral elemanlarına hem de alınan sesleri arttırarak işitmenin hassasiyetine ve frekans seçiciliğine katkıda bulunan motor elemanlarına sahiptir. Akustik olarak uyarıldıklarında uzayıp bükülme özelliğine sahiptirler.

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

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

1.1.2 İşitme Kaybının Sınıflandırılması

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

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

İşitme organ defektlerine göre; iletim tipi işitme kaybı ve sensorinöral tip işitme kaybı bulunmaktadır. İletim tipi işitme kaybı, dış veya orta kulak bozuklukları sonucunda meydana gelen işitme kaybıdır. Sensörinöral tip işitme kaybı; iç kulak, duyu sinirleri ve merkezi sinir sistemindeki hasarlar sonucu meydana gelen işitme kaybıdır. Her iki tipin de görüldüğü olgular ise karışık tip işitme kaybı olarak adlandırılır (Petit 2001; Tekin 2001).

Şiddetine göre; hafif (20-40 dB), orta (41-70 dB), şiddetli (71-95 dB), derin (>95 dB) işitme kayıpları olarak sınıflandırılır (Tekin 2001).

Başlangıç yaşına göre; doğuştan, erken başlangıçlı (prelingual) ve geç başlangıçlı (postlingual) işitme kaybı olarak üçe ayrılmaktadır. Prelingual (dil gelişimi öncesi-5 yaşına kadar) işitme kayıpları otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım göstermekte ancak postlingual (dil gelişimi sonrası) işitme kayıpları genellikle otozomal dominant kalıtım göstermektedir (Finsterer 2005).

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

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

olmayan işitme kaybına neden olabilmektedirler (*GJB2*, *GJB6*, *MYO7A*, *MYO6*, *TMCI*, *TECTA*) (Finsterer 2005).

Fenotipe yansımalarına göre; sendromik işitme kayıpları (%30-40) ve sendromik olmayan işitme kayıpları (%60-70) olarak 2 sınıfa ayrılmaktadır.

1.1.3. Sendromik İşitme Kaybı

İşitme kaybına sinir, böbrek, iskelet, göz, pigment anomalileri gibi başka klinik anomalilerin de eşlik etmesi sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır. Sendromik işitme kayıpları otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmektedir. Bu sendromlara örnek olarak Brankio-Oto-Renal sendrom (BOR), Waardenburg sendromu, Norrie sendromu, Jervell&Lange-Nielsen sendromu (JLNS), Stickler sendromu, Pendred sendromu, Alport sendromu, Usher sendromu verilebilir (Nance 2003).

1.1.4. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı

Sendromik olmayan işitme kaybına; kulak ve vestibuler sistem hastalıkları dışında başka klinik veya laboratuvar bulgusu eşlik etmemektedir. Sendromik olmayan işitme kaybına neden olan gen lokusları "DFN" şeklinde gösterilmektedir. DFNA otozomal dominant, DFNB otozomal resesif, DFN X'e bağlı kalıtım gösteren lokusları belirtmektedir (Willems 2000).

Bazı genlerdeki mutasyonlar hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına neden olabilirler. Bunlara *CDH23* (Usher send. Tip1), *COL11A2* (Sticker send. Tip3, Osmed send.), *DSPP* (Dentinogenesis imperfecta), *GJB2* (Palmoplantar keratoderma ve işitme kaybı, Vohwinkel's send., KID), *MYO7A* (Usher send. Tip1B), *SLC26A4* (Pendred send.), *USH1C* (Usher send. Tip1C), *GJB6*, *PCDH15* örnek olarak verilebilir (Finsterer 2005).

İç kulağın anatomik yapısının karmaşık olması ve işitme mekanizmasında bir çok proteinin görev alması nedeni ile işitme kaybına neden olan genler oldukça fazladır. Bugüne kadar *GJB2* dışında 21 tane otozomal dominant, 26 tane otozomal resesif ve 1 tane X'e bağlı kalıtılan genlerdeki mutasyonların sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir (Çizelge 1.1).

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

Lokus	Gen	Kromozomal lokalizasyon	Kalıtım Modeli	Referans
Yok	CRYM		Otozomal dominant	(Abe 2003)
DFNA1	DIAPH1	5q31	Otozomal dominant	(Lynch 1997)
DFNA2	GJB3 (Cx31)	1p34	Otozomal dominant	(Xia 1998)
DFNA2	KCNQ1	1p34	Otozomal dominant	(Kubisch 1999)
DFNA3	GJB2(Cx26)	13q12	Otozomal dominant	(Kelsell 1997)
DFNA3	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal dominant	(Grifa 1999)
DFNA4	MYH14	19q13	Otozomal dominant	(Donaudy 2004)
DFNA5	DFNA5	7p15	Otozomal dominant	(Van Laer 1998)
DFNA6/14	WFS1	4p16.3	Otozomal dominant	(Bespalova 2001; Young 2001),
DFNA8/12	TECTA	11q22-24	Otozomal dominant	(Verhoeven 1998)
DFNA9	COCH	14q12-q13	Otozomal dominant	(Robertson 1998)
DFNA10	EYA4	6q22-q23	Otozomal dominant	(Wayne 2001)
DFNA11	MYO7A	11q12.3-q21	Otozomal dominant	(Liu 1997)
DFNA13	COLL11A2	6p21	Otozomal dominant	(McGuire 1999)
DFNA15	POU3F4	5q31	Otozomal dominant	(Vahava 1998)
DFNA17	MYH9	22q	Otozomal dominant	(Lalwani 2000)
DFNA20/26	ACTG1	17q25	Otozomal dominant	(van Wijk 2003; Zhu 2003)
DFNA22	MYO6	6q13	Otozomal dominant	(Melchionda 2001)
DFNA28	TFCP2L3	8q22	Otozomal dominant	(Peters 2002)
DFNA36	TMC1	9q13-q21	Otozomal dominant	(Kurima 2002)
DFNA39	DSPP	4q21.3	Otozomal dominant	(Xiao 2001)
DFNA48	MYO1A	12q13-q14	Otozomal dominant	(Donaudy 2003)
Yok	PRES (Prestin)	7q21.1	Otozomal resesif	(Liu 2003)
DFNB1	GJB2 (Cx26)	13q11-q12	Otozomal resesif	(Kelsell 1997)
DFNB1	GJB6(Cx30)	13q12	Otozomal resesif	(del Castillo 2002)
DFNB2	MYO7A	11q	Otozomal resesif	(Liu 1997; Weil 1997)
DFNB3	MYO15A	17p11.2	Otozomal resesif	(Wang 1998)
DFNB4	SLC26A4	7q31	Otozomal resesif	(Li 1998)
DFNB5	TMIE	3p21	Otozomal resesif	(Naz 2002)
DFNB7/11	TMC1	9q13-q21	Otozomal resesif	(Kurima 2002)
DFNB8/10	TMPRSS3	21q22.3	Otozomal resesif	(Scott 2001)
DFNB9	OTOF	2p23-p22	Otozomal resesif	(Yasunaga 1999)
DFNB12	CDH23	10q21-q22	Otozomal resesif	(Bork 2001)
DFNB16	STRC	15q15	Otozomal resesif	(Verpy 2001)
DFNB18	USH1C	11p15.1	Otozomal resesif	(Ahmed 2002; Ouyang 2005)
DFNB21	TECTA	11q22-q24	Otozomal resesif	(Mustapha 1999)
DFNB22	OTOA	16p12.2	Otozomal resesif	(Zwaenepoel 2002)
DFNB23	PCDH15	10q21-q22	Otozomal resesif	(Ahmed 2003)
DFNB24	RDX	11q.23	Otozomal resesif	(Khan 2007)
DFNB28	TRIOBP	22q13.1	Otozomal resesif	(Riazuddin 2006; Shahin 2006)
DFNB29	CLDN14	21q22.3	Otozomal resesif	(Wilcox 2001)
DFNB30	MYO3A	10p11.1	Otozomal resesif	(Walsh 2002)
DFNB31	WHRN	9q32-q34	Otozomal resesif	(Mburu 2003)
DFNB36	ESPN	1p36.3-p36.1	Otozomal resesif	(Naz 2004)
DFNB37	MYO6	6q13	Otozomal resesif	(Ahmed 2003)
DFNB49	TRIC	5q12.3-q14.1	Otozomal resesif	(Riazuddin 2006)
DFNB53	COL11A2	6p21.3	Otozomal resesif	(Chen 2005)
DFNB59	P1VK	2q31.1-q31.3	Otozomal resesif	(Delmaghani 2006)
DFNB67	TMHS	6p21.3	Otozomal resesif	(Shabbir 2006)
DFN3	POU3F4		X'e bağlı	(de Kok 1995)

1.1.5. Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı Genleri

1.1.1.1 *PRESTIN* Geni

SLC26A5 olarak da adlandırılan bu gen 7q22.1'de lokalizedir ve 21 ekzon içermektedir. *SLC26A/SulP* taşıyıcı protein ailesinin bir üyesi olan bir protein kodlar. Bu protein kohlear dış tüy hücrelerinin motor proteini (Zheng 2000).

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

1.1.1.2. *GJB2* Geni

Bu gen 13. kromozomun q11-q12 bölgesinde *DFNB1* lokusunda bulunmaktadır ve 26 kD'lık bir konneksin proteini kodlamaktadır. Sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olan genler içinde en sık görülenidir. Konneksinler hücreler arası bağlantı proteinleridir ve iç kulakta potasyum döngüsü ve endolenf dengesi için önemlidir. *GJB2* geninin ürünü olan konneksin 26 proteini K^+ iyonunun tüy hücrelerinden stria vaskularise geri dönüşümünü sağlayan hücreler arası kanalları oluşturur ve bu sayede K^+ endolenfe geri pompalanabilir.

Birçok toplumda bu gendeki mutasyonların genetik nedenli işitme kayıplarının %20-50'sini oluşturduğu gösterilmiştir (Bitner-Glindzicz 2002). Türk toplumunda ise bu gen mutasyonları genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %20'sinden sorumludur (Tekin 2001; Tekin 2003; Tekin 2005) . Birçok toplumda bu gende bildirilen mutasyonlar içinde 35delG mutasyonu %70 görülme sıklığına sahiptir (Nance 2003). Bu gendeki bazı mutasyonlar sendromik olmayan otozomal dominant işitme kaybına neden olmaktadır.

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

1.1.1.3. *GJB6* Geni

Bu gen 13. kromozomun q12 bölgesinde DFNB1 lokusunda bulunmaktadır. Farklı toplumlarda *GJB2* mutasyonu heterozigot olan işitme engellilerin %10-42'sinde *GJB6* genini içine alan heterozigot delesyonlar tanımlanmıştır (del Castillo 2002). Bu delesyonlar dışında bu gende tanımlanan bir yanlış anlamlı mutasyon otozomal dominant işitme kaybı kaybına neden olmaktadır (Grifa 1999).

1.1.1.4. *MYO7A* Geni

Bu gen 11. kromozomun q13.5 bölgesinde DFNB2 lokusunda bulunmaktadır. Aynı zamanda Usher sendromuna (Tip b) neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda miyozin VIIA'nın cDNA sekansı bu proteinin 2,215 amino asit içerdiğini ve klasik olmayan miyozin yapısında olduğunu göstermektedir (Weil 1996). Bu genin 48 kodlayan ekzonu bulunmaktadır ve en büyük transkripti 7.4 kb büyüklüğündedir.

Bu gendeki mutasyonlar Usher sendromlu hastalarda fotoreseptör hücrelerindeki mikrotübüllerde, nazal silya hücrelerinde, sperm hücrelerinde anormal organizasyona sebep olmaktadır. Ayrıca korti organının dejenerasyonuna yol açarak işitme kaybına sebep olduğu gösterilmiştir (Weil 1997). *MYO7A*'nın retinanın pigment epitelyum ve fotoreseptör hücrelerinde ifade bulduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu gen embriyonik kohlear ve nöroepitel hücrelerinde ifade olmaktadır (Weil 1996).

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

1.1.1.5. *MYO15A* Geni

Bu gen 17. kromozomda p11.2 bölgesinde DFNB3 lokusunda bulunmaktadır. 71 kb'lık bir alanda 66 ekzondan oluşmaktadır. En uzun *MYO15A* mRNA transkripti 3,530 amino asit içermekte ve 395 kDa ağırlığında bir protein kodlamaktadır. İki alternatif kırılma transkripti ekzon 2'nin varlığı (izoform sınıf 1) veya yokluğuyla (izoform sınıf 2) ayırt edilmektedir (Liang 1999; Belyantseva 2003). Ekzon 2, 1,203 amino asit içeren N-terminal uzantı bölgesini kodlar ve bu bölgenin biyolojik işlevi bilinmemektedir.

Miyozinler ATP hidrolizinden elde edilen kimyasal enerjiyi aktin filamentleri boyunca hareketi sağlayacak güce çeviren aktin bağımlı hücresel motorlardır. Miyozin ailesi, klasik miyozin II sınıfı ve yaklaşık 20 klasik olmayan miyozin sınıfı içerir (Berg 2001; Krendel 2005). Hücresel göç ve yapışma, hücre içi taşıma, organel ve makromoleküllerin lokalizasyonu, sinyal aktarımı, kas kasılması, hücre hareketi, sitokinez, ekzositoz, endositoz, transkripsiyon, vezikül ve kargo değişimi, iç kulaktaki tüy hücre stereosilia farklılaşması ve tümör baskılama gibi değişik hücresel işlevlerle ilişkilendirilmişlerdir (Belyantseva 2003; Vale 2003; Krendel 2005). Klasik olmayan miyozinlerden myosin Ia, IIIa, VI, VIIa, XVa ve klasik miyozin genlerinden MYH9 ve MYH14 normal duyma işlevi için esastır. Bu genlerdeki mutasyonlar işitme kaybıyla ilişkilendirilmiştir (Friedman 1995).

Bu gende bugüne kadar 6 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 1 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.6. *SLC26A4* Geni

Bu gen 7q31 kromozomal bölgede bulunmaktadır ve pendrin olarak adlandırılan bir anyon taşıyıcı protein kodlamaktadır. 12 transmembran bölgeden oluşan bu protein 780 amino asit içerir ve 86 kDa ağırlığındadır (Everest 1997).

Pendrin, yapısal olarak sülfat taşıyıcılara benzediğinden sülfat taşıdığı düşünülmüş ancak sonra hücre içi ve dışı arasında rekabete dayalı iyot-klor taşıyıcılığı yaptığı ve iç kulakta sınırlı sayıda hücrede sentezlendiği gösterilmiştir (Scott 1999).

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

1.1.1.7. *TMIE* Geni

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

TMIE (Trans Membran Inner Ear expressed) geni transmembran iç kulak proteini isimli bir protein üretmektedir. Bu proteinin tam işlevi henüz bilinmemektedir ancak normal duyma işleminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *TMIE*'nin birincil sekansı proteinin belirgin bir biyokimyasal işlevini göstermemektedir. Ancak bu gendeki işlev kaybettirici mutasyonların insan ve farelerde işitme kaybına sebep olduğu gösterilmiştir. Etkilenmiş Spinner faresindeki iç kulak patolojisi *Tmie*'nin normal bir doğum sonrası olgunlaşma sırasında kohleadaki duyusal tüy hücrelerinin gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir (Mitchem 2002) .

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

1.1.1.8. *TMC1* Geni

Bu gen insanda 9. kromozomda q13-q219 bölgesinde lokalizedir. Bu genin hem otozomal dominant (DFNA36) hem de otozomal resesif (DFNB7/DFNB11) işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bu gen 2,283 nükleotid içermektedir ve proteini 87-kD büyüklüğündedir. Bu gen ürünü olan protein çok geçişli bir transmembran proteindir, altı transmembran bölgesi ve sitoplazmik yönelimli N ve C-terminali içermektedir.

TMC1 (TransMembrane Cochlear expressed gene) cDNA'sının genomik sekansı, bu genin ekzon 5'deki kodlayan metiyonin kodununun üst kısmındaki dört ekzonla birlikte en uzun m-RNA'yı kodlayan 24 ekzonu olduğunu göstermektedir. İşlevi bilinmeyen bu protein yapısı bilinen hiçbir proteine benzerlik göstermemektedir. Proteindeki TMC bölgesi adı verilen ve işlevi bilinmeyen bölge tüm TMC'lerde benzerdir (Kurima 2002).

Resesif allellerdeki işlev bozucu *TMC1* mutasyonları dil gelişimi öncesi ve şiddetli işitme kaybına (DFNB7/B11) neden olur (Kurima 2002; Kalay 2005). Aksine *TMC1* DFNA36 lokusunda sadece belirtilmiş bir ailede dil gelişimi öncesi ve dil gelişimi sonrasındaki ilk 10 yıllık dönemde derin işitme kaybı yapan bir yanlış anlamlı mutasyonla birlikte seyretmektedir (Kurima 2002; Makishima 2004). Bu gende 10 tane yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon ve 3 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.9. *TMPRSS3* Geni

Bu gen 21. kromozomda DFNB8/10 bölgesinde lokalizedir. 13 ekzonu bulunmakta ve transmembran proteaz, serin 3 isimli bir protein kodlamaktadır. RT-PCR analizi sonucunda bu genin birçok dokuda ve fetal kohleada ifade olduğu gösterilmiştir (Scott 2001).

TMPRSS3 mutasyonlarının iki formda otozomal resesif işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bir Pakistanlı ailede çocukluk yaşta başlayan resesif işitme kaybı DFNB8 lokusunda gösterilmiştir ve 4. intronda bir kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır. Bir Filistinli ailede ise çocukluk yaşta başlayan resesif işitme kaybı DFNB10 lokusunda gösterilmiş ve

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

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

1.1.1.10. *OTOF* Geni

Yasunaga vd (2000) yaptıkları çalışmada tanımlanan bu gen 2. kromozomun p23-p22 bölgesinde DFNB9 lokusunda bulunmakta ve otoferlin isimli bir protein kodlamaktadır. 28 kodlayan ekzonu , 5' ve 3' UTR bölgesi bulunan bu gen 21 kb büyüklüğündedir (Yasunaga 2000). Bu gen, C. Elegans spermatogenesis faktörü FER-1 ve insan disferlin geni ile homoloji göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda *OTOF*'un korti organındaki iç tüy hücrelerinde, utrikulus ve sakkulusta ifade olduğunu göstermiştir. Bu geninin C-terminal bölgesi ile hücre membranına bağlanan sitosolik bir protein kodladığı ve membran yapısındaki veziküllerin plazma membranına taşınmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Varga vd (2003) tarafından işitme kaybının özel bir tipi tanımlanmış ve sendromik olmayan resesif işitsel nöropati olarak adlandırılmıştır (NSRAN). İşitsel nöropatili hastalarda değişik düzeylerde işitme kaybı görülmekte olup, konuşma düzeyleri zayıftır. Bu hastalarda işitme yardımcı işe yaramamakta olup kohlear implant başarılı olabilmektedir (Varga 2003).

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

1.1.1.11. *CDH23* Geni

CDH23 kaderin gen ailesinin bir üyesidir. Bu gen 10. kromozomun DFNB12 lokusunda q21-q22 bölgesinde bulunmakta ve Ca^{++} 'a bağlı hücre-hücre tutunma glikoproteinini kodlamaktadır. Bu protein; transmembranı tek geçişli, hücre dışı bölgesinde 27 tekrar içermekte ve 3353 amino asitten oluşmaktadır (Di Palma 2001). Northern blott analizi bu genin retina da 9,5 kb'lı bir transkripti olduğunu ayrıca köleada da ifadesi olduğunu göstermiştir (Bork 2001). Yapılan çalışmalarda genin 5' ucunda kodlamayan iki ekzonuyla beraber toplam 70 ekzonu olduğu bildirilmiştir (Di Palma 2001). Boyut ve organizasyon bakımından fare ve insan lokusu benzerlik göstermektedir.

Kaderinler geniş bir transmembran protein ailesini kapsamaktadır (Di Palma 2001) ve hücre-hücre adezyonunda, hücre sıralanmasında ve hücre göçünde kritik rol oynamaktadırlar. Kaderinler hücre dışı bölgelerinde ektodomain veya kaderin motifi olarak adlandırılan değişken sayı tekrarları içermektedirler. Bu motifler hücre-hücre tutunmasında Ca^{++} 'a bağlı homofilik paralel ve antiparalel dimerlerin oluşumuna eşlik etmektedir (Yap 1997)

CDH23'deki mutasyonlar, aynı zamanda işitme kaybıyla birlikte retinitis pigmentosa bulgusunun eşlik ettiği Usher sendromu tip 1d'ye neden olmaktadır.

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

1.1.1.12. *STRC* Geni

Verpy vd (2001) yaptıkları çalışmada bu genin 15. kromozomda q15 bölgesinde DFNB16 lokusunda olduğu ve 29 ekzonu bulunduğu gösterilmiştir. Bu gen stereosilin proteini kodlamaktadır ve iç kulaktaki tüy hücrelerinde ifade olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar sendromik olmayan işitme kaybına neden olmaktadır (Verpy 2001).

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

1.1.1.13. *USH1C* Geni

Bu gen 11. kromozomda p15.1 bölgesinde DFNB18 lokusunda bulunmakta ve harmonin isimli bir protein kodlamaktadır. Usher sendromu tip I, otozomal resesif işitme kaybı, vestibüler disfonksiyon ve ilerlemiş retinitis pigmentosa ile birlikte gitmektedir (Scanlan 1999).

Harmoninin 2 PDZ bölgesinin CDH23'ün stoplazmik bölgesindeki iki komplementer bağlanma yüzeyiyle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Kulakta CDH23 ve harmonin tüy hücre stereosilialarında, retinada ise fotoreseptör hücre tabakasında ifade olduğu gösterilmiştir (Siemens 2002).

Yapılan çalışmalarda *MYO7A*, *CDH23* ve *USH1C* genlerindeki işlev kaybettirici mutasyonların Usher sendromuna neden olduğu gösterilmiştir (Boeda 2002). Bu gende 1 yanlış anlamlı/anlamsız, 2 delesyon, 5 kırılma bölgesi ve 2 insersiyon tanımlanmıştır. Bunlardan IVS12+5G>C kırılma bölgesi mutasyonu dışındaki diğer mutasyonlar Usher sendromu 1c'ye neden olmaktadır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.14. *TECTA* Geni

Bu gen 11. kromozomun q22-q24 bölgesinde lokalizedir ve α -tektorin isimli bir protein kodlamaktadır. Gen 23 ekzon içermektedir ve 2,155 amino asitlik bir öncü protein kodlamaktadır. Bu protein %95 oranla fare proteinine benzerlik göstermektedir (Verhoeven 1998).

Genin kodladığı α -tektorin proteini iç kulaktaki tektoral membranın ana bileşenidir ve vestibülün duyu epitelinde sentezlenmektedir. Protein β -tektorin proteini ile birlikte tektoral membran proteinlerinin yarısını oluşturmaktadır (Willems 2000).

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

1.1.1.15. *OTOA* Geni

Bu gen kromozomun 16 p12.2 bölgesinde D16S3046 ve D16S412 belirteçlerinin arasında lokalizedir. 28 ekzona sahip ve 82 kb büyüklüğünde olan bu gen otoankorin isimli bir protein kodlamaktadır (Zwaenepoel 2002). Bu gen farelerde iç kulağın vestibular aparatında bulunan duysal epitelden izole edilmiştir ve iç kulağa özgü bir membran proteini kodladığı düşünülmektedir.

Bu gende 1 kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.16. *PCDH15* Geni

Bu gen 10q21-q22 kromozomal bölgede lokalizedir ve 33 ekzon içermektedir. Ca^{++} bağımlı hücre-hücre birleşme glikoproteinini kodlayan kaderin protein ailesinin bir üyesidir ve normal kohlea işlevi için önemli bir proteindir. Bu geninin sadece ilk iki ekzonu Usher sendromu tip If ile ilişkilendirilmiştir (Ahmed 2001).

CDH23 ve *PCDH15*'in insanlarda işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. İmmünokimyasal çalışmalar bu iki proteinin tip linklerin tepe ve alt kısımlarında bulunduğunu göstermektedir. Biyokimyasal analizler *CDH23* homodimerinin *PCDH15* homodimeri ile etkileşerek siterosiliar bağlantıyı sağladığını göstermektedir.

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

1.1.1.17. *TRIOBP* Geni

Bu genin 22. kromozomun uzun kolunda bulunduğu gösterilmiştir (Hirosawa 2001). Yapılan çalışmalarda genin sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı lokusu olan *DFNB28* de q13.1 bölgesinde olduğu gösterilmiştir (Riazuddin 2006; Shahin 2006). Bu genin esas transkripti 2.8 kb, en küçük transkripti ise 2.0-4.4 kb büyüklüğündedir ve birçok dokuda bulunmaktadır. Shahin vd (2006) ve Riazuddin vd (2006) bu genin alternatif kırılma formlarını tanımlamışlardır. Bu genin en uzun izoformu 2,365 amino asittir. Shahin vd (2006) yaptıkları çalışmada bu genin en uzun izoformunun fetal beyin, retina ve kohleada ifade bulunduğunu göstermişlerdir. Bu proteinin N-terminal yarısı *TRIO* *TGD1* bölgesi ile etkileşmektedir. Bu bölgenin ise aktin hücre iskelet organizasyonunun düzenlenmesi, hücre büyüme ve hücre göçü gibi olaylarda görev aldığı gösterilmiştir (Seipel 2001).

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

1.1.1.18. *CLDN14* Geni

21. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır. Genomik sekansın cDNA sekansı ile karşılaştırılması sonucunda genin üç ekzonu ve üçüncü ekzonu içerip içermemeye bağlı olarak 2 izoformunun bulunduğunu göstermişlerdir (Hattori 2000). Genin beş alternatif transkripti tanımlanmıştır (Wattenhofer 2005). Klaudin proteinleri, 24 üyeli *CLDN* gen ailesi tarafından kodlanan 20-27 kDa ağırlığında olan proteinlerdir. Yalnızca sıkı bağlantı

fibrillerinin oluşumundan sorumlu olan protein ailesi benzer membran topolojisi göstermektedir. Birçok dokuda birbirleriyle homofilik ve heterofilik şekilde etkileşim gösteren farklı klaudin proteinleri sentezlenmektedir. Bu proteinler hücreler arası molekül ve iyonların serbest geçişini önleyen sıkı bağlantıların yapısal proteindir.

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

1.1.1.19. *MYO3A* Geni

Bu gen 10. kromozomun DFNB10 bölgesinde lokalizedir ve işitme kaybına eşlik eden diğer 4 miyozine ilişkilidir (Walsh 2002).

Miyozin IIIA, klasik olmayan miyozinler sınıf III'e dahil aktin bağımlı bir motor proteindir. Klasik olmayan miyozinler C-terminal kargo bağlanma bölgelerine göre ayrılırlar. Miyozin IIIA gibi sınıf III miyozinler korunmuş N-terminal motor bölgelerinde kinaz bölgesi içerirler ve fotoreseptörlerde ifade olurlar. Miyozin IIIA insan retinasında ve özellikle kohleadaki iç ve dış tüy hücrelerinde ifade olmaktadır (Walsh 2002).

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

1.1.1.20. *WHRN* Geni

Bu gen 9. kromozomda bulunmaktadır ve virlin isimli bir protein kodlamaktadır. Genin 12 ekzonu bulunmakta ve 920 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin C-terminalinde prolince zengin bölgeyle ayrılan 3 PDZ bölgesi içerdiği gösterilmiştir (Yap 2003).

İnsan *WHRN* geni uzun ve kısa transkriptler içermektedir. Northern blot analiziyle tanımlanan iki transkript yaklaşık 1.8 kb ve 4 kb'lıktır. Kodlanan proteinin kısa C-terminal izoformları bir PDZ bölgesi ve bir prolince zengin bölge içermektedir. Uzun izoform ise üç

PDZ bölgesi ve bir prolince zengin bölge içermektedir. Bu proteine en çok benzerlik gösteren protein harmonin proteinidir. Bu iki proteinin üç PDZ bölgesi %65 oranında benzerlik göstermektedir (Mburu 2006).

Yapılan çalışmalar virlinin farelerde sterosillerin tepe bölgelerinde bulunduğunu göstermektedir. Virlin sentezi sterosilia gelişmesi boyunca devam etmektedir. Miyozin XVA mutantlarında sterosiller kısalmıştır ve tepelerindeki virlin sentezinde azalma ve durma hızlanmaktadır. Virlin mutantlarında ise sterosillerdeki miyozin XVA sentezi devam etmektedir ancak sterosiliada görünmesi gecikmektedir. Virlin sentezi sterosilia uzaması ve aktin polimerizasyonu için kritik role sahiptir (Kikkawa 2005).

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

1.1.1.21. *ESPN* Geni

13 ekzon içeren bu gen 1. kromozomun p36.3-36.6 bölgesinde lokalizedir ve 854 amino asitlik espin proteinini kodlamaktadır. İnsan espin proteini %83 oranda faredekine benzerlik göstermektedir. Bu protein fetal dönemde insan iç kulağında sentezlenmekte ve aktin paketleme proteini olarak görev yapmaktadır. Farelerin iç kulağında espin genellikle sterosillerde bulunmaktadır (Naz 2004).

Bu gendeki mutasyonlar, vestibüler bulgusu olmayan otozomal dominant işitme kaybına da neden olmaktadır (Donaudy 2006). Bugüne kadar 2 delesyon tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.22. *MYO6* Geni

İnsan miyozin VI geni 6p12-q16.3 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. Miyozin VI, klasik olmayan miyozinler grubunda bulunan aktin temelli moleküler motor proteinleridir. Hücre içi vezikül ve organel taşınmasında görev alır (Hasson 1994; Rock 2001).

Fare cDNA'sı proteinin 1,266 amino asit kodladığını göstermektedir. Farelerde kohlea ve özellikle tüy hücrelerinde sentezlenen bu proteinin normal işitme için gerekli olduğunu göstermiştir (Avraham 1995). Miyozin VI'nın insan fetal kohleasında sentezlendiğini ve bu proteinin iç kulak fizyolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Avraham 1995). Miyozin VI'nın taşıyıcı protein olarak iş gördüğü ayrıca transkripsiyonel aktivitede gerekli olan RNA polimeraz ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Vreugde 2006).

Bu gendeki mutasyonlar aynı zamanda otozomal dominant sendromik olmayan işitme kaybına sebep olmaktadır (Melchionda 2001). Bazı mutasyonların ise otozomal dominant işitme kaybıyla birlikte ailesel hipertropik kardiyomiyopati'ye sebep olduğu gösterilmiştir (Mohiddin 2004).

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

1.1.1.23. COL1A2 Geni

Bu gen 6p21.3 kromozomal bölgede lokalizedir ve kollojen tip XI alfa2 isimli bir protein kodlamaktadır. Gen 66 ekzon içermektedir ve 30,5 kb büyüklüğündedir. Kollajenlerin amino propeptidi genellikle 5-8 ekzon tarafından kodlanmaktadır. Bu gen diğer kollajenlerden amino propeptidinin 14 ekzon tarafından kodlanmasıyla ayrılır (Lui 1996). Tip II kollajenler tip IX ve XI kollajenleriyle ilişkilidir (Brunner 1994).

Bu gendeki mutasyonların aynı zamanda Stickler sendromu ve OSMED (otospondylomega-epiphyseal displazi sendromu) yaptığı gösterilmiştir (Vikkula 1995; Sirko-Osadsa 1998).

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

1.1.1.24. *PJVK* Geni

Delmaghani vd (2006) pejvakin geninin 2. kromozomun DFNB59 lokusunda 2q31.1-q31.3 bölgesinde lokalize olduğunu göstermişlerdir. 9,8 kb uzunluğundaki bu gen 7 ekzon içermekte ve 352 amino asitten oluşmaktadır. Hücresel lokalizasyon sinyali ve çinko bağlanma motifi içermektedir (Delmaghani 2006). Pejvakin ve DFNA5'in ekzon organizasyonlarının benzerlik göstermesi bu iki genin benzer orijinden geldiklerini düşündürmektedir (Delmaghani 2006).

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

1.1.1.25. *TMHS* Geni

Bu gen 6p21.3 kromozomal bölgede lokalizedir. Genin diğer adı *LHFP15*'dir ve tüy hücresi tetraspan membran proteini isimli bir protein kodlamaktadır. Farelerde yapılan çalışmada bu genin 4 ekzonu olduğu , 216 amino asitlik bir protein kodladığı ve bu proteinin 4 transmembran bölgesi olduğu gösterilmiştir. İmmünofloresan lokalizasyonda *Tmhs*'nin iç kulaktaki iç ve dış tüy hücrelerinin sterosilialarında bulunduğu gösterilmiştir (Longo-Guess 2005).

Bu gendeki mutasyonlarının vestibüler işlev bozukluğu, korti dejenerasyonu ve iç kulaktaki tüy yumaklarının morfogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu gende işitme kaybı yapan 1 tane delesyon, 1 tane yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonu tanımlanmıştır (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

1.1.1.26. *TRIC* Geni

Bu gen 5q12.3-q14.1 kromozomal bölgede lokalizedir ve triselülin isimli proteini kodlamaktadır. Bu protein hücreler arası sıkı bağlantı proteinidir, birçok dokudaki epitel hücrelerinin temasına yapı ve işlev olarak katılmaktadır.

Bu protein iç kulaktaki kohlear triselular sıkı bağlantı bölgelerinde ve vestibular epitelde bulunmaktadır. Bu gendeki 4 farklı resesif mutasyonun sendromik olmayan işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Aynı zamanda işitme kaybına eşlik eden alternatif kırılma formları tanımlanmıştır (Riazuddin 2006).

1.1.1.27. *RDX* Geni

Bu gen 11. kromozomun q23 bölgesinde DFNB24 lokusunda bulunmaktadır ve radiksin isimli bir protein kodlamaktadır. Protein 627 amino asitten oluşmaktadır ve 3 bilinen işlevsel bölgesi mevcuttur.

Ezin, radiksin ve moesin paralog proteinler olup ERM protein ailesi içinde yer almaktadır. Bu protein hücre iskeletindeki aktin filamentleri ve integral zar proteinleri arasında çapraz bağ oluşturmaktadır. Farede *Rdx* yokluğunda iç kulak tüy hücresi dejenerasyonu sonucunda oluşan işitme kaybı meydana gelmektedir.

Pakistanlı ailelerde bu gende bulunan 2 farklı mutasyonun işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Mutant allellerin radiksinin aktin bağlama motifini etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca bu gendeki başka bir mutasyonun proteinin FERM bölgesini kısalttığı gösterilmiştir (Khan 2007).

İşitme kaybına sebep olan 27 tane gen mevcuttur. Bir ailenin işitme kaybı nedeni araştırılırken bu genlerin hepsine mutasyon analizi yapmak mümkün olmamaktadır. Bu çalışma uygun aileler seçildiğinde, aileden en az 2 etkilenmiş birey kullanılarak mikrodizin analizi yardımıyla genleri çevreleyen homozigot blokların tespitiyle ilgili genlerin saptanmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

1.2.1. Mikrodizin Analizi

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

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

Oligoçipler 20-80 bp uzunluğundaki oligonükleotidlerin önce sentezlenip sonra çip yüzeyine sabitlenmesi veya doğrudan çip üzerinde sentezlenmesi (fotolitografi) ile üretilir. Affimetrix firması tarafından genom boyunca SNP taraması yapmak için Mapping 10K 2.0 Array, Mapping 50K Array, Mapping 100K Array , Mapping 500K Array, Genome-Wide Human SNP Array 5.0 ve Genome-Wide Human SNP Array 6.0 çipleri geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde genom boyunca 906.600 SNP tarama imkanı sağlanmıştır.

1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (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 µg/ml jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır.

Oligoprimlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(GC)+2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliği arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılan oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir.

Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak yada uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri de rasgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermeme ve guanin, sitozin nükleotidlerinin %50'yi geçmemesi gerekmektedir.

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).

1.2.3. Mikrosatellit Analizi

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

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

birçok allel ile karakterize edilir.

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

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

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

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

Mutasyon taraması için bir çok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP) dir. PCR tekniği kullanılarak uygulanan bu yöntem; denatüre edici olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jeldeki yürüme farklılığına dayanarak 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).

1.2.5. DNA Dizi Analizi

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

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif 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 moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır (Lüleci M 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 çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Klinik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışma 105S464 nolu “Otozomal Resesif Sensorinöral İşitme Kaybı Yapan Gen Değişimlerinin Ortaya Çıkarılması” isimli TÜBİTAK projesiyle kısmen desteklenmiştir. Anne baba arasında akrabalık olan ve en az üç etkilenmiş bireyde sendromik olmayan doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan ileri ve çok ileri sensorinöral işitme kaybı bulunan beş aile araştırmaya dahil edilmiştir. Bu aileler benzer özellikteki daha çok sayıda aile içinden bilinen bir işitme kaybı geninin sorumlu olduğu tahmin edilerek seçilmiştir. Ailelerin hiçbirinde *GJB2* mutasyonlarının olmadığı gösterilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan formlar kullanılmıştır (Tarih:30.01.2006, Karar no: 85-2215).

2.2. Yöntemler

Bu çalışmadan önce 36 tane otozomal resesif işitme kaybı olan aile alınmış ve tüm genom boyunca tek nokta polimorfizmi genotiplenmiştir. Bunlardan bilinen otozomal resesif bir gen lokusu ile birlikte kalıtım gösteren beş ailede bölgeye özgü mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genotiplendirme yapılmıştır. Bu analiz mikrosatellit genotipleriyle fenotipin birlikte kalıtıldığını gösterdiğinde ilgili gende SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. DNA İzolasyonu

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

Bireylerden, 1 mL 0,5 M Etilendiamintetraasetikasilikli (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 mL kan örneği alınır. Alınan kan örneği falkon tüpüne (50 mL) konur ve içerisinde 25 mL RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, 20 dk buzda bekletir. +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), İzoamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

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 20dk 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. Mikrodizin analizi

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

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

Bu yöntem her aileden en az iki etkilenmiş bireye uygulanmıştır. Hastaların genomik DNA örnekleri EDTA-TE Tamponu kullanılarak 50 ng/μL olacak şekilde ayarlanır ve kesim aşamasına geçilir. Bu aşamada buzda 15 μL ddH₂O, 2,5 μL buffer tango (10X) ve 1,25 μL Xba I (20 U/μL) içeren bir karışım hazırlanır. Bu karışıma 6,25 μL genomik DNA eklenir ve 2000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. Hazırlanan örnek 37 °C etüvde 16 saat bekletilir. Ardından PCR cihazında 70 °C 'de 20 dk bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanır.

Bu işlemin ardından ligasyon işlemine geçilir. 1,25 μL Adaptor Xba, 2,5 μL T4 DNA Ligaz tamponu kullanılarak bir karışım hazırlanır ve bu karışıma 1,25 μL T4 DNA Ligaz ile 20 μL kesilmiş DNA örneği eklenir. 2000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. PCR cihazında 16 °C'de 120 dk, 70 °C'de 20 dk bekletilir. Bu işlemden sonra 25 μL ligasyonlu örnek 75 μL ddH₂O ile sulandırılır.

Ardından PCR aşaması gelmektedir. Her birey için gerekli olan örnek miktarını elde etmek amacıyla 5 adet PCR yapılmaktadır. Her PCR reaksiyonu için 10 μL PCR Buffer, 10 μL dNTP (herbiri 2,5 mM), 10 μL MgCl₂ (25 mM), 7,5 μL PCR Primer,001, 2 μL Taq

polimeraz (5u/μL) 50,5 μL ddH₂O ve 10 μL dilüye edilmiş ligasyon ürünü kullanılmaktadır. Bu karışım DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research (Bio-Rad, ABD) PCR cihazında; 95°C'de 3 dk, 35 döngü 95°C'de 20 s, 59°C'de 15 s, 72°C 7 dk ve 4°C bitiş programına tabi tutulmaktadır.

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

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

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarından gelen ailelere ait genetik veriler Microsoft Excel programına aktarılmış, SNP'lerin kromozomal ve DNA lokalizasyonlarına göre sıralaması yapılmıştır. Bugüne kadar tanımlanmış 27 otozomal resesif işitme kaybı geninin genomik lokalizasyonu ensembl (www.ensembl.org) veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir. Bu genler daha önceden hazırlanmış SNP verilerini içeren Microsoft Excel tablolarında ilgili genomik lokalizasyona yerleştirilmiştir. Her ailede kendi içinde etkilenmiş bireylerin genotipleri bilinen bir geni homozigot olarak çevreliyorsa, bu gendeki homozigot bir mutasyonun ailedeki işitme kaybına neden olabileceği düşünülmüştür.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yapılan mikrodizin analizi sonuçlarına göre; *TMIE* gen bölgesine bağlantı gösteren 1 aile (559 nolu aile), *CDH23* gen bölgesine bağlantı gösteren 1 aile (561 nolu aile) ve *TMC1* gen bölgesine bağlantı gösteren 3 aile (551, 647, 734 nolu aileler) saptanmıştır.

Her gen için o genin içinde veya yakınında bulunan üç mikrosatellit belirteci kullanılmıştır. Bu mikrosatellit belirteçleri ile yapılan PCR reaksiyonunda son konsantrasyonu 0,6 pmol olacak şekilde oligonükleotid çiftleri, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 ünite taq polimeraz, 15 mM MgCl₂ ve toplam hacmi 25µL'ye tamamlayacak miktarda ddH₂O kullanılmıştır.

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

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

Çizelge 2.1. *TMIE*, *TMC1*, *CDH23* genleri için kullanılan mikrosatellit belirteçleri.

Belirtecin Adı	Kr No	Kromozomal lokalizasyonu	Gen	Nükleotid dizisi	Boyutu (bp)	PCR programı
D3S1767	3	46,931,413-46,931,658	TMIE	F: 5' ATG CTG TAT TTC AAC ACA CAG G 3' R: 5' AAT TAG GCA CGG TAG CAC AC 3'	244	Program 1
D3S1289	3	54,454,520 – 54,454,685	TMIE	F: 5' AGC AAC TTG TAA GAG AGC ATT C 3' R: 5' AAT GCT CCA TTT TCT CCT TC 3'	178	Program 1
D3S1582	3	54,670,857 – 54,670,995	TMIE	F: 5' GGG GAT ATT TCA CTG AAG ATG 3' R: 5' AGA AAA TCC CAG AGG AAC AG 3'	121	Program 2
D9S1837	9	74,374,949 - 74,375,187	TMC1	F: 5' CAT GAT GGT GGT CTC TGG 3' R: 5' GGT GGG GCT CAA AGA GTA G 3'	205-251	Program 3
D9S1806	9	73,391,177 - 73,391,440	TMC1	F: 5' TTT TAG GTG TTC TCA GTA CAT GC 3' R: 5' GGG AGC AAC ATT TTG ACA TT 3'	216-266	Program 3
D9S1876	9	74,422,611 - 74,422,758	TMC1	F: 5' GAT GTA CCC AGA GAA GTC TCG 3' R: 5' AGT GGT TAC CAT TTA CCC AAG 3'	132-152	Program 4
D10S1650	10	72,963,220 - 72,963,357	CDH23	F: 5' GAA GCC TGT GGT CTA ATG AG 3' R: 5' TTC TGG CCT CTG CAG C 3'	104	Program 3
D10S1694	10	73,097,085 – 73,097,225	CDH23	F: 5' CCT GTC TGG CCC AGG TA 3' R: 5' AGT AGG GGT GCT GCT TGA 3'	121	Program 3
D10S1759	10	72,729,755 – 72,729,936	CDH23	F: 5' TGC ACA ACT GGG GAA ACT 3' R: 5' TGG GCA CGC TCA CAC T 3'	150	Program 3

Program 1 ; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk , 68°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 72°C’de 1 dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk , 59°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 2 ; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk , 65°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 72°C’de 1 dk; 20 döngü 94°C’de 1 dk , 55°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 3 ; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk , 60°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 72°C’de 1 dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk , 50°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 4 ; 94°C’de 10 dk ardından 19 döngü 92°C’de 40 sn , 60°C’de 40 sn her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 19 döngü 92°C’de 40 sn, 60°C’da 40 sn her döngüde 1 sn artacak şekilde ve 72°C’de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Techne, ABD).

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

2.2.4. Mikrosatellit için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Bu çalışma %6’lık poliakrilamid jel kullanılarak yapılmıştır. Jelin yapımında %40’lık 19:1 oranında hazırlanan akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 190 g akrilamid (Merck,Almanya) ve 10 g N,N'-metilen-bis-akrilamidin (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C’de ısıtılarak çözünmesi sağlanmış ve hacim distile su ile 500 mL’ye tamamlanmıştır. Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu için; 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 mL 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem,Almanya) distile su ile 1000 mL hacime tamamlanarak yapılmıştır.

Mikrosatellit jelinin döküleceği camlar öncelikle distile su ile yıkanıp alkolle temizlenmiştir. Sonra jelin cama yapışmamasını sağlamak amacıyla her iki cam bir miktar SigmaCode (Amersham, İsveç) ile silinmiştir. Ardında camlar arasına 0.8 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilerek sabitlenmiştir. 62.49 g üre, 13 mL TBE 5X, 19.5 mL %40 (19:1) akrilamid/bisakrilamid solüsyonu yaklaşık 20 mL distile suda 37°C’de eritilmiştir. Ardından hacim distile su ile 130 mL’ye tamamlanmış ve jel içeriği 0.22 µm filtreden süzöldükten sonra 10 dk vakum pompası yardımıyla havası alınmıştır.

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

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

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

2.2.5. Mikrosatellit Jeli için Gümüş Boyama

Gümüş boyama için 3 farklı solüsyon kullanılmaktadır. 1. solüsyon %0.15 oranında gümüş nitrat içermektedir. Bu solüsyon için %1'lik stok gümüşten 150 mL alınarak 900 mL distile su ile karıştırılır. Jel yürüme işlemi bittikten sonra camlardan ayrılarak bu solüsyonda yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Ardında gümüş solüsyonundan iyice temizlenmesi amacıyla jel distile sudan geçirip, 2. solüsyona tabi tutulmuştur. Bu solüsyon 150 mL %15'lik NaOH, 6 mL formaldehit ve 1350 mL distile su kullanılarak hazırlanıp, jel bu solüsyonda bantlar görünür hale gelene kadar boyanmıştır. Ardında bu solüsyon dökülerek jel 3. solüsyonda bekletilmiştir. Bu solüsyon, %7.5'lük Na₂CO₃ stok solüsyonu

10 kez seyreltilmesiyle hazırlanır ve boyama reaksiyonunu durdurmak amacıyla kullanılmaktadır.

Jel sonuçlarına göre 559 nolu aile D3S1289, D3S1582, D3S1767 isimli mikrosatellit belirleyicilerine göre *TMIE* gen bölgesine; 561 nolu aile D10S1650, D10S1694, D10S1759 isimli mikrosatellit belirleyicilerine göre *CDH23* gen bölgesine; 551 nolu aile, 647 nolu aile ve 734 nolu aile D9S1837, D9S1806, D9S1878 isimli mikrosatellit belirleyicilerine göre *TMC1* gen bölgesine bağlantı göstermektedir.

Bu aşamadan sonra ailelerin segregasyon gösterdiği genlere mutasyon analizi yapılmıştır. Bunun için temel olarak 2 yöntem kullanılmıştır. Bunlar SSCP ve DNA dizi analiz yöntemleridir.

2.2.6. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

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

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

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

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

Jel; 12,34 mL %40'lık akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, 14 mL TBE 5X solüsyonu, 40,16 mL distile su ve 3.5 mL gliserol kullanılarak hazırlanmıştır. Karışım 0.22 µm filtreden süzöldükten sonra vakum ile havası alınmıştır. Ardından bu jel içeriğine 0,6 mL %10'luk Amonyum Persülfat ve 40 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökölmüştür. Jel polimerleştikten sonra 1,5 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneyeceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

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

PCR örneklerinin içerdiği adenin ve sitozin nükleotid sayılarını baz alarak aşağıda belirtilen formöl ile bir sıcaklık değeri (Ts) hesaplanmıştır ve örnek yüklenmeden önce jeller hesaplanan bu sıcaklık derecesine getirilmiştir (Li 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 yürütölmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

2.2.7. SSCP Jeli için Gümüş Boyama

Bu yöntem için kullanılan gümüş boyama mikrosatellit jellerini boyamak için kullanılan yöntemden sadece 1. solüsyondaki gümüş nitrat solüsyonunun konsantrasyonu bakımından farklıdır. 1. solüsyon için %1'lik stok gümüş nitrat %0,1'lik olacak şekilde 100 mL %1'lik stok gümüş nitrat solüsyonu , 900 mL distile su kullanılarak seyreltilir. Jeller bu

solüsyonda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra formaldehit ilave edilmiş %1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonu ile boyanmıştır. Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile muamele edilerek boyama işlemi sonlandırılmıştır. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenmiştir.

Bu yöntemle taranan *TMC1* ve *CDH23* genlerinin ekzon sayısı, ekzonlara özgü oligonükleotid dizileri, ekzon boyutları, Ts değerleri ve oligonükleotidlerin optimize olduğu PCR koşulları Çizelge 2.3, 2.4 'de verilmiştir. Bu genlerdeki bant farklılığına sahip bireyler DNA dizi analizi ile taranmıştır. *TMIE* geni 4 ekzonu olması nedeniyle direkt DNA dizi analizi yöntemiyle taranmıştır. Bu genin ekzon sayısı, ekzonlara özgü oligonükleotid dizileri, ekzon boyutları, ve oligonükleotidlerin optimize olduğu PCR koşulları Çizelge 2.2 verilmiştir.

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

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon boyutu (bp)
Ekzon 1	F: 5'ACCCACCTCAGTGTC 3'	F: 5'TGACAGCCTCCCCAGTCC 3'	Program 3	400
Ekzon 2	F: 5'AGCTGGCCTCGCCTAACTC 3'	F: 5'ATTGCTGCTCTGAGCCCTCT 3'	Program 3	246
Ekzon 3	F: 5'CCATTCTTGGGTCTCTGAA 3'	F: 5'GAGCAGAGGAACAGGGTGAC 3'	Program 3	289
Ekzon 4	F: 5'CCAGGACCTTGTCTCACCAC 3'	F: 5'CCCAAATGAGCTCAGAGTCC 3'	Program 3	248

Çizelge 2.3. *TMCI* geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon boyutu (bp)	Ts değeri (°C)
Ekzon 5	F: 5' GGCACAAGTGTGTGGATGTG 3'	R: 5'TCCAAAGTTTTCAAATACCTTTATACC 3'	Program 1	202	23,39
Ekzon 6	F: 5'TGCACAAAAACATTATGATAAAAACA 3'	R: 5'AGCTCAAGTCCACAAGAGGAT 3'	Program 1	233	25,62
Ekzon 7	F: 5' TGGGAGGAAGCACTTTCTGA 3'	R: 5'TCTTCAGCATTGGAACCTTTGA 3'	Program 1	267	26,39
Ekzon 8	F: 5'TGATCACATGTGTGGCTCAG 3'	R: 5' CCATCCTCCCACCAATACAC 3'	Program 1	202	26,18
Ekzon 9	F: 5' TCATTGCAACTCACCTCCTTT 3'	R: 5' CCAGTGTCTTCTTAGAGGCAAT 3'	Program 1	198	25,33
Ekzon 10	F: 5' TTTGAGGTGGGGGATAAACA 3'	R: 5' TCTCTAAGACAACCTTCTCCACCT 3'	Program 1	199	25,20
Ekzon 11	F: 5' AGGCAACCAAGACAAAGCTC 3'	R: 5' TGA CTCTAAGACGTGAAAATAGCC 3'	Program 1	299	23,27
Ekzon 12	F: 5' TGATCACATGTGTGGCTCAG 3'	R: 5' GCCGTGGGTTTCAGAATAAAA 3'	Program 1	239	22,21
Ekzon 13	F: 5' TTGCTCTTCACGACAACTGC 3'	R: 5' TCCCTCCATTTGATCCAGA 3'	Program 1	247	23,73
Ekzon 14	F: 5' TTTTCTGGCTGCTGGGTTA 3'	R: 5' TTA CTCTTAGAAAATACAAACAGCAGGT 3'	Program 1	231	24,23
Ekzon 15	F: 5' ATTCTATTTTGGGTTTTTGTGTTGT 3'	R: 5' CAAATGTCAGGTTCTAAGCACA 3'	Program 1	285	23,49
Ekzon 16	F:5'AAAAAGCAATAATAACTTTAAACACCA 3'	R: 5' CAACACTCTTATGGCAAGGACA 3'	Program 2	281	24,25
Ekzon 17	F: 5' TGCCTTTGAAATCTCTGTTGTC 3'	R: 5' GCCAATCTTATGGAAGAGATATTGA 3'	Program 1	292	23,73
Ekzon 18	F: 5'CCAACACTAGGACCATTTGAAG 3'	R: 5' AAACACCCAAGAATTATCAATAAAAA 3'	Program 1	264	24,73
Ekzon 19	F: 5' TTGCCTTTCAGTTTTGACCA 3'	R: 5' AACCTGGGAGGCTTTTCTGT 3'	Program 2	177	21,21
Ekzon 20	F: 5' GGAGTAAAGACTCAAACTGAGCA 3'	R: 5' GAACACGATGCCTGAGTCAA 3'	Program 1	322	19,8
Ekzon 21	F: 5' ACCATGGTTTTTCCATATGTTC 3'	R: 5' CCAGGAAGAATCACAGAGG 3'	Program 1	234	22,04
Ekzon 22	F: 5' AAGAAGTATCTTGGGGAAGTAAA 3'	R: 5' CTCAGTGTCTTCTACTGCTTGACA 3'	Program 1	205	25,76
Ekzon 23	F: 5' TGTC AAGCAGTAGAAAACACTGAG 3'	R: 5' TAATGCCACTCACCATCCAA 3'	Program 1	216	24,59
Ekzon 24	F: 5' TTGCCTCTGTTTCATCTTCTC 3'	R: 5' AGCAGTCCACATGCTTGTT 3'	Program 1	190	21,56

Çizelge 2.4. *CDH23* geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları.

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon uzunluğu (baz çifti)	Ts değeri (°C)
Ekzon 1	F: 5' GCTATACCCAGGATAGGACAATGT 3'	R: 5' CCTGTGAGAGCTGGCAGAAGGCAAC 3'	Program1	465	33,17
Ekzon 2	F: 5' CCTGTGTCAACCTTATAGAGTGTGT 3'	R: 5' GATGACCTCAACCTGTAAAGATCCC 3'	Program1	242	26,71
Ekzon 3	F: 5' GGAAGGCATAAACGTGACCTCCTCTC 3'	R: 5' GATGCCACTGTGGAGTCAGAATGG 3'	Program1	327	31,39
Ekzon 4	F: 5' AAGCTCCTAGGGCAATCTGGAGC 3'	R: 5' CACCTTTCCGTGTGATCACCTGG 3'	Program1	291	32,14
Ekzon 5	F: 5' GGGTCACAGGATTTCTGGACCC 3'	R: 5' TGTGTGCCACTGGGTCAATGTCC 3'	Program1	249	24,96
Ekzon 6	F: 5' GGCTGAAGGATGTAGAGAATGG 3'	R: 5' TGTGTGCCACTGGGTCAATGTCC 3'	Program1	396	30,83
Ekzon 7	F: 5' CCTTCCCTGCTGGAGTGCAAGAGCA 3'	R: 5' GCTTGTCCAGAACAACACTCATCACTGC 3'	Program1	441	30,95
Ekzon 8	F: 5' GCTGTGGGTGCCATGATAGCTA 3'	R: 5' CCTCAGAGCCTGAGATGCCTACT 3'	Program1	241	22,49
Ekzon 9	F: 5' TGAGTCTTTAATGCCAGAGAGG 3'	R: CCTCGGACACTGTGGAGGTTG 3'	Program1	307	32,03
Ekzon 10	F: 5' GGTAAGCAAGAGCTGTGTGCTGTG 3'	R: 5' TTATCCTCAGAACCACCAGGAG 3'	Program1	391	25,52
Ekzon 12	F: 5' CCCACCCAAAGCAGCTCTGGG 3'	R: 5' GGTCAAGGAATCTTACC 3'	Program1	351	29,46
Ekzon 13	F: 5' CAGAGACTCTAACAGGTGCTCTGG 3'	R: 5' CCTGATTGCTGAGGTCCCTTGGAC 3'	Program1	377	24,83
Ekzon 14	F: 5' CCAAAGGAGACGTGCGAGAGGAAC 3'	R: 5' GTTCCCAGATCTCATGAGTCTGG 3'	Program1	236	26,61
Ekzon 15	F: 5' GGCAAGGACAGGCTGGGAAATGC 3'	R: 5' CAAGCAAGCAAGTACAGGGAGAAG 3'	Program1	395	28,98
Ekzon 16	F: 5' GCCTCCAGTTGAAGCACAAGGG 3' R:	5' TCCTGAGTAGCCAGAGTGTCAAG 3'	Program1	414	31,39
Ekzon 17	F: 5' CCATGCCAGCCATAACTTCTCTGC 3'	R: 5' GTTACAGGAAGCACTCACCATCC 3'	Program1	292	27,63
Ekzon 18	F: 5' CAGACCTAGCCTGACTCCTTGGTG 3'	R: 5' CCTCCCACAATTTGTGTGCAGAGC 3'	Program1	276	30,04
Ekzon 19	F: 5' CACCTCCTGAGAGCTGGTCACTG 3'	R: 5' CTGGTCTCAAAGCTGGTCTGTCTC 3'	Program1	390	36,02
Ekzon 20	F: 5' CCAGATCATGGTAGCTTGCTAAC 3'	R: 5' CACAAAGCCTCACACTGGCTCAG 3'	Program1	355	37,65
Ekzon 21	F: 5' GGTGGAGCTGGCAGAATTAATGC 3'	R: 5' CTATTGCAAGAGCCAGCTCAGAG 3'	Program1	366	31,06
Ekzon 22	F: 5' CTCAGTGAAGGGGTCTGCTC 3'	R: 5' GTACCCAGAGGCCAGT 3'	Program4	299	32,14
Ekzon 23	F: 5' CTCACCATTGCTTCTTCC 3'	R: 5' CCTATCCTTTTCTGCCACA 3'	Program5	242	26,71
Ekzon 24	F: 5' GAAGCATCCATCCCAGTGTG 3'	R: 5' CACTGAGCACACAGCAGA 3'	Program5	327	31,39
Ekzon 25	F: 5' TGACTCCCTTGGGAATTCAT 3'	R: 5' CAGAGGCTAAAGCCCAACAG 3'	Program5	406	35,2
Ekzon 26	F: 5' CCACTCCTGGACTCACCATC 3'	R: 5' AGGCACCCTGTGTGAACCTCT 3'	Program3	283	24,97
Ekzon 27	F: 5' GAAGTGTGCCCTTCTCTCAG 3'	R: 5' CTCTGGTGGCCACTGAGCAT 3'	Program5	297	29,00
Ekzon 28	F: 5' CTGGGTGGCATTCAAGAAAGT 3'	R: 5' CCTCATCTCCAGACCTTTG 3'	Program5	195	25,13
Ekzon 29	F: 5' AGGAGGGGACTGGTGAACCT 3'	R: 5' TGTCTAGCTGTGGGCTTGG 3'	Program5	313	28,13
Ekzon 30	F: 5' GGAAAGCAGTGACCACACAA 3'	R: 5' TGGGGAGGTTTGCTCGA 3'	Program5	239	27,58
Ekzon 31	F: 5' TCTATCGGGACTGCACAGC 3'	R: 5' TGCACACAGAAGGAGCTCAA 3'	Program5	499	17,4
Ekzon 32	F: 5' ACGTGACAGGCCTTGTCTTA 3'	R: 5' AGGACATGGGATTGGAAGTG 3'	Program5	579	18,23
Ekzon 33	F: 5' AGGGTTTGTCTGATGTTCCAG 3'	R: 5' GATCCTGGCTGTTTCACTC 3'	Program5	304	27,25
Ekzon 34	F: 5' TTAGCCCTGACTCCAGTTGC 3'	R: 5' CCCCCGTATGTCCAGCTAT 3'	Program5	205	27,25
Ekzon 35	F: 5' TACAGGAGCAGGTGCCAGAC 3'	R: 5' TTGGGCAGATGGACTAAAGG 3'	Program5	454	27,8
Ekzon 36	F: 5' TCGCAGACATAGGAGTGGTG 3'	R: 5' ATAGGTTTCGCCCTTGTCT 3'	Program3	506	27,2
Ekzon 37	F: CAGTGGTTCCCATCACAG 3'	R:AGGACAGGGTCTTGGATT 3'	Program5	365	28,25
Ekzon 38	F: TGGCTAAGCTTTCCACCAT 3'	R:GGTGTCTCGCCACATCTCT 3'	Program5	405	24,55
Ekzon 39	F: GGCTTGCTAGAGGAAGCAGA 3'	R:CCCAAAGAGTTGCTGGATGT 3'	Program5	400	31
Ekzon 40	F: TTCTCCATGACCAACTGCAC 3'	R:TAGGGCAGGGTCTCTTTT 3'	Program5	398	33,57
Ekzon 41	F: AATTAGGGAGGCCAAGCAG 3'	R:AATGGAGGCCAAGAGGAGTT 3'	Program3	401	22,6
Ekzon 42	F: CCAACCTACCAACCTCTCTC 3'	R:ACCCACTGGGTCTAGGTTTC 3'	Program5	301	31,02

Çizelge 2.4 (devam). *CDH23* geninin ekzonları, oligonükleotid dizileri, ekzonların Ts değerleri, baz çifti uzunlukları ve PCR programları belirtilmiştir.

Ekzon numarası	Sağ oligonükleotid dizisi	Sol oligonükleotid dizisi	PCR programı	Ekzon uzunluğu (baz çifti)	Ts değeri (°C)
Ekzon 43	F: CTCCCCTCTCATCCATCGT 3'	R: GCTGTGAAAAATGGGGTCTC 3'	Program5	361	34,54
Ekzon 44	F: GCACCCCTTTTCTGTGTGT 3'	R: AACTCCGTGTCCAACCTGAG 3'	Program5	338	32,14
Ekzon 45	F: CTCCCCTTTCCCTCTCCAAC 3'	R: GAGAAAGAAGGGGGAAGCAG 3'	Program2	561	30
Ekzon 46	F: CAGCCACAAGTCCCAGATTC 3'	R: TTGGGCTCTGAGTGACCAATG 3'	Program5	297	25,28
Ekzon 47	F: GGTACCTAGCCCTTCTCT 3'	R: CTTGGGGACTAAGCAAGCAG 3'	Program4	502	30
Ekzon 48	F: AATGAGGAGTGGCCAAATG 3'	R: GGGCAGGGAGAGAGAGTAGG 3'	Program4	413	32
Ekzon 49	F: GGGACTGACCTTGGCCTACT 3'	R: ACTTTTGGTGGCTGCTCAGT 3'	Program5	259	23,9
Ekzon 50	F: TGGCCATAGTAGGTGCTCAA 3'	R: CCACTTGCTAGAGGCTTTGC 3'	Program5	268	15,74
Ekzon 51	F: CTCCTTACCTTTGGCCTTGA 3'	R: CACGCTTCCCTTACTCCTG 3'	Program5	301	26,73
Ekzon 52	F: TACTCTCTGCTCCCACTGC 3'	R: CCACTTCTTAGGCCACAGC 3'	Program4	303	32
Ekzon 54	F: ACTGTGCTTTCGCTCCTA 3'	R: TGTTTCCGTGTCTAGCCAAA 3'	Program5	251	28,5
Ekzon 55	F: CTGAAACAGGACTGGAAGC 3'	R: GGCATATGTGGGTATCTC 3'	Program5	260	28,5
Ekzon 56	F: CCATGATCCCACCCTCAG 3'	R: GGAAGAGGCAGGTGGTGTA 3'	Program5	343	31,53
Ekzon 57	F: TTACACCACCTGCCTTCC 3'	R: CCAGATGACAGTCCATGCAG 3'	Program3	256	29,69
Ekzon 58	F: TGAGTCTTGAGCCGTACCC 3'	R: CCTTCTTCTCCCTCCAGTG 3'	Program2	346	26,49
Ekzon 59	F: GGGTCTATTTGCAGGGAAGG 3'	R: CAGACAGGCTGACAGTCAA 3'	Program5	242	27,25
Ekzon 60	F: GCTGAGGAGGAGAGCTGAGA 3'	R: AGGAGGATAGCCAGGACGAT 3'	Program4	263	33,94
Ekzon 64	F: TCACACCCAAGTCAGTGAA 3'	R: CCCCTAAAGAACCAGCTT 3'	Program5	350	27,50
Ekzon 65	F: GCCTCTGCTCCAGCCTAACAT 3'	R: AACCTCAGCCAAGGGACTG 3'	Program5	202	30
Ekzon 66	F: TGTACCCCTTACTCCAGAGG 3'	R: CCGGCTACTCAGAGATGGAG 3'	Program4	199	30,54
Ekzon 67	F: CCACATAGCCAGTGGGTCTC 3'	R: CCACAAGGCTTCCCTGTCTA 3'	Program2	435	29,7

Program 1 ; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk , 68°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 72°C’de 1dk, 20 döngü 94°C’de 1 dk , 58°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 2; 95°C’de 5 dk ardından 35 döngü 94°C’de 1 dk , 60°C’de 1 dk , 72°C’de 1dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 3 ; 94°C’de 10 dk ardından 19 döngü 92°C’de 40 sn , 60°C’de 40 sn her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 19 döngü 92°C’de 40 sn, 60°C’da 40 sn her döngüde 1 sn artacak şekilde ve 72°C’de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Techne, ABD).

Program 4 ; 95°C’de 5 dk ardından 20 döngü 94°C’de 1 dk , 65°C’de 1 dk her döngüde 0.5°C düşecek şekilde , 72°C’de 1d k, 20 döngü 94°C’de 1 dk , 55°C’da 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

Program 5; 95°C’de 5 dk ardından 35 döngü 94°C’de 1 dk , 58°C’de 1 dk , 72°C’de 1dk ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Primus, ABD).

2.2.8. DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada istenen DNA parçacığının nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger’in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemli çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD). Cihaz için 0,2 mL’lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Her bir örnek için 8 µL sekans solüsyonu (premix; 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1µL dNTP karışımı, 2µL ddUTP, 2µL ddGTP, 2µL ddCTP, 2µL ddATP, 1µL polimeraz enzimi), 1µL temizlenmiş PCR ürünü, 2 pmol sağ veya sol oligonükleotid ve hacimi 20 µL’ye tamamlayacak kadar distile su konularak “cycle sequencing” gerçekleştirilmiştir. Bu program 94°C’de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C’de 20 s denatürasyon, 50°C’de 20 s yapışma ve 60°C’de 4 dk’lık uzama evresi şeklinde gerçekleşmektedir. “Cycle sequencing” sonlandıktan hemen sonra örneklerin içine reaksiyonun durdurulması için her bir örnek için 5 µL durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/mL’lik Glikojen) ve 60 µL %95’lik

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

3.BULGULAR

Çalışmaya alınan ailelerde *TMIE* (1 aile), *CDH23* (1 aile) ve *TMC1* (3 aile) genlerindeki mutasyonların sorumlu olabileceği mikrodizin analizleriyle tahmin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bu çalışmadaki beş ailenin mikrodizin sonuçları.

Aile No	Bağlantı Bulunan Kromozom	Bağlantı Bulunduğu Gen	Genin Bulunduğu Bölge	Ailedeki Homozigot Bloğun Bulunduğu Bölge	Homozigot bloğun bittiği noktalardaki SNP adı
559	3	<i>TMIE</i>	46,717,827-46,727,205	36,835,547-56,175,927	SNP_A-1512084
551	9	<i>TMC1</i>	74,326,537-74,641,087	73,764,352-80,155,413	SNP_A-1512080
647	9	<i>TMC1</i>	74,326,537-74,641,087	20,881,855-73,764,352	SNP_A-1511967
734	9	<i>TMC1</i>	74,326,537-74,641,087	30,075,410-76,409,215	SNP_A-1513391
561	10	<i>CDH23</i>	72,826,700-73,245,659	68,552,078-76,631,338	SNP_A-1516878

3.1. 559 Numaralı Aile

Başlangıçtaki mikrodizin analizinde bu aileden alınan beş etkilenmiş bireyin sonuçları Çizelge 3.2'de görülmektedir. Analiz sonucunda *TMIE* geni etrafında bütün bireylerde ortak bir homozigot blok tespit edilmiştir.

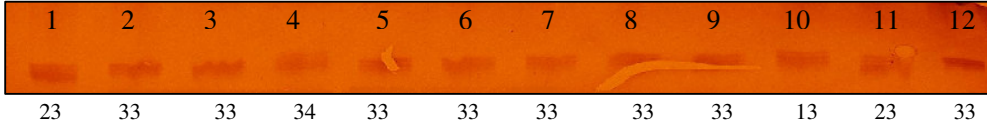
Çizelge 3.2. 559 nolu ailenin *TMIE* genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.

SNP ID	Kr No	Lokalizasyon	559-106	559-201	559-202	559-203	559-204
SNP_A-1518071	3	42479456	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509386	3	44062468	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1516695	3	44201927	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1516779	3	44987786	AA	AA	NoCall	AA	AA
SNP_A-1515237	3	45451490	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1515175	3	45451698	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1512996	3	45488062	BB	NoCall	NoCall	BB	NoCall
SNP_A-1507746	3	45685991	AA	AA	NoCall	AA	AA
SNP_A-1516032	3	45686739	NoCall	AA	AA	AA	NoCall
SNP_A-1508194	3	45784453	AA	AA	NoCall	AA	AA
SNP_A-1510104	3	45785098	NoCall	AA	AA	NoCall	AA
SNP_A-1508136	3	46118934	BB	BB	NoCall	BB	BB
SNP_A-1508248	3	46119188	BB	BB	NoCall	BB	BB
SNP_A-1513833	3	46513022	BB	BB	NoCall	BB	NoCall
SNP_A-1517629	3	46549422	BB	BB	NoCall	BB	BB
TMIE	3	46717827-	46727205				
SNP_A-1517291	3	46904357	BB	BB	NoCall	BB	BB
SNP_A-1512987	3	47293751	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1516378	3	48732295	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1517759	3	51324927	AA	AA	NoCall	AA	AA
SNP_A-1516539	3	51814659	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1518605	3	51884070	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1516352	3	52857484	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1519191	3	52894136	AA	AA	NoCall	AA	AA
SNP_A-1512446	3	53432979	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1517881	3	53730993	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1517297	3	53904036	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1510592	3	54154626	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1508667	3	54903802	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514818	3	55238146	AA	AA	NoCall	AA	NoCall
SNP_A-1513593	3	55438520	AA	AA	AA	AA	AA

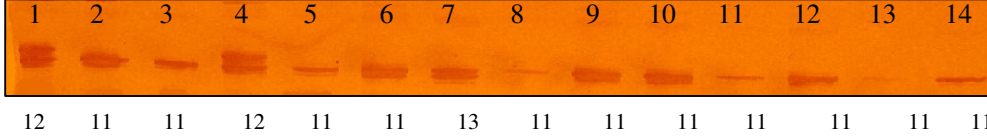
Bu aile bireylerindeki ortak homozigot blok 36835547-56175927 kromozomal bölge aralığında bulunmaktadır.

TMIE genini çevreleyen D3S1767, D3S1582, D3S1289 mikrosatellit belirteçleri kullanıldığında bütün etkilenmiş bireylerin aynı allel için homozigot, sağlıklı bireylerin ise heterozigot veya diğer allele homozigot oldukları gösterilmiştir (Şekil 3.1.a,b).

a

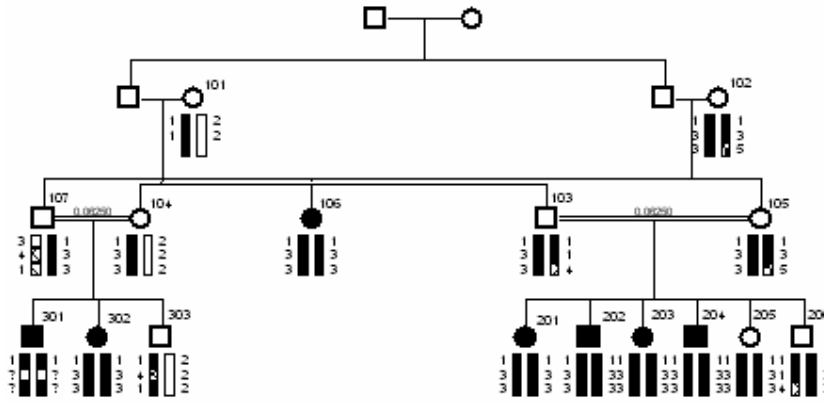


b



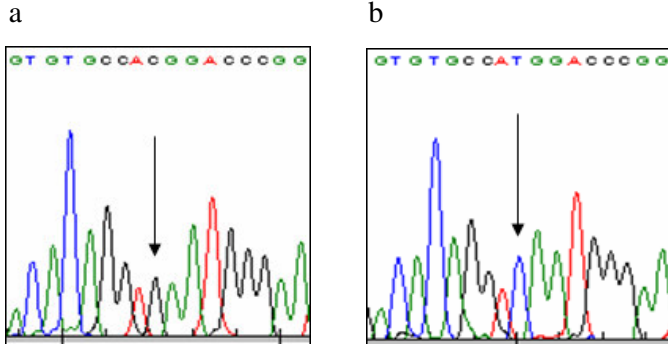
Şekil 3.1.a. *TMIE* geni için kullanılan D3S1289 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 4, 9, 10, 11, 12 normal bireyler; 2, 3, 5, 6, 7, 8 etkilenmiş bireyler. b. *TMIE* geni için kullanılan D3S1767 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 14 normal bireyler.; 2, 3, 5, 8, 11,12 etkilenmiş bireyler.

Bu mikrosatellit verileri doğrultusunda ailenin haplotip analizi Cyrillic2 programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 559 nolu ailenin mikrosatellit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi. Akraba evliliği çizgileri üzerindeki numaralar akrabalık katsayısıdır (f).

Ardından genin 4 ekzonu olması nedeniyle direkt olarak DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmış ve bu ailedeki etkilenmiş bireylerde genin 3. ekzonda 250. pozisyondaki sitozin bazının timin bazına değiştiği görülmüştür. Bu değişiklik 84. arjinin amino asidini kodlayan CGG kodonunu, triptofan amino asidini kodlayan TGG kodonuna dönüştürür ve p.R84W mutasyonu olarak adlandırılır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *TMIE* geninin 250. pozisyonundaki C-T değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan DNA dizi analizi görüntüsü. **a.** Normal dizi. **b.** homozigot mutant dizi

3.2. 551, 647, 734 Numaralı Aileler

Bu çalışma kapsamında üç ailede *TMCI* genine bağlantı bulunmuştur. Öncelikle bu ailelerden ikişer etkilenmiş bireye mikrodizin analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda bu gen etrafında bütün bireylerde homozigot blok tespit edilmiştir (Çizelge 3.4). Devam eden homozigot blok içerisinde heterozigot SNP'ler bulunmaktadır. Ancak genin çok yakınından bir rekombinasyon geçtiği düşünülerek bu ailelerde çalışmaya dahil edilmiştir.

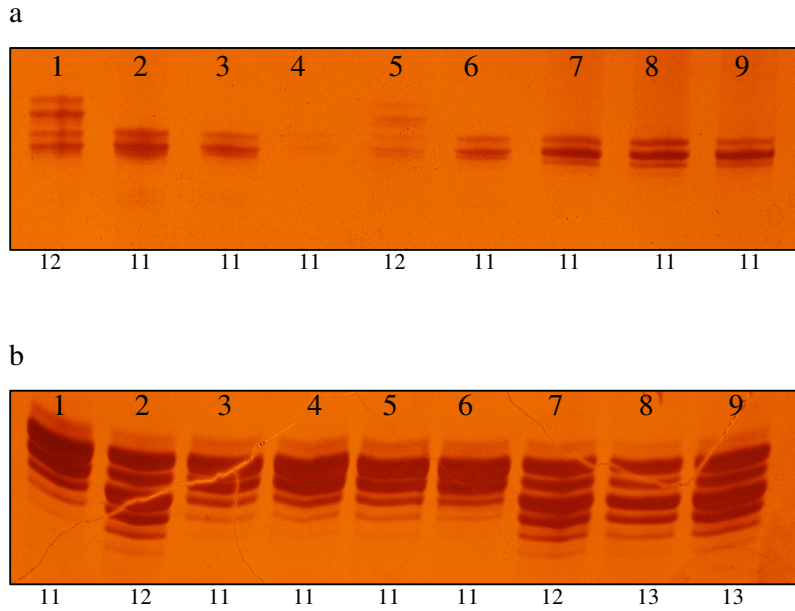
Çizelge 3.3. 551, 647 ve 734 nolu ailelerin *TMCI* genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.

SNP numarası	Kr	fiziksel pozisyon	551-108	551-109	647-106	647-104	734-102	734-302
SNP_A-1517810	9	70235778	AA	AA	AA	AA	BB	BB
SNP_A-1517625	9	70471521	BB	BB	BB	BB	AA	AA
SNP_A-1514747	9	70699419	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1511166	9	70894647	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518056	9	71036603	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1515847	9	71805689	AA	AA	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509025	9	72019634	BB	BB	AA	AA	BB	BB
SNP_A-1512095	9	72363501	NoCall	NoCall	BB	BB	AA	AA
SNP_A-1507701	9	72579861	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1511414	9	72631718	AA	AA	AA	AA	BB	BB
SNP_A-1507564	9	72631779	AA	AA	BB	BB	AA	AA
SNP_A-1518158	9	72768286	AA	AA	AA	AA	BB	BB
SNP_A-1518202	9	72768346	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518124	9	72862979	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509573	9	72869057	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1510709	9	73206593	BB	BB	BB	BB	AA	AA
SNP_A-1511967	9	73764352	AB	AA	AA	AA	AA	AA
TMCI	9	74326537-	74641087					
SNP_A-1508106	9	74714604	NoCall	NoCall	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1510353	9	74720374	BB	BB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1518943	9	74852824	NoCall	NoCall	NoCall	BB	BB	BB
SNP_A-1516047	9	74895327	AA	AA	AB	BB	AA	AA
SNP_A-1510800	9	75226175	NoCall	NoCall	BB	BB	AA	AA
SNP_A-1517517	9	75446556	NoCall	NoCall	AB	AA	AA	AA
SNP_A-1510088	9	76062448	BB	BB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1516988	9	76408875	BB	BB	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1513391	9	76409215	AA	AA	AB	AA	AA	AA
SNP_A-1515131	9	77295320	BB	BB	AA	AA	AB	AB
SNP_A-1519095	9	77343415	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1510432	9	77347450	AA	AA	AB	BB	BB	BB
SNP_A-1518955	9	77492323	BB	BB	NoCall	AA	AB	AB
SNP_A-1517666	9	77911088	BB	BB	AB	BB	AB	AB
SNP_A-1512431	9	78021235	BB	BB	BB	BB	AB	AB
SNP_A-1509449	9	78094092	BB	BB	AA	AA	AB	AB
SNP_A-1516040	9	78391977	BB	BB	AA	AA	AB	AB
SNP_A-1516825	9	78420062	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1514846	9	79894551	BB	BB	BB	BB	AB	AB
SNP_A-1512080	9	80155413	AA	AA	AA	AA	AB	AB

551 nolu ailenin 108 nolu bireyindeki homozigot blok 74714604-80155413 bölge aralığında; 109 nolu bireydeki blok 30075410-76409215 bölge aralığında bulunmaktadır.

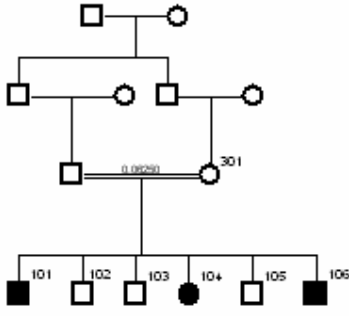
647 nolu ailedeki 106 nolu bireyde homozigot blok 20881855-73764352 bölge aralığında, 104 nolu bireyde 20881855-81613614 bölge aralığında bulunmaktadır. 734 nolu ailede ise 102 ve 302 nolu bireylerde homozigot blok 30075410-76409215 bölge aralığında bulunmaktadır.

TMCI genini çevreleyen D9S1837, D9S1806, D9S1876 mikrosatellit belirteçleri kullanıldığında bu üç ailedeki bütün etkilenmiş bireylerin aynı allel için homozigot, sağlıklı bireylerin ise heterozigot veya diğer allele homozigot oldukları gösterilmiştir (Şekil 3.4.a,b).



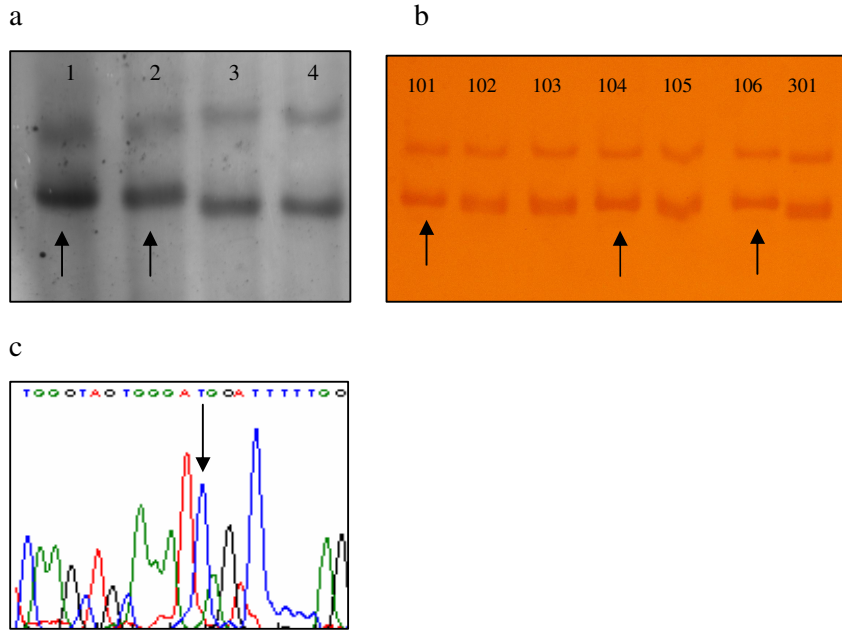
Şekil 3.4.a. *TMCI* geni için kullanılan D9S1806 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 1, 5, 7, 8, 9 normal bireyler; 2, 3, 4, 6 etkilenmiş bireyler. **b.** *TMCI* geni için kullanılan D9S1837 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 2, 7, 8, 9 normal bireyler; 1, 3, 4, 5, 6 etkilenmiş bireyler.

Bu genin kodlayan 20 ekzonu olması nedeniyle öncelikle SSCP ile mutasyon taraması yapılmıştır.



Şekil 3.5. 647 nolu ailenin aile ağacı.

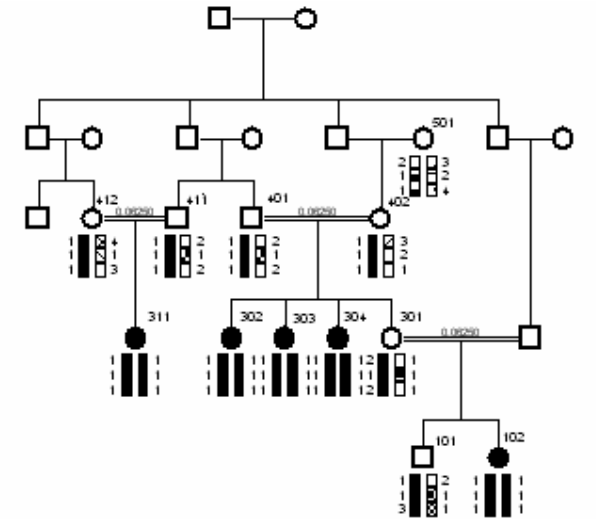
Aile ağacı Şekil 3.5’de verilmiş 647 nolu ailede genin 16. ekzonunda etkilenmiş bireylerde SSCP yöntemiyle bant farklılığı saptanmıştır. Ardından etkilenmiş bireylere genin bu ekzonuna DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır ve 1333. pozisyondaki sitozin bazının timin bazına değiştiği gösterilmiştir. Bu değişiklik 445. arjinin amino asidini kodlayan CGC kodonunu, sistein amino asidini kodlayan TGC kodonuna dönüştürür ve p.R445C mutasyonu olarak adlandırılır (Şekil 3.6.a,b,c).



Şekil 3.6.a. Genin 16. ekzonunda 647-101 ve 104 nolu etkilenmiş bireylerin SSCP jel görüntüsü. 1,2 etkilenmiş bireyler; 3,4 normal bireyler. **b.** *TMCI* geninin 16. ekzonunun aile bireylerindeki SSCP görüntüsü. 101, 104, 106 etkilenmiş bireyler; 102, 103, 105, 301

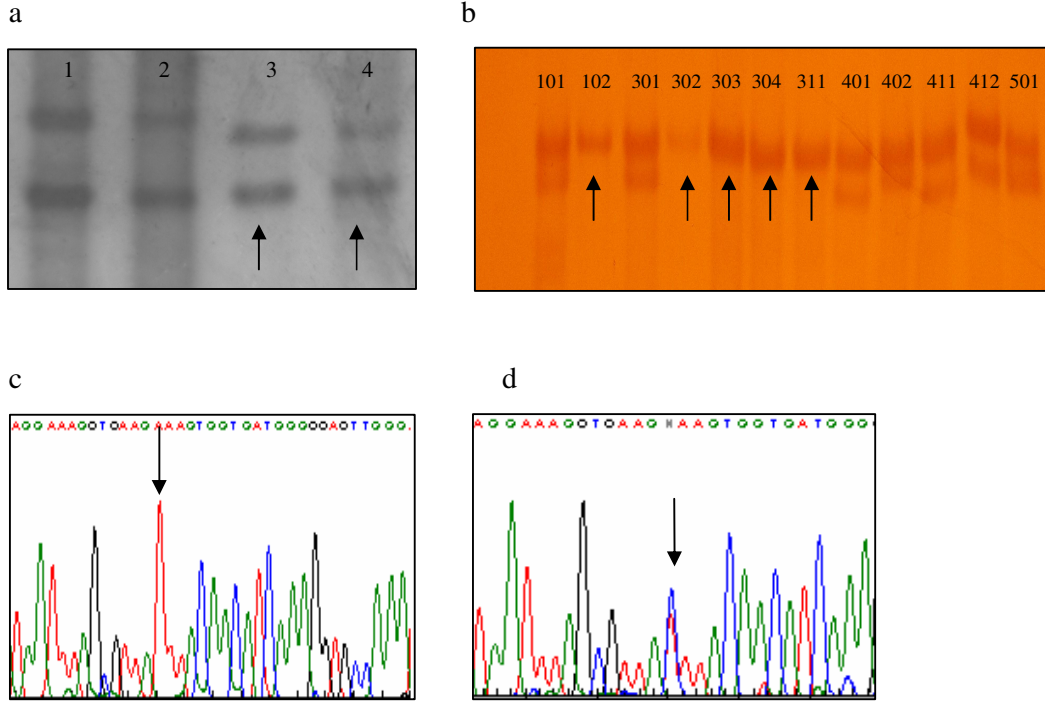
normal bireyler. c. *TMC1* geninin 1333. pozisyonundaki C-T değişiminin düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot DNA dizi analizi görüntüsü.

Yapılan mikrosatellit analiz sonuçları doğrultusunda 734 nolu ailenin haplotip analizi Cyrillic2 programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.7).



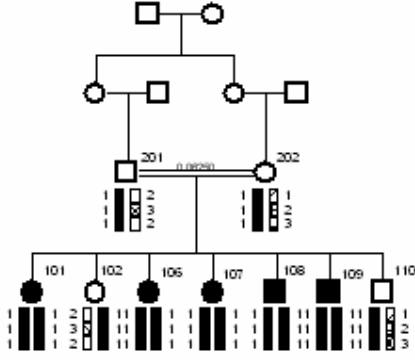
Şekil 3.7. 734 nolu ailenin mikrosatellit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi. Akraba evliği çizgileri üzerindeki numaralar akrabalık katsayısıdır (f).

734 nolu ailede genin 6. ekzonunda etkilenmiş bireylerde SSCP yöntemiyle bant farklılığı saptanmıştır. Bu değişim bütün aile bireylerinde segregasyon göstermektedir. Ardından etkilenmiş bireylere genin bu ekzonuna DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmış ve 6. intronun 2. bazı olan timinin adenin bazına dönüştüğü gösterilmiştir. Mutasyon IVS6+2 T>A olarak adlandırılır (Şekil 3.8.a,b,c,d).



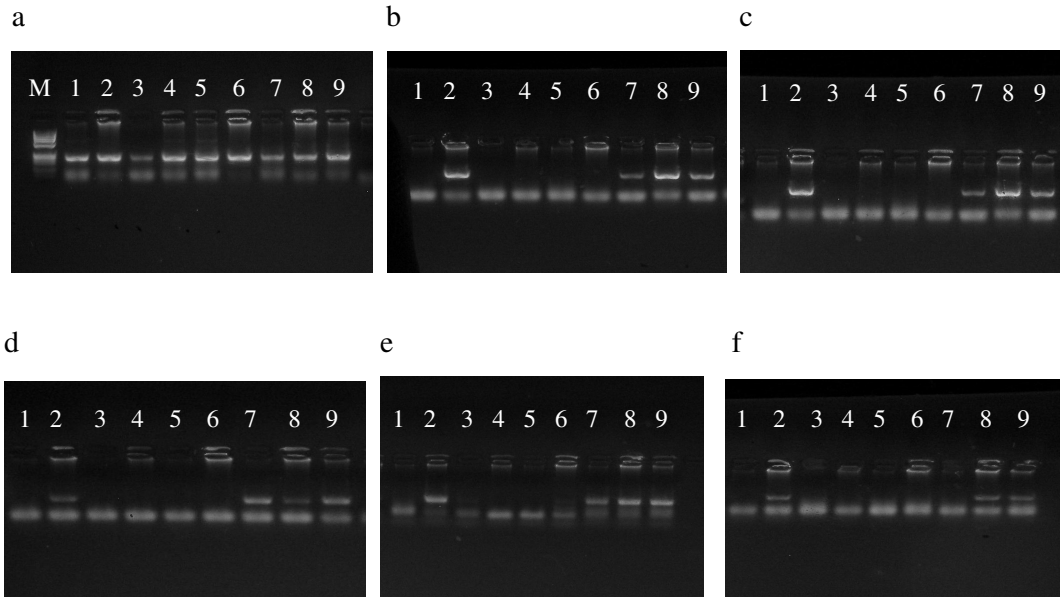
Şekil 3.8.a. Genin 6. ekzonunda 734-302 ve 304 etkilenmiş bireylerin SSCP jel görüntüsü. 1,2 normal bireyler; 3,4 etkilenmiş bireyler. **b.** *TMC1* geninin 6. ekzonunun aile bireylerindeki SSCP görüntüsü. 102, 302, 303, 304, 311 etkilenmiş bireyler; 101, 301, 401, 402, 411, 412, 501 normal bireyler. **c.** *TMC1* geninin 6. intronunun 2. bazındaki T-A değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü. **d.** *TMC1* geninin 6. intronunun 2. bazındaki T-A değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan heterozigot DNA dizi analizi görüntüsü.

551 nolu ailenin haplotip analizi mikrosatellit verileri doğrultusunda Cyrillic2 programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.9).

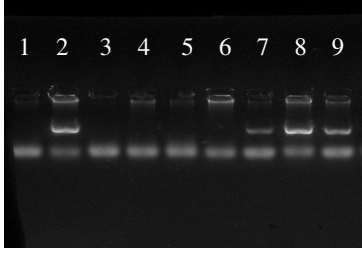


Şekil 3.9. 551 nolu ailenin mikrosatellit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi. Akraba evliği çizgileri üzerindeki numaralar akrabalık katsayısıdır (f).

Bu gende 551 nolu aileden iki etkilenmiş bireye SSCP analizi yapılmaya başlanmıştır ancak bu sırada 19. ve 24. ekzonu kapsayan 6 ekzonda etkilenmiş bireylerde herhangi bir bant gözlenememiştir. Ancak ailedeki normal bireylerde bu ekzonlarda bant bulunmaktadır. Bunun sonucunda ailede 19. ve 24. ekzonu kapsayan 6 ekzonda homozigot bir delesyon olduğu düşünülmüştür (Şekil 3.10.a, b, c, d, e, f, g).



g



Şekil 3.10. **a.** *TMC1* geninin 18. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **b.** *TMC1* geninin 19. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **c.** *TMC1* geninin 20. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **d.** *TMC1* geninin 21. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **e.** *TMC1* geninin 22. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **f.** *TMC1* geninin 23. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. **g.** *TMC1* geninin 24. ekzonunun agaroz jel görüntüsü. M Marker ; 1,3,4,5,6 ailedeki etkilenmiş bireyler; 2,7,8,9 ailedeki normal bireyler.

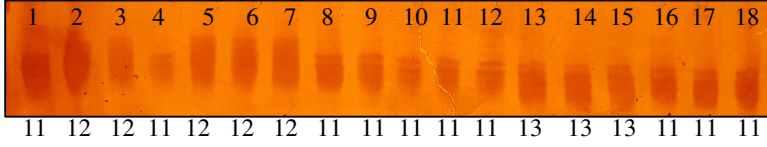
3.3. 561 Numaralı Aile

Bu çalışma kapsamında 561 nolu aileden altı etkilenmiş bireye mikrodizin analizi yapılmıştır. Mikrodizin analizi sonucunda *CDH23* geninin etrafında bütün bireylerde ortak bir homozigot blok tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. 561 nolu ailenin *CDH23* genine bağlantı bulunan bölgesinin mikrodizin analizi.

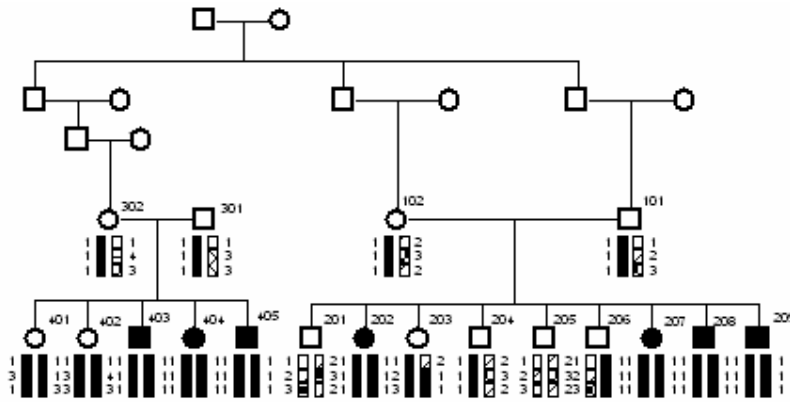
SNP ID	Kr No	Lokalizasyon	561-202	561-207	561-208	561-209	561-403	561-405
SNP_A-1514769	10	68552078	AA	AA	AA	AB	AA	AA
SNP_A-1513490	10	69078810	BB	BB	BB	NoCall	BB	BB
SNP_A-1509245	10	69080969	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1515697	10	69717445	AA	AA	NoCall	NoCall	AA	AA
SNP_A-1519347	10	71041135	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1518740	10	71041420	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1513431	10	71406490	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1512629	10	71407071	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1517430	10	72381709	AA	AA	NoCall	NoCall	AA	AA
CDH23	10	72826700-73245659						
SNP_A-1515662	10	72998061	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1509901	10	74314563	BB	BB	NoCall	NoCall	BB	BB
SNP_A-1508929	10	74592633	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SNP_A-1508973	10	74592754	BB	BB	BB	NoCall	BB	BB
SNP_A-1515370	10	75056963	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1516878	10	76287485	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP_A-1508785	10	76631338	AB	AB	NoCall	AA	AA	AA

CDH23 genini çevreleyen D101650, D10S1759, D10S1694 mikrosatellit belirteçleri kullanıldığında bu ailedeki bütün etkilenmiş bireylerin aynı allel için homozigot, sağlıklı bireylerin ise heterozigot veya diğer allele homozigot oldukları gösterilmiştir (Şekil 3.11).



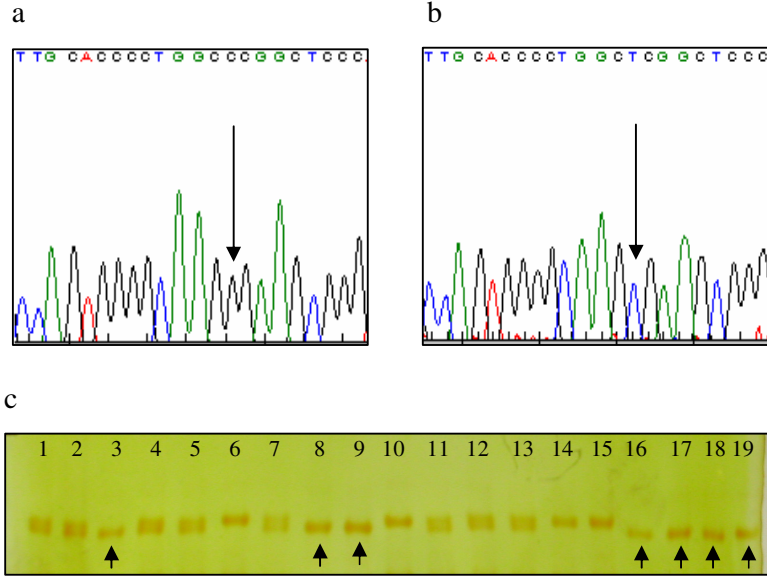
Şekil 3.11. *CDH23* geni için kullanılan D10S1650 mikrosatellit belirteci ile yapılmış jel görüntüsü. 4, 9, 10, 11,16,17 etkilenmiş bireyler; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15 normal bireyler.

Ailenin haplotip analizi Cyrillic2 programı kullanılarak mikrosatellit verileri doğrultusunda oluşturulmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. 561 nolu ailenin mikrosatellit verileri kullanılarak oluşturulan haplotip analizi. Akraba evliği çizgileri üzerindeki numaralar akrabalık katsayısıdır(f).

561 nolu ailede genin 29. ekzonunda etkilenmiş bireylerde SSCP yöntemiyle bant farklılığı saptanmıştır. Ardından etkilenmiş bireylere genin bu ekzonuna DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır ve c.3595-13C>T değişimi bulunmuştur (Şekil 3.13.a,b).



Şekil 3.13.**a.** Genin 28. intronundaki c.3595-13C>T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan normal DNA dizi analizi görüntüsü. **b.** Genin 28. intronundaki c.3595-13C>T değişiminin, düz primer kullanılarak oluşturulan homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü. **c.** Genin 29. ekzonun aile bireylerindeki SSCP jel görüntüsü. 1,2,4,5,7,11,12,13 heterozigot ; 3, 8, 9, 16, 17, 18, 19 homozigot etkilenmiş bireyler, 6,14,15 homozigot normal bireyler.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı olan ailelerde sorumlu genetik değişikliklerin gösterilmesidir. Bu amaçla başlangıçta SNP genotiplenmesi yapılan 36 aile içinden belirli bir otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı geni etrafında homozigot bölge bulunan ailelerden beş tanesi seçilerek bu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu ailelere mikrosatelit analizi yapılarak genin fenotip ile segregasyonu doğrulanmıştır. Bu analiz sonucunda 3 ailede *TMCI* , 1 ailede *CDH23* ve 1 ailede de *TMIE* geninde sorumlu değişikliklerin bulunabileceği gösterilmiştir.

TMCI genine bağlantı bulunan 3 ailede daha önce tanımlanmamış 3 farklı değişiklik bulunmuştur. Bu değişiklikler 647 nolu ailede yanlış anlamlı p.R445C değişikliği , 734 nolu ailede IVS6+2 T>A kırılma bölgesi değişikliği ve 551 nolu ailede 19 ve 24. ekzonuda içine alacak şekilde büyük bir delesyondur .

Bu gende bugüne kadar tanımlanan diğer mutasyonlar Çizelge 4.1, 4.2, 4.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. *TMCI* geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar.

Mutasyon türü	Amino asit değişimi	Kodon numarası	Referans
Anlamsız	Arg-Term	34	(Kurima 2002)
Yanlış anlamlı	Tyr-Cys	259	(Kalay 2005)
Yanlış anlamlı	Pro-Leu	274	(Kalay 2005)
Yanlış anlamlı	Tyr-Cys	277	(Santos 2006)
Çerçeve kayması	Arg-Pro	362	(Kalay 2005)
Yanlış anlamlı	Val-Met	372	(Santos 2006)
Anlamsız	Arg-Term	389	(Meyer 2005)
Yanlış anlamlı	Arg-His	445	(Santos 2006)
Anlamsız	Arg-Term	512	(Kurima 2002)
Yanlış anlamlı	Asp-His	572	(Kitajiri 2007)
Yanlış anlamlı	Asp-Asn	572	(Kurima 2002)
Yanlış anlamlı	Met-Val	654	(Kurima 2002)
Yanlış anlamlı	Ser-Arg	668	(Santos 2006)
Yanlış anlamlı	Glu-Lys	679	(Santos 2006)

Çizelge 4.2. *TMCI* geninde tanımlanmış kırılma bölgesi mutasyonları.

Mutasyon türü	IVS	Verici/alıcı	Pozisyon	Yer değişimi	Referans
Kırılma bölgesi	10	Alıcı bölge	-8	T-A	(Kurima 2002)
Kırılma bölgesi	13	Verici bölge	+1	G-A	(Kurima 2002)
Kırılma bölgesi	19	Verici bölge	+5	G-A	(Meyer 2005)

Çizelge 4.3. *TMCI* geninde tanımlanmış delesyon mutasyonları.

Mutasyon türü	Delesyon	Referans
Delesyon	27 kb'lık ekzon 4-5 (genomik DNA düzeyinde)	(Kurima 2002)
Delesyon	5 bçlik 15.ekzonda (c.1083_1087delCAGAT)	(Kalay 2005)

647 nolu ailede *TMCI* geninin 16.ekzonunda c.1333 C>T değişimi bulunmuştur ve ailede segregasyon göstermektedir. Bu değişim 445. pozisyondaki arjinin amino asidini sistein amino asidine çevirmektedir. Daha önce bir Pakistanlı ve bir Türk ailede 445. kodonun 2. pozisyonundaki guanin nükleotidini adenin nükleotidine çeviren bir mutasyon tanımlanmıştır (Kalay 2005; Santos 2006). Bu mutasyon arjinin amino asidini histidin amino asidine çevirmektedir. Ancak bu çalışmada bulduğumuz c.1333C>T (p.R445C) değişimi arjinin amino asidini sistein amino asidine dönüştürmektedir. Bu değişimin protein üzerindeki etkisini saptamak amacıyla polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) adı verilen internet tabanlı bir program kullanılmıştır. Bu programa proteinin amino asit dizisi girilmekte ve bulunan değişiklik belirtilmektedir. Program bu bölgenin evrim boyunca korunmuşluğu ve proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak bir hesaplama yapmaktadır. Yapılan hesaplamada bu noktada bulunan amino asit ile değişim sonucunda oluşan amino asidin profil skoru 2.792 olarak hesaplanmıştır. Program 2'nin üzerindeki değerlerde bu değişimin proteini büyük ihtimalle hasara uğrattığını belirtmektedir. Bölgenin evrim boyunca korunduğunu Çizelge 4.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. *TMC1* genindeki homosapiens'te 445. pozisyondaki arjinin amino asidinin diğer türlerdeki amino asit dizisi.

TMC1 proteini [Homo sapiens]	...CPTLFDLFAELEDYHPLIALKWLLG	R	IFALLLGNLYVFILALMDEINNKIE...
Bos taurus	...CPTLFDLFAELEDYHPLIALKWLLG	R	IFALLLGNLYVFILALMDEINNKIE...
Monodelphis domestica	...CPTLFDLFAELEDYHPLIALKWLLG	R	IFALLLGNLYVFILAILDEINNKLE...
Gallus gallus	...CPTLFDVISSLENYHPRIALRWQLG	R	IFALFLGNLYTFIHALMDEINLKLE...
Danio rerio	...CPMLFDVISTLENYHPRIALQWQLG	R	IFALFLGNLYTFIHALMDAIQLKRA...
Canis familiaris	...CPPLFETIATLENYHPRIGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLS...
Pan troglodytes	...CPPLFETIAALENYHPRTGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLA...
Bos taurus	...CPPLFETIAALENYHPRIGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDIQLKLS...
Monodelphis domestica	...CPPLFETIAALENYHPRIGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLS...
Mus musculus	...CPPLFETIAALENYHPRTGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLS...
Gallus gallus	...CPPLFETIATLENYHPRIGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVNEKLA...
Macaca mulatta	...CPPLFETIAALENYHPRTGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLA...
Takifugu rubripes	...CPPLFETIAELEDYHPRIALKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLFALFDEVNTKLE...
Tetraodon nigroviridis	...CPPLFETIAELEDYHPRIALKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLFALFDEVNTKLL...
TMC2 proteini [Homo sapiens]	...CPPLFETIAALENYHPRTGLKWQLG	R	IFALFLGNLYTFLALMDDVHLKLA...
TMC3 proteini [Homo sapiens]	...APSAFDLIAALEMYHPRTTLRFQLA	R	VLVLYLGNLYSLIALLDKVNSMSI...
Aedes aegypti	...FPMVFEALGLLEYHPRKQLRIQLA	R	IMVLNLLNLYSLIFALFDKISHMTE...

734 nolu ailede bulunan IVS6+2 T>A değişimi genin 6. ekzon/intron kırılma bölgesinde bulunmaktadır ve ailede segregasyon göstermektedir. Bu gende bugüne kadar 3 tane kırılma bölgesi mutasyonu tanımlanmıştır. Ancak tanımlanan mutasyonlar arasında bu çalışmada belirtilen değişim bulunmamaktadır. Bu değişim genomik DNA'da intronun 5' ucunda bulunan GT dinükleotidindeki timin bazını adenin bazına çevirmektedir. Bu nedenle kırılma işlemi bozduğu düşünülmüştür.

551 nolu ailede ekzon 19 ve 24'ü de kapsayan büyük bir delesyon saptanmıştır. Delesyon 18. introndan başlamaktadır ve yaklaşık olarak kromozomun SNP_A-1510353 noktasına kadar devam eden bir bölgeyi kapsamaktadır. Mikrodizin analizi sonucunda *TMC1* geninin hemen alt kısmında 74,714,604 bölgesinde bulunan SNP_A-1508106 hasta bireylerde okunamamıştır ancak bir sonraki 74,720,374 bölgesinde bulunan SNP_A-1510353 isimli SNP analiz edilebilmiştir. Bu veri, delesyonun SNP_A-1508106'nın olduğu bölgeyi kapsadığını ve SNP_A-1508106 ile SNP_A-1510353 arasındaki bir bölgede sonlandığını düşündürmektedir.

TMIE geninin 3. ekzonunda bulunan c. 250C>T (p.R84W) homozigot mutasyonu daha önce Naz vd (2002) yaptıkları çalışmada tanımlanmıştır. Bu mutasyon *TMIE*'nin sitoplazmik bölgesi varsayılan bölgedeki arjinin rezidüsünü triptofana çevirmektedir. Bu değişim ailede segregasyon göstermektedir. Ayrıca polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) programı sayesinde bu noktadaki 2 amino asit varyantının profil skoru 2.25 olarak hesaplanmıştır. Program 2'nin üzerindeki değerlerde bu değişimin proteini büyük ihtimalle hasara uğrattığını belirtmektedir. Bölgenin evrim boyunca korunduğunu Çizelge 4.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. *TMIE* genindeki homosapiens'te 84. pozisyondaki arjinin amino asidinin diğer türlerdeki amino asit dizisi.

Monodelphis domestica	...VVGIFS L FVLS I I I TLCC VFNCRVP	R	TRKEIEARYLQRRAAKMYTDKLETV...
Danio rerio	...VVGIFSMFI LA I I I TLCC I FKCR IP	R	TKKEIEARHAQRQAACKKYANTLETV...
Gallus gallus	...V IGIFA I FVLAVI I TLCC I FKCR IP	R	TKKEIEARYAQRQAACKTYADKLETV...
Tetraodon nigroviridis	...V IGIFAVFALAVV I TLCC I FKCR IP	R	TKKEIEARHAQRQAACKKYANTLETV...
Mus musculusV I TLCCV FTCPGP	R	TRKEIEARYLQRKAACKMYTDKLETV...

Bugüne kadar *TMIE* geninde tanımlanan diğer mutasyonlar Çizelge 4.6, 4.7, 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *TMIE* geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar.

Mutasyon türü	Kodon değişimi	Amino asit değişimi	Kodon numarası	Referans
Yanlış anlamlı	tCGT-TGT	Arg-Cys	81	(Naz 2002)
Yanlış anlamlı	aCGG-TGG	Arg-Trp	84	(Naz 2002)
Yanlış anlamlı	cCGG-TGG	Arg-Trp	92	(Naz 2002)

Çizelge 4.7. *TMIE* geninde tanımlanmış insersiyon mutasyonları.

Mutasyon türü	İnsersiyon	Kodon	Nükleotid	Referans
İnsersiyon	CCAAG^CCGCCcgccTCCGCTGACC	41	126	(Naz 2002)

Çizelge 4.8. *TMIE* geninde tanımlanan insersiyon-delesyon mutasyonu.

Mutasyon türü	Delesyon	İnsersiyon	Kodon	Referans
İnsersiyon/delesyon	CCTGACCCACag_IIE2_cccagC^ACGGCCCCA	c	34	(Naz 2002)

561 nolu ailede *CDH23* geninde 28. intronunda c.3595-13C>T intronik değişimi bulunmuştur. Bu gende bugüne kadar tanımlanan mutasyonlar arasında c.3595-13C>T değişikliği bulunmamaktadır. Bu değişimin ekzon/intron kırılma bölgesini etkileyebileceği düşünölmektedir. İtronik ve ekzonik cis-elementler doğru kırılma işlemleri için önemlidir. Bu elementler hem susturucu hem de uyarıcı rol oynamaktadırlar ve alternatif kırılmayı düzenledikleri düşünölmektedir. Ekzonik kırılma artırıcıları (enhancer) (ESEs), yaygın olarak görünürler ve genellikle çoğu ekzonda bulunmaktadırlar. Bu amaçla ESEfinder3 programı kullanılarak bir analiz yapılmıştır (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>). Bu program belirtilen sekans dizisindeki 4 farklı insan SR (serin-arginine zengin) protein motifine (SF2/ASF, SC35, SRp40, SRp55) dayanarak ve ağırlık matrisi kullanarak değerlendirme yapmaktadır (Cartegni 2003). Programa normal dizi girildiğinde bu diziye SF2/ASF ve SF2/ASF (IgM-BRCA1) artırıcılarının diziye bağlandığı görölmüştür. Ancak bulunan c.3595-13C>T değişikliği belirtildiğinde bu iki artırıcının diziye bağlanma bölgeleri ortadan kaybolduğu görölmüştür. Bu nedenle bu değişikliğin ekzon/intron kırılma işlemlerini bozduğu düşünölmüştür.

Ayrıca bu değişim 200 sağlıklı bireyde SSCP yöntemiyle taranmış ve hiçbir bireyde bu değişime rastlanmamıştır. Bu da değişimin bir mutasyon olduğunu düşöndürmektedir. Ancak bu gende bugüne kadar tanımlanan mutasyonlardan sadece yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonların sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı yaptığı gösterilmiştir. Bu gende tanımlanan kırılma bölgesi mutasyonlarının hepsi Usher sendromuyla eşlik etmektedir. Bu nedenle bu değişimin mutasyon olup olmadığı belirlenememiştir.

Bu gende tanımlanan diğer mutasyonlar Çizelge 4.9, 4.10, 4.11, 4.12'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.10. *CDH23* geninde tanımlanmış yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

Mutasyon türü	Kodon değişimi	Amino asit değişimi	Kodon numarası	Fenotip	Referans
Yanlış anlamlı	CAA-TAA	Gln-Term	58	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GAT-GGT	Asp-Gly	124	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GCC-ACC	Ala-Thr	366	Usher sendromu 1d	(Ouyang 2005)
Yanlış anlamlı	AAT-AGT	Asn-Ser	452	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	CTG-CAG	Leu-Gln	480	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	CGG-CAG	Arg-Gln	582	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GAC-AAC	Asp-Asn	990	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Bork 2001)
Yanlış anlamlı	CGG-TGG	Arg-Trp	1060	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GGC-GAC	Gly-Asp	1186	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	CCC-CGC	Pro-Arg	1206	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	ACA-GCA	Thr-Ala	1209	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Anlamsız	CAG-TAG	Gln-Term	1294	Usher sendromu 1d	(Bork 2001)
Yanlış anlamlı	GAC-AAC	Asp-Asn	1341	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(de Brouwer 2003)
Anlamsız	CGA-TGA	Arg-Term	1502	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	CGG-CAG	Arg-Gln	1507	Usher sendromu 1d	(Ouyang 2005)
Yanlış anlamlı	GCC-CCC	Ala-Pro	1586	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GAG-AAG	Glu-Lys	1595	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	CGG-CAG	Arg-Gln	1746	Usher sendromu 1d	(Bolz 2001)
Yanlış anlamlı	GAC-AAC	Asp-Asn	1846	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Astuto 2002)
Yanlış anlamlı	GAC-AAC	Asp-Asn	2045	Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı	(Bork 2001)

Çizelge 4.11. *CDH23* geninde tanımlanmış kırılma bölgesi mutasyonları (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

Mutasyon türü	IVS	Verici/Alıcı	Pozisyon	Yer değişimi	Fenotip	Referans
Kırılma bölgesi	4	Verici bölge	+1	G-A	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Kırılma bölgesi	13	Alıcı bölge	+1	G-C	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Kırılma bölgesi	20	Verici bölge	+1	G-A	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Kırılma bölgesi	23	Verici bölge	+1	G-A	Usher sendromu 1d	(Bork 2001)
Kırılma bölgesi	25	Verici bölge	-1	A-C	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Kırılma bölgesi	35	Verici bölge	-1	G-C	Usher sendromu 1d	(Bolz 2001)
Kırılma bölgesi	42	Verici bölge	-1	G-A	Usher sendromu 1d	(von Brederlow 2002)
Kırılma bölgesi	44	Verici bölge	+1	G-A	Usher sendromu 1d	(Bork 2001)
Kırılma bölgesi	45	Alıcı bölge	-9	G-A	Usher sendromu 1d	(von Brederlow 2002)
Kırılma bölgesi	51	Verici bölge	+5	G-A	Usher sendromu 1d	(Bolz 2001)

Çizelge 4.12. *CDH23* geninde tanımlanmış delesyon mutasyonları (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

Mutasyon tür	Delesyon	Kodon (Δ)	Fenotip	Referans
Delesyon	GACAAT^GACCcCCTGGTGT	63	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Delesyon	GCTGGCA^CAGgTCGGCTTGC	362	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Delesyon	CCACTC^TTCAiCCAGGTGGTG	370	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Delesyon	CAGCTAC^ATGatgAATGTGTCCG	1280	Usher sendromu 1d	(Bolz 2001)
Delesyon	CTCAAC^AGCAcGGCCACCTG	2051	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
Delesyon	GCCTCCACCAcag_I46E47_CC^AAGCTGAC	2278	Usher sendromu 1d	(Ouyang 2005)
Delesyon	GGGCC^ACCCciGGGACCACAC	2310	Usher sendromu 1d	(von Brederlow 2002)
Delesyon	AGCCGTG^GACcCTGACAAGGG	2322	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)

Çizelge 4.13. *CDH23* geninde tanımlanmış insersiyon mutasyonları (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/).

Mutasyon türü	İnsersiyon	Kodon (Δ)	Nükleotid	Fenotip	Referans
İnsersiyon	CAGCTAC^ATGatgaATGAATGTGT	1280	3840	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)
İnsersiyon	GTAAT^GCCACaCATCGACAGA	2130	6392	Usher sendromu 1d	(Ouyang 2005)
İnsersiyon	CGTGAG^GGGCcCAATCAAGGG	3208	9626	Usher sendromu 1d	(Astuto 2002)

Bugüne kadar toplam 27 gendeki değişikliklerin sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle işitme kaybı olan bir ailede sorumlu genetik değişikliğin saptanması oldukça zordur. Bu araştırmada uygun ailelerde az sayıda etkilenmiş birey kullanılarak yapılan genom boyunca SNP genotipleme ile sorumlu genetik değişikliklerin hangi gende olduğuna yönelinebileceği ve daha sonra yapılacak mutasyon tarama yöntemleriyle gerçek değişikliklere ulaşılabilceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abe, S., Katagiri, T., Saito-Hisaminato, A., Usami, S., Inoue, Y., Tsunoda, T., Nakamura, Y. 2003. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet*, 72 (1); 73-82.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S. L., Guo, Y., Sabar, M. F., Sieving, P., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Belyantseva, I. A., Wilcox, E. R. 2003. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet*, 12 (24); 3215-23.
- Ahmed, Z. M., Smith, T. N., Riazuddin, S., Makishima, T., Ghosh, M., Bokhari, S., Menon, P. S., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Wilcox, E. R. 2002. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet*, 110 (6); 527-31.
- Akar, N. (1999). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, AÜTF Antıp AŞ Yayınları.
- Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Kremer, H., van Hauwe, P., Moller, C. G., Cremers, C. W., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., Ramesar, R., Reardon, W., Bitoun, P., Millan, J., Legge, R., Friedman, T. B., Kimberling, W. J. 2002. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet*, 71 (2); 262-75.
- Bespalova, I. N., Van Camp, G., Bom, S. J., Brown, D. J., Cryns, K., DeWan, A. T., Erson, A. E., Flothmann, K., Kunst, H. P., Kurnool, P., Sivakumaran, T. A., Cremers, C. W., Leal, S. M., Burmeister, M., Lesperance, M. M. 2001. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet*, 10 (22); 2501-8.
- Bitner-Glindzicz, M. 2002. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 63 73-94.
- Bolz, H., von Brederlow, B., Ramirez, A., Bryda, E. C., Kutsche, K., Nothwang, H. G., Seeliger, M., del, C. S. C. M., Vila, M. C., Molina, O. P., Gal, A., Kubisch, C. 2001. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*, 27 (1); 108-12.
- Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Morell, R. J. 2001. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, 68 (1); 26-37.
- Brunner, H. G., van Beersum, S. E., Warman, M. L., Olsen, B. R., Ropers, H. H., Mariman, E. C. 1994. A Stickler syndrome gene is linked to chromosome 6 near the COL11A2 gene. *Hum Mol Genet*, 3 (9); 1561-4.
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q., Krainer, A. R. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 31 (13); 3568-71.

- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N. C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., Smith, R. J. 2005. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive nonsyndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J Med Genet*, 42 (10); e61.
- de Brouwer, A. P., Pennings, R. J., Roeters, M., Van Hauwe, P., Astuto, L. M., Hoefsloot, L. H., Huygen, P. L., van den Helm, B., Deutman, A. F., Bork, J. M., Kimberling, W. J., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Kremer, H. 2003. Mutations in the calcium-binding motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family. *Hum Genet*, 112 (2); 156-63.
- de Kok, Y. J., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcolm, S., Pembrey, M. E., Ropers, H. H., Cremers, F. P. 1995. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, 267 (5198); 685-8.
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Alvarez, A., Telleria, D., Menendez, I., Moreno, F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346 (4); 243-9.
- Delmaghani, S., del Castillo, F. J., Michel, V., Leibovici, M., Aghaie, A., Ron, U., Van Laer, L., Ben-Tal, N., Van Camp, G., Weil, D., Langa, F., Lathrop, M., Avan, P., Petit, C. 2006. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet*, 38 (7); 770-8.
- Di Palma, F., Pellegrino, R., Noben-Trauth, K. 2001. Genomic structure, alternative splice forms and normal and mutant alleles of cadherin 23 (Cdh23). *Gene*, 281 (1-2); 31-41.
- Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R. E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K. B., Gasparini, P. 2003. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, 72 (6); 1571-7.
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C. M., Nurnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., Van Camp, G., Gasparini, P., Savoia, A. 2004. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74 (4); 770-6.
- Donaudy, F., Zheng, L., Ficarella, R., Ballana, E., Carella, M., Melchionda, S., Estivill, X., Bartles, J. R., Gasparini, P. 2006. Espin gene (ESPN) mutations associated with autosomal dominant hearing loss cause defects in microvillar elongation or organisation. *J Med Genet*, 43 (2); 157-61.
- Everest, P., Allen, J., Papakonstantinou, A., Mastroeni, P., Roberts, M., Dougan, G. 1997. Salmonella typhimurium infections in mice deficient in interleukin-4 production: role of IL-4 in infection-associated pathology. *J Immunol*, 159 (4); 1820-7.
- Finsterer, J., Fellingner, J. 2005. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69 (5); 621-47.
- Friedman, T. B., Liang, Y., Weber, J. L., Hinnant, J. T., Barber, T. D., Winata, S., Arhya, I. N., Asher, J. H., Jr. 1995. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat Genet*, 9 (1); 86-91.
- Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P. 1999. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*, 23 (1); 16-8.

- Hirosawa, M., Nagase, T., Murahashi, Y., Kikuno, R., Ohara, O. 2001. Identification of novel transcribed sequences on human chromosome 22 by expressed sequence tag mapping. *DNA Res*, 8 (1); 1-9.
<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/ggi/ggi.cgi>.
<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>.
<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>.
- Kalay, E., Karaguzel, A., Caylan, R., Heister, A., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Brunner, H. G., de Brouwer, A. P., Kremer, H. 2005. Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*, 26 (6); 591.
- Kelley, M. W. 2006. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the ear. *Nature Reviews Neuroscience*, 7 837-849.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., Leigh, I. M. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387 (6628); 80-3.
- Khan, S. Y., Ahmed, Z. M., Shabbir, M. I., Kitajiri, S., Kalsoom, S., Tasneem, S., Shayiq, S., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Khan, S. N., Smith, R. J., Riazuddin, S., Friedman, T. B. 2007. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat*, 28 (5); 417-23.
- Kikkawa, Y., Mburu, P., Morse, S., Kominami, R., Townsend, S., Brown, S. D. 2005. Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. *Hum Mol Genet*, 14 (3); 391-400.
- Kitajiri, S., Makishima, T., Friedman, T. B., Griffith, A. J. 2007. A novel mutation at the DFNA36 hearing loss locus reveals a critical function and potential genotype-phenotype correlation for amino acid-572 of TMC1. *Clin Genet*, 71 (2); 148-52.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T. J. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96 (3); 437-46.
- Kurima, K., Peters, L. M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P. S., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Deiningner, P. L., Hampton, L. L., Sullivan, S. L., Battey, J. F., Jr., Keats, B. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Griffith, A. J. 2002. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet*, 30 (3); 277-84.
- Lalwani, A. K., Goldstein, J. A., Kelley, M. J., Luxford, W., Castelein, C. M., Mhatre, A. N. 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet*, 67 (5); 1121-8.
- Li, W., Gao, F., Liang, J., Li, C., Zhang, H., Tang, Z., Chen, L., Jin, Q., Tang, W. 2003. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single-strand conformation polymorphism by DNA base composition. *Electrophoresis*, 24 (14); 2283-9.
- Li, X. C., Everett, L. A., Lalwani, A. K., Deshmukh, D., Friedman, T. B., Green, E. D., Wilcox, E. R. 1998. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 18 (3); 215-7.
- Liu, X. Z., Ouyang, X. M., Xia, X. J., Zheng, J., Pandya, A., Li, F., Du, L. L., Welch, K. O., Petit, C., Smith, R. J., Webb, B. T., Yan, D., Arnos, K. S., Corey, D., Dallos, P., Nance, W. E., Chen, Z. Y. 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet*, 12 (10); 1155-62.

- Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P., Brown, S. D. 1997. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*, 17 (3); 268-9.
- Longo-Guess, C. M., Gagnon, L. H., Cook, S. A., Wu, J., Zheng, Q. Y., Johnson, K. R. 2005. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (22); 7894-9.
- Lui, V. C., Ng, L. J., Sat, E. W., Cheah, K. S. 1996. The human alpha 2(XI) collagen gene (*COL11A2*): completion of coding information, identification of the promoter sequence, and precise localization within the major histocompatibility complex reveal overlap with the *KE5* gene. *Genomics*, 32 (3); 401-12.
- Lüleci M, S. M., Alper Ö. (2000). *Renkli Genetik Atlası*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.
- Lynch, E. D., Lee, M. K., Morrow, J. E., Welch, P. L., Leon, P. E., King, M. C. 1997. Nonsyndromic deafness *DFNA1* associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science*, 278 (5341); 1315-8.
- Makishima, T., Kurima, K., Brewer, C. C., Griffith, A. J. 2004. Early onset and rapid progression of dominant nonsyndromic *DFNA36* hearing loss. *Otol Neurotol*, 25 (5); 714-9.
- Mburu, P., Kikkawa, Y., Townsend, S., Romero, R., Yonekawa, H., Brown, S. D. 2006. Whirlin complexes with p55 at the stereocilia tip during hair cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (29); 10973-8.
- Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R. H., Rump, A., Hardisty, R. E., Blanchard, S., Coimbra, R. S., Perfettini, I., Parkinson, N., Mallon, A. M., Glenister, P., Rogers, M. J., Paige, A. J., Moir, L., Clay, J., Rosenthal, A., Liu, X. Z., Blanco, G., Steel, K. P., Petit, C., Brown, S. D. 2003. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with *DFNB31*. *Nat Genet*, 34 (4); 421-8.
- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M. C., Brunner, H. G., Cremers, C. W., Takanosu, M., Li, S. W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., Van Camp, G., Smith, R. J. 1999. Mutations in *COL11A2* cause non-syndromic hearing loss (*DFNA13*). *Nat Genet*, 23 (4); 413-9.
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M. L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K., Gasparini, P. 2001. *MYO6*, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 69 (3); 635-40.
- Meyer, C. G., Gasmelseed, N. M., Mergani, A., Magzoub, M. M., Muntau, B., Thye, T., Horstmann, R. D. 2005. Novel *TMC1* structural and splice variants associated with congenital nonsyndromic deafness in a Sudanese pedigree. *Hum Mutat*, 25 (1); 100.
- Mitchem, K. L., Hibbard, E., Beyer, L. A., Bosom, K., Dootz, G. A., Dolan, D. F., Johnson, K. R., Raphael, Y., Kohrman, D. C. 2002. Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss *DFNB6*. *Hum Mol Genet*, 11 (16); 1887-98.
- Mohiddin, S. A., Ahmed, Z. M., Griffith, A. J., Tripodi, D., Friedman, T. B., Fananapazir, L., Morell, R. J. 2004. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (*MYO6*). *J Med Genet*, 41 (4); 309-14.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J. S., Loiselet, J., Petit, C. 1999. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal

- recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet*, 8 (3); 409-12.
- Nance, W. E. 2003. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9 (2); 109-19.
- Naz, S., Giguere, C. M., Kohrman, D. C., Mitchem, K. L., Riazuddin, S., Morell, R. J., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Smith, R. J., Wilcox, E. R. 2002. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet*, 71 (3); 632-6.
- Naz, S., Griffith, A. J., Riazuddin, S., Hampton, L. L., Battey, J. F., Jr., Khan, S. N., Wilcox, E. R., Friedman, T. B. 2004. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet*, 41 (8); 591-5.
- Noyan, A. (1999). Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. Ankara, Meteksan.
- Ouyang, X. M., Yan, D., Du, L. L., Hejtmancik, J. F., Jacobson, S. G., Nance, W. E., Li, A. R., Angeli, S., Kaiser, M., Newton, V., Brown, S. D., Balkany, T., Liu, X. Z. 2005. Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Hum Genet*, 116 (4); 292-9.
- Öner, C. (2002). Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık.
- Peters, L. M., Anderson, D. W., Griffith, A. J., Grundfast, K. M., San Agustin, T. B., Madeo, A. C., Friedman, T. B., Morell, R. J. 2002. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet*, 11 (23); 2877-85.
- Petit, C., Leveilliers, J., Hardelin, J. P. (2001). Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*. 35: 589-646.
- Riazuddin, S., Khan, S. N., Ahmed, Z. M., Ghosh, M., Caution, K., Nazli, S., Kabra, M., Zafar, A. U., Chen, K., Naz, S., Antonellis, A., Pavan, W. J., Green, E. D., Wilcox, E. R., Friedman, P. L., Morell, R. J., Friedman, T. B. 2006. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet*, 78 (1); 137-43.
- Robert L. Nussbaum, R. R. M., Huntington F. Willard (2005). Thompson and Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitapevi (türkçe çeviri).
- Robertson, N. G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S. N., Eavey, R. D., McKenna, M., Nadol, J. B., Jr., Miyamoto, R. T., Linthicum, F. H., Jr., Lubianca Neto, J. F., Hudspeth, A. J., Seidman, C. E., Morton, C. C., Seidman, J. G. 1998. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet*, 20 (3); 299-303.
- Santos, R. L., El-Shanti, H., Sikandar, S., Lee, K., Bhatti, A., Yan, K., Chahrour, M. H., McArthur, N., Pham, T. L., Mahasneh, A. A., Ahmad, W., Leal, S. M. 2006. Novel sequence variants in the TMIE gene in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *J Mol Med*, 84 (3); 226-31.
- Scott, D. A., Wang, R., Kreman, T. M., Sheffield, V. C., Karniski, L. P. 1999. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet*, 21 (4); 440-3.
- Scott, H. S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S. Q., Radhakrishna, U., Papasavvas, M. P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S. E. 2001. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet*, 27 (1); 59-63.

- Seipel, K., O'Brien, S. P., Iannotti, E., Medley, Q. G., Streuli, M. 2001. Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci*, 114 (Pt 2); 389-99.
- Shabbir, M. I., Ahmed, Z. M., Khan, S. Y., Riazuddin, S., Waryah, A. M., Khan, S. N., Camps, R. D., Ghosh, M., Kabra, M., Belyantseva, I. A., Friedman, T. B. 2006. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 43 (8); 634-40.
- Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Abu Sa'ed, J., Abu Rayan, A., Lynch, E. D., Lee, M. K., Avraham, K. B., King, M. C., Kanaan, M. 2006. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 78 (1); 144-52.
- Siemens, J., Kazmierczak, P., Reynolds, A., Sticker, M., Littlewood-Evans, A., Muller, U. 2002. The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (23); 14946-51.
- Sirko-Osadsa, D. A., Murray, M. A., Scott, J. A., Lavery, M. A., Warman, M. L., Robin, N. H. 1998. Stickler syndrome without eye involvement is caused by mutations in COL11A2, the gene encoding the alpha2(XI) chain of type XI collagen. *J Pediatr*, 132 (2); 368-71.
- Tekin, M., Arnos, K. S., Pandya, A. 2001. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358 (9287); 1082-90.
- Vahava, O., Morell, R., Lynch, E. D., Weiss, S., Kagan, M. E., Ahituv, N., Morrow, J. E., Lee, M. K., Skvorak, A. B., Morton, C. C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T. B., King, M. C., Avraham, K. B. 1998. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*, 279 (5358); 1950-4.
- Van Laer, L., Huizing, E. H., Verstreken, M., van Zuijlen, D., Wauters, J. G., Bossuyt, P. J., Van de Heyning, P., McGuirt, W. T., Smith, R. J., Willems, P. J., Legan, P. K., Richardson, G. P., Van Camp, G. 1998. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet*, 20 (2); 194-7.
- van Wijk, E., Krieger, E., Kemperman, M. H., De Leenheer, E. M., Huygen, P. L., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Kremer, H. 2003. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J Med Genet*, 40 (12); 879-84.
- Varga, R., Kelley, P. M., Keats, B. J., Starr, A., Leal, S. M., Cohn, E., Kimberling, W. J. 2003. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet*, 40 (1); 45-50.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., Van Camp, G. 1998. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 19 (1); 60-2.
- Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, T. P., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Laine, S., Popot, J. L., Moreno, F., Mueller, R. F., Petit, C. 2001. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet*, 29 (3); 345-9.
- Vikkula, M., Mariman, E. C., Lui, V. C., Zhidkova, N. I., Tiller, G. E., Goldring, M. B., van Beersum, S. E., de Waal Malefijt, M. C., van den Hoogen, F. H., Ropers, H. H. et al. 1995. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell*, 80 (3); 431-7.

- von Brederlow, B., Bolz, H., Janecke, A., La, O. C. A., Rudolph, G., Lorenz, B., Schwinger, E., Gal, A. 2002. Identification and in vitro expression of novel CDH23 mutations of patients with Usher syndrome type 1D. *Hum Mutat*, 19 (3); 268-73.
- Vreugde, S., Ferrai, C., Miluzio, A., Hauben, E., Marchisio, P. C., Crippa, M. P., Bussi, M., Biffo, S. 2006. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell*, 23 (5); 749-55.
- Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., Lee, M. K., Kanaan, M., King, M. C., Avraham, K. B. 2002. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (11); 7518-23.
- Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., Probst, F. J., Wilcox, E. R., Touchman, J. W., Morton, C. C., Morell, R. J., Noben-Trauth, K., Camper, S. A., Friedman, T. B. 1998. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 280 (5368); 1447-51.
- Wattenhofer, M., Reymond, A., Falciola, V., Charollais, A., Caille, D., Borel, C., Lyle, R., Estivill, X., Petersen, M. B., Meda, P., Antonarakis, S. E. 2005. Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro. *Hum Mutat*, 25 (6); 543-9.
- Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G., Smith, R. J. 2001. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, 10 (3); 195-200.
- [webhost.ua.ac.be/hhh/ Hereditary Hearing Loss Homepage](http://webhost.ua.ac.be/hhh/HereditaryHearingLossHomepage).
- Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., Petit, C. 1997. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 16 (2); 191-3.
- Weil, D., Levy, G., Sahly, I., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., El-Amraoui, A., Crozet, F., Philippe, H., Abitbol, M., Petit, C. 1996. Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (8); 3232-7.
- Wilcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J., Friedman, T. B. 2001. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 104 (1); 165-72.
- Willems, P. J. 2000. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*, 342 (15); 1101-9.
- www.ensembl.org.
- www.hgmd.cf.ac.uk/ac/ The Human Gene Mutation Database.
- Xia, J. H., Liu, C. Y., Tang, B. S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H. P., Zhang, B. R., Xie, W., Hu, D. X., Zheng, D., Shi, X. L., Wang, D. A., Xia, K., Yu, K. P., Liao, X. D., Feng, Y., Yang, Y. F., Xiao, J. Y., Xie, D. H., Huang, J. Z. 1998. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet*, 20 (4); 370-3.
- Xiao, S., Yu, C., Chou, X., Yuan, W., Wang, Y., Bu, L., Fu, G., Qian, M., Yang, J., Shi, Y., Hu, L., Han, B., Wang, Z., Huang, W., Liu, J., Chen, Z., Zhao, G., Kong, X. 2001. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet*, 27 (2); 201-4.
- Yap, A. S., Briehner, W., M. Gumbiner, B. M. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13 119-46.
- Yap, C. C., Liang, F., Yamazaki, Y., Muto, Y., Kishida, H., Hayashida, T., Hashikawa, T., Yano, R. 2003. CIP98, a novel PDZ domain protein, is expressed in the central

- nervous system and interacts with calmodulin-dependent serine kinase. *J Neurochem*, 85 (1); 123-34.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C. 1999. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet*, 21 (4); 363-9.
- Young, T. L., Ives, E., Lynch, E., Person, R., Snook, S., MacLaren, L., Cater, T., Griffin, A., Fernandez, B., Lee, M. K., King, M. C. 2001. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet*, 10 (22); 2509-14.
- Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A. T., Morell, R. J., Elfenbein, J. L., Fisher, R. A., Leal, S. M., Smith, R. J., Friderici, K. H. 2003. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet*, 73 (5); 1082-91.
- Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X. Z., Nouaille, S., Nance, W. E., Kanaan, M., Avraham, K. B., Tekaia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C. 2002. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (9); 6240-5.

ASLI SIRMACI

Ocak'2008

1. Kişisel Bilgiler;

Doğum Yeri/tarihi: Ankara/ 22.04.1983

Uyruğu: T.C

İletişim Adresi: Başkent Doktorlar Sitesi No:82 Çayyolu / ANK

Tel: 240 1059

e-mail: aslisirmaci@yahoo.com

2. Eğitim Bilgileri;

Lise: Özel Aykan Koleji (1997-2000)

Üniversite: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2000-2004)

Staj: A.Ü.T.F. Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik 2003 (2003)

3. Bilimsel İlgi Alanları

- **Bulunduğu Projeler;**

1. Otozomal Resesif Sensorinöral İşitme Kaybı Yapan Gen Değişimlerinin Ortaya Çıkarılması (Tübitak Projesi) 2006.

- **Posterler;**

1. 41. Türk Pediatri Kongresi. 22-25 Haziran 2005, Ankara. P22-027. GJB6(connexin 26) geninde işitme kaybı yapan büyük delesyonlar [Del(GJB6-D13S1830) ve Del(GJB6-D13S1854)] Türk işitme engelli çocuklarda bulunmamaktadır.
2. Trisomy 9 mosaicism in an infant with failure to thrive. Chromosome Research.
3. 57. The American Society of Human Genetics. 23-27 Ekim 2007, San Diego. Significant Locus Heterogeneity in Turkish Families with Autosomal Recessive Non-syndromic Sensorineural Hearing Loss.

- **Yayınları;**

1. Sirmaci A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. J Genet. 2006 Dec;85(3):213-6.
2. Tekin M, Hismi BO, Fitoz S, Ozdag H, Cengiz FB, Sirmaci A, Aslan I, Inceoglu B, Yuksel-Konuk EB, Yilmaz ST, Yasun O, Akar N. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. Am J Hum Genet. 2007 Feb;80(2):338-44.

3. Diğer Bilgiler;

- 2007 Ankara üniversitesi Biyoteknoloji enstitüsü 6. Ankara Biyoteknoloji Günleri
- 2006 Ankara üniversitesi Biyoteknoloji enstitüsü 5. Ankara Biyoteknoloji Günleri
- 2005 Ankara üniversitesi Biyoteknoloji enstitüsü 4. Ankara Biyoteknoloji Günleri