



**T.C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TÜRK TOPLUMUNDA AİLESEL NONSENDROMİK  
İŞİTME KAYBININ GENETİK TEMELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr.Aslı Subaşıoğlu Uzak**

**KAYSERİ 2012**



**T.C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TÜRK TOPLUMUNDA AİLESEL NONSENDROMİK  
İŞİTME KAYBININ GENETİK TEMELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr.Aslı Subaşıoğlu Uzak**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. MUNİS DÜNDAR**

**Bu tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TSU-11-3483 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**KAYSERİ 2012**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden beri her konuda desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam ve danışmanım **Prof. Dr. Munis Dünder**'a,

Tüm tez çalışmam boyunca yanımda olan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve bundan sonraki çalışma hayatım boyunca da her zaman yanımda olacağına inandığım, tezimi laboratuvarında çalışmama imkân sağlayan değerli hocam **Prof. Dr. Mustafa Tekin**'e;

Yıllardır bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösteren sayın hocam **Prof. Dr. Yusuf Özkul**'a,

Her konuda bilgi ve desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam **Doç. Dr. Çetin Saatçi**'ye;

Bu tezin başından sonuna kadar her sürecinde ilgisini ve bilgisini esirgemeyen sevgili arkadaşım **Uzm. Bio. Duygu Duman**'a;

Laboratuvar tekniklerini öğrenme ve uygulama süreçlerinde deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım **Bio. E. Funda Emiroğulları** ve **Bio. Aslı Sırmacı**'ya;

Anabilim dalımızda yıllardır birlikte çalıştığım **tüm meslektaşlarım** ile **çalışma arkadaşlarıma**;

Bana verdikleri sonsuz sevgi, gösterdikleri sabır ve her konudaki destekleri için öncelikle sevgili annem **Seren Subaşıoğlu**'na, eşim **Serhat**, canım kızım **Defne**'me ve **tüm aileme** çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Amaç:**İşitme kaybı; kişinin dış dünya ile uyum ve iletişimde, sosyal ve duygusal gelişiminde ve bunların yanı sıra kendini ifade etme, kavrama ve algılama süreçlerinde değişikliklere yol açan en yaygın duysal fonksiyon bozukluğudur. Genel olarak toplumda işitme kaybının sıklığı 1000 canlı doğumda bir olarak bilinmektedir. Bu değer yaklaşık yarısından genetik nedenler, diğer yarısından ise çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda elde edilen veriler insan genlerinin en az %1'inin işitme için gerekli olduğunu öne sürmektedir.

İşitme kaybının yaklaşık %80'lik kısmının otozomal resesif geçişli olması dolayısı ile özellikle Türkiye gibi akraba evliliklerinin oranının yüksek olduğu ülkelerde bu konu daha da önem kazanmıştır. Bu uzmanlık projesi ile Türk toplumunda ailesel işitme kaybına sıklıkla neden olan genlerin belirlenmesi, ilerleyen dönemlerde işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve hastaların tanı süreçlerine yapılacak katkının yanı sıra bir sonraki kuşaklar için de verilecek genetik danışmalık hizmetine katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza iki ve daha fazla işitme engelli çocuğa sahip, ebeveynlerin akraba olduğu 21 aileden 122 birey dahil edilmiştir. Sonradan geçirilmiş bir hastalık ya da kaza sonucu ortaya çıkmış olan işitme kaybı olguları ile işitme kaybının nedeninin herhangi bir sendromla ya da hastalıkla ilişkili olarak bulunduğu olgular çalışmaya dahil edilmemişlerdir. Ailelerde *GJB2* geni sekans analizi ile öncelikli olarak taranmıştır. Mutasyon saptanmayan aileler *open array* moleküler yöntemi kullanılarak işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen açısından incelenmiştir. (*SLC26A4, MYO7A, MYO15A, OTOF, CDH23, TMIE, TECTA, PCDH15, TMC1, TMPRSS3, TMHS*).

**Bulgular ve Sonuç:** 5 ailede *GJB2* geninde c.35delG homozigot, 3 ailede c.35delG heterozigot mutasyonu ve bir ailede p.V153I heterozigot polimorfizmi tespit edilmiştir. c.35delG heterozigot mutasyon saptanan 2 ailede daha önce literatürde tanımlanmamış p.C169X heterozigot mutasyonu ile, 1 ailede ise c.IVS1+1G>A mutasyonu saptanmıştır.

*Open array* yöntemi ile bir aile *TMIE* geninde p.R84W mutasyonu saptanmış, bir ailede *OTOF* geninde segregasyon, bir ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon, bir ailede ise; *TMHS*, *OTOF* ve *TMPRSS3* genlerinde segregasyon saptanmıştır. Kalan 8 ailede tez kapsamında uygulanan yöntemler ile herhangi bir olası genetik değişiklik saptanamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İşitme Kaybı, Mikroçip, Sekans, Tek Nükleotid Polimorfizmi

## ABSTRACT

**Aim:** Hearing loss is the most common sensorial disorder which effects the adaptation and communication with the external world as well as social and emotional development, self-expression and perception. It is known that hearing loss occurs approximately in one case per 1000 live births with genetic causes accounting for approximately 50% of cases. It has emerged from recent genetic research that at least 1% of human genes are required for normal hearing. Additionally, as it is known that 80% of the hearing loss is related to autosomal recessive genetic transmission, the elucidation of the genetic mechanisms underlying hearing loss, especially in countries in which consanguineous marriages are more common such as Turkey, becomes more important. With this project we aimed to identify the genes which are the more common causes of hearing loss in Turkey using genetic screening programs for hearing loss as well as standard genetic counseling to affected families.

**Materials (Patients) And Methods:** Twenty-one families with parental consanguinity segregating non-syndromic autosomal recessive profound deafness were included in this study. The first screen looked for mutations in *GJB2* gene as this is the most common genetic cause of the non- syndromic autosomal recessive deafness and then we genotyped SNP markers flanking the *SLC26A4*, *MYO7A*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*, *TMIE*, *TECTA*, *PCDH15*, *TMC1*, *TMPRSS3*, *TMHS* genes in the remaining 12 families without mutations in *GJB2* gene.

**Results And Conclusion:** In *GJB2* gene the c.35delG mutation was found to be homozygous in five families. It was heterozygous in three families two of which have also a novel heterozygous c.C169X mutation and c.35delG was associated with the heterozygous c.IVS1+1G>A mutation in one family. The p.V153I variant was found to be heterozygous in one family.

By genotyping SNP markers flanking the *SLC26A4*, *MYO7A*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*, *TMIE*, *TECTA*, *PCDH15*, *TMC1*, *TMPRSS3*, *TMHS* genes, we found the p.R84W mutation in the *TMIE* gene in one of the families. Co-segregation of SNP genotypes was

detected with the *OTOF* gene in one family and *TMPRSS3* in another family. Co-segregation of the *TMHS*, *OTOF* and *TMPRSS3* was observed in one family. None of the studied loci co-segregated in the other 8 families suggesting that mutations in other genes are present.

**Key Words:** Hearing Loss, Microarray, Sequence, Single Nucleotide Polymorphism

## İÇİNDEKİLER

Teşekkür .....	i
Özet .....	ii
Abstract .....	iv
Kısaltmalar ve Simgeler .....	ix
Şekiller Dizini .....	xi
Tablolar Listesi.....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 İşitme Duyusu .....	3
2.2. Kulağın Anatomik Yapısı .....	3
2.2.1 Dış Kulak .....	4
2.2.2 Orta Kulak .....	4
2.2.3 İç Kulak .....	5
2.3. İşitmenin Fizyolojisi .....	6
2.4 İşitme Kaybı Ve Sınıflaması .....	8
2.4.1 Sendromik İşitme Kaybı .....	9
2.4.2 Sendromik Olmayan İşitme Kaybı.....	12
2.5 Çalışmada değerlendirilen Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kaybı Genleri.....	18
2.5.1 <i>GJB-2</i> (Gap Junction Protein, Beta 2).....	18
2.5.2 <i>SLC26A4</i> (Solute Carrier Family 26, Member 4) .....	18
2.5.3 <i>MYO7A</i> (Miyozin VIIA) .....	19



2.5.4 <i>MYO15A</i> (Miyozin XVA) .....	19
2.5.5 <i>OTOF</i> (Otoferlin) .....	20
2.5.6 <i>CDH23</i> (Cadherin 23-Otocadherin) .....	20
2.5.7 <i>TMIE</i> (Transmembrane Inner Ear-Expressed) .....	20
2.5.8 <i>TECTA</i> (Tectorin, Alpha) .....	21
2.5.9 <i>PCDH15</i> (Protocadherin 15) .....	21
2.5.10 <i>TMC1</i> (Transmembrane Channel-Like Protein 1) .....	21
2.5.11 <i>TMPRSS3</i> (Transmembrane Protease, Serine 3) .....	22
2.5.12 <i>TMHS</i> (Tetraspan Membrane Protein Of Hair Cell Stereocilia) .....	22
2.6 Moleküler Teknikler.....	23
2.6.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu. ....	23
2.6.2 DNA Dizi Analizi .....	24
2.6.3 <i>Open Array</i> Tekniği .....	26
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>28</b>
3.1 Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	28
3.2. Yöntemler.....	29
3.2.1. Periferik Kandan DNA izolasyonu .....	29
3.2.1.1. DNA izolasyonunda kullanılan malzemeler .....	29
3.2.1.2. DNA İzolasyon basamakları .....	30
3.2.2. Konneksin 26 ( <i>GJB2</i> ) Geninde Dizi Analizi ile Mutasyon Taraması.....	31
3.2.2.1. DNA örneklerinin PZR ile çoğaltılması.....	31
3.2.2.2. Amplifiye Edilen Örneklerin Agaroz Jelde Değerlendirilmesi.....	33
3.2.2.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması-pürifikasyonu- Birinci Pürifikasyon.....	34
3.2.2.4. Dizi analizi için PZR-2. PZR-Sekans PZR .....	35
3.2.2.5. PZR ürünlerinin saflaştırılması-pürifikasyonu- İkinci Pürifikasyon ve Örneklerin Otomatik DNA dizi analiz cihazına yüklenmesi .....	35

3.2.3. <i>Open Array</i> Yöntemi ile mutasyon tarama çalışmaları.....	36
3.2.3.1. Taranacak SNP'ler ve seçimleri.....	36
3.2.3.2. DNA örneklerinin <i>Open Array</i> Yöntemi için Hazırlanması .....	47
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>51</b>
4.1. <i>GJB2</i> Geni Sekans Analizi Sonuçları .....	53
4.2. . <i>Open Array</i> Yöntemi ile değerlendirilen hastalarda tespit edilen değişiklikler .....	56
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
5.1. <i>GJB2</i> Geninde Gözlenen Mutasyonların Literatür ile Tartışılması .....	64
5.2. <i>Open Array</i> Yönteminin Sonuçlarının Literatür ile Tartışılması .....	68
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>72</b>
KAYNAKLAR .....	74
EKLER.....	87
KABUL ONAY .....	90

## KISALTMA VE SİMGELER

<b>A</b>	: Adenin
<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>BAC</b>	: Bakteri yapay kromozomu
<b>C</b>	: Sitozin
<b>Ca<sup>++</sup></b>	: Kalsiyum
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>dB</b>	: Desibel
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	: Didistile su
<b>ddNTP</b>	: Dideoksinükleotitler
<b>dk</b>	:Dakika
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DNA</b>	: Deoksiribonukleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinukleozid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetikasit
<b>G</b>	: Guanin
<b>Gr</b>	: Gram
<b>Hz</b>	: Hertz
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum iyonu
<b>Kb</b>	: Kilobaz
<b>kD</b>	: Kilodalton
<b>LD</b>	: Bağlantı dengesizliği

<b>LOH</b>	: Heterozigotluk Kaybı
<b>mg</b>	: Miligram
<b>Mg<sup>++</sup></b>	: Magnezyum
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Mikromolar
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>OH</b>	: Hidroksil
<b>P</b>	: Fosfor
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>rpm</b>	: Dakikada dönüş sayısı
<b>rRNA</b>	: Ribozomal ribonükleik asit
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SNP</b>	: Tek nükleotid polimorfizmi
<b>SSCP</b>	: Tek iplikcikli uygunluk polimorfizmi
<b>T</b>	: Timin
<b>TBE</b>	: Tris, Borik asit, EDTA
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikromolar

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kulağın yarı şematik ön, sağ taraftan genel görünüşü.....	4
Şekil 2.2. Koklea, bir kıvrımdan geçen şematize edilmiş enine kesit. ....	6
Şekil 2.3. Korti oranının çalışma mekanizması. ....	8
Şekil 2.4. Konuşma sesleri ve bazı seslerin odyolojik değerleri.....	9
Şekil 3.1 Şekil 3.1 <i>openarray</i> 384-kuyucuklu örnek pleytinin şematik gösterimi .....	47
Şekil 3.2. Genotipleme çipinin şematik gösterimi .....	48
Şekil 3.3. <i>OpenArray autoloader (biomek fx p, laboratory automation workstation)</i> ....	48
Şekil 3.4. <i>TaqMan® openarray®</i> genotipleme kaseti .....	49
Şekil 3.5. Kasetlerin kapatılması işleminin şematik gösterimi .....	49
Şekil 3.6. <i>OpenArray® case sealing station</i> .....	50
Şekil 4.1. Kontrol dizi ile birlikte c.35delG homozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	54
Şekil 4.2. Kontrol dizi ile birlikte c.35delG heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	54
Şekil 4.3. Kontrol dizi ile birlikte p.V153I heterozigot (c.457 G>A ) mutasyonu .....	55
Şekil 4.4. Kontrol dizi ile birlikte c.IVS1+1G>A heterozigot (-3170 G>A ) mutasyonu .....	55
Şekil 4.5. Kontrol dizi ile birlikte p.C169X heterozigot (c.508 C>A) mutasyonu .....	56
Şekil 4.6. <i>TMIE</i> geni p.R84W (rs28942097), <i>open array</i> grafiksel verisi.....	57
Şekil 5.1. <i>GJB2</i> geni baz ve aminoasit dizisi.....	57

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Koklear sıvıların kimyasal kompozisyonu .....	7
Tablo 2.2. Otozomal dominant kalıtılan non sendromik işitme kaybına yol açan genler ve lokusları .....	13
Tablo 2.3. Otozomal resesif kalıtılan non sendromik işitme kaybına yol açan genler ve lokusları .....	15
Tablo 2.4. X ve Y kromozomuna bağlı kalıtılan non sendromik işitme kaybına yol açan genler ve lokusları .....	17
Tablo 2.5. Mitokondriyal kalıtılan non sendromik işitme kaybına yol açan genler ve lokusları .....	17
Tablo 3.1. <i>GJB2</i> geni, 1. ekzon için I. PZR içeriği .....	32
Tablo 3.2. <i>GJB2</i> geni, 1. ekzon için I. PZR protokolü.....	32
Tablo 3.3. <i>GJB2</i> geni 2. ekzon için I. PZR içeriği .....	32
Tablo 3.4. <i>GJB2</i> geni 2. ekzon için I. PZR protokolü.....	33
Tablo 3.5. <i>GJB2</i> geni II. PZR içeriği- <i>Big Dye</i> reaksiyonu .....	35
Tablo 3.6. <i>GJB2</i> geni II. PZR protokolü.....	35
Tablo 3.7. <i>SLC26A4</i> geni için seçilmiş SNP'ler .....	37
Tablo 3.8. <i>MYO7A</i> geni için seçilmiş SNP'ler.....	38
Tablo 3.9. <i>MYO15A</i> geni için seçilmiş SNP'ler.....	39
Tablo 3.10. <i>OTOF</i> geni için seçilmiş SNP'ler .....	40
Tablo 3.11. <i>CDH3</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	41
Tablo 3.12. <i>TMIE</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	42
Tablo 3.13. <i>TECTA</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	42
Tablo 3.14. <i>PCDH15</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	43

Tablo 3.15. <i>TMCI</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	44
Tablo 3.16. <i>TMPRSS3</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	45
Tablo 3.17. <i>TMHS</i> geni için seçilmiş SNP'ler. ....	46
Tablo 3.18. <i>Open Array</i> yönteminde kullanılan PZR protokolü.....	50
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan bireylerin fenotipleri .....	52
Tablo 4.2. <i>GJB2</i> geni sekans analizi sonuçları .....	53
Tablo 4.3. <i>TMIE</i> geni p.R84W, rs28942097 <i>open array</i> verisi .....	58
Tablo 4.4. <i>OTOF</i> geninde segregasyon gösteren 909 nolu ailenin <i>open array</i> verisi ...	59
Tablo 4.5. <i>TMPRSS3</i> geninde segregasyon gösteren 910 nolu ailenin <i>open array</i> verisi.....	60
Tablo 4.6. <i>OTOF</i> geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin <i>open array</i> verisi ....	61
Tablo 4.7. <i>TMPRSS3</i> geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin <i>open array</i> verisi.....	62
Tablo 4.8. <i>LHFPL5</i> geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin <i>open array</i> verisi.....	63

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

İşitme kaybı; kişinin dış dünya ile uyum ve iletişimde, sosyal ve duygusal gelişiminde ayrıca bunların yanı sıra kendini ifade etme, kavrama ve algılama süreçlerinde değişikliklere yol açan en yaygın duyuşal fonksiyon bozukluğudur. Genel olarak toplumda işitme kaybının sıklığı 1000 canlı doğumda bir olarak bilinmektedir. Bu değerin yaklaşık yarısından genetik nedenler, diğler yarısından ise çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır (1). Çevresel faktörler arasında; doğum öncesi annenin geçirdiğı kızamıkçık, sitomegalovirus gibi enfeksiyon hastalıkları, prematürite, ototoksik ilaç kullanımı, doğum sonrası dönemde geçirilmiş menenjit, mastoidit ve kronik orta kulak iltihabı gibi hastalıklar ve travma öyküsü sayılabilir (2-5). Genetik temelli işitme kayıplarını ise sendromik olan ve sendromik olmayan olarak başlıca iki çatı altında toplamak mümkündür. İşitme kaybına başka hiçbir organ sistemi veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediğı durumlarda sendromik olmayan (nonsendromik) işitme kaybı söz konusudur ve bu grup genetik kaynaklı işitme kayıplarının yaklaşık %70-80' ini oluşturmaktadır. Geriye kalan %20-30'luk grup ise sendromik işitme kayıplarını oluşturur. Bugüne kadar bulguları arasında işitme kaybının da gözlendiğı bir çok sendrom tanımlanmıştır. İşitme kaybının eşlik ettiğı en sık görülen sendromlar; Pendred, Usher, Brakio-oto-renal (BOR), Waardenburg ve Alport sendromlarıdır (6-9). Bu sendromlar, işitme kayıplı popülasyonunun %15-20'lik kısmını oluşturmaktadır.

Sendromik olmayan işitme kayıpları başlığı altında değeriendirilen grup içerisinde bugüne kadar Mendel kalıtımına ve mitokondriyal kalıtıma uyan 50'den fazla gen



belirlenmiştir. Sendromik olmayan işitme kaybı için belirlenen gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak isimlendirilmiş ve otozomal dominant lokuslar için DFNA, otozomal resesif lokuslar için DFNB ve X'e bağlı lokuslar için de DFN ifadeleri kullanılmıştır. Aynı gendeki mutasyonlar hem dominant hem de resesif tiplere yol açabilirken, yine aynı gendeki mutasyonlar hem sendromik olan hem de sendromik olmayan işitme kaybına yol açabilmektedir (10,11). Çok sayıda araştırmaya rağmen, halen işitme kaybının etiyojisi ve gelişimi ile ilgili karanlık noktalar mevcuttur. İç kulağın ve işitme mekanizmasının son derece karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle çok sayıda farklı genin olaya katılması beklenen bir sonuçtur. Son yıllarda elde edilen veriler insan genlerinin en az %1'inin işitme için gerekli olduğunu öne sürmektedir (12). İşitme kaybının yaklaşık %80'lik kısmının otozomal resesif geçişli olması dolayısı ile özellikle Türkiye gibi akraba evliliklerinin oranının yüksek olduğu ülkelerde bu konu daha da önem kazanmıştır.

Bu çalışma ile Türk toplumunda ailesel işitme kaybına sıklıkla neden olan genlerin belirlenmesi, ilerleyen dönemlerde işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve bunun yanı sıra bir sonraki kuşaklar için verilecek genetik danışmalık hizmetine katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır. Ayrıca tespit edilecek mutasyonlar ile hastalara preimplantasyon genetik tanı imkânı sunmak da mümkün olabilecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

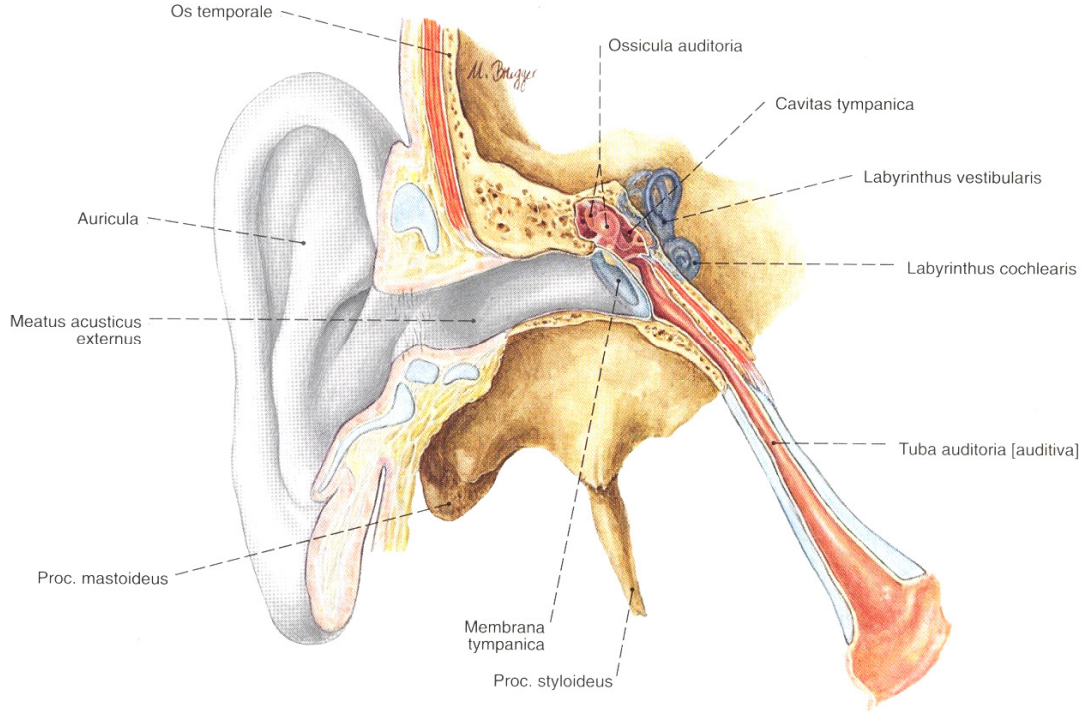
### **2.1. İŞİTME DUYUSU**

Ses genel tanımı ile bir titreşimdir, kaynağından uygun bir ortamda yayılan mekanik bir titreşim dalgası olarak da ifade edilen ses, bir enerji kaynağından yayılan titreşimlerin etkisi ile gaz, sıvı ve katı ortamlardaki moleküllerin sıkışıp gevşemesi sonucu ortaya çıkan enerji olarak da tanımlanabilir. Ses işitme duyusunun uyarandır. Bir saniyede oluşan titreşimlerin sayısına sesin frekansı denir. Ses frekans birimi Hertz (Hz)'dir. Ortamdaki moleküllerin bir defa sıkışıp gevşeme hareketi içinde kalan mesafe sesin dalga boyunu belirler. Ses dalgalarının genliği yani amplitüdü ise sesin şiddetini oluşturur. Sesin şiddet birimi desibel (dB) 'dir. Sesin frekansı arttıkça ses tizleşir, incelik, düşük frekanslı sesler ise pes/kalın sesleri oluşturur. İnsan kulağı frekansı 20 ile 20.000 Hz, şiddeti ise 0-120 dB arasındaki sesleri işitebilir. Sağlıklı işitmenin meydana gelebilmesi için bir ses kaynağına, ses dalgalarını ileten maddesel bir ortama ve bunları algılayan sağlıklı bir kulağa gereksinim duyarız (13).

### **2.2. KULAĞIN ANATOMİK YAPISI**

İşitmenin yanı sıra denge işlevinden de sorumlu olan kulak temporal kemik içine yerleşmiş görev ve yapı olarak birbirinden farklı üç bölümden oluşmaktadır. Dış kulak ses dalgalarını toplayıp orta kulağına iletirken, orta kulak aldığı ses dalgalarının mekanik olan enerjisini değiştirerek, iç kulağına iletmekten sorumludur. İç kulak ise aldığı bu ses

dalgalarını sinir sinyallerine dönüştürerek beyinde işitme merkezine gönderir ve sesin algılanıp yorumlanması gerçekleşir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kulağın yarı şematik ön, sağ taraftan genel görünüşü. Dış kulak yolu, timpan boşluğu, tuba auditoria kısmen açılmış durumda (15).

### 2.2.1. Dış kulak

Dış kulak; kulak kepçesi (auricula) ve dış kulak yolundan (meatus acusticus externus) oluşur. Dış kulak yolu yaklaşık 2,5 cm kadardır ve “s” harfi şeklinde kıvrılmıştır. Dış kulak yolunun sonunda yarı saydam olan kulak zarı (membrana tympanica) bulunur. Dış kulak, kulak zarının dışında kalan kısımdır. Kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgaları orta kulağa iletilir (14).

### 2.2.2. Orta Kulak

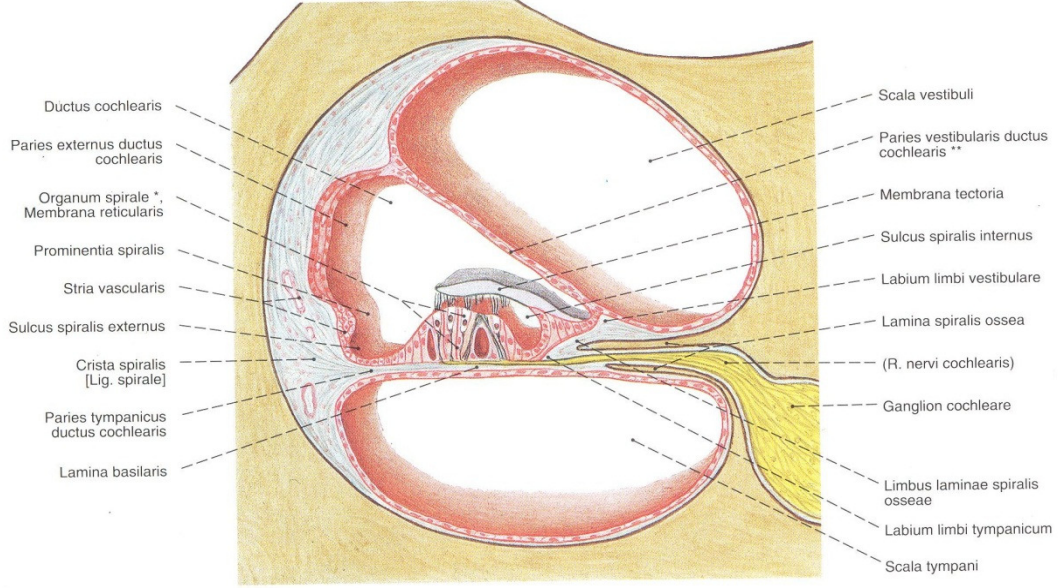
Orta kulak, kulak zarı ve çekiç (malleus), örs (incus), üzengi (stapes) adı verilen üç hareketli kemikçiği barındıran hava dolu bir boşluktur. Hava, östaki tüpü (tuba auditoria) adı verilen küçük bir kanal ile orta kulağa taşınır. Östaki tüpü orta kulakla nazofarenksi birleştiren, atmosfer basıncı ile orta kulak içi basıncı dengeleyen yola verilen isimdir. Ses dalgalarının kulak zarında oluşturduğu titreşimler, orta kulak boşluğundaki küçük

kemikçiklerden iç kulağa iletilir. Bu üç kemikçik vücudun en küçük kemikçikleridir ve kulak zarına gelen titreşimleri arttırarak iç kulağın perilenf sıvısına iletirler. Orta kulaktaki çekiç kemikçiğinin tabanı kulak zarının iç yüzeyine, üzengi kemikçiğinin tabanı oval pencereye (fenestra vestibuli) bağlıdır. Oval pencere bu sayede içe ve dışa doğru hareketler oluşturur. Böylece orta kulak havadaki titreşimleri iç kulağın sıvı ortamına taşıyan bir dönüştürme görevi yapar (14, 16). Orta kulakta bu yapılardan başka kemikçiklerin hareketini düzenleyen tensor timpani kası ve üzengi kası bulunur. Bu kaslar şiddetli seslerin iç kulağa zarar vermesinin önlenmesinde görevlidirler ayrıca gürültülü ortamlarda düşük frekanslı seslerin maskelenmesine olanak sağlamanın da yanı sıra kişinin kendi konuşma sesine olan işitme duyarlılığını da azaltmaktırlar (17).

### **2.2.3. İç Kulak**

İç kulak, denge ile ilişkili olan vestibüler sistem ile işitme merkezi olan koklear sistemden oluşur. Kemiksi ve zarsı labirent olarak iki kısmı mevcuttur. Kemiksi labirent perilenf adı verilen bir sıvı ile doludur ve 3 büyük kemik boşluk içerir. Labyrinthus osseus'da denilen bu kemik boşlukları; denge organı (vestibulum), salyangoz (koklea) ve yarım daire kanalları (semisirküler kanalları) 'dır (1, 2). Koklea, kemik labirent'in salyangoz şeklindeki kısmıdır. 35 mm boyunda ve giderek azalan çapı ile kendi üzerinde yaklaşık 2,5 kere sarılır ve apeks'de kör olarak sonlanır (Şekil 2.2). İşitme sinyallerini yönlendiren merkezdir. Bağ dokusundan oluşan baziler membran ve ince zar şeklindeki Reissner membranı, kokleayı uzunluğu boyunca üç bölmeye ayırmaktadır. Kokleadan enine kesit alındığında da gözlenen bu bölmeler yukardan aşağıya doğru "skala vestibüli", "skala media" ve "skala timpani" şeklinde sıralanırlar. Skala vestibüli ve skala timpani perilenf içerir ve oval pencereden başlayıp yuvarlak pencerede sonlanan uzun birer borudurlar. Skala mediada ise endolenf bulunur ve bu bölmede bulunan korti organı değişik ses frekanslarına cevap veren iç ve dış tüy hücreleri içermektedir (14, 15, 18, 19). İç tüy hücreleri bir sıra halinde bulunmaktadırlar ve işitme korteksine sinyaller ileten reseptör hücreleridir. Dış tüy hücreleri ise üç sıra halinde bulunmaktadırlar. Bu hücreler hem işitmenin hassasiyetine hem de frekans seçiciliğine katkıda bulunan motor elemanlara sahiptirler. Aktin filamentler içeren hücre iskeleti ve plazma zarı boyunca yerleşmiş birçok molekül, bu motor elemanlar arasında bulunurlar ve uyarılmış olan dış tüy hücrelerinin boyunun uzayıp kılmasında etkilidirler (2). Her tüy hücresi apikal kutbunda kademeli uzunlukta bulunan ve dikey olarak uzanan, "v" şeklinde dizilmiş yaklaşık 100 adet silindir şeklinde stereosilia ile kaplanmıştır. Her bir

sterosilia ise hücrenin plazma zarıyla çevrelenmiş bir aktin iskeletinden oluşmaktadır (2, 20-24).



Şekil 2.2. Koklea, bir kıvrımdan geçen şematize edilmiş enine kesit (15).

\*Korti organı

\*\* Reissner membranı

### 2.3. İŞİTMENİN FİZYOLOJİSİ

Dış ortamdan gelen ses dalgaları önce dış kulak ve sonra da orta kulaktan geçerek mekanik etkileri sonucunda perilenf içinde dalgalanmalara neden olur. Perilenf ve endolenfin iyonik kompozisyonu birbirinden farklıdır ve farklı olan bu iyon konsantrasyonu koklear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskülarisin marginal hücreleri tarafından sağlanmaktadır (Tablo 2.1) (16).

Tablo 2.1. Koklear sıvıların kimyasal kompozisyonu (25).

	ST* Perilenf	SV** Perilenf	Endolenf	SSS***
Sodyum (mM)	148	141	1.3	149
Potasyum (mM)	4.2	6.0	157	3.1
Klor (mM)	119	121	132	129
Bikarbonat (mM)	21	18	31	19
Kalsiyum (mM)	1.3	0.6	0.023	-
Protein (mg/dl)	178	242	38	24
pH	7.3	7.3	7.4	7.3

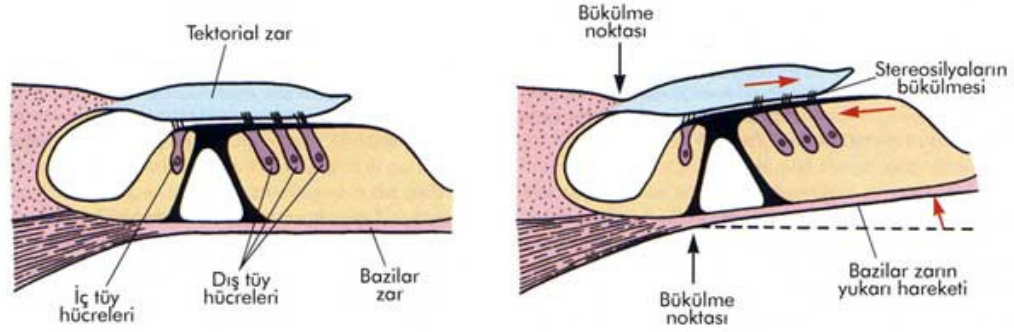
\*ST = Scala Timpani,

\*\*SV = Scala Vestibuli,

\*\*\*SSS = Serebrospinal Sıvı

Perilenfte oluşan dalgalanmalar endolenfe yansiyarak, tektoral membranda titreşimlere yol açar. Tektoral membrandaki titreşimlerden dolayı stereosililerde bükülmeler meydana gelir (Şekil 2.3). Bu bükülme sonucunda stereosililerdeki harekete duyarlı katyon kanalları açılarak potasyum ( $K^+$ ) açısından zengin endolenften hücre içine doğru potasyum akışı başlar. Bu durum hücrelerin depolarizasyonu ile sonuçlanır. Depolarize olan hücrenin kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) kanalları aktive olur. Hücreye kalsiyum akışı başlar. Kalsiyum iyonları akustik siniri aktive eden nörotransmitterlerin salınımını tetikler. Böylece mekanik enerji koklear sinire aktarılan elektrik enerjisine dönüşmüş olur ve beynin duyu korteksine taşınır. Sonuç olarak koklea kanalı bir ses reseptörü olarak özelleşmiştir (2, 16, 22, 26). İşitmenin normal bir şekilde devamı için endolenften hücre içine doğru pompalanarak aksiyon potansiyelini oluşturan  $K^+$  iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Bu durum hücrede artan kalsiyum miktarının, kalsiyuma duyarlı potasyum kanallarını açması ile gerçekleşir, potasyum iyonları hücreden dışarı çıkarlar (27). Ve ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmındaki kanalı geçerler. Burada iyonların hücreler arası geçişi konneksonlar aracılığı ile sağlanır.

Stria vaskularise gelen iyonlar voltaj kapılı potasyum kanallarından geçerek endolenfe geri pompalanırlar (11).



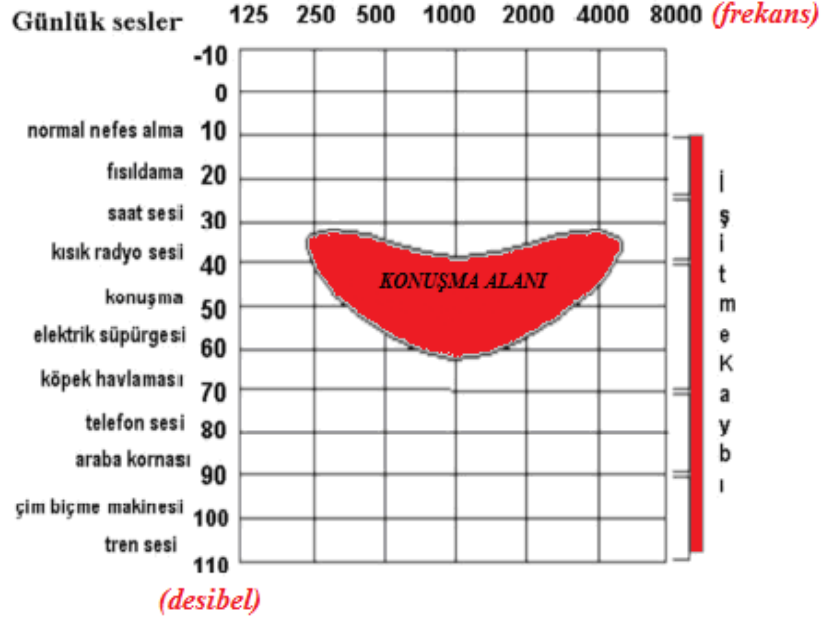
Şekil 2.3. Korti oranının çalışma mekanizması. Baziller zardaki titreşim ile birlikte, tektorial zar içine gömülü olan tüy hücre uzantıları (steriosililer) bükülür ve bu mekanik etki, hücrelerin elektriksel potansiyelini değiştirerek, mekanik olan ses titreşimlerinin elektriksel sinir sinyallerine dönüşümü sağlar (28).

#### 2.4. İŞİTME KAYBI VE SINIFLAMASI

İşitme kaybı etiyojisine göre; genetik ve çevresel nedenli işitme kayıpları olarak, başlama yaşına göre; doğuştan, prelingual (2 yaşından önceki dönem) ve postlingual (2 yaşından sonraki dönem) işitme kaybı olarak, işitme yolu üzerindeki işitme kaybına yol açan bölgeye bağlı; iletim tipi, sensorinöral ve miks tip olarak, şiddetine göre; hafif, orta, orta derece şiddetli, şiddetli ve derin işitme kaybı olarak, progresyonuna göre; ilerleyici işitme kaybı, ilerleyici olmayan işitme kaybı ve değişken progresyon gösteren işitme kaybı olarak ve fenotipe yansıma durumuna göre; sendromik olan ve sendromik olmayan işitme kaybı olarak sınıflandırılabilir (2, 5, 12, 29).

Şiddetine göre sınıflandırıldığında odyolojik bulgular göz önünde bulundurulur (16). Örneğin hafif işitme kaybında (26-40 dB) kişiler fısıltılı konuşma seslerini duyamazlar. Orta dereceli işitme kaybında (41-55 dB) ise; karşılıklı konuşmaları duyamazlar. Şiddetli işitme kaybı olan bireyler (71-90 dB) bağırta seslerini duyamazlar. Çok ileri işitme kaybı olanlar ise (>90 dB), hiçbir sesi duyamazlar. Şekil 2. 4'te bazı konuşma sesleri ve seslerin odyolojik değerleri gösterilmektedir.

### *Konuşma sesleri ve bazı çevresel seslerin odyolojik değerleri*



Şekil 2.4. Konuşma sesleri ve bazı seslerin odyolojik değerleri (Referans 30'dan değiştirilerek alınmıştır.)

#### **2.4.1. Sendromik İşitme Kaybı**

İşitme kaybının eşlik ettiği en sık görülen sendromlar Pendred, Usher, Brakio-oto-renal (BOR), Waardenburg ve Alport sendromlarıdır ve bu sendromlar; işitme kayıplı popülasyonun %15-20'lik kısmını oluşturmaktadır(6-9, 31).

Pendred Sendromu ilk olarak 1896 yılında tanımlanmış olup doğuştan işitme kaybına eşlik eden tiroit bezinde aşırı büyüme sonucunda gözlenen guatr ile birliktelik gösterir ancak bütün olgularda guatr bulunmayabilir. Hastaların yaklaşık yarısında hipotiroidi saptanır. Hastaların çoğunda iç kulak anomalileri de bulunur (Mondini malformasyonu veya genişlemiş vestibüler kanallar gibi) (32). Sendrom otozomal resesif geçişli olup genel popülasyonda görülme oranı yaklaşık olarak 10.000'de bir olmakla birlikte, doğumsal işitme kayıplarının % 5-10'unu oluşturur (33). Pendred sendromuna neden olan "PDS" geni 7. kromozomun uzun kolunda (7q31) bulunmaktadır. Bu genin ürettiği pendrin proteini iyon/klor taşıyıcısı olarak fonksiyon görmektedir (34).



Usher sendromu doğumsal iki taraflı sensorinöral işitme kaybı ve retinitis pigmentosa ile seyreden otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır. Toplumda 100.000’de 3-6 oranında görüldüğü bildirilmiştir. İşitme ve görme kaybının en sık birlikte görüldüğü sendromdur. Doğumsal işitme kayıplarının yaklaşık %5’sini oluşturmaktadır. Klinik olarak 3 tipi vardır. Tüm tiplerinde retinitis pigmentosa olmakla birlikte Tip 1’de ileri derecede işitme kaybı, vestibüler fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı denge bozuklukları ile motor gelişim bozukluğu mevcuttur. Tip 2’de işitme kaybı orta-ileri derecede iken vestibüler fonksiyon bozukluğu ve motor gelişim bozukluğu gözlenmez. Tip 3’de ise özellikle 10 yaşından sonra ilerleyici işitme kaybı görülür, vestibüler fonksiyon bozukluğu eşlik edebilir ya da etmeyebilir. Usher sendromlu hastaların %25’inde bulgulara zeka geriliği de eşlik etmektedir (35). Bugüne kadar farklı aile çalışmalarında Usher sendromundan sorumlu çeşitli genler saptanmıştır. Tip 1 Usher sendromundan sorumlu *MYO7A (USH1B)* (36), *USH1C* (37,38), *USH1D* (39,40), *USH1F* (41,42), Tip2 ‘den sorumlu *USH2A* (36) ve Tip 3’den sorumlu *USH3* (43) genleri tespit edilmiştir. Genetik olarak oldukça heterojen olan tabloda çalışmalar sürdürülmektedir.

Brakio-oto-renal (BOR) sendrom; sensörinöral ve iletim tipi işitme kaybı, dış, orta ve iç kulakta yapısal defektler, brakial fistül ve kistlerin yanı sıra üriner sistem patolojileri ile karakterizedir. Bu sendrom otozomal dominant geçişlidir. Sendromdan sorumlu gen; 8. kromozomun uzun kolunda (8q13.3) bulunan *EYAI* (drosophila ‘eyeless’) genidir (44). Populasyonda sıklığı 40.000’de bir olup, doğumsal işitme kayıplarının yaklaşık %2’sini oluşturmaktadır (45).

Waardenburg Sendromu otozomal dominant geçişli olup kraniofasial anomaliler, pigmentasyon bozuklukları ve doğumsal sensorinöral işitme kaybı ile seyreder. Klinik olarak dört tipi mevcuttur. Tip 1’de işitme kaybı, iç kantuslar arasındaki mesafenin uzun olması (distopia kantorum), saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri ile birlikte (46). Özellikle başın frontal bölgesindeki saçta sınırları belirgin beyaz perçem bulunabilmektedir. Tip 2’de Tip 1’den farklı olarak distopia kantorum yoktur. Tip 3’te tip 1 bulgularına ek olarak ekstremitte kontraktürleri vardır. Tip 4’te ise tip 1 bulgularına ek olarak Hirschprung hastalığı mevcuttur. Genel toplumdaki prevalansı 42.000’de birdir. Doğumsal işitme kayıplarının %2’sini Waardenburg sendromu (WS) oluşturur (47-49). Tip 1 ve Tip 3’te sorumlu olan gen *PAX3* geni, *MITF* geninin aktivasyonunu sağlamakta olup, 2. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır (2q35).

Tip 2'den sorumlu olan *MITF* geni 3. kromozomun kısa koluna (3p14.1) yerleşmiştir ve tirozin kinaz aktivasyonu yapmaktadır. Tip 4'de ise *ENDRB*, *EDN3* ve *SOX10* genleri saptanmıştır. Reseptör-ligand fonksiyonundan sorumlu olan bu genler 13q22 ve 20q13 kromozomal bölgelerinde bulunmaktadır (11).

Alport Sendromu; bir bazal membran hastalığı olup, ilerleyici nefrit, bilateral sensorinöral işitme kaybı ve oküler bozukluklarla karakterizedir (1). İşitme kaybı özellikle yüksek tonlarda ve ilerleyici karakterdedir. Karakteristik göz bulgusu olarak en sık bilateral anterior lentikonus gözlenmektedir. Genel popülasyonda sıklığı 50.000'de bir olarak tahmin edilmekle birlikte, doğumsal işitme kayıplılarının %1'inde Alport Sendromu gözlenmektedir. Alport Sendromunda %50-85 X'e bağlı dominant geçiş bulunurken (*COL4A5* geni), %10-15'inde otozomal dominant ve nadir olarak da otozomal resesif kalıtım (*COL4A3* ve *COL4A4* geni) gözlenmektedir (50,51).

Yukarıda belirtilen sendromların yanı sıra işitme kaybının sıklıkla görüldüğü sendromlar arasında Goldenhar Sendromu, Treacher-Collins Sendromu, Digeorge Sendromu sayılabilir.

Goldenhar sendromu; fasiyal asimetri, preauriküler deri katlantıları, servikal vertebral displazi, kolobom ve epibulber dermoid ile karakterizedir ve hemifasiyal mikrozomi veya fasioaurikülovertebral displazi olarak da isimlendirilir. İşitme kaybı genellikle doğuştan, tek taraflı ve ileti tipi olarak görülmektedir (18).

Treacher-Collins Sendromu olgularında baş ve yüzde gelişim defektleri söz konusudur. Yüzde zigomatik kemiklerin simetrik olarak az gelişmesi, palpebral fissürlerin aşağı çekikliği, göz kapağı kolobomu, yarı damak ve bunların yanı sıra ileti tipi işitme kaybı görülebilmektedir (52).

Erken embriyonik dönemde brankiyal arkların gelişimsel bozukluklarından kaynaklandığı düşünülen Digeorge Sendromu, timus veya parotis bezlerinin yokluğu, kardiyovasküler sistem ve kraniofasial anomaliler ile karakterizedir. İşitme kaybı, orta kulak anomalileri sonucunda ileti tipi olabildiği gibi, iç kulakta da bilateral Mondini anomalisi bulunduğu durumlarda sensorinöral tipte de görülebilmektedir (53).

#### 2.4.2. Sendromik Olmayan İşitme Kaybı

İşitme kayıplı bireylerin %70'inde ise ek her hangi bir patoloji izlenmemekte ve bu grup sendromik olmayan işitme kayıpları başlığı altında değerlendirilmektedir. Bu grup içerisinde Mendel kalıtımına ve mitokondriyal kalıtıma uyan 50'den fazla gen belirlenmiştir. Non sendromik işitme kaybı için belirlenen gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak isimlendirilmiş ve otozomal dominant lokuslar için DFNA, otozomal resesif lokuslar için DFNB ve X'e bağlı lokuslar için de DFN olarak isimlendirilmiştir. Aynı gendeki mutasyonlar hem dominant hem de resesif tiplere yol açabilirken, yine aynı gendeki mutasyonlar hem sendromik olan hem de sendromik olmayan işitme kaybına yol açabilmektedir. Son yıllarda genom boyu taramaları yoluyla işitme kaybına yol açabilecek bölgeleri incelemeyi amaçlayan değişik çalışmalar yürütülmektedir. Otozomal dominant kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybı için bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda 50'den fazla lokus saptanmıştır. Otozomal resesif kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybı için de 70'den fazla lokus tespit edilmiştir. X'e bağlı resesif ve mitokondriyal kalıtım için de çalışmalar yapılmış ve sorumlu çeşitli genler ve mutasyonlar tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra Y kromozomunda işitme kaybına yol açan tek bir lokus saptanmıştır (10, 11) (Tablo 2.2-2.3-2.4-2.5).

Tablo 2.2. Otozomal dominant kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybına yol açan genler ve lokusları(10)

Lokus Adı (OMIM)	Kromozomal Lokalizasyonu	Gen Adı (OMIM) ve Genin OMIM Numarası	Referans
DFNA1	5q31	<i>DIAPH1</i> -124900	Léon ve ark., 1992 ; Lynch ve ark., 1997
DFNA2A	1p34	<i>KCNQ4</i> -603537	Coucke ve ark., 1994 ; Kubisch ve ark., 1999
DFNA2B	1p35.1	<i>GJB3</i> -603324	Xia ve ark., 1999
DFNA3A	13q11-q12	<i>GJB2</i> -121011	Chaib ve ark., 1994 ; Denoyelle ve ark., 1998 ; Kelsell ve ark., 1997
DFNA3B	13q12	<i>GJB6</i> -612643	Grifa ve ark., 1999
DFNA4	19q13	<i>MYH14</i> -600652	Chen ve ark., 1995 ; Donaudy ve ark., 2004
DFNA5	7p15	<i>DFNA5</i> -600994	Van Camp ve ark., 1995 ; Van Laer ve ark., 1998
DFNA6	4p16.3	<i>WFS1</i> -600965	Lesperance ve ark., 1995 ; Van Camp ve ark., 1999 ; Bepalova ve ark., 2001 ; Young ve ark., 2001
DFNA7	1q21-q23	Bilinmiyor.	Fagerheim ve ark., 1996
DFNA8	DFNA12'ye bakmız		
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i> -601369	Manolis ve ark., 1996 ; Robertson ve ark., 1998
DFNA10	6q22-q23	<i>EYA4</i> -601316	O'Neill ve ark., 1996 ; Wayne ve ark., 2001
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i> -601317	Tamagawa ve ark., 1996 ; Liu ve ark., 1997
DFNA12	11q22-24	<i>TECTA</i> -601543	Verhoeven ve ark., 1997 ; Verhoeven ve ark., 1998
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i> -601868	Brown ve ark., 1997 ; McGuirt ve ark., 1999
DFNA14	DFNA6'ya bakmız.		
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i> -602459	Vahava ve ark., 1998
DFNA16	2q24	Bilinmiyor.	Fukushima ve ark., 1999
DFNA17	22q	<i>MYH9</i> -603622	Lalwani ve ark., 1999 ; Lalwani ve ark., 2000
DFNA18	3q22	Bilinmiyor.	Bonsch ve ark., 2001
DFNA19	10 (perisentrik bölge)	Bilinmiyor.	The Molecular Biology of Hearing and Deafness, Bethesda, October 8-11, 1998 (Green ve ark., abstract 107)
DFNA20	17q25	<i>ACTG1</i> -604717	Morell ve ark., 2000, Yang ve ark., 2000, Zhu ve ark., 2003, van Wijk ve ark., 2003 , Kemperman ve ark., 2004
DFNA21	6p21	Bilinmiyor.	Kunst ve ark., 2000
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i> -606346	Melchionda ve ark., 2001
DFNA23	14q21-q22	Bilinmiyor.	Salam ve ark., 2000
DFNA24	4q	Bilinmiyor.	Hafner ve ark., 2000
DFNA25	12q21-24	Bilinmiyor.	Greene ve ark., 1999
DFNA26	DFNA20'ye bakmız.		
DFNA27	4q12	Bilinmiyor.	Fridell ve ark., 1999 , Peters ve ark., 2008
DFNA28	8q22	<i>GRHL2</i> -608641	Anderson ve ark., 1999 , Peters ve ark., 2002

DFNA30	15q25-26	Bilinmiyor.	Mangino ve ark., 2001
DFNA31	6p21.3	Bilinmiyor.	Snoeckx ve ark., 2004
DFNA32	11p15	Bilinmiyor.	Li ve ark., 2000
DFNA33	13q34-qter	Bilinmiyor.	Bonsch ve ark., 2009
DFNA36	9q13-q21	<i>TMC1</i> -606705	Kurima ve ark., 2002
DFNA38	DFNA6'ya bakmız.		
DFNA41	12q24-qter	Bilinmiyor.	Blanton ve ark., 2002
DFNA42	5q31.1-q32	Bilinmiyor.	Xia ve ark., 2002
DFNA43	2p12	Bilinmiyor.	Flex ve ark., 2003
DFNA44	3q28-29	<i>CCDC50</i> -607453	Modamio-Hoybjor ve ark., 2003; Modamio-Hoybjor ve ark., 2007
DFNA47	9p21-22	Bilinmiyor.	D'Adamo ve ark., 2003
DFNA48	12q13-q14	<i>MYO1A</i> -607841	D'Adamo ve ark., 2003, Donaudy ve ark., 2003
DFNA49	1q21-q23	Bilinmiyor.	Moreno-Pelayo ve ark., 2003
DFNA50	7q32.2	<i>MIRN96</i> -613074	Modamio-Hoybjor ve ark., 2004; Mencia ve ark., 2009
DFNA51	9q21	<i>TJP2</i> -613558	Walsh ve ark., 2010
DFNA52	4q28	Bilinmiyor.	Xia ve ark., 2002
DFNA53	14q11.2-q12	Bilinmiyor.	Yan ve ark., 2005
DFNA54	5q31	Bilinmiyor.	Gurtler ve ark., 2004
DFNA57	19p13.2	Bilinmiyor.	Bonsch ve ark., 2008
DFNA58	2p12-p21	Bilinmiyor.	Lezrovitz ve ark., 2009
DFNA59	11p14.2-q12.3	Bilinmiyor.	Chatterjee ve ark., 2009
DFNA60	2q21.3-q24.1	Bilinmiyor.	Liu XZ ve ark. ARO meeting. Denver, February 2007.
DFNA64	12q24.31-12q24.32	<i>SMAC/DIABLO</i> -614152	Chen ve ark., 2011

Tablo 2.3. Otozomal resesif kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybına yol açan genler ve lokusları(10).

Lokus Adı (OMIM)	Kromozomal Lokalizasyonu	Gen Adı (OMIM) ve Genin OMIM Numarası	Referans
DFNB1	13q12	<i>GJB2</i> -220290	Guilford ve ark., 1994 ; Kellsell ve ark., 1997
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i> -600060	Guilford ve ark., 1994 ; Liu ve ark., 1997 ; Weil ve ark., 1997
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15A</i> -600316	Friedman ve ark., 1995 ; Wang ve ark., 1998
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i> -605646	Baldwin ve ark., 1995 ; Li ve ark., 1998
DFNB5 *	14q12	Bilinmiyor.	Fukushima ve ark., 1995
DFNB6	3p14-p21	<i>TMIE</i> -607237	Fukushima ve ark., 1995 ; Naz et al, 2002
DFNB7/11	9q13-q21	<i>TMC1</i> -600974	Jain ve ark., 1995 ; Scott ve ark., 1996 ; Kurima ve ark., 2002
DFNB8/10	21q22	<i>TMPRSS3</i> -605316	Veske ve ark., 1996 ; Bonn�-Tamir ve ark., 1996 ; Scott ve ark., 2001
DFNB9 **	2p22-p23	<i>OTOF</i> -601071	Chaib ve ark., 1996 ; Yasunaga ve ark., 1999
DFNB10	DFNB8'e bakınız.		
DFNB11	DFNB7'e bakınız.		
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i> -601386	Chaib ve ark., 1996; Bork ve ark., 2001
DFNB13	7q34-36	Bilinmiyor.	Mustapha ve ark., 1998
DFNB14	7q31	Bilinmiyor.	Mustapha ve ark., 1998
DFNB15	19p13.3	<i>GIPC3</i> -601869	Chen ve ark., 1997, Charizopoulou ve ark., 2011
DFNB16	15q21-q22	<i>STRC</i> -603720	Campbell ve ark., 1997 ; Verpy ve ark., 2001
DFNB17	7q31	Bilinmiyor.	Greinwald ve ark., 1998
DFNB18	11p14-15.1	<i>USH1C</i> -602092	Jain ve ark., 1998 ; Ouyang ve ark., 2002 ; Ahmed ve ark., 2002
DFNB19	18p11	Bilinmiyor.	The Molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8-11, 1998 (Green ve ark., abstract 108)
DFNB20	11q25-qter	Bilinmiyor.	Moynihan ve ark., 1999
DFNB21	11q	<i>TECTA</i> -603629	Mustapha ve ark., 1999
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i> -607039	Zwaenepoel et al., 2002
DFNB23	10p11.2-q21	<i>PCDH15</i> -609533	Ahmed et al, 2003
DFNB24	11q23	<i>RDX</i> -611022	Khan ve ark., 2007
DFNB25	4p13	<i>GRXCRI</i> -613285	SKromozom:aders ve ark., 2010
DFNB26	4q31	Bilinmiyor.	Riazuddin ve ark., 2000
DFNB27	2q23-q31	Bilinmiyor.	Pulleyn ve ark., 2000
DFNB28	22q13	<i>TRIOBP</i> -609823	Walsh ve ark., 2000 ; Shahin et al, 2006 ; Riazuddin et al, 2006
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i> -614035	Wilcox ve ark., 2001
DFNB30	10p11.1	<i>MYO3A</i> -607101	Walsh ve ark., 2002
DFNB31	9q32-q34	<i>WHRN</i> -607084	Mustapha ve ark., 2002 ; Mburu ve ark., 2003
DFNB32	1p13.3-22.1	<i>GPSM2</i> -608653	Masmoudi ve ark., 2003 ; Walsh ve ark., 2010
DFNB33	9q34.3	Bilinmiyor.	Medlej-Hashim ve ark., 2002

DFNB35	14q24.1-24.3	ESRRB-608565	Ansar ve ark., 2003 ; Collin ve ark., 2008
DFNB36	1p36.3	ESPN-609006	Naz ve ark., 2004
DFNB37	6q13	MYO6-607821	Ahmed ve ark., 2003
DFNB38	6q26-q27	Bilinmiyor.	Ansar ve ark., 2003
DFNB39	7q21.1	HGF-608265	Schultz ve ark., 2009
DFNB40	22q	Bilinmiyor.	Delmaghani ve ark., 2003
DFNB42	3q13.31-q22.3	ILDRI-609646	Aslam ve ark., 2005; Borck ve ark., 2011
DFNB44	7p14.1-q11.22	Bilinmiyor.	Ansar ve ark., 2004
DFNB45	1q43-q44	Bilinmiyor.	Bhatti ve ark., 2008
DFNB46	18p11.32-p11.31	Bilinmiyor.	Mir ve ark., 2005
DFNB47	2p25.1-p24.3	Bilinmiyor.	Hassan ve ark., 2005
DFNB48	15q23-q25.1	Bilinmiyor.	Ahmad ve ark., 2005
DFNB49	5q12.3-q14.1.	MARVELD2-610153	Ramzan ve ark., 2004 ; Riazuddin ve ark., 2006
DFNB51	11p13-p12	Bilinmiyor.	Shaikh ve ark., 2005
DFNB53	6p21.3	COL11A2-609706	Chen ve ark., 2005
DFNB55	4q12-q13.2	Bilinmiyor.	Irshad ve ark., 2005
DFNB59	2q31.1-q31.3	PJVK-610220	Delmaghani ve ark., 2006
DFNB61	7q22.1	SLC26A5613865	Liu ve ark., 2003
DFNB62	12p13.2-p11.23	Bilinmiyor.	Ali ve ark., 2006
DFNB63	11q13.2-q13.4	LRTOMT/COMT2-612414	Du ve ark., 2008 ; Ahmed ve ark., 2008
DFNB65	20q13.2-q13.32	Bilinmiyor.	Tariq ve ark., 2006
DFNB66	6p21.2-22.3	LHFPL5-610265	Tlili ve ark., 2005 ; Shabbir ve ark., 2006 ; Kalay ve ark., 2006
DFNB67	DFNB66'ya bakınız.		
DFNB68	19p13.2	Bilinmiyor.	Santos ve ark., 2006
DFNB71	8p22-21.3	Bilinmiyor.	Chishti ve ark., 2009
DFNB72	19p13.3	Bilinmiyor.	Ain ve ark., 2007 ; Rehman ve ark., 2011
DFNB73	1p32.3	BSND-606412	Riazuddin ve ark., 2009
DFNB74	12q14.2-q15	MSRB3-613718	Waryah ve ark., 2009 ; Ahmed ve ark., 2011
DFNB77	18q12-q21	LOXHD1-613079	Grillet ve ark., 2009
DFNB79	9q34.3	TPRN-613307	Rehman ve ark., 2010
DFNB81	19p	Bilinmiyor.	Rehman ve ark., 2011
DFNB82	DFNB32'ye bakınız.		
DFNB83	DFNA47'ye bakınız.		
DFNB84	12q21.2	PTPRQ-603317	SKromozom:aders er al., 2010
DFNB85	17p12-q11.2	Bilinmiyor.	Shahin ve ark., 2010
DFNB91	6p25	SERPIN6-613453	Sirmaci ve ark., 2010
DFNB93	11q12.3-11q13.2	Bilinmiyor.	Tabatabaiefar ve ark., 2011
DFNB95	19p13	Bilinmiyor.	Charizopoulou ve ark., 2011

\* DFNB5 ilk olarak DFNB4 olarak tanımlanmıştır.

\*\* DFNB9 ilk olarak DFNB6 olarak tanımlanmıştır.

Tablo 2.4. X ve Y kromozomuna bağılı kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybına yol açan genler ve lokusları(10)

Lokus Adı (OMIM)	Kromozomal Lokalizasyonu	Gen Adı (OMIM) ve Genin OMIM Numarası	Referans
DFNX1 (DFN2)	Xq22	<i>PRPS1</i> -304500	Liu ve ark., 2010
DFNX2 (DFN3)	Xq21.1	<i>POU3F4</i> -304400	De Kok ve ark., 1995
DFNX3 (DFN4)	Xp21.2	bilinmiyor	Lalwani ve ark., 1994
DFNX4 (DFN6)	Xp22	<i>SMPX</i> - 300066	del Castillo ve ark., 1996
DFNX5 (AUNX)	Xq23-q27.3	Bilinmiyor	Wang ve ark., 2006
DFNY1	Y	Bilinmiyor	Wang ve ark., 2004

Tablo 2.5. Mitokondriyal kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybına yol açan genler ve lokusları(10)

Gen	Mutasyon	Referans
MTTS1	7510T->C	Hutchin ve ark., 2000
MTTS1	7511T->C	Friedman ve ark., 1999 ; Sue ve ark., 1999

Bulunmuş olan genlerin hücredeki fonksiyonları değerlendirildiğinde; adezyon molekülü, enzim, iyon kanalı veya taşıyıcı, integral membran proteini olabildikleri gibi; hücre iskeletinde, ekstrasellüler matrikste, nekzularda, makromoleküllerin organizasyonunda, nöron yada sinapslarda, translasyon ve transkripsiyon regülasyonunda ve nörolojik gelişimde görevli olabildikleri görülmektedir(11).

İç kulağın ve işitme mekanizmasının son derece karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle çok sayıda farklı genin olaya katılması beklenen bir sonuçtur. Son yıllarda elde edilen veriler insan genlerinin en az %1'inin işitme için gerekli olduğunu öne sürmektedir(11).



## 2.5. ÇALIŞMADA DEĞERLENDİRİLEN SENDROMİK OLMAYAN OTOZOMAL RESESİF İŞİTME KAYBINA YOL AÇAN GENLER

### 2.5.1 *GJB2 (Gap Junction Protein, Beta 2)*

*GJB2* geni konneksin 26 olarak adlandırılan 26 kD'lik bir konneksin protein kodlamaktadır. Konneksinler integral membran proteinleri olup, hücresel bağlantı kanallarıdır. Bu kanallar  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  ve küçük sinyal moleküllerinin geçişine imkân sağlarlar. İç kulakta  $K^+$  döngüsünde ve endolenf dengesinde hayati önem taşımaktadırlar. Konneksin 26 proteininin,  $K^+$  iyonunun tüy hücrelerinden stria vaskularise geri dönüşümünü sağlayan hücreler arası kanalların oluşumunda ve  $K^+$  'un endolenfe geri pompalanmasında görevli olduğu düşünülmektedir (54). *GJB2* 'nin stria vaskulariste, basal membranda, limpu ve spiral çıkıntıda eksprese olduğu gösterilmiştir (55). *GJB2* geni 2 ekzondan oluşmakta ve birinci ekzon translasyona uğramamaktadır (56). Gen, 13. kromozomun q11-q12 bölgesinde DFNB1 lokusunda haritalanmıştır (57). Sendromik olmayan işitme kaybı nedeni olan genler içinde en sık mutasyon saptanmış olan genidir. Bugüne kadar *GJB2*'de 150'den fazla işlev bozucu mutasyon tanımlanmıştır (58). Bu gendeki mutasyonların farklı toplumlarda genetik nedenli işitme kayıplarının %20-50'sini oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (59).

### 2.5.2. *SLC26A4 (Solute Carrier Family 26, Member 4)*

*PDS* geni olarak da isimlendirilen *SLC26A4* geni bir anyon taşıyıcısı olarak bilinen Pendrin proteinini kodlamaktadır. Tiroit bezi, iç kulak ve böbrekte eksprese olan bu transmembran proteinin klor, iyot, bikarbonat ve format anyonlarını taşıdığı gösterilmiştir (34, 60) . Genin kokleada endolenf geri emilim bölgesinde eksprese olduğu ve mutasyonlarının endolenf sıvısının dengesini bozarak işitme kaybına yol açtığı tespit edilmiştir (61). Bu gen 7q31 bölgesinde haritalanmıştır ve 21 ekzondan oluşmaktadır. İlk ekzon translasyona uğramaz (60). Doğuştan işitme kaybı ile tiroit bezinde aşırı büyüme sonucunda gözlenen guatrın da saptandığı Pendred sendromuna da bu gendeki mutasyonlar sebep olmaktadır. Aynı zamanda temporal kemik anomalilerinin eşlik ettiği ilerleyici işitme kaybı olgularında da *SLC26A4* geninde mutasyonlar tespit edilmiştir. Temporal kemik anomalileri mutasyon saptanan bireylerde genişlemiş vestibüler kanal, Mondini displazisi ve koklear spiral kanal hipoplazisi (normal de 2,5 dönüşten oluşan kokleanın 1,5 olması) gibi çeşitlilik göstermektedir. Son çalışmalar, sendromik olmayan işitme kaybı olgularının

yaklaşık %4'üne bu gendeki mutasyonların sebep olduğu yönündedir (62). *SLC26A4*'te bugüne kadar 120 den fazla mutasyon tanımlanmış olup bunların bir kısmı Pendred sendromuna, bir kısmı da genişlemiş vestibüler kanala yol açmaktadır. (58).

### **2.5.3. *MYO7A* (*Myosin VIIA*)**

Kasa ait olmayan miyozin ağır zincir 7A'yı kodlayan bu gen 11. kromozomun q13.5 bölgesinde DFNB2 lokusunda bulunmaktadır. Gendeki mutasyonlar, Usher syndrome tip 1B, resesif kalıtılan atipik Usher Sendromu, otozomal resesif (DFNB2) ve otozomal dominant (DFNA11) sendromik olmayan işitme kaybından sorumludur.

Genin 49 ekzonundan 48'i kodlamaktadır. Kodlanan protein 2215 aminoasitten oluşmakta ve klasik olmayan miyozin yapısındadır. Gen; iç kulak, retina, testis, akciğer ve böbrekte eksprese olmaktadır (63). Gendeki mutasyonlar, fotoreseptör hücrelerindeki mikrotübüllerde, nazal silia hücrelerinde, sperm hücrelerinde anormal organizasyona sebep olmaktadır. Aynı zamanda iç kulakta semisirküler kanal ve utrikulun tip 1 ve tip 2 tüysü hücrelerinde, steriyosillalarda, kutikular yapılarda ve hücre gövdesinde eksprese olan *MYO7A*'daki mutasyonlar korti organının dejenerasyonuna da yol açarak işitme kaybına neden olmaktadır (63, 64). Gendeki ilk mutasyonlar retinitis pigmentosa, vestibüler semptom, ve prelingual sağırlıkla karakterize Usher sendrom tip 1B'li bir hastada tanımlanmıştır (64, 65). Bu güne kadar ise, 340 farklı mutasyon ve 248 protein varyantı rapor edilmiştir (63).

### **2.5.4. *MYO15A* (*Myosin XVA*)**

DFNB3 lokusunda, 17p11.2 kromozomal bölgesinde haritalanmış olan bu gen, miyozin 15 A proteinini kodlamaktadır (66). Gen kodlayan 66 ekzondan oluşur. Klasik olmayan protein yapısındaki ürün, 3530 aminoasit içermektedir. İç kulakta kutikular plak üzerinde yer alan tüy hücrelerinde eksprese olup, tüy hücrelerinde aktin organizasyonu için gereklidir (67). Nörosensöriyal epitel hücrelerinde, sakkulus, utriculus ve crista ampullariste de eksprese olduğu gösterilmiştir (68). Söz konusu gendeki mutasyonlar doğuştan sendromik olmayan işitme kaybı ile ilişkili bulunmuştur (69).

Gende bugüne kadar 25 farklı mutasyon tanımlanmıştır (70).

### **2.5.5. *OTOF (Otoferlin)***

Otoferlin proteinini kodlayan *OTOF* geni, 2p23-22 kromozom bölgesinde ve DFNB9 lokusuna haritalanmıştır (71). Genin C-terminal bölgesi ile hücre membranına bağlanan bir proteini kodladığı ve membranın yapısındaki veziküllerin plazma membranına taşınmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. *OTOF* geni, alternatif intron çıkartılması ile çeşitli translasyon başlangıç bölgelerinin kullanılması sonucunda; otoferlin proteininin uzun ve kısa izoformlarını kodlamaktadır (72, 73). Proteinin uzun izoformunda *OTOF* geninin tüm 48 ekzonu mRNA oluşumu için kullanılırken, kısa izoformunun mRNA'sının oluşturulması için genin ilk 19 ekzon kullanılmaz (72, 74). *OTOF* geni korti organındaki iç tüy hücrelerinde utrikulus ve sakkulusta ve beyinde yüksek seviyede eksprese olurken; kalp, plasenta, akciğer, pankreas, iskelet kası ve böbrek de daha düşük düzeyde eksprese olduğu belirtilmiştir (72,75). Gendeki mutasyonların işitme kaybının özel bir tipi olan sendromik olmayan resesif işitsel nöropatiye yol açtığı tespit edilmiştir (76). Hastalarda işitme kaybı değişik düzeylerde olmakla birlikte, hastalar normal otoakustik emisyon gösterirler (77). Bugüne kadar bu gende 40'dan fazla mutasyon rapor edilmiştir (78).

### **2.5.6. *CDH23(Cadherin 23-Otocadherin)***

Hücreler arası adezyon proteinleri süper ailesi olan kaderin ailesine dahil olan bu gen,  $Ca^{++}$  a bağlı hücre-hücre tutunma glikoproteinini kodlamaktadır. Protein 3354 aminoasit içermekte, tek transmembran domain ve 27 kaderin tekrarından oluşmaktadır (40). Sterosilianın tüy hücreleri kohezyonunda görevli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca erken tüy hücre farklılaşmasında ve sterosiliaların organizasyonunda da görevli olduğuna dair yayınlar mevcuttur (79). *CDH23* geni DFNB12 lokusunda ve 10q21-22 kromozom bölgesine haritalanmıştır. Gen 69 ekzondan oluşur (80). Retinada ve kokleada ifadelendiği gösterilmiştir (39). Gendeki mutasyonlar, otozomal resesif geçişli işitme kaybına neden olmakla birlikte, işitme kaybına, retinitis pigmentosanın da eşlik ettiği Usher sendromu Tip 1D'ye de neden olmaktadır (77). *CDH23* geninde şimdiye kadar 35'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (58)

### **2.5.7. *TMIE (Transmembrane Inner Ear-Expressed)***

*TMIE* geni, transmembran iç kulak proteini isimli bir proteini kodlamaktadır. Gen 3p21 kromozomal bölgesinde haritalanmış olup, DFNB6'da lokalizedir. 4 ekzondan oluşan genin birçok farklı dokuda eksprese olduğu bilinmektedir (81, 82). *TMIE* geni

etkilenmiş fare çalışmalarında gözlenen iç kulak patolojisi; genin normal bir doğum sonrası olgunlaşma sürecinde, kokleadaki duyusal tüy hücrelerinin olgunlaşması ve stereosilyaların da gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir (61). Gendeki mutasyonlar otozomal resesif geçişli, doğuştan ya da prelingual dönem başlangıçlı, ağırdan tama kadar olabilen, iç kulak anomalilerinin gözlenmediği sensörinöral tipte işitme kaybına yol açmaktadır (70). Bu güne kadar gende 6 mutasyon tanımlanmış olup, ekzon 3’de gözlenen p.R84W mutasyonunun Anadolu’da olası founder etki sonucunda daha sık gözlendiği rapor edilmiştir (70).

#### **2.5.8. *TECTA (Tectorin, Alpha)***

Bu gen  $\alpha$ -tektorin adlı bir protein kodlamakta olup  $\alpha$ -tektorin tektoryal membranların kollajen olmayan temel bileşenidir (77). Tektoryal membran iç kulağın özelleşmiş tüy hücrelerinin stereosilyaları ile bağlantı halindedir. Gen kodlayan 23 ekzondan oluşmakta olup, 11q23-q25 kromozom bölgesinde haritalanmıştır (83, 84).  $\alpha$ -tektorin 2155 aminoasitten oluşmaktadır. Gendeki mutasyonlar sonucu etkilenen protein domainine bağlı olarak, farklı fenotipik bulgularla karşılaşılmaktadır. Mutasyonlar hem otozomal dominant hem de otozomal resesif işitme kaybına yol açabilmektedir. Bugüne kadar gende 13 farklı mutasyon bildirilmiştir (58).

#### **2.5.9. *PCDH15 (Protocadherin 15)***

Protokaderin 15 isimli, kaderin protein ailesinin bir üyesi olan,  $Ca^{++}$  bağımlı hücre-hücre birleşme glikoproteinini kodlayan gen, normal koklea işlevi için önemlidir. *PCDH15*’in iç kulak tüy hücre stereosilyası ve retina fotoreseptörlerinde ifade edildiği yapılan immunohistokimyasal çalışmalar ile ortaya konulmuştur (85). *CDH23* ile birlikte bu iki genin tüy hücrelerinin mekanotransdüksiyon olayında gelişim ve rejenerasyon süreçlerinde önemli rol oynadığı da in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir (86). Gen 10q21-q22 kromozomal bölgesinde lokalizedir, 33 ekzon içermektedir ve kodlağı protein 1955 aminoasitten oluşmaktadır (87). Gendeki mutasyonlar, Usher Sendromu tip 1F ve otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkili bulunmuştur. Şimdiye kadar 14’den fazla mutasyon tanımlanmıştır (58).

#### **2.5.10. *TMC1 (Transmembrane Channel-Like Protein 1)***

*TMC1* geni *TMC* gen ailesi üyesi olup, çok geçişli bir transmembran proteinini kodlamaktadır. Gen 9. kromozomda q13-q21 bölgesinde lokalizedir. Genin 24 ekzonu bulunmakta, 3201 baz çifti büyüklüğünde mRNA’yı kodlamaktadır, proteini 87-kD

büyükliktedir (88). Proteinin iç kulaktaki fonksiyonu tam bilinmemekle birlikte, fare çalışmaları iç kulaktaki dış tüy hücrelerinde eksprese olduğunu göstermektedir (89). Mutasyonlarının hem otozomal dominant (DFNA36) hem de otozomal resesif (DFNB7/DFNB11) işitme kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Bugüne kadar 31 farklı resesif mutasyon belirlenmiştir. Genin resesif mutasyonları ağır veya tam, doğuştan işitme kaybına yol açmaktadır. Gendeki dominant mutasyonlar ise ilerleyici tipte işitme kaybına yol açmaktadır (89).

#### **2.5.11. *TMPRSS3 (Transmembrane Protease, Serine 3)***

Bu gen 21q22.3 kromozom bölgesinde yer almakta ve transmembran serin proteaz 3 isimli proteinini kodlamaktadır. Gen 13 ekson içermektedir (90). Genin birçok dokuda ve korti organının destek hücreleri ile stria vaskulariste ifade olduğu gösterilmiştir (91). Kodladığı proteinin amilorid duyarlı sodyum kanallarında ve endolenften sodyum geri alımında görevli olduğu düşünülmektedir (92). *TMPRSS3* mutasyonlarının doğuştan ve çocukluk çağı başlangıçlı olmak üzere iki farklı formda otozomal resesif işitme kaybına yol açtığı gösterilmiştir (91). Bu güne kadar gende 19 mutasyon bildirilmiştir (92).

#### **2.5.12. *TMHS(Tetraspan Membrane Protein Of Hair Cell Stereocilia) (LHFPL5-lipoma HMGIC fusion partner-like 5)***

Tüy hücreleri stereosiliyası tetraspan membran proteinini kodlayan gen, dört ekzon içermekte olup, 2162 baz çiftlik bir mRNA kodlamaktadır. Gen, ilk olarak farede 17. kromozom üzerinde haritalanmış olup, insan 6p21.31 kromozomal bölgesi ile homoloji göstermektedir (93). Genin protein ürünü ise 219 amino asitten oluşmakla birlikte, dört transmembran helikazı içerdiği düşünülmektedir (94). Farede bu proteine %60'dan fazla benzerlik gösteren iki protein (*LHFL3*, *LHFL4*) daha tespit edilmiştir, bu iki protein *TMHS* ile birlikte tetraspan süper ailesine dâhildir. Memelilerde bu aile başlıca beyin, spinal kord, retina gibi nöral dokularda ifade edilirler. *TMHS* apikal membran ve tüy hücreleri stereosiliyasında lokalize olduğu bilinen tek tetraspan proteindir. Tüy hücrelerinin morfogenezinde görevli olduğu ve gendeki mutasyonların vestibüler işlev bozukluğuna, korti dejenerasyonuna ve iç kulaktaki tüy yumaklarında anomalilere yol açabileceği düşünülmektedir. (93). Gendeki mutasyonlar otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş ve şimdiye kadar 4 mutasyon tanımlanmıştır (58).

## 2.6. MOLEKÜLER TEKNİKLER

### 2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan yöntem, spesifik bir DNA dizisinin canlı doku dışındaki bir ortamda çoğaltılması yöntemidir (95). Az miktardaki DNA ile hızlı çalışma imkânı sunması nedeniyle pek çok alanda kullanılmaktadır.

Yöntem temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır.

1. DNA'nın çift zincirli yapısının yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon-ayrılma),
2. Çoğaltılması hedeflenen bölgeye özgül sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing-yapışma)
3. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak zincirin uzaması (polimerizasyon-ekstansiyon-uzama)

Bu üç aşamaya bir PZR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Yaklaşık olarak 3-5 dakika (dk) arasında süren bu döngü, ortalama 20-40 kez tekrarlanır ve kalıp DNA'nın istenilen bölgesinin, döngü sayısı katı kadar çoğaltılmış olur ( $2^n$ ). Denatürasyon aşamasında yaklaşık 90-95 °C ısıya, 5-10 dakika süre ile maruz kalarak tek zincirli hale gelen DNA, daha sonraki aşamada 50-70 °C arasında bir ısıya maruz kalır. Bu aşamada tek zincirli DNA'nın uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidlerin bağlanması sağlanır. DNA sentezi 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda, bir önceki basamakta bağlanan oligonükleotidlerin kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapması ile gerçekleşir. Isıya dayanıklı polimeraz enziminin kullanıldığı bu aşamada, nükleotidler 5' ucundan 3' ucuna doğru eklenerek hedef DNA'nın iki zincirli kopyası oluşturulur (96).

PZR'da dikkat edilmesi hususlar kısaca özetlenecek olursa;

Bu reaksiyonun en kilit noktasında yer alan DNA polimeraz enziminin çalışabilmesi için uygun şartların sağlanması çok önemlidir. Her enzim gibi DNA polimeraz enziminin de en etkin olduğu bir pH değeri vardır. Ve reaksiyon boyunca bu pH ın korunabilmesi için tampon çözeltileri kullanılmaktadır. Ayrıca enzimin çalışmasını sağlayan en önemli iyon olan  $Mg^{+2}$ , oligonükleotidlerin DNA molekülüne bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Fazla miktardaki  $Mg^{+2}$ , enzimin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzimin aktivitesini düşürür ve hatta enzimin inaktive olmasına neden

olur. Oligoprimerlerin hedef bölgeye bağlanma aşamasındaki sıcaklık, annealing ısısı olarak da ifade edilmektedir ve oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu aşamada kullanılan uygun sıcaklık değeri reaksiyonun spesifikliğini arttırmaktadır.

Oligonükleotidlerin uzunluğu ( 15-30 nükleotid tercih edilmektedir), çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunması ve nükleotid içeriklerinin rastgele ancak orantılı olması, tekrarlayan diziler içermemesi önemlidir. Kullanılan her bir deoksiniükleotid trifosfatın (dNTP) konsantrasyonunun eşit olması ayrıca miktarının uygun olması gerekmektedir. dNTP miktarının az olması ürünün miktarının azalmasına, fazla miktarda kullanımı hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına sebep olmaktadır (95).

### **2.6.2. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi ya da sekanslama; DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi ile Fred Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen dideoksiniükleotid metodu DNA dizi analizi için iki temel tekniktir. Her iki teknikte de DNA'nın hazırlanma süreci, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezinden oluşan üç ana aşama mevcuttur.

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yönteminde; DNA'nın belirli bazlardan kırılması söz konusudur. Öncelikle dizisi saptanacak DNA parçacığının bir zinciri kullanılır. Bu zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif <sup>32</sup>P ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlayacaktır. Sonraki aşamada, her baz için bir adet olmak üzere dört ayrı kimyasal kesim reaksiyonu meydana gelir. Sonuçta farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış diziler elde edilir ve kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretlidirler ancak boyları farklılık göstermektedir. Elde edilen bu dört reaksiyon ürünleri, poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır ve uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılır (97). DNA parçacıklarının uçları daha öncesinde, radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemiyle bantlar görüntülenir ve böylece DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (95, 96).

Fred Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan ikinci yöntem ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zincirinin sentezi esasına dayanır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir. Dizisi belirlenecek olan DNA zinciri yeni

sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Yöntemde, PZR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla sentez gerçekleştirilir (95). Yöntemde; dizisi belirlenecek DNA örneği; polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP ve ddNTP ile tampon görevi gören maddeler kullanılır. Reaksiyonda kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır fakat 3' ucunda OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanır. Böylece farklı uzunlukta DNA parçacıkları elde edilir. Diğer yöntemde olduğu gibi edilen ürünler jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır ve uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılırak, DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır.

Günümüzde dizi analizi için otomatik sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerde radyoaktif izotoplar yerine floresan boyalar kullanılır. Sonuç olarak temelde PZR ürünlerinin floresan işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesine esasına dayanan bu sistemlerde ilk PZR sonrası elde edilen ürünler 'cycle sequencing' denilen yeni bir PZR döngüsüne tabi tutulur. Bu II. PZR aşamasında, ilk döngüden elde edilen ürünler kalıp DNA işlevini görür. DNA polimeraz varlığında primer yardımıyla floresan işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire girer ve reaksiyon normal PZR döngüsü gibi devam eder. İki PZR arasındaki temel fark primerin uzaması sırasında işaretli ddNTP'lerin bağlanması ile zincirin sonlanmasıdır.

Son olarak floresan işaretli bazlar kullanılan bu sistemlerde, amplifikasyon sonrası ürünler kapiller jelle yüklenir ve sistem üzerindeki lazer ışığı ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar. Bilgisayar programları yardımı ile her bir baz kendine özgü bir renk eğrisi ile gösterilir ve böylece istenilen bölgenin nükleotid dizisi belirlenmiş olur (95,96).

Çalışmamızda DNA Dizi analizi için yeni ve gelişmiş bir teknoloji kullanıldı. 96 kapillerli 3730 DNA Analizör (Applied Biosystems), yüksek performanslı, örnek başına düşük maliyetli DNA fragman analizleri ve geleneksel DNA sekans uygulamalarının yapılabildiği bir sistemdir. Yüksek optik hassasiyetinin yanı sıra, çoklu otomasyon özellikleri ile insan kaynaklı hataları minimize eder. Bu cihaz; mikrosatellite analizi, RFLP (Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), LOH (Heterozigotluk Kaybı), SSCP (Tek iplikcikli uygunluk polimorfizmi), SNP (Tek nükleotid



polimorfizmi) tarama gibi geniş çapta sekanslama ve fragment analizi uygulamalarında kullanılmaktadır.

### **2.6.3. Open Array Tekniği**

Mikroçip teknolojisi, küçük örnek hacimleri kullanılarak tek bir deneyde, gen ekspresyon analizleri ve SNP genotiplemelerini yapmayı mümkün kılan, tek bir çip üzerinde tüm genomu incelemeye olanak sağlayan son derece hızlı ve gelişmiş yöntemdir. İlk kez 1997 yılında Solinas-Toldo ve arkadaşları hedef bir diziyi cam matriks üzerine sabitleyerek mikroçiplerin temelini atmışlardır (98). Daha sonraki çalışmalarda, Pollack ve arkadaşları çip platformu üzerine cDNA dizisini sabitleyerek genom düzeyinde DNA'daki kopya sayısındaki değişmeleri incelemiştirler (99). Sonraki yıllarda bilgisayar ve mühendislik bilimlerindeki gelişmelere paralel ilerleyen bu teknoloji ile cam matriks üzerinde her biri spesifik bir geni temsil eden binlerce DNA parçasının (sentetik oligonükleotidler, cDNA'lar (Komplementer DNA), BAC (Bakteri yapay kromozomu), kozmitler ve PZR ürünleri gibi) yapıştirılması ile elde edilen çipler ile daha hızlı ve güvenilir veriler elde edilmeye başlandı. SNP mikroçiplerin de yardımı ile hastalığa veya hastalığa yatkınlığa neden olan genler saptanabilmekte ayrıca bu gelişmiş teknoloji kanser araştırmalarında, mutasyonların tespitinde, gen haritalanmasında, DNA dizi analizlerinde ve epigenetik modifikasyonlara yönelik çalışmalarda da kullanılabilir.

Yöntem temelde aşığıdaki basamaklar ile özetlenebilir.

1. Değerlendirilmesi istenilen hedef DNA, RNA ya da cDNA dizilerine tamamlayıcı diziler içeren problemleri içeren mikroçip platformları hazırlanır veya ticari olarak temin edilir.
2. İncelenecek örnekten floresan ile işaretlenmiş DNA, RNA ya da cDNA hazırlanır.
3. İşaretlenmiş DNA ya da cDNA ile mikroçip platformu uygun koşullarda hibridizasyona tabi tutulur.
4. Hibridizasyondan sonra fazla olan işaretli örnekleri ortamdaki uzaklaştırmak için cam matriksin yıkanır.
5. Yıkama sonrasında platform yüzeyinde hibridizasyonun varlığı, floresan lazer ile elde edilen ışımalar sayesinde bir dedektör yardımıyla algılanır.

6. Işıma emisyon spektrumu ölçülür.
7. Okunan emisyon spektrumu bilgisayar ortamına aktarılarak depolanır.
8. Depolanan görüntünün bir bilgisayar yazılımı aracılığıyla değerlendirilir.a

Bu aşamalar sonrasında mikroçip platformu üzerindeki hangi noktalarda hibridizasyon olduğu ve niceliksel olarak düzeyi değerlendirilerek yorumlanması yapılır (100).

Araştırmamızda kullanılan *TaqMan*® *OpenArray*® Genotipleme teknolojisi ise, fazla sayıda genotiplemenin az miktarda örnek ve sarf malzeme kullanılarak yapılabildiği, geniş uygulama alanı bulunan bir platformdur. Bu yöntem veri kalitesi ile çözünürlüğünün çok yüksek olmasından dolayı da tercih edilmektedir.

*OpenArray* yönteminde kullanılan pleytler mikroskop slaydı boyutlarındadır (63-mm × 19-mm). Her bir pleyt 48 alt array ve her bir alt array’de 64 kuyucuktan oluşur. Sonuç olarak pleytlerin üzerine yerleştirilmiş 3,072 reaksiyon kuyucuğu bulunmaktadır. Her bir kuyucuk 300 µm çap ve 300 µm derinlikte ve 33-nL’lik reaksiyon kapasitesine sahiptir. 256 SNP’ye kadar *TaqMan* genotipleme testlerinin (araştırmacının seçeceği), liyofilize halde pleyte yüklemesi yapılır ve kullanıma hazır halde araştırmacıya gönderilir.

Genotipleme deneyi, aynı zamanda allelik diskriminasyon deneyi olarak da adlandırılmakta olup, bilinmeyen bir örneğin genotipini saptamaya dönük son nokta deneyidir. Bu yöntem ile SNP’lerdeki iki alleli birbirinden ayırarak tespit etmemiz mümkün olmaktadır.

Söz konusu çipteki her bir probun 5’ ucunda raportör boya bulunmaktadır. *VIC*® boyası söz konusu SNP’teki 1. allelin, *FAM*™ boyası ise 2. allelin 5’ ucunda bulunur. Ayrıca her bir probun 5’ ucunda ileri ve geri primerler bulunmaktadır. Ayrıca her bir probda; probun uzunluğunu arttırmadan, erime sıcaklığının artmasına neden olan “*Minör Groove Binder*” bulunur ve bu modifikasyon prob boylarının daha kısa tasarlanmasına olanak sağlar. Son olarak problemlerin 3’ ucunda floresan vermeyen “*quencher*”lar bulunur ve böylece, gerçek zamanlı (real time) PZR sistemleri raportör floresan boyayı doğru olarak saptar.

Yöntem sonuç olarak bize, 1. allel homozigot, 2. allel homozigot ya da örneğimizin iki alleli de taşıyarak heterozigot olduğunu belirtir. Floresan boyalar kullanılarak elde edilen görüntüler son olarak diğer yöntemlerde olduğu gibi bilgisayar yazılımları aracılığıyla değerlendirilir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI**

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen aileler Kayseri ve çevresindeki İşitme Engelliler Okullarında yapılmış anket çalışması sonucunda belirlenmiştir (Bkz. Ek 1). Anne ve babanın akraba olması ve en az iki çocuğun işitme kaybı tanısı almış olması kriterlerine uyularak, aileler Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na görüşmeye çağrılmışlardır. Ayrıntılı klinik değerlendirmeye tabi tutularak, muayene edilen hastalarda işitme kaybının nedeninin herhangi bir sendromla ilişkili olmaması için özellikle Pendred, Usher, Brakio-oto-renal (BOR), Waardenburg ve Alport gibi sendromlar klinik olarak elimine edilmiştir. Sonuç olarak araştırmamıza iki ve daha fazla işitme engelli çocuğa sahip, ebeveynlerin akraba olduğu 21 aileden 122 birey dahil edilmiştir. Her bir aileye araştırma detaylı olarak anlatılmış, çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden ailelerden gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formları alınmıştır (Bkz. Ek 2).

Bu çalışmada örneklerin toplanması Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda ve *GJB2* geni sekans analizi ve bu gende mutasyon saptanamayan ailelerde mikroçip yöntemi ile bilinen 11 otozomal resesif işitme kaybına yol açan genin taranması Amerika Birleşik Devletleri, Miami Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Genetiği Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu komitesince 04.01.2011 tarihinde, 2011/53 karar numarası ile kabul edilmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-11-3483 nolu proje ile desteklenmiştir (Bkz. Ek 3).

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Periferik Kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için klasik fenol/kloroform yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için, araştırmaya katılan bireylerden, 1 mL 0,5 M Etilendiamintetraasetikası (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 mL kan örneği alındı.

#### 3.2.1.1. DNA izolasyonunda kullanılan malzemeler:

##### \* Disodyum etilendiamin tetraasetat (EDTA)

186,1 gr EDTA (AppliChem, Almanya) ve 800ml dH<sub>2</sub>O manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Yaklaşık 20 gr NaOH ile pH:8 'e ayarlanır. +4°C de saklanır.

##### \* Red Blood Cell (RBC) lizis solüsyonu

24 gr Amonyumklorid (AppliChem, Almanya), 2,4 gr Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya) ve 400 µl EDTA (0,5M pH:7) (AppliChem, Almanya), dH<sub>2</sub>O ile 2000 ml'ye tamamlanır (155 mM Amonyum Klorid; 10 mM Sodyum Bikarbonat; 0,5 mM EDTA). +4°C de saklanır.

##### \* Trisklorid (Tris HCL)

12,11 gr Tris (100Mm) (Amresco, Ohio, ABD) alınıp, 1 lt dH<sub>2</sub>O içinde çözülür. HCl ile pH:8'e ayarlanır. +4°C de saklanır.

##### \* Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

100 gr SDS (Merck, Almanya) 900 ml dH<sub>2</sub>O içinde 68°C' de eritilir. HCl ile pH: 7,2'ye ayarlanır ve 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

##### \* Nükleaz Solüsyonu (Sodyum Klorid, Tris Klorid, EDTA-STE)

2,336 gr Sodyum Klorid (NaCl) (0,1M) (Merck, Almanya), 4 ml Tris Klorid (Tris HCl) (10mM, pH: 8) ve 0,8 ml EDTA (1mM, pH:8) alınıp dH<sub>2</sub>O ile 400 ml'te tamamlanır. +4°C de saklanır.

##### \* Fenol-Kloroform

25 birim Fenol (Merck, Almanya), 24 birim Kloroform (Merck, Almanya) ve 1 birim İzoamilalkol (Merck, Almanya) alınıp, üzerine 1:1 oranında 100mM Tris HCl (pH:8) eklenir. +4°C de, koyu renkli camda saklanır.

**\* Sodyum Asetat (Na Asetat)**

408,1 gr Na asetat (Sigma, ABD), 800 ml dH<sub>2</sub>O ile karıştırılır, asetikasitle pH:7'ye ayarlanır. +4°C de saklanır.

**\* Tris-EDTA (TE)**

1 ml Tris HCl (1M pH: 8) ve 0,2 ml EDTA (0,5M pH: 8) alınıp, dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'te tamamlanır. +4°C de saklanır.

**3.2.1.2. DNA İzolasyon basamakları**

1. Alınan kan örneği falkon tüpüne (50 mL) konuldu ve içerisinde 25 mL RBC lizis solüsyonu eklendi.
2. 20 dk buzda bekletildi.
3. +4 °C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant döküldü.
4. Tüpün dibindeki pellet üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edildi. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlandı.
5. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklendi.
6. Bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklandı.
7. 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 SDS ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletildi.
8. Ertesi gün DNA izolasyonunda proteinlerin uzaklaştırılma işlemi başladı. Tüplere 1'e 1 oranında Fenol Kloroform eklenerek 10 dk çalkalandı.
9. Buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
10. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar Na Asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol eklendi.

11. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C' de bir gece bekletildi.
12. Üçüncü gün DNA'nın konsantrasyon ve çözeltide kalan nükleotid, amino asit ve çeşitli düşük molekül ağırlıklı kirliliklerin uzaklaştırılma işlemleri başladı. Tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü.
13. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µL %70'lik alkol eklendi ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
14. Santrifüj sonunda alkol döküldü ve tüpler kurutma kâğıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakıldı.
15. Kurutulduktan sonra tüp içerisine TE solüsyonu eklenip 37°C' de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.

Elde edilen DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonu spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler ile değerlendirildi. Saflık oranları genel olarak 1,8-2,4 aralığında konsantrasyonları ise ortalama 100 -500ng/µL aralığında saptandı.

Çalışmalar yapılan kadar izole edilen DNA örnekleri -20°C 'de saklandı.

### **3.2.2. Konneksin 26 (*GJB2*) Geninde Dizi Analizi ile Mutasyon Taraması**

#### **3.2.2.1. DNA örneklerinin PZR ile çoğaltılması**

Elde edilen 122 genomik DNA örneğinin 50'sinde ( her aileden 2 veya 3 birey ) öncelikle *GJB2* geninde mutasyon olup olmadığına bakıldı. *GJB2* genini amplifiye etmek ve dizi analizi yapmak için 2 çift primer kullanıldı. 1. primer çifti ile amplifiye edilen ve dizi analizi sonrasında okunamayan bölgeleri için 2. primer çifti kullanılarak işlemler tekrarlandı. Kullanılan primer dizileri ve PZR koşulları aşağıda verilmiştir.

*GJB2* Geni Ekzon 1 için primer çifti:

Primer 1F 5' CCG GGA AGC TCT GAG GAC 3'

Primer 1R 5' GCA ACC GCT CTG GGT CTC 3'

Tablo 3.1. *GJB2* Geni, 1. Ekzon için I. PZR İçeriği (*AmpliTaq Gold* (hazır kit) protokolü)

dH <sub>2</sub> O	4.5 µl
GC Enhancer	5 µl
İleri (Forward) primer	1 µl
Geri (Reverse) primer	1 µl
DNA	1 µl
MasterMix	12.5 µl
Reaksiyon Volümü	25µl

Tablo 3.2. *GJB2* Geni, 1. Ekzon için I. PZR Protokolü

Denatürasyon	95	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	35 döngü
Yapışma ve Uzama	60 °C	30 sn	
	72°C	30 sn	
Final uzama	72°C	7 dk.	

Ekzon 2 için primer çifti:

Primer 2F 5'GCT TAC CCA GAC TCA GAG AAG 3'

Primer 2R 5' TGA GCA CGG GTT GCC TCA TC 3'

Tablo 3.3. *GJB2* Geni 2. Ekzon için I. PZR İçeriği

dH <sub>2</sub> O	17 µl
10X buffer	2,5 µl
dNTP	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
İleri (Forward) primer	0,6 µl
Geri (Reverse) primer	0,6 µl
DNA	1 µl
Taq	0,2 µl
Reaksiyon Volümü	25 µl

Tablo 3.4. *GJB2* Geni 2. Ekzon için I. PZR Protokolü

Denatürasyon	94°C	3 dk	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	65°C	30 sn	2 döngü
	72°C	30 sn	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	63°C	30 sn	2 döngü
	72°C	30 sn	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	61°C	30 sn	2 döngü
	72°C	30 sn	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	59°C	30 sn	2 döngü
	72°C	30 sn	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	57°C	30 sn	2 döngü
	72°C	30 sn	
Denatürasyon	94°C	5 sn	
Yapışma ve Uzama	55°C	30 sn	2 döngü
	72°C	45 sn	
Final Uzama	72°C	3 dk.	

### 3.2.2.2. Amplifiye Edilen Örneklerin Agaroz Jelde Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi, DNA parçalarının ayrılması ve tanımlanması için standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Jeldeki DNA bantları, jel hazırlanırken kullanılan etidyum bromürün etkisi ile jelin mor ötesi ışık altında değerlendirilmesi ile saptanabilmektedir. Yöntem temel olarak büyüklüğü bilinen bir boyut belirteci kullanılarak, büyüklüğü bilinmeyen DNA moleküllerinin tespit edilme esasına dayanır (101). Bu çalışmada PZR ürünleri %2'lik agaroz (Sigma, ABD) jelde değerlendirildi. Agaroz jel, değerlendirilecek PZR ürününün baz çifti uzunluğuna göre belirli konsantrasyonlarda hazırlanmaktadır. Jel için 1 gr agaroz tartılıp ve TBE 1X solüsyonu



ile 50 ml total hacime tamamlandı. TBE 1X solüsyonu, stok olarak hazırlanan TBE 5X solüsyonundan deiyonize su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı.

\*TBE 5X stok solüsyonu;

54 gr Tris (Amresco, Ohio, ABD),

27,5 gr Borik asit (AppliChem, Almanya),

20 mililitre 0,5 M EDTA (AppliChem, Almanya)

Karışım; deiyonize su ile 1 litre hacme tamamlanarak hazırlanır.

Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. Üzerine 2 µl Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya) ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra içine taraklar yerleştirilmiş olan jel kalıbına (Owl Scientific, ABD) döküldü. Agarozun polimerize olması için 15-20 dk beklendi. Kalıptan taraklar uzaklaştırıldı. Polimerize olman jel, içerisinde 0.5X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir PZR ürününden 5 µl, 5 µl Bromfenol mavisi (Merck, Almanya) ile muamele edilerek jele yüklendi. PZR ürünlerinin doğru değerlendirilebilmesi için 15-20 µl kadar boyut belirleyicisi (MBI Fermentas, Litvanya) PZR ürünleri ile birlikte jele yüklendi. 100 volt akımda 40-50 dk kadar yürütüldü (SCIE-PLAS, İngiltere). Ultraviyole ışık veren transillüminatörde (Light VUTM, Owl Scientific, ABD) incelendi.

### **3.2.2.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması-pürifikasyonu-Birinci pürifikasyon**

İncelenecek gen bölgesinin çoğaltılması sonrasında PZR ürünlerinin saflaştırılması, diğer bir ifade ile temizlemesi gerekmektedir. Bu nedenle saflaştırma işlemi sefadeksli pleytler ile gerçekleştirildi. Pleytteki kuyucuklar toz halindeki sefadeks (Sigma, ABD) ile doldurulduktan sonra her kuyucuğa 300 µl deiyonize su eklendi. Üzeri kaplandı. 2 saat oda ısısında bekletildi. Altına boş bir pleyt yerleştirilerek 25°C, 850 G'de, 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki pleyt biriken su atıldı ve kuyucuklara 150 µl deiyonize su eklendi. Tekrar altına boş bir pleyt yerleştirilerek 25°C, 850 G'de, 5 dk. santrifüj edildi. Alttaki pleyt atılarak yerine yeni pleyt yerleştirildi ve kenarlardan bantlandı. PZR sonrasında elde ettiğimiz ürünlere 4 µl SOPE (Solid phase Oligo/Protein Elimination) (Vh Bio, İngiltere) eklendi. SOPE ile karışan PZR ürünleri safadeksli pleytlere yüklendi. Tekrar 25°C, 850 G' de, 5 dk santrifüj edildi. Altaki pleyte geçen temizlenmiş PZR ürünlerimiz ikinci PZR için kullanılmak üzere hazırlanmış oldu.

#### 3.2.2.4. Dizi analizi için PZR-II. PZR-Sekans PZR

Dizi analizi için kalıp DNA olarak temizlenen PZR ürünleri kullanıldı. Primer dizisi ilk PZR’ da kullanılan dizi ile aynı idi. Reaksiyonlar için CEQ2000XL Beckman Coulter, ABD cihazı kullanıldı. Reaksiyon bittiğinde, reaksiyonda kullanılan Big Dye’in ışıktan etkilenmemesi için pleyt alüminyum folyo ile kaplandı.

Tablo 3.5. *GJB2* Geni II. PZR İçeriği-Big Dye Reaksiyonu

Big Dye (Big Dye Terminator Ready Reaction Mix)	0,75 µl
5x Sekans Tamponu (5xSequencing Buffer)	2 µl
Kalıp DNA	1,5 µl
Primer (tek yön, geri veya ileri) (0.1 ug/ul)	0,75 µl
Deiyonize su	5 µl
Reaksiyon Volümü	10 µl

Tablo 3.6. *GJB2* Geni II. PZR Protokolü

96°C	1dk	25 döngü
96°C	10 sn	
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	
40°C	5 dk	

#### 3.2.2.5. PZR ürünlerinin saflaştırılması-pürifikasyonu-İkinci pürifikasyon

Birinci pürifikasyon işlemine benzer şekilde, pleyttteki kuyucuklar toz halindeki sefadeks ile doldurulduktan sonra her kuyucuğa 300 µl deiyonize su eklendi. Üzeri kaplandı. 2 saat oda ısısında bekletildi. Altına boş bir pleyt yerleştirilerek 25°C, 850 G’de, 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki pleyt biriken su atıldı ve kuyucuklara 150 µl deiyonize su eklendi. Tekrar altına boş bir pleyt yerleştirilerek 25°C, 850 G’de, 5 dk. santrifüj edildi. Alttaki pleyt atılarak yerine yeni pleyt yerleştirildi ve kenarlardan bantlandı. 10 µl deiyonize su ve 10 µl II. PZR sonrasında elde ettiğimiz,

aluminyum folyoya sarılı pletteki ürünler ikinci kez yıkanmış olan sefadeksli pleyte yüklendi. Tekrar 25°C, 850 G'de, 5 dk santrifüj edildi. Altaki pleyt'e geçen temizlenmiş PZR ürünlerimiz dizi analizi için kullanılmak üzere hazırlanmış oldu. Işıktan etkilenmemesi için tekrar aluminyum folyo ile kaplandı. Otomatik DNA dizi analiz cihazı, AB (Applied Biosystem) 3730 cihazına folyo paketinden çıkartılarak yüklendi.

Cihazdan alınan veriler doğrultusunda *GJB2* geni NCBI (National Center for Biotechnology Information) referans dizileri ile karşılaştırılarak analiz edildi.

### **3.2.3. Open Array yöntemi ile tarama çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Taranacak SNP'ler ve seçimleri**

*GJB2* geninde sekans çalışmaları sonucunda mutasyon saptanmayan 12 aileye *open array* yöntemi ile 128 SNP kullanılarak 11 gen açısından taramalar yapılmıştır.

Araştırılmış olan genler *SLC26A4*, *MYO7A*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*, *TMIE*, *TECTA*, *PCDH15*, *TMC1*, *TMPRSS3*, *LHFPL5*'dir. Genler Türk toplumunda en sık işitme kaybına yol açan genler arasından seçilmiştir (102). *Open array* platformuna yerleştirilecek olan SNP'ler <http://pga.gs.washington.edu/> sitesinden belirlendi. Her gen için SNP'ler; genin lokalizasyonu göz önünde bulundurularak, öncelikle genlerin içinden ve 15000 baza kadar 5' ve 3' tarafından seçildi. Küçük allel frekans 0.2 ve üzerinde olan ve birbiriyle bağlantı dengesizliğinde (LD; linkage disequilibrium) olmayan (LD 0,8'in üzerinde olan belirteçler çalışmaya alınmadı) SNP'ler çalışmada değerlendirildi.

Araştırılan her gen için seçilen SNP'ler aşağıdaki tablolarda mevcuttur. Tablolarda kalın harflerle yazılmış satırlar, söz konusu SNP'in, ilgili genin içinden seçildiğini belirtmektedir.

Tablo 3.7. *SLC26A4* geni için seçilmiş SNP'ler

	dbSNP131	Genomik pozisyonu	ABI ASSAY ID
1	rs7778250	Kromozom: 7: 107224565	C-25645841-10
2	rs2712227	Kromozom: 7: 107305115	C-16059028-10
3	rs2395910	Kromozom: 7: 107309812	C-16223518-10
4	rs10276013	Kromozom: 7: 107317175	C-11431989-10
5	rs6970857	Kromozom: 7: 107323209	C-26938307-10
6	rs1858929	Kromozom: 7: 107328315	C-11609755-10
7	rs1858930	Kromozom: 7: 107328537	C-11609754-10
	<b><i>SLC26A4</i></b>	<b>Kromozom: 7: 107332335-107358250</b>	
8	rs12667481	Kromozom: 7: 107359384	C-3176209-10
9	rs10235244	Kromozom: 7: 107366884	C-30537324-10
10	rs3735605	Kromozom: 7: 107423254	C-25637184-10
11	rs1008707	Kromozom: 7: 107425684	C-2193560-10
12	rs929393	Kromozom: 7: 107437048	C-8856481-10
13	rs989960	Kromozom: 7: 107445727	C-346537-10

Tablo 3.8. *MYO7A* geni için seçilmiş SNP'ler

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs948977	Kromozom: 11:76801982	C-3242287-10
2	rs1043418	Kromozom: 11:76836350	C-9597709-20
3	rs1043420	Kromozom: 11:76836439	C-9597710-10
4	rs7943716	Kromozom: 11:76837499	C-2134008-10
	<b><i>MYO7A</i></b>	<b>Kromozom: 11:76839310-76926286</b>	
5	<b>rs7945715</b>	<b>Kromozom: 11:76840360</b>	<b>C-29272730-10</b>
6	<b>rs6592708</b>	<b>Kromozom: 11:76859758</b>	<b>C-31730768-10</b>
7	<b>rs11605022</b>	<b>Kromozom: 11:76872414</b>	<b>C-3242314-10</b>
8	<b>rs11607721</b>	<b>Kromozom: 11:76881988</b>	<b>C-12034431-10</b>
9	<b>rs12805873</b>	<b>Kromozom: 11:76898728</b>	<b>C-3242251-10</b>
10	<b>rs2276285</b>	<b>Kromozom: 11:76901927</b>	<b>C-15881246-10</b>
11	<b>rs11237122</b>	<b>Kromozom: 11:76920003</b>	<b>C-26901290-20</b>
12	<b>rs12793619</b>	<b>Kromozom: 11:76921358</b>	<b>C-1537353-30</b>
	<b><i>MYO7A</i></b>	<b>Kromozom: 11:76839310-76926286</b>	

Tablo 3.9. *MYO15A* geni için seçilmiş SNP'ler

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs2955371	Kromozom: 17:17967397	C-53286-10
2	rs2230316	Kromozom: 17:17997209	C-12115996-10
3	rs721669	Kromozom: 17:18005073	C-2278922-1
	<b><i>MYO15A</i></b>	<b>Kromozom: 17:18012020-18083115</b>	
4	<b>rs854787</b>	<b>Kromozom: 17:18035019</b>	<b>C-7443180-20</b>
5	<b>rs854786</b>	<b>Kromozom: 17:18036283</b>	<b>C-7443190-10</b>
6	<b>rs2280777</b>	<b>Kromozom: 17:18041507</b>	<b>C-2601396-1</b>
7	<b>rs712270</b>	<b>Kromozom: 17:18057167</b>	<b>C-2601405-30</b>
8	<b>rs712274</b>	<b>Kromozom: 17:18064195</b>	<b>C-7443248-10</b>
	<b><i>MYO15A</i></b>	<b>Kromozom: 17:18012020-18083115</b>	
9	rs8071834	Kromozom: 17:18099991	C-9243787-10
10	rs2746025	Kromozom: 17:18151611	C-1633109-10
11	rs2071242	Kromozom: 17:18151611	C-15868525-20

Tablo 3.10. *OTOF* geni için seçilmiş SNP'ler.

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs11674089	Kromozom: 2:26587076	C-2039619-10
2	rs2280516	Kromozom: 2:26677810	C-15970387-20
	<b>OTOF</b>	<b>Kromozom: 2:26680072-26781566</b>	
3	rs2272069	Kromozom: 2:26699855	C-442982-1
4	rs12052886	Kromozom: 2:26711829	C-1836942-10
5	rs869440	Kromozom: 2:26723697	C-8721918-10
6	rs939817	Kromozom: 2:26733500	C-7861665-10
7	rs6746918	Kromozom: 2:26742511	C-244579-10
8	rs1879760	Kromozom: 2:26750645	C-11751215-10
9	rs4665874	Kromozom: 2:26759848	C-11751247-10
10	rs6547103	Kromozom: 2:26775560	C-319654-20
11	rs13029128	Kromozom: 2:26776725	C-31125434-10
	<b>OTOF</b>	<b>Kromozom: 2:26680072-26781566</b>	
12	rs1011108	Kromozom: 2:26782621	C-189455-10
13	rs939815	Kromozom: 2:26791454	C-7864223-10

Tablo 3.11. *CDH3* geni için seçilmiş SNP'ler.

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
	<b><i>CDH23</i></b>	<b>Kromozom: 10:73156704-73575702</b>	
1	<b>rs10823751</b>	<b>Kromozom: 10:73198999</b>	<b>C-31629702-20</b>
2	<b>rs4747153</b>	<b>Kromozom: 10:73199501</b>	<b>C-25760641-10</b>
3	<b>rs7903717</b>	<b>Kromozom: 10:73215319</b>	<b>C-31629720-10</b>
4	<b>rs2211204</b>	<b>Kromozom: 10:73224374</b>	<b>C-2101692-10</b>
5	<b>rs2039861</b>	<b>Kromozom: 10:73266187</b>	<b>C-11655891-10</b>
6	<b>rs10762454</b>	<b>Kromozom: 10:73303755</b>	<b>C-2101769-10</b>
7	<b>rs1665688</b>	<b>Kromozom: 10:73417236</b>	<b>C-8862842-10</b>
8	<b>rs1227048</b>	<b>Kromozom: 10:73434279</b>	<b>C-8862820-10</b>
9	<b>rs9415986</b>	<b>Kromozom: 10:73439975</b>	<b>C-2154936-10</b>
10	<b>rs7917781</b>	<b>Kromozom: 10:73537388</b>	<b>C-2154837-10</b>
11	<b>rs10762480</b>	<b>Kromozom: 10:73537978</b>	<b>C-2154835-10</b>
12	<b>rs3802709</b>	<b>Kromozom: 10:73545236</b>	<b>C-2154828-10</b>
	<b><i>CDH23</i></b>	<b>Kromozom: 10:73156704-73575702</b>	



Tablo 3.12. *TMIE* geni için seçilmiş SNP'ler.

	dbSNP131	Genomik pozisyonu	ABI ASSAY ID
	<i>TMIE</i>	<b>Kromozom: 3:46742823-46752413</b>	
1	<b>rs28942097</b>	<b>Kromozom: 3:46750654</b>	<b>C-27860794-10</b>
	<i>TMIE</i>	<b>Kromozom:3:46742823-46752413</b>	

Tablo 3.13. *TECTA* geni için seçilmiş SNP'ler.

	dbSNP131	Genomik pozisyonu	ABI ASSAY ID
1	rs12795310	Kromozom: 11:120931054	C-1316345-20
2	rs10892668	Kromozom: 11:120937637	C-1316340-10
	<b><i>TECTA</i></b>	<b>Kromozom :11:120973375-121061513</b>	
3	<b>rs504626</b>	<b>Kromozom: 11:120976428</b>	<b>C-1316313-10</b>
4	<b>rs1829</b>	<b>Kromozom: 11:120981408</b>	<b>C-1316378-10</b>
5	<b>rs536069</b>	<b>Kromozom: 11:120996292</b>	<b>C-613404-1</b>
6	<b>rs10502247</b>	<b>Kromozom: 11:120998942</b>	<b>C-22274876-10</b>
7	<b>rs1893023</b>	<b>Kromozom: 11:121004151</b>	<b>C-1316403-10</b>
8	<b>rs11218158</b>	<b>Kromozom: 11:121014228</b>	<b>C-1316432-10</b>
9	<b>rs11218161</b>	<b>Kromozom: 11:121015711</b>	<b>C-32027662-10</b>
10	<b><i>TECTA</i></b>	<b>Kromozom: 11:120973375-121061513</b>	
11	rs618523	Kromozom: 11:121061986	C-613460-10
12	rs688099	Kromozom: 11:121072088	C-613471-10
13	rs948381	Kromozom: 11:121111458	C-3117744-20

Tablo 3.14. *PCDH15* geni için seçilmiş SNP'ler.

	dbSNP131	Genomik pozisyonu	ABI ASSAY ID
	<i>PCDH15</i>	<b>Kromozom: 10:55562535-56561051</b>	
1	rs11003876	<b>Kromozom: 10:55594049</b>	<b>C-30959216-10</b>
2	rs10763012	<b>Kromozom: 10:55601509</b>	<b>C-30959226-10</b>
3	rs1900414	<b>Kromozom: 10:55666743</b>	<b>C-1704626-10</b>
4	rs11003961	<b>Kromozom: 10:55735549</b>	<b>C-27067171-10</b>
5	rs718309	<b>Kromozom: 10:55781181</b>	<b>C-815142-10</b>
6	rs11004085	<b>Kromozom: 10:55884408</b>	<b>C-31911324-20</b>
7	rs10733925	<b>Kromozom: 10:55896722</b>	<b>C-479365-10</b>
8	rs725612	<b>Kromozom: 10:55953028</b>	<b>C-1085873-20</b>
9	rs10825279	<b>Kromozom: 10:55973589</b>	<b>C-25643500-10</b>
10	rs920526	<b>Kromozom: 10:56054752</b>	<b>C-2185771-10</b>
11	rs2026414	<b>Kromozom: 10:56208736</b>	<b>C-2749632-20</b>
12	rs1930165	<b>Kromozom: 10:56301930</b>	<b>C-12114560-10</b>
13	rs1930164	<b>Kromozom: 10:56302037</b>	<b>C-12114555-10</b>
14	rs1937392	<b>Kromozom: 10:56395812</b>	<b>C-276781-10</b>
15	rs10763138	<b>Kromozom: 10:56511366</b>	<b>C-1818641-10</b>
16	rs1336194	<b>Kromozom: 10:56532036</b>	<b>C-8815240-10</b>
	<i>PCDH15</i>	<b>Kromozom:10:55562535-56561051</b>	

Tablo 3.15. *TMC1* geni için seçilmiş SNP'ler.

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs7875995	Kromozom: 9:75172587	C-29351789-10
2	rs7873761	Kromozom: 9:75175048	C-27111860-10
3	rs17057904	Kromozom: 9:75181511	C-34342586-10
	<b><i>TMC1</i></b>	<b>Kromozom: 9:75192818-75445445</b>	
4	<b>rs16764</b>	<b>Kromozom: 9:75206393</b>	<b>C-7706893-10</b>
5	<b>rs13285932</b>	<b>Kromozom: 9:75211603</b>	<b>C-31993766-10</b>
6	<b>rs970386</b>	<b>Kromozom: 9:75226846</b>	<b>C-8342576-10</b>
7	<b>rs1417614</b>	<b>Kromozom: 9:75295593</b>	<b>C-7706534-10</b>
8	<b>rs1341032</b>	<b>Kromozom: 9:75352123</b>	<b>C-8342475-10</b>
9	<b>rs746786</b>	<b>Kromozom: 9:75367604</b>	<b>C-7704160-10</b>
10	<b>rs895080</b>	<b>Kromozom: 9:75368525</b>	<b>C-7704148-20</b>
11	<b>rs1663763</b>	<b>Kromozom: 9:75369006</b>	<b>C-8342234-10</b>
12	<b>rs1550760</b>	<b>Kromozom: 9:75375810</b>	<b>C-7704137-10</b>
	<b><i>TMC1</i></b>	<b>Kromozom: 9:75192818-75445445</b>	

Tablo 3.16. *TMPRSS3* geni için seçilmiş SNP'ler.

	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs1079380	Kromozom: 21:43770283	C-1723949-1
2	rs424694	Kromozom: 21:43789772	C-772646-10
3	rs2839490	Kromozom: 21:43789854	C-11369609-10
4	rs462149	Kromozom: 21:43789899	C-825159-10
	<b><i>TMPRSS3</i></b>	<b>Kromozom: 21:43791996-43803860</b>	
5	<b>rs225310</b>	<b>Kromozom: 21:43793723</b>	<b>C-825161-10</b>
6	<b>rs1078272</b>	<b>Kromozom: 21:43796913</b>	<b>C-825165-10</b>
7	<b>rs1109352</b>	<b>Kromozom: 21:43799723</b>	<b>C-9476589-20</b>
8	<b>rs225430</b>	<b>Kromozom: 21:43801712</b>	<b>C-825166-1</b>
	<b><i>TMPRSS3</i></b>	<b>Kromozom: 21:43791996-43803860</b>	
9	rs10887973	Kromozom: 21:43806193	C-1724018-1
10	rs9981624	Kromozom: 21:43825722	C-30520387-10
11	rs9980448	Kromozom: 21:43839730	C-30250240-10
12	rs13052676	Kromozom: 21:43852232	C-1724086-10

Tablo 3.17. *TMHS* geni için seçilmiş SNP'ler.

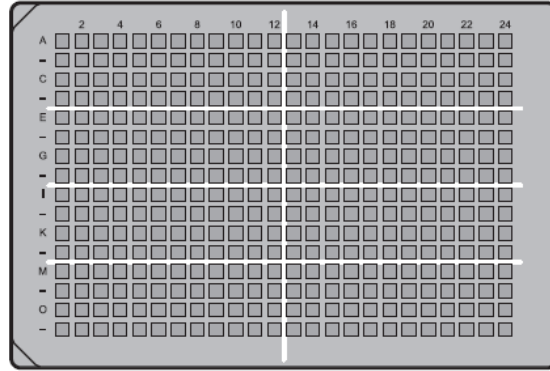
	<b>dbSNP131</b>	<b>Genomik pozisyonu</b>	<b>ABI ASSAY ID</b>
1	rs1343796	Kromozom: 6:35739341	C-7516821-10
2	rs10807154	Kromozom: 6:35742308	C-1979170-10
3	rs2817012	Kromozom: 6:35760403	C-1979125-20
4	rs2817013	Kromozom: 6:35761684	C-15812392-10
5	rs6921084	Kromozom: 6:35761781	C-29875367-10
	<b><i>TMHS</i></b>	<b>Kromozom: 6:35773071-35791852</b>	
6	rs1049649	Kromozom: 6:35803192	C-3157452-1
7	rs2395637	Kromozom: 6:35820544	C-3157425-10
8	rs7752049	Kromozom: 6:35723417	C-29416155-10
9	rs2817057	Kromozom: 6:35734884	C-15812486-20
10	rs2817064	Kromozom: 6:35741963	C-1979171-10
11	rs9470094	Kromozom: 6:35752792	C-1979143-10
12	rs12211728	Kromozom: 6:35755658	C-32201913-20

### 3.2.3.2. DNA örneklerinin *Open Array* Yöntemi için Standardizasyonu ve Hazırlanması

DNA örnekleri Thermo Nanodrop spektrofotometresi ile konsantrasyon ve saflık açısından değerlendirildi ve uygun olmayan örnekler için DNA izolasyonu tekrarlandı.

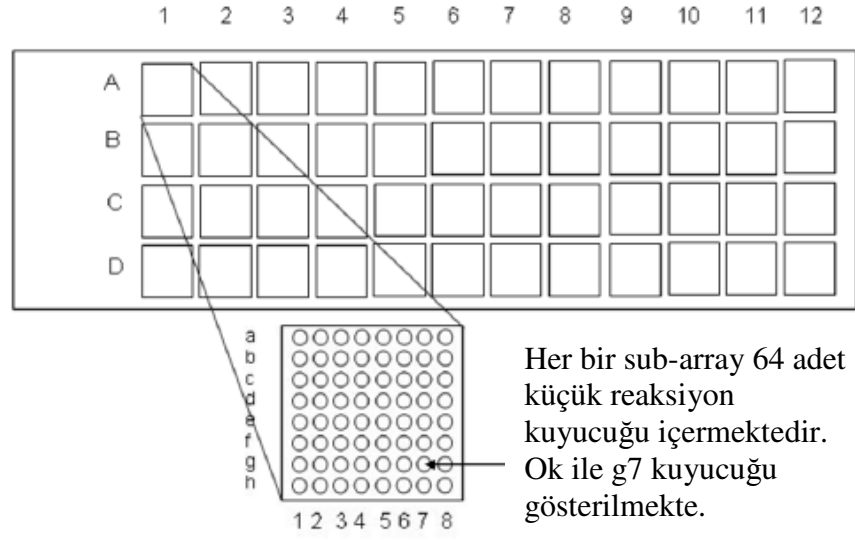
Çalışmaya 50 ng/μL çift zincirli genomik DNA ile başlandı. Konsantrasyonu fazla olan örnekler nükleaz içermeyen deiyonize su ile seyreltilti.

Standardize edilmiş olan 10 mikrolit DNA örnekleri OpenArray 384-Kuyucuklu Örnek Pleyti'ne (OpenArray® 384-Well Sample Plates- Applied Biosystems ) (Şekil 3.1) aktarıldı. Her kuyucuğa 10 mikrolit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) yüklendi. Bu pleyt, TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Miksi ve DNA örneklerinin karıştırılması için kullanılır. 1000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.



Şekil 3.1 OpenArray 384-Kuyucuklu Örnek Pleytinin Şematik Gösterimi

Daha sonra hazırlanmış olan örnekler, genotipleme pleytine (TaqMan OpenArray Genotyping Plate, Custom Format 128) ( Şekil 3.2) otomatik bir yükleyici sistem olan OpenArray AutoLoader (Biomex FX P, Laboratory Automation Workstation) (Şekil 3.3) ile aktarıldı.

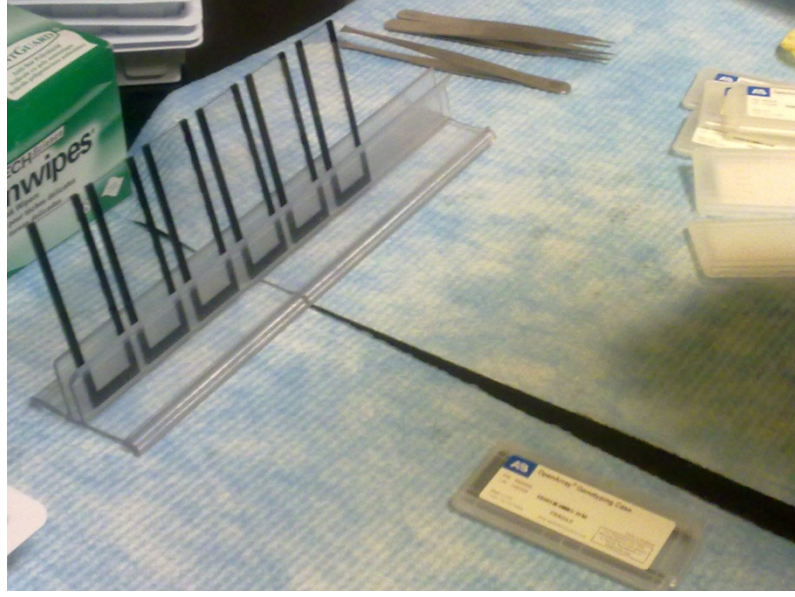


Şekil 3.2. Genotipleme Çipinin Şematik gösterimi

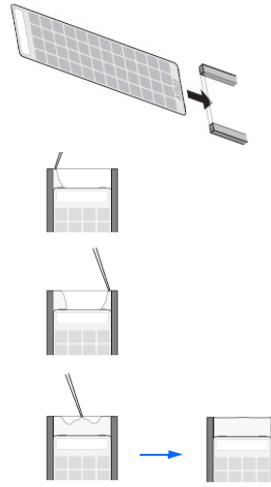


Şekil 3.3. OpenArray AutoLoader (Beckman Biomek FX P, Laboratory Automation Workstation). Örnek pleytinden, genotipleme çiplerine aktarım sağlanır.

TaqMan® OpenArray® Genotipleme kasetlerinin 2/3'lük kısmı OpenArray® Immersion yağı ile dolduruldu ve genotipleme çipleri, TaqMan® OpenArray® Genotipleme kasetinin (Şekil 3.4) içine dikkatlice yerleştirilir.



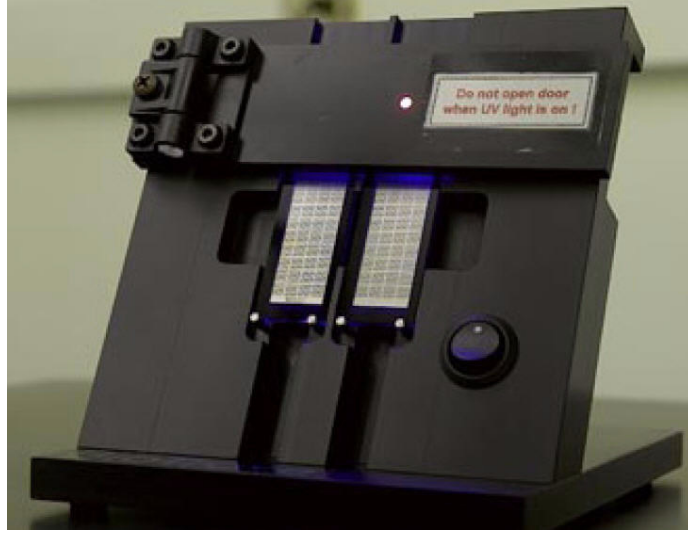
Şekil 3.4. TaqMan® OpenArray® Genotipleme kasetleri



Şekil 3.5. Kasetlerin kapatılması işleminin şematik gösterimi

Sonraki aşamada genotipleme çiplerini içine yerleştirdiğimiz kasetlerin açık olan ucu bir çeşit tutkal (OpenArray® Sealing Glue) ile kapatıldı (Şekil 3.5).





Şekil 3.6. OpenArray® Case Sealing Station

Tutkalın kuruması için cihaza (OpenArray® Case Sealing Station) (Şekil 3.6) yüklendi. Kurutma işlemi yaklaşık 90 sn sürdü.

Hazırlanmış olan örnekler PZR için Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 cihazına yüklendi. Kullanılan PZR protokolü (Tablo 3.19) aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.18 *Open Array* yönteminde kullanılan PZR Protokolü

Sıcaklık	93	95	94	53	25	4
Süre	10 dk	0.45 dk	0.13 dk	2.14 dk	2 dk	-
		50 döngü				

PZR aşaması sonrasında çipler karanlıkta muhafaza edilerek OpenArray® Görüntüleme Cihazına yüklendi. Son aşama verilerin analiz aşamasıdır.

## **4. BULGULAR**

Bu araştırma ebeveynlerin akraba olduğu, sendromik olmayan, doğuştan ağır-total sensörinöral işitme kaybına sahip, iki veya daha fazla sayıda çocuğu olan 21 aileden 122 birey ile yapılmıştır. Çalışmaya katılan gönüllülerin cinsiyetleri ve işitme kayıplı bireyler tablo 4.1 gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Fenotipleri

Birey No.	Cinsiyet	İşitme Kaybı	Birey No.	Cinsiyet	İşitme Kaybı	Birey No.	Cinsiyet	İşitme Kaybı
901-101	M	*	906-101	F		913-101	M	
901-102	F	*	906-102	F	*	913-102	M	*
901-103	F	*	906-103	M	*	913-103	M	*
901-104	M	*	906-201	M		913-201	M	
901-105	F		906-301	F		913-301	F	
901-301	F	*	906-501	M	*	914-101	F	*
901-501	F	*	906-521	F	*	914-102	M	*
901-502	F	*	907-101	F		914-201	M	
901-521	F		907-102	M		914-301	F	
901-531	M		907-103	F	*	915-101	F	*
902-101	M	*	907-104	F	*	915-102	M	
902-102	F		907-105	M	*	915-103	F	*
902-103	F	*	907-201	M		915-201	M	
902-104	F		907-301	F		915-301	F	
902-105	F	*	908-101	M	*	916-101	F	
902-202	F		908-102	F		916-102	M	*
902-301	F		908-103	F	*	916-103	M	*
902-302	M		908-104	F		916-201	M	
902-501	M	*	908-201	M		916-301	F	
902-502	M	*	908-301	F		917-101	F	*
902-503	M	*	908-501	M	*	917-102	M	*
903-101	F	*	908-502	F	*	917-201	M	
903-102	F	*	909-101	M		917-301	F	
903-103	M	*	909-102	F	*	918-101	F	*
903-201	M		909-103	M	*	918-102	F	*
903-301	F		909-201	M		918-103	M	
904-101	F	*	909-301	F		918-201	M	*
904-102	M		910-101	M	*	918-301	F	*
904-103	M	*	910-102	F	*	919-101	F	*
904-104	M	*	910-201	M		919-102	F	
904-201	M		910-301	F		919-103	M	*
904-301	F		911-101	F	*	919-201	M	
905-101	M	*	911-102	M	*	919-301	F	
905-102	F	*	911-201	M		920-101	F	*
905-201	M		911-301	F		920-102	M	
905-301	F		912-101	M	*	920-103	M	*
905-302	F		912-102	F	*	920-201	M	
905-401	M		912-201	M	*	920-301	F	
905-501	M	*	912-301	F		938-101	F	*
			912-801	F		938-102	M	*
						938-201	M	
						938-301	F	

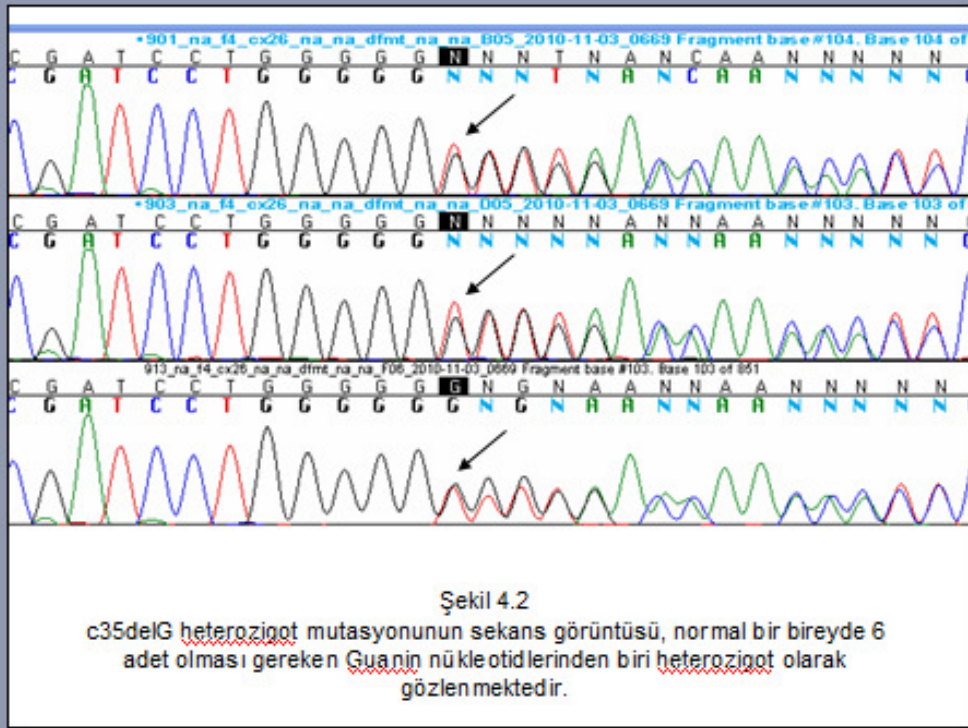
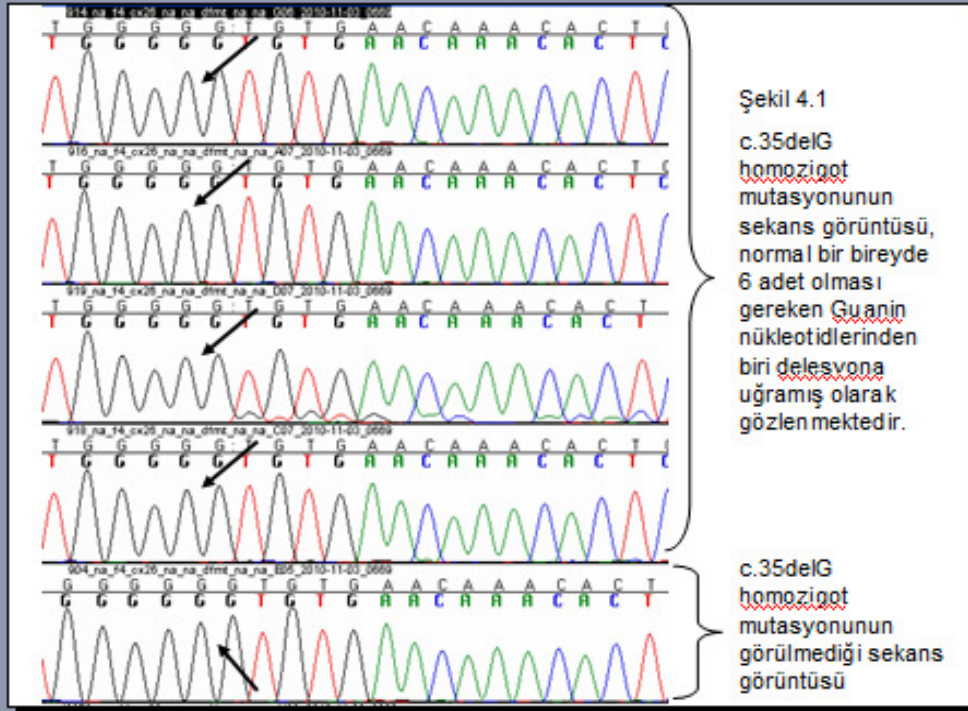
#### 4.1. *GJB2* GENİ SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI

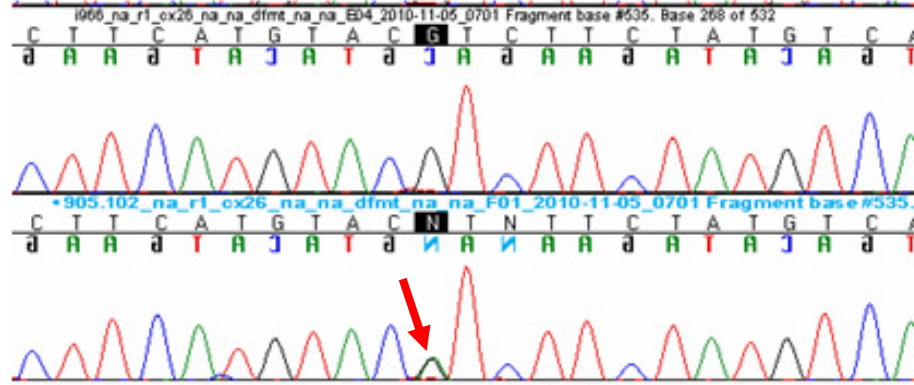
9 ailede saptanmış olan genetik değişlikle tablo 4.2’de mevcuttur.

Tablo 4.2.*GJB2* Geni Sekans Analizi Sonuçları

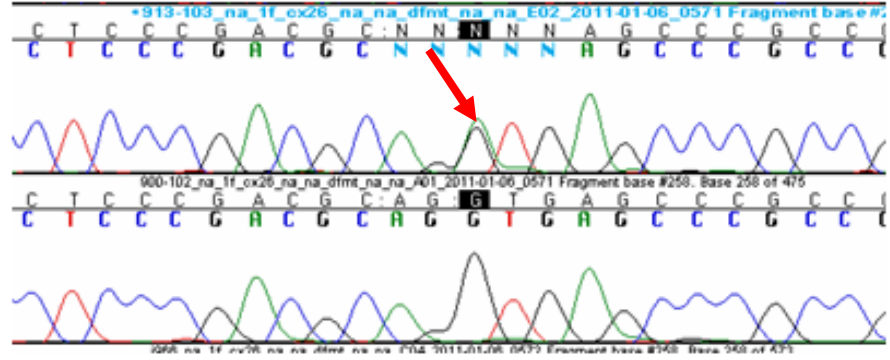
Aile No	Gjb2 Genotipi	Ailede Etkilenmiş Birey sayısı	Memleketi
901	c.35delG / p.C169X	7	Kayseri
903	c.35delG / p.C169X	3	Kayseri
905	p.V153I / WT	3	Kayseri
913	c.35delG / c.IVS1 + 1G>A	2	Kayseri
914	c.35delG / c.35delG	2	Kayseri
916	c.35delG / c.35delG	2	Kayseri
918	c.35delG / c.35delG	4	Kayseri
919	c.35delG / c.35delG	2	Kayseri
938	c.35delG / c.35delG	2	Kayseri

5 ailede de *GJB2* geninde c.35delG homozigot, bir ailede de p.V153I heterozigot olarak saptanmıştır. Üç ailede c.35delG heterozigot olarak tespit edilmiş olup, bu ailelerden birinde c.IVS1+1G>A, diğer ikisinde ise c.C169X mutasyonu tespit edilmiştir.

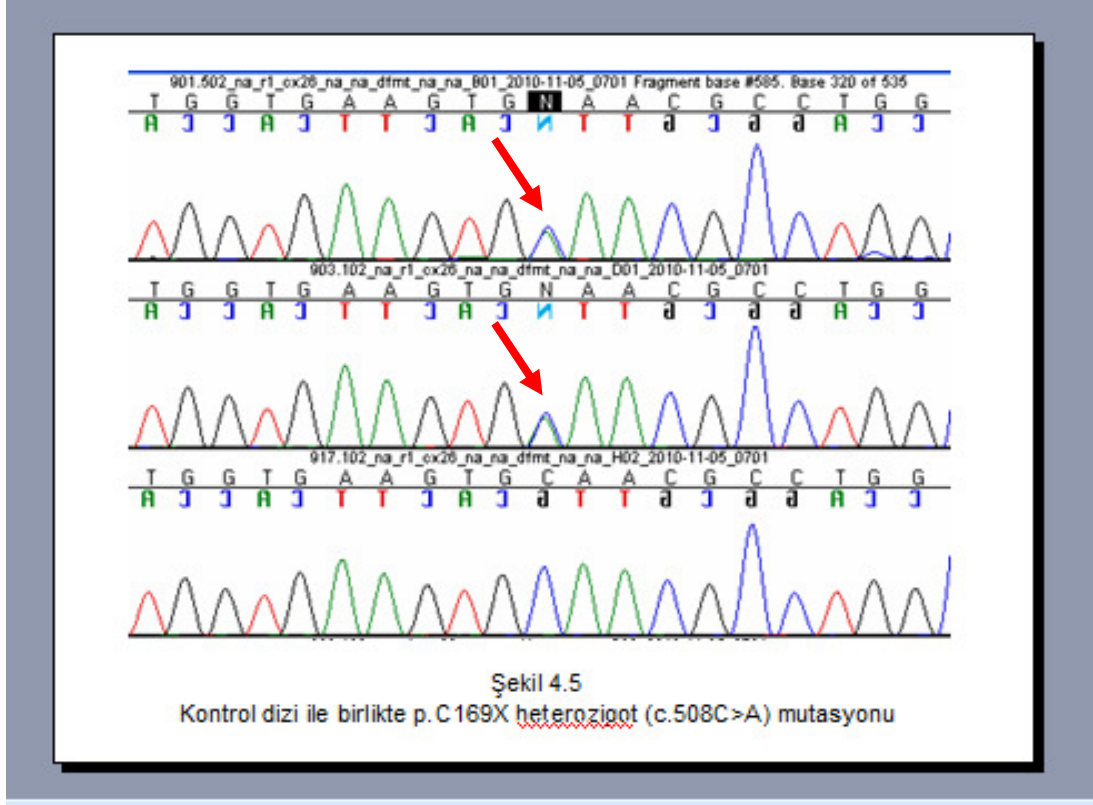




Şekil 4.3.  
Kontrol dizi ile birlikte p.V153I heterozigot mutasyonu (c.457G>A)



Şekil 4.4  
Kontrol dizi ile birlikte IVS1+1G>A heterozigot (-3170 G>A ) mutasyonu

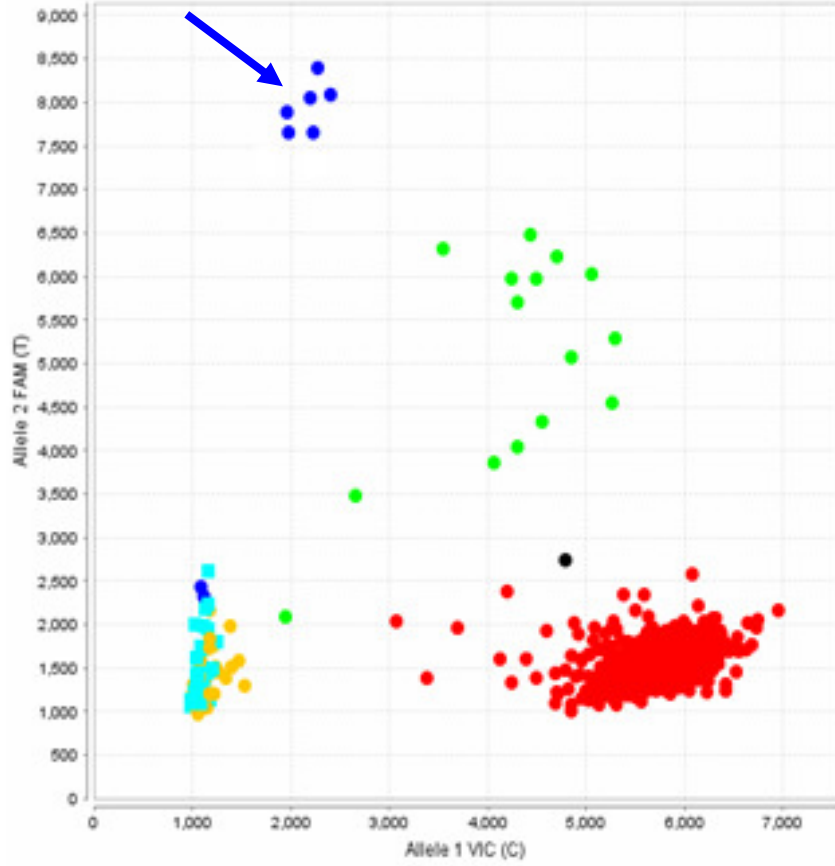


#### 4.2. OPEN ARRAY YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLEN HASTALARDA TESPİT EDİLEN DEĞİŞİKLİKLER

GJB2 geninde mutasyon saptanmayan 12 aile *open array* yöntemi kullanılarak işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen açısından incelenmiştir. Araştırılmış olan genler *SLC26A4*, *MYO7A*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*, *TMIE*, *TECTA*, *PCDH15*, *TMCI*, *TMPRSS3*, *LHFPL5*'dir. Genler Türk toplumunda en sık işitme kaybına yol açan genler arasından seçilmiştir (102). *Open array* platformuna yerleştirilecek olan SNP' ler <http://pga.gs.washington.edu/> sitesinden belirlendi. Her gen için; genin lokalizasyonu göz önünde bulundurularak, öncelikle genlerin içinden veya 15000 baza kadar 5' ve 3' tarafından, küçük allel frekansı 0.2 ve üzerinde olan ve birbiriyle bağlantı dengesizliğinde (linkage disequilibriumda) olmayan (LD 0,8'in üzerinde olan belirteçler çalışmaya alınmadı) seçildi.

Sadece *TMIE* geni için SNP yerine bir mutasyon platforma eklenerek, söz konusu mutasyon araştırıldı.

Bir aile de *TMIE* geninde p.R84W mutasyonu, bir ailede *OTOF* geninde segregasyon, bir ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon, bir ailede ise *TMHS*, *OTOF* ve *TMPRSS3* genlerinde segregasyon saptanmıştır. Kalan 8 ailede tez kapsamında uygulanan yöntemler ile herhangi bir olası genetik değişiklik saptanamamıştır.



Şekil 4.6 *TMIE* geni p.R84W (rs28942097), *open array* grafiksel verisi. Grafikte görülen mavi noktalar, 902 nolu ailenin hasta bireylerine aittir. Yeşillerden bazıları yine 902 nolu ailenin taşıyıcı bireylerine aittir.

Yöntemde 127 SNP ve bir mutasyon (*TMIE* geni p.R84W mutasyonu) kullanılmıştır. Her bir SNP için yukarıdaki grafik benzeri tablo bulunmaktadır ve her bir nokta bir hastayı temsil etmektedir. Mavi renk *-FAM<sup>TM</sup>dye-* homozigot mutant tipi, yeşil renk- *FAM<sup>TM</sup>* ve *VIC<sup>®</sup> dye-* heterozigotluğu, kırmızı-*VIC<sup>®</sup> dye-* homozigot wild tipi belirtmektedir. Değerlendirme yapılırken diğer renkler dikkate alınmaz. Grafik üzerinden değerlendirme yapılırken ilgili noktanın üzerine gelindiğinde, o kişinin söz



konusu bölge için genotipi aşağıdaki tabloda olduğu gibi görülebilmektedir. Ailedeki segregasyona bakılarak yorum yapılmaktadır.

Tablo 4.3. *TMIE* Geni p.R84W, rs28942097 *Open Array* verisi.

	rs28942097			rs28942097
Aile No		Fenotip	Aile No	
902-102	CT	Sağlıklı kardeş	908-101	CC
<b>902-103</b>	<b>TT</b>	<b>İşitme kayıplı kardeş</b>	908-102	CC
902-104	CT	Sağlıklı kardeş	908-103	CC
<b>902-105</b>	<b>TT</b>	<b>İşitme kayıplı kardeş</b>	908-104	CC
902-202	CT	Anne	908-201	CC
902-302	CT	Baba	908-301	CC
<b>902-501</b>	<b>TT</b>	<b>İşitme kayıplı 1. derece kuzen</b>	908-502	CC
<b>902-502</b>	<b>TT</b>	<b>İşitme kayıplı 1. derece kuzen</b>	909-101	CC
<b>902-503</b>	<b>TT</b>	<b>İşitme kayıplı 1. derece kuzen</b>	909-103	CC
904-101	CC		909-301	CC
904-102	CC		910-101	CC
904-103	CC		910-102	CC
904-104	CC		910-201	CC
904-201	CC		910-301	CC
904-301	CC		911-101	CC
905-101	CC		911-102	CC
905-102	CC		911-201	CC
905-201	CC		911-301	CC
905-301	CC		912-101	CC
905-302	CC		912-102	CC
905-401	CC		912-201	CC
905-501	CC		912-301	CC
907-101	CC		912-801	CC
907-102	CC		917-101	CC
907-103	CC		917-102	CC
907-104	CC		917-201	CC
907-105	CC		917-301	CC
907-201	CC		920-101	CC
907-301	CC		920-102	CC
			920-103	CC
			920-201	CC
			920-301	CC

C normal alleli, T mutant alleli göstermektedir. Sadece 902 nolu ailede işitme kayıplı bireylerde her iki allelde mutant olup, anne, baba ve sağlıklı kardeşler heterozigot olarak görülmektedir. Taranan diğer ailelerde mutant allele rastlanmamıştır.

Tablo 4.4. *OTOF* geninde segregasyon gösteren 909 nolu ailenin *open array* verisi

	909-101	<b>909-103</b>	909-301
	Sağlıklı kardeş	<b>İşitme kaybı</b>	Sağlıklı baba
rs11674089	AG	<b>GG</b>	AG
rs2280516	GG	<b>GG</b>	GG
<b>rs2272069</b>	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	<b>GG</b>	CG
<b>rs869440</b>	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	<b>AA</b>	AA
<b>rs939817</b>	CT	<b>CC</b>	CT
<b>rs6746918</b>	AA	<b>GG</b>	AA
<b>rs1879760</b>	AA	<b>AA</b>	AA
<b>rs4665874</b>	CC	<b>CC</b>	CC
<b>rs6547103</b>	GG	<b>GG</b>	GG
<b>rs13029128</b>	GT	<b>GG</b>	GT
rs1011108	CT	<b>CC</b>	CT
rs939815	CC	<b>CC</b>	CC

Sonuç olarak yöntem anne, baba ya da sağlıklı kardeş ve akrabalarda heterozigot olan bölgelerde, hasta birey ya da bireylerde homozigot blok tarama esasına dayanmaktadır.

Tablo 4.5. *TMPRSS3* geninde segregasyon gösteren 910 nolu ailenin *open array* verisi

	<b>910-101</b>	<b>910-102</b>	910-201	910-301
	<b>İşitme kaybı</b>	<b>İşitme kaybı</b>	Sağlıklı anne	Sağlıklı baba
rs1079380	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
rs424694	<b>TT</b>	<b>TT</b>	CT	TT
rs2839490	<b>TT</b>	<b>TT</b>	CT	TT
rs462149	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
<b>rs225310</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GT	GG
<b>rs1078272</b>	<b>TT</b>	<b>TT</b>	TT	TT
<b>rs1109352</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
<b>rs225430</b>	<b>AA</b>	<b>AA</b>	AA	AC
rs1088797 3	<b>TT</b>	<b>TT</b>	TT	GT
rs9981624	<b>GG</b>	<b>GG</b>	CG	GG
rs9980448	<b>CC</b>	<b>CC</b>	CT	CT
rs1305267 6	<b>CC</b>	<b>CC</b>	CC	CT

*OTOF, TMPRSS3, TMHS* genlerinde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin *open array* veri tabloları

Tablo 4.6. *OTOF* geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin *Open Array* Verisi

	<b>917-101</b>	<b>917-102</b>	<b>917-201</b>	<b>917-301</b>
	<b>İşitme kaybı</b>	<b>İşitme kaybı</b>	<b>Sağlıklı Anne</b>	<b>Sağlıklı Baba</b>
rs11674089	<b>GG</b>	<b>GG</b>	AG	GG
rs2280516	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
<b>rs2272069</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	CG
<b>rs869440</b>	AA	AA	AA	AG
<b>rs939817</b>	CC	CC	CC	CT
<b>rs6746918</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	AG	GG
<b>rs1879760</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	AG	GG
<b>rs4665874</b>	AA	AA	AC	Amplifikasyon gözlenmemiştir.
<b>rs6547103</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	CG
<b>rs13029128</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GT	GG
rs1011108	<b>TT</b>	<b>TT</b>	TT	CT
rs939815	<b>CC</b>	<b>CC</b>	CC	CC

Tablo 4.7. *TMPRSS3* geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin *open array* verisi

	<b>917-101</b>	<b>917-102</b>	<b>917-201</b>	<b>917-301</b>
	<b>İşitme kaybı</b>	<b>İşitme kaybı</b>	<b>Sağlıklı Anne</b>	<b>Sağlıklı Baba</b>
rs1079380	<b>AG</b>	<b>AA</b>	AG	AG
rs424694	<b>CC</b>	<b>CT</b>	CT	CT
rs2839490	<b>CT</b>	<b>CT</b>	CT	TT
rs462149	<b>AG</b>	<b>GG</b>	GG	AG
<b>rs225310</b>	<b>TT</b>	<b>UND</b>	GT	GT
<b>rs1078272</b>	<b>TT</b>	<b>TT</b>	AT	TT
<b>rs1109352</b>	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
<b>rs225430</b>	<b>AA</b>	<b>AA</b>	AC	AA
rs10887973	<b>TT</b>	<b>TT</b>	TT	TT
rs9981624	<b>GG</b>	<b>GG</b>	GG	GG
rs9980448	<b>TT</b>	<b>TT</b>	TT	TT
rs13052676	<b>CT</b>	<b>TT</b>	TT	CT

Tablo 4.8. *TMHS* geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin *Open Array* Verisi

	<b>917-101</b>	<b>917-102</b>	<b>917-201</b>	<b>917-301</b>
	İşitme kaybı	İşitme kaybı	<b>Sağlıklı Anne</b>	<b>Sağlıklı Baba</b>
rs1343796	AG	Amplifikasyon gözlenmemiştir	AG	AA
rs10807154	GG	GG	GG	AG
rs2817012	CC	CC	CG	CC
rs2817013	AC	AC	AC	CC
rs6921084	TT	TT	CT	CT
rs1049649	AA	AA	AC	AA
rs2395637	GG	GG	GG	GG
rs7752049	AA	AA	AC	AA
rs2817057	GG	GG	AA	GG
rs2817064	AG	AG	AG	AG
rs9470094	GG	GG	GG	GG
rs12211728	AG	AA	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	AG

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. *GJB2* GENİNDE GÖZLENEN MUTASYONLARIN LİTERATÜR İLE KARŞILAŞTIRILMASI

*GJB2* geninin mutasyonlarının, sendromik olmayan işitme kaybında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. 1997 yılında ilk kez *GJB2* genindeki mutasyonların araştırılmasından bu yana pek çok çalışma, birçok farklı popülasyonda gerçekleştirilmiştir (54). Gen otozomal resesif sendromik olmayan işitme kayıplarının neredeyse yarısından sorumludur. *GJB2* geninde bugüne kadar 150 farklı mutasyon tanımlanmış olup, farklı popülasyonlarda farklı mutasyonlar dikkat çekmektedir.

Patolojik mutasyonların çoğunluğu genin kodlama bölgesi olan ekzon 2'de yer almaktadır. Yine bu ekzonda gözlenen c.35delG mutasyonu ülkemizde ve dünya genelinde sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybının en önemli sebebidir.

*GJB2* geninde beyaz ırkta ve Askenazi Yahudileri'nde en sık c.35delG mutasyonuna rastlanmakta olup, bu mutasyonu c.167delT izlemektedir. Doğu Asya toplumlarında ise bu mutasyonların yanı sıra c.235delC mutasyonu da sıklıkla saptanmaktadır (103). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *GJB2* geninde saptanan diğer mutasyonların başında c.IVS1+1G>A gelmektedir. (104). Bu mutasyonu delE120, p.W24X, c.233delG, p.Q80R, c.310del1, c.299-300delAT, c.167delT, p.P184R, p.L90P, p.P173S, p.R127H, p.Q80K mutasyonları izlemektedir (105).

c.35delG mutasyonu; altı guanin nükleotidinin oluşturduğu seriden, tek bir guanin nükleotidinin delesyona uğraması sonucunda oluşmaktadır ve bu durum çerçeve

kaymasına neden olarak, 13. pozisyonda dur kodonu (UGA) oluşturmaktadır (106, 107). Mutasyonun protein düzeyindeki etkisi ise; 226 aminoasitlik normal proteinin yerine, 12 aminoasitlik işlevsel olmayan bir Cx26 proteininin oluşumu şeklindedir (106).

c.35delG'nin beyaz ırktaki taşıyıcı frekansı çeşitli araştırmalarda %28-32 arasında bildirilmiştir (108-110).

Ülkelere göre bakıldığında ise İtalya'da bu mutasyonun taşıyıcı frekansı %3.4, Yunanistan'da %3.5, Fransa'da 2.7, Malta ve Portekiz'de %2.8 olarak belirlenirken bu oran Amerika, Avrupa ve Asya ülkelerinde belirgin olarak düşüş göstermektedir (111). Türkiye'de taşıyıcı sıklığı %1.8 bulunmuştur (112).

Türkiye'de yapılmış başka çalışmalarda ise c.35delG mutasyonu işitme engellilerin %5 ile %53'ünde saptanmıştır (11, 113). İç Anadolu ve Güney Batı Anadolu'da mutasyon frekansı en yüksek olmakla birlikte, sporadik vakalarda %13.2, ailesel vakalarda ise %22.1 olarak bildirilmiştir (113).

Allel frekansının görülme sıklığının farklı popülasyonlarda değişken seyretmesine paralel olarak, homozigot c.35delG mutasyonunun sendromik olmayan işitme kaybına neden olma sıklığı, ırklara ve popülasyonlara göre büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin Çin, Japonya, Gana, Hindistan, Kore, Pakistan, Tayvan ve Tayland'da sendromik olmayan işitme kayıplı bireylerde yapılan çalışmalarda homozigot c.35delG mutasyonu rapor edilmemiştir (77,114). Buna karşın Danimarka'da yapılmış bir araştırmada homozigot c.35delG mutasyon oranı %1.8, Slovakya da yapılmış bir araştırma'da ise %40 oranında saptanmıştır (77).

Türkiye'de de bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bulgular coğrafi dağılıma ve çalışmaya katılan olgu sayısına göre farklılık göstermektedir. Barış ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada homozigot 35delG mutasyonu %20.4 olguda saptanırken, heterozigot mutasyon %2.1 olguda görülmüştür (115). Tekin ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir başka çalışmada ise; olguların %15'inde homozigot c.35delG mutasyonu, %7.81'inde ise heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır (116).

Bu konuda ailesel çalışmalarda yapılmış olup, Uyguner ve arkadaşları tarafından yapılmış otozomal resesif işitme kayıplı 60 ailenin değerlendirildiği bir çalışmada, ailelerin %21.7'sinde homozigot c.35delG mutasyonu, %3.3'ünde ise heterozigot c.35delG mutasyonu tespit edilmiştir (117). Tekin ve arkadaşları tarafından yapılmış bir başka ailesel vakaların değerlendirildiği çalışmada ise %17.5 c.35delG homozigot



mutasyonu, %1.9 c.35delG heterozigot mutasyonu saptanmıştır (104,113). Kalay ve arkadaşlarının yapmış oldukları ailesel işitme kayıplı bireylerin değerlendirildiği bir çalışmada ise homozigot c.35delG mutasyonu olguların %21.5'inde, heterozigot c.35delG mutasyonu ise olguların %4.3'ünde tespit edilmiştir (105).

Çalışmamıza dahil edilen 21 aileden 122 bireyin 62'inde işitme kaybı mevcuttu. 5 ailede homozigot c.35delG mutasyonu, 3 ailede ise heterozigot c.35delG mutasyonu saptanmıştır. Bu güne kadar yapılmış olan çalışmalarda *GJB2* mutasyonlarının genellikle şiddetli (81-100db) ve derin (100db'den fazla) prelingual sensorinöral işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (118). Çalışmamıza dahil edilen grupta da işitme kaybı düzeyi literatür ile uyumlu olup, mutasyon saptanan tüm olgularda derin işitme kaybı mevcuttu.

*GJB2* geninde heterozigot c.35delG mutasyonu saptanan bir ailede heterozigot c.IVS1+1G>A mutasyonu da mevcuttu.

c.IVS1+1G>A mutasyonu ilk kez Denoyelle tarafından bildirilmiştir (119). Mutasyon genin kodlama yapmayan 1. ekzonunda yer almaktadır ve -3170 G>A mutasyonu olarak da bilinmektedir ve kırılma işlevini bozarak etki ettiği düşünülmektedir (119, 120). Bu mutasyonla ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte son yıllarda Türkiye'nin de dahil olduğu bazı toplumlarda bu mutasyonun sıklığı bildirilmiştir. c.IVS1+1G>A mutasyonu Çek popülasyonunda daha yaygın olarak bulunmuş, tüm patolojik *GJB2* mutasyonları arasında %4 oranında tespit edilmiştir (121). Hollanda'da yapılmış başka bir çalışmada ise c.35delG ve del(GJB6-D13S1830) mutasyonlarından sonra üçüncü sıklıkta görüldüğü rapor edilmiştir (122). Tüm bu yapılmış çalışmalarda; hastaların *GJB2* geninin kodlayan, 2. ekzonunda heterozigot olan bir patolojik mutasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine Çin'de yapılmış bir araştırma da ise *GJB2* geninde heterozigot mutasyon taşıyan hasta bireylerde bu mutasyon araştırılmış ve vakaların %1.89'unda bildirilmiştir (123). Tüm bu yayınlarda bu mutasyonun sadece ekzon 2'de heterozigot mutasyon taşıyan bireylerde araştırılması gerektiği önerilmiştir. Ayrıca Tekin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ekzon 2 'de heterozigot mutasyon tespit edilmiş 16 hastanın 8 tanesinde heterozigot c.IVS1+1G>A mutasyonu saptanmıştır (124).

Padma ve arkadaşları tarafından yapılmış başka bir çalışmada ise, ekzon 2'de herhangi bir patolojik mutasyonu heterozigot ya da homozigot olarak taşımayan bireylerde bu

mutasyon saptanmış olup (çalışma grubunun %0.3), bu çalışmanın sonucunda da sendromik olmayan işitme kaybı olan tüm bireylerde bu mutasyonun çalışılması gerektiği vurgulanmıştır (125).

Çalışma grubumuzdaki bir ailedeyine *GJB2* geninde, c.457G>A olarak da ifade edilen p.V153I değişikliği heterozigot olarak saptanmıştır. Bu değişiklik ile ilgili olarak literatürde çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda polimorfizm olarak değerlendirilirken (126), bazı çalışmalarda işitme kaybına yol açabilecek patojenik bir mutasyon olarak (127) belirtilmiştir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) sitesinden incelendiğinde, p.V153I, olası-patojenik olmayan SNP (rs111033186) olarak tanımlanmıştır. (128). Sonuç olarak daha önce yapılmış çalışmalarda işitme kaybı olmayan bireylerde de saptanmış olması polimorfizm olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda, *GJB2* geninde, c.35delG heterozigot mutasyonu saptanan iki ailede aynı zamanda daha önce literatürde tanımlanmayan heterozigot p.C169X (c.508 C>A) mutasyonu saptanmıştır. “TGC” sistein aminoasidini kodlamaktadır ve ailelerde, kodonun üçüncü bazında bir heterozigot mutasyon söz konusudur. Dur kodonuna yol açan bu mutasyon; *GJB2* geninin kodladığı 226 aminoasitlik protein yerine 169 aminoasitlik bir proteinin oluşumuna sebep olacaktır ki, protein düzeyindeki etkisinin daha ileri çalışmalar ile gösterilmesi gerekmektedir.

```

      *  ** *  R  *      *Y YR      *      D      *      MR
601 GACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACCGTCTT
402 GACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTT
134 --T--Y--T--S--S--I--F--F--R--V--I--F--E--A--A--F--M--Y--V--F

      *      *W R  *      **      *      R      *  *  *      **** *  *  *
661 CTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCACCGCCTGGCCTTG
462 CTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCACCGCCTGGCCTTG
154 --Y--V--M--Y--D==G--F--S--M--Q--R--L--V--K--C--N--A--W--P--C

      **      ** R      *S      *      *      **      *
721 TCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTT
522 TCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTT
174 --P--N--T--V--D--C--F--V--S--R--P--T--E--K--T--V--F--T--V--F

```

Şekil 5.1. *GJB2* geni baz ve aminoasit dizisi. Söz konusu mutasyon bölgesi (p.C169X (c.508 C>A)) yuvarlak içinde belirtilmiştir (129).

## 5.2. OPEN ARRAY YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLEN HASTALARDA TESPİT EDİLEN DEĞİŞİKLİKLER

*GJB2* geninde mutasyon saptanmayan 12 aile *open array* yöntemi kullanılarak işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen açısından incelenmiştir (*SLC26A4, MYO7A, MYO15A, OTOF, CDH23, TMIE, TECTA, PCDH15, TMC1, TMPRSS3, LHFPL5*).

Araştırmamızda kullanılan *TaqMan® OpenArray®* Genotipleme teknolojisi, fazla sayıda genotiplendirmenin az miktarda örnek ve sarf malzeme kullanılarak yapılabildiği, geniş uygulama alanı bulunan bir platformdur. Veri kalitesi ile çözünürlüğünün çok yüksek olmasından dolayı tercih edilmiştir.

Bu tarama yönteminin seçilme nedeni araştırmaya dahil edilen ailelerin hepsinde anne ve babanın akraba olması ve en az 2 çocuklarının etkilenmiş olması nedeniyle ortak atadan kalıtılmış olan mutasyonların, homozigot olma olasılığının yüksek olmasıdır. Böylece hasta bireylerde homozigot bölgeler taranarak mutasyonun nerede olduğu hakkında bilgi edinilmektedir. Sonuç olarak yöntemin analiz aşaması; anne, baba ya da sağlıklı kardeş ve akrabalarda heterozigot olan bölgelerde, hasta birey ya da bireylerde homozigot blok tarama esasına dayanmaktadır. Ailelerdeki segregasyona bakılarak yorum yapılmıştır. Uygulanan tarama yöntemi ile genom ancak belli aralıklarla taranabildiğinden, söz konusu homozigot blokların küçük olması halinde, o gende mutasyon olması durumunda bile, gen göz ardı edilerek, atlanabilir. Ayrıca yöntem kesin sonuç vermemekle birlikte, klasik sekans analizleri ile doğrulama gerektirmektedir. Fakat aynı zamanda aday gen araştırmalarında bilinen genlerin dışlanması için kullanılacak hızlı ve ucuz bir yöntemdir.

Çalışmamızda *TaqMan® OpenArray®* Genotipleme ile bir ailede *TMIE* geninde R84W mutasyonu saptandı. Bir ailede *OTOF* geninde segregasyon, bir ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon, bir ailede ise *TMHS, OTOF ve TMPRSS3* genlerinde segregasyon saptanmıştır. Kalan 8 ailede tez kapsamında uygulanan yöntemler ile herhangi bir genetik değişiklik saptanamamıştır.

*TMIE* geni, transmembran iç kulak proteini isimli bir proteini kodlamaktadır. Gen 3p21 kromozomal bölgesinde, 4 ekzondan oluşmaktadır (81, 82).

*TMIE* geni etkilenmiş fare çalışmalarında gözlenen iç kulak patolojisi; genin normal bir doğum sonrası olgunlaşma sürecinde, kokleadaki duyu tüy hücrelerinin olgunlaşması ve stereosilyaların da gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (61). Bu güne kadar 156

aminoasitlik proteini kodlayan bu gende sendromik olmayan işitme kaybı ile ilişkili; ikisi ekstrasellüler bölgede (4-BP INS, 125CGCC, p.E31G), ikisi intronik bölgede (6-BP DEL/1-BP INS intron 1’de, c.212-2A > C intron 2’de), 3 tanesi de sitoplazmik bölgede (p.R81C, p.R84W, p.R92W) yer alan 7 mutasyon tanımlanmıştır (130).

*TMIE* geni ile ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, Türkiye’de 49 birbiriyle akrabalığı bulunmayan sendromik olmayan işitme kayıplı aile ile yapılmış bir çalışmada %6.6 oranında *TMIE* geninde mutasyon saptanmıştır (102). Pakistan’da yapılmış geniş çaplı bir çalışma da ise, *TMIE* geninde %1.7 oranında mutasyona rastlanmıştır.

p.R84W (c.250C>T) mutasyonu tek başına değerlendirilecek olursa, ilk kez kuzey Hindistan’dan bir ailede tespit edilmiştir (81). Daha sonra Türk toplumunda yapılmış bir çalışmada önce 51 aile değerlendirilmiş, 4 ailede bu mutasyona rastlanmıştır ve daha sonra 254 aile söz konusu mutasyon açısından değerlendirilmiş ve 4 ailede daha p.R84W mutasyonuna rastlanmıştır. Yöresel dağılıma bakılınca en yüksek yüzde, %10.3 ile Güneydoğu Anadolu bölgesinde saptanmıştır. Ekzon 3’de gözlenen söz konusu bu mutasyonun Anadolu’da olası *founder* etki sonucunda daha sık gözlemlendiği düşünülmüş ve Orta Doğu popülasyonlarında sendromik olmayan işitme kaybı tarama programlarına söz konusu mutasyonun eklenmesi önerilmiştir (82). Bu mutasyonun 21 aile gibi kısıtlı bir çalışma grubu içinde dahi tespit edilmesi bu öneriyi destekler niteliktedir.

*Open array* ile tarama yaptığımız grupta iki ailede *OTOF* geninde segregasyon saptanmıştır. Otoferlin proteinini kodlayan *OTOF* geninin, korti organındaki iç tüy hücrelerinde utrikulus ve sakkulusta ve beyinde yüksek seviyede eksprese olmaktadır (72,75). Gendeki mutasyonların işitme kaybının özel bir tipi olan sendromik olmayan resesif işitsel nöropatiye yol açtığı tespit edilmiştir (76). Bugüne kadar 40’dan fazla patolojik allelik varyant rapor edilmiştir (78).

Pakistan’da 557 aileyi kapsayan geniş çaplı bir araştırmada *OTOF* mutasyonları 13 ailede saptanmış ve % 2.3 sıklıkta gözlemlendiği rapor edilmiştir (131). Chiu ve arkadaşları tarafından yapılmış başka bir çalışmada Asya toplumlarında söz konusu tipteki işitme kaybının en sık nedenlerinden biri olarak *OTOF* geni belirtilmiştir (132). İspanyada tüm sendromik olmayan otozomal resesif prelingual işitme kaybında prevalansı %5 olarak bildirilmiştir (74). Duman ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada ise *GJB 2*

geninden sonra otozomal resesif sendromik olmayan nörosensöriyal tipteki işitme kaybında, Türk toplumunda en sık rastlanılan genler rapor edilmiş ve *OTOF* %5 sıklık ile, *MYO15A* (%9,9), *TMIE* (%6,6) ve *TMC1* (%6,6) sonrasında en sık mutasyon saptanan dördüncü gen olarak saptanmıştır (102). Araştırmamızda *OTOF* geninde segregasyon saptadığımız ailelere bir sonraki çalışmalarda sekans analizi yapılması planlanmıştır.

Çalışmamızda yine iki ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon saptanmıştır. *TMPRSS3* transmembran serin proteaz 3 isimli proteinini kodlamakta ve korti organının destek hücreleri ile stria vaskulariste eksprese olmaktadır (91). Kodladığı proteinin amilorid duyarlı sodyum kanallarında, endolenften sodyum geri alımında görevli olduğu düşünülmektedir (92). Guipponi ve arkadaşlarının bir çalışmasında söz konusu genin mutasyonlarına, işitme kayıplı popülasyonda her ne kadar çok sık rastlanmasa da, işitmenin mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (133).

Watenhofer ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada İspanya, İtalya, Yunanistan ve Avustralya'dan toplam 448 aile incelenmiş ve %0.45 sıklıkta söz konusu gende mutasyon saptanmıştır. Yine aynı çalışmada beyaz ırkta yaklaşık olarak sıklığı % 0.38 olarak bildirilmiştir (134). Pakistan'da 159 aileyi değerlendirildiği bir çalışmada 4 ailede ilgili gende mutasyon saptanmış olup, Pakistan popülasyonunda yaklaşık olarak sıklığı %2.5 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada Kuzey Amerika kökenli aileler de yine aynı gendeki mutasyonlar açısından taranmış fakat hiçbir patolojik mutasyona rastlanmamıştır.

Duman ve arkadaşları tarafından Türk toplumunda yapılmış bir çalışmada ise anne ve babanın akraba olduğu ve en az 3 işitme kayıplı çocuğu bulunan aile taranmış ve *TMPRSS3* geninde %1.7 sıklıkta mutasyon saptanmıştır (102). Her ne kadar çalışma grubumuzda 2 ailede de söz konusu gende segregasyon saptanmış olsa da *TMPRSS3* geni literatürden de edinilen bilgile ışığında, işitme kaybına sıklıkla yol açan genlerden değildir. Diğer sıklıkla mutasyon saptanan genlerde değişiklik saptanmadığı durumlarda incelenmesi, ya da *array* platformlarına eklenerek segregasyon saptanan ailelerde klasik yöntemlerle taranması önerilmektedir.

Çalışmamızda bir ailede *TMHS* geninde segregasyon saptanmıştır. *TMHS* geni, tüy hücreleri sterosiliyası tetraspan membran proteinini kodlamaktadır. Tüy hücrelerinin morfogenezinde görevli olduğu, gendeki mutasyonların vestibüler işlev bozukluğuna,

korti dejenerasyonuna ve iç kulaktaki tüy yumaklarında anomalilere yol açabileceği düşünülmektedir (93). Gendeki mutasyonların işitme kaybı üzerindeki etkisi ilk defa farelerde tanımlanmış olup daha sonraki çalışmalarda Shabbir ve arkadaşları tarafından biri Pakistan ve diğeri Hindistan'dan olmak üzere iki ailede tanımlanmıştır. Daha sonra Kalay ve arkadaşları tarafından iki geniş Türk ailesinde yapılmış bir çalışmada söz konusu gende iki farklı mutasyon daha tespit edilmiştir (c.649delG (p.Glu216ArgfsX26) ve c.494C>T (p.Thr165Met)). Aynı çalışmada kontrol taramalarında c.649delG taşıyıcılığına rastlanmıştır. Literatürde *TMHS* geninde sadece dört mutasyon saptanarak bunlardan ikisinin Türk toplumunda gözlenmesi dikkat çekicidir. Bu gen ile ilgili çok fazla çalışma da bulunmamaktadır ve bu nedenlerle *open array* platformuna eklenerek çalışmamıza dahil edilmiştir. Araştırmamızda *TMHS* geninde segregasyon saptadığımız aileye bir sonraki çalışmalarda sekans analizi yapılması planlanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza dahil edilen 21 aileden 122 bireyin 62'sinde işitme kaybı mevcuttu. Çalışma grubumuzdaki 5 ailede *GJB2* geninde homozigot c.35delG mutasyonu, 3 ailede ise heterozigot c.35delG mutasyonu bir ailede ise p.V153I polimorfizmi saptandı. *GJB2* geninde heterozigot 35delG mutasyonu saptanan bir ailede ek olarak heterozigot c.IVS1+1G>A mutasyonu da mevcuttu. Çalışmamızda, c.35delG heterozigot saptanan diğer iki ailede ise; daha önce literatürde tanımlanmayan heterozigot p.C169X (c.508 C>A) mutasyonu saptandı. Söz konusu değişikliğin işitme kaybı patogenezindeki yerinin aydınlatılması için öncelikle sağlıklı kontrollerde taranması ve protein düzeyindeki etkisinin daha ileri çalışmalar ile gösterilmesi gerektiği düşünüldü.

*GJB2* geninde mutasyon saptanmayan 12 aile *open array* yöntemi kullanılarak işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen açısından incelendi. Sadece *TMIE* geni için SNP yerine bir mutasyon (p.R84W) platforma eklenerek, söz konusu mutasyon araştırıldı.

Çalışmamızda bir aile de *TMIE* geninde p.R84W mutasyonu saptandı. Bir ailede *OTOF* geninde segregasyon, bir ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon, bir ailede ise *TMHS*, *OTOF* ve *TMPRSS3* genlerinde segregasyon saptandı. Araştırmamızda söz konusu genlerde segregasyon saptadığımız ailelere bir sonraki çalışmalarda sekans analizi yapılması planlandı. Uygulanan tarama yöntemi ile genom ancak belli aralıklarla tarandığından, homozigot blokların küçük olması halinde araştırılan gende mutasyon olsa bile yakalanamayabilir. Ayrıca yöntem kesin sonuç vermemekte ve klasik sekans analizleri ile doğrulama gerektirmektedir. Fakat aynı zamanda aday gen

araştırmalarında bilinen genlerin dışlanması için kullanılabilir hızlı ve ucuz bir yontemdir.

Çalışmada değerlendirilen yirmi bir ailenin sekizinde bu tez kapsamında uygulanan araştırma yontemleri ile herhangi bir genetik değişiklik saptanamadı. Daha ileri ve kapsamlı tekniklerle sonraki çalışmalarda bu ailelerde işitme kaybına yol açan genetik değişikliklerin araştırılması planlandı.



## KAYNAKLAR

1. Kalatzis, V, Petit, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998;7:1589–1597
2. Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med.* 2000 Apr 13;342(15):1101-9.
3. Parving A, Newton V. Guidelines for description of inherited hearing loss. *J Audiol Med* 1995; (4):2-5.
4. Fraser GR. The causes of profound deafness in childhood. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1976:11-48.
5. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
6. Emery, Alan E H; Rimoin, David L; Emery & Rimoin's principles and practice of medical genetics.; 4th ed. / edited by David L. Rimoin ... [et al.]; London ; New York : Churchill Livingstone, 1996. p1149-1170
7. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. Jr., eds.: Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford University Press, 1995:337-9.
8. Van Camp G, Willems PJ, Kunts H, Marres H, Smith RJ: Recent developments in genetic hearing impairment. *J Audiol Med* 1998; (7):120-33.
9. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH: Nonsyndromic hearing impairment: Unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997; (60):758-764.
10. Part of a homepage/Web site [Edited 13 Dec 2011]The Hereditary Hearing loss Homepage [Internet]. Available from: <http://hereditaryhearingloss.org/main.aspx?c=.HHH&n=86162>
11. Tekin M, Arnos K, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358:1082-90
12. Calapoğlu NŞ. Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği. *S.D.Ü Tıp Fak Derg* 2006; 13 (2): 37-46

13. Koç C. Kulak burun bogaz hastalıkları ve bas boyun cerrahisi Günes kitabevi.2004
14. Guyton & Hall. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi. 1996
15. Putz R, Pabst R, editors. Sobotta atlas of human anatomy. Vol. 1. 20th ed. München: Urban & Schwarzenberg; 1993. Çeviri editörü: Arıncı K, Sobotta insan anatomisi atlası. Cilt 1. İstanbul: Beta Basım A.Ş.; 1994. s. 365-384.
16. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. Annu Rev Genet 2001;35:589-646.
17. Wang L, Bresee CS, Jiang H, et al. Scleraxis is required for differentiation of the stapedius and tensor tympani tendons of the middle ear. J Assoc Res Otolaryngol. 2011 Aug;12(4):407-21. doi: 10.1007/s10162-011-0264-5. Epub 2011 Mar 12.
18. Canalis RF, Lambert P.R, The ear: comprehensive otology. In: Knopp D, Haris S, Verriest H, editors, Philadelphia ; Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
19. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W, Histology: a text atlas, 4th edition, Philadelphia,; Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
20. Flock A, Cheung HC. Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. J Cell Biol 1977 Nov;75(2 Pt 1):339-43.
21. Tilney LG, Derosier DJ, Mulroy MJ. The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. J Cell Biol 1980 Jul;86(1):244-59.
22. Hudspeth AJ. How the ear's Works work. Nature 1989;341(6241):397-404
23. Markin VS, Hudspeth AJ. Gating-spring models of mechano-electrical transduction by hair cells of the internal ear. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1995;24:59-83.
24. Gregory IF, Inna AB, Thomas BF, Andrew JG. Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells, Nature Reviews Genetics 2004;5:489-498.
25. Part of a homepage/Web site Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,KBB Anabilim Dalı [Internet]. Available from: <http://kbb.uludag.edu.tr/ickulak-anatomihizalan.htm>
26. Nobili R, Mammano F, Ashmore J. How well do we understand the cochlea. Trends Neurosci 1998;21:159-67.

27. Noyan, A. *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Ankara, Meteksan. 1999.
28. Part of a homepage/Web site Başkent Üniversitesi ,Ses Dalgalarının özellikleri ve sesin algılanması) [Internet]. Available from: <http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/index.htm>
29. Morton, C. C. and W. E. Nance. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med*, 2006, 354(20); 2151-64.
30. Part of a homepage/Web site. Ministry of Education Special Education Home [Internet]. Available from: <http://www.bced.gov.bc.ca/specialed/hearimpair/range.htm#link1>
31. Tekin M, Cin S. İşitme kaybının genetik özellikleri., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2002;3:211-216
32. Reardon W, O Mahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *QJM* 2000; 93: 99-104
33. Kopp P. Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid*. 1999 Jan;9(1):65-9.
34. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; 21: 440-3.
35. Smith RJH, Berlin CI, Hejtmancik JF, Keats BJB, Kimberling WJ, Lewis RA, Möller CG, Pelias MZ, Tranebjaerg L. Clinical diagnosis of the Usher syndromes. *Am J Med Genet* 1994; 50: 32-38
36. Keats BJB, Corey DP. The Usher syndromes. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 1999; 89: 158-166
37. Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, et al. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet* 2000; 26: 56-60.
38. Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet* 2000; 26:51-55.

39. Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, et al. 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* 2001; 68:26-37
40. Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A, et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 2001; 27:108-112
41. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, et al. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet* 2001; 69:25-34
42. Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH, et al. Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1709-18
43. Joensuu T, Hamalainen R, Yuan B, et al. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 673-84
44. Pierides AM, Athanasiou Y, Demetriou K, Koptides M, Deltas CC. A family with the branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic correlations. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Jun;17(6):1014-8.
45. Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kumar S, Kimberling WJ. EYA1 nonsense mutation in a Japanese branchio-oto-renal syndrome family. *J Hum Genet*. 1999;44(4):261-5.
46. Jutras B, Russell LJ, Hurteau AM, Chapdelaine M. Auditory neuropathy in siblings with Waardenburg's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67: 1133-1142.
47. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 1997; 34: 656-65
48. Newton VE, Read AP. Waardenburg Syndrome. *Audiological Medicine* 2003; 1: 77-88.
49. Oysu C, Oysu A, Aslan I, Tinaz M. Temporal bone imaging findings in Waardenburg's syndrome. *Int JPediatr Otorhinolaryngol* 2001; 58: 215-221.
50. Maziers N, Dahan K, Pirson Y. From Alport syndrome to benign familial hematuria: clinical and genetic aspect. *Nephrol Ther*. 2005 May;1(2):90-100. Epub 2005 Jun 1.

51. Weber M, Netzer KO, Pullig O. Molecular aspects of Alport's syndrome. *Clin Investig. Review.* 1992 Sep;70(9):809-15.
52. Dixon, M. J. Treacher Collins syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 1996: 1391-1396, 1996.
53. Goldmuntz E. DiGeorge syndrome: new insights. *Clin Perinatol.* 2005; 32: 963-78.
54. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3.
55. Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127:1037–1042.
56. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 1997; 199: 165-171.
57. Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, Gros D, Yamasaki H, Mesnil M. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human Kromozom: 13q11-q12 and mouse Kromozom: 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 1996;72:185-186
58. Open database: D.N. Cooper, E.V. Ball, P.D. Stenson, A.D. Phillips, K. Shaw and M.E. Mort. The Human Gene Mutation Database. [Edited 2011] Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>
59. Bitner-Glindzicz, M. 2002. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*,63 73-94.
60. Brownstein ZN, Dror AA, Gilony D, Migirov L, Hirschberg K, Avraham KB. A novel SLC26A4 (PDS) deafness mutation retained in the endoplasmic reticulum. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Apr;134(4):403-7.
61. Mitchem, K. L., Hibbard, E., Beyer, L. A., et al. 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*, 2002,11 (16); 1887-98.
62. Albert S, Blons H, Jonard L, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(6):773-779.

63. Sun Y, Chen J, Sun H, et al. Novel missense mutations in MYO7A underlying postlingual high- or low-frequency non-syndromic hearing impairment in two large families from China. *J Hum Genet.* 2011 Jan;56(1):64-70. Epub 2010 Dec 9.
64. Weil D, Kussel P, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 1997;16(2):191-3.
65. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997;16(2):188-90.
66. Friedman, T. B., Liang, Y., Weber, J. L., et al. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of Kromozom: 17. *Nature Genet.* 9: 86-91, 1995.
67. Piatto, V. B., E. C. Nascimento, F. Alexandrino, et al. Molecular genetics of non-syndromic deafness. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)*, 2005, 71(2); 216-23.
68. Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 1999; 1;61(3):243-58.
69. Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280: 1447-1451, 1998.
70. Shearer AE, Hildebrand MS, Webster JA, et al. Mutations in the first MyTH4 domain of MYO15A are a common cause of DFNB3 hearing loss. *Laryngoscope.* 2009 Apr;119(4):727-33.
71. Yasunaga, S., Petit, C. Physical map of the region surrounding the otoferlin locus on Kromozom: 2p22-p23. *Genomics* 66: 110-112, 2000.
72. Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, et al. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):591-600.

73. Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual nonsyndromic hearing loss. *J Med Genet* 2002 Jul;39(7):502-6.
74. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat* 2008 Jun;29(6):823-31.
75. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness, *Nat Genet* 1999;21(4):363-9
76. Varga, R., Kelley, P. M., Keats, B. J., et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. 2003. *J Med Genet*, 40 (1); 45-50.
77. Petersen MB, Willems PJ Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006; 69: 371–392
78. Wang DY, Wang YC, Weil D, et al. Screening mutations of OTOF gene in Chinese patients with auditory neuropathy, including a familial case of temperature-sensitive auditory neuropathy. *BMC Med Genet*. 2010 May 26;11:79.
79. Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, et al. Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):103-7.
80. Wagatsuma, M., Kitoh, R., Suzuki, H., Fukuoka, H., Takumi, Y., Usami, S. Distribution and frequencies of CDH23 mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet*. 2007, 72: 339-344.
81. Naz, S., Giguere, C. M., Kohrman, D. C., et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet*. 2002, 71: 632-636.
82. Sırmacı A, Oztürkmen-Akay H, Erbek S, et al. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin Genet*. 2009 Jun;75(6):562-7. Epub 2009 May 5.

83. Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature Genet.* 1998, 19: 60-62. Note: Erratum: *Nature Genet.* 1999, 21: 449 only.
84. Hughes, D. C., Legan, P. K., Steel, K. P., Richardson, G. P. Mapping of the alpha-tectorin gene (TECTA) to mouse Kromozom: 9 and human Kromozom: 11: a candidate for human autosomal dominant nonsyndromic deafness. *Genomics*, 1998;48: 46-51.
85. Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., et al. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum. Molec. Genet.* 2003,12: 3215-3223.
86. Alagramam KN, Goodyear RJ, Geng R, et al. Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS One.* 2011 Apr 21;6(4):e19183.
87. Alagramam, K. N., Murcia, C. L., Kwon, H. Y., Pawlowski, K. S., Wright, C. G., Woychik, R. P. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nature Genet.* 2001, 27: 99-102.
88. Hilgert N, Alasti F, Dieltjens N, et al. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clin Genet.* 2008 Sep;74(3):223-32. Epub 2008 Jul 9.
89. Hildebrand MS, Kahrizi K, Bromhead CJ, et al. Mutations in TMC1 are a common cause of DFNB7/11 hearing loss in the Iranian population. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010 Dec;119(12):830-5.
90. Finsterer, J., Fellingner, J. 2005. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69 (5); 621-47.
91. Scott, H. S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., et al. Insertion of betasatellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet*, 2001, 27 (1); 59-63.
92. Lee K, Khan S, Islam A, et al. Novel TMPRSS3 variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet.* 2011 Apr 29.



93. Longo-Guess, C. M., Gagnon, L. H., Cook, S. A., Wu, J., Zheng, Q. Y. Johnson, K. R. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, .2005, 102 (22); 7894-9.
94. Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, et al. Mutations of human *TMHS* cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*. 2006 Aug;43(8):634-40. Epub 2006 Feb 3.
95. Akar, N. *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*, AÜTF Antıp AŞ Yayınları, 508 sayfa, Ankara, 1999.
96. Williams S. K. Michael. *Concepts of Genetics* 2002. Çeviri Editörü: Öner, C. *Genetik Kavramlar*. Ankara: Palme Yayıncılık. s: 744-745, 2002.
97. Eberhard P. *Genetik Atlası* Çeviri Editörü: Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 53-56, 2000.
98. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridisation: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Kromozom:s Cancer* 1997; 20: 399-407.
99. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. Genom-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23; 41-6.
100. Başaran E., Aras S., Cansaran-Duman D. *Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış Ve Uygulama Alanları*. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010; 67 (2): 85-96
101. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989.
102. Duman D, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Jan-Feb;15(1-2):29-33. Epub 2010 Nov 30.
103. Choi SY, Lee KY, Kim HJ, Kim HK, Chang Q, Park HJ, Jeon CJ, Lin X, Bok J, Kim UK. Functional evaluation of *GJB2* variants in nonsyndromic hearing loss. *Mol Med*. 2011 May Jun;17(5-6):550-6. doi: 10.2119/molmed.2010.00183. Epub 2011 Jan 8.

104. Tekin M, Arici ZS. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet A*. 2007 Jul 15;143A(14):1583-91.
105. Kalay E, Caylan R, Kremer H, Brouwer APM, Karagüzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hearing Research* 2005;203:88-93
106. Cohn, E.S., Kelley, P.M., Fowler, T., Gorga, M.P., Lefkowitz, D., Kuehn, H., Schaefer, G.B., Gobar, L.S., Hahn, F.J., Harris, D.J. & Kimberling, W.J. 1999. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics* 103(3); 546-550.
107. Zelante, L. Gasparini, P. Estivill, X. Melchionda, S. D'Agruma, L. Govea, N. Milá, M. Monica, M.D. Lutfi, J. Shohat, M. Mansfield, E. Delgrosso, K. Rappaport, E. Surrey, S. Fortina P. 1997. Connexin26 mutations associated with the most common form of non syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.*, 6(9); 1605-1609.
108. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Milà M, Zelante L, Gasparini P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*. 1998 Feb 7;351(9100):394-8.
109. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet*. 1998 Feb 7;351(9100):415.
110. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan;8(1):19-23.
111. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*. 2003 Aug;24(4):275-88. Review.

112. Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH, Xia XJ, Liu XZ, Nance WE, Pandya A. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet.* 2001 May;108(5):385-9.
113. Tekin, M., Duman, T., Bogoclu, G., Incesulu, A., Comak, E., Ilhan, I., Akar, N. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Human Mutation,* 2003;21: 552-553.
114. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002: 111: 394–397.
115. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet* 2001; 60:452-5.
116. Tekin, M., Bogoclu, G., Arican, ST., Orman, MN., Tastan, H., Elsayed, S., Akar, N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clinical Genetics,* 2005: 67 (3): 273-273.
117. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, Yuksel-Apak M, Wollnik B. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet.* 2003;64(1):65-9.
118. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106 (1):50-7.
119. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of the childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999; 353:1298-303.
120. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M: Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002, 110:284-289.

121. Seeman P. and Sakmoryova I. 2006 High prevalence of the IVS1+1 G-A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients in the coding region of GJB2. *Clin. Genet.* 69, 410–413.
122. Santos R., Aulchenko Y., Huygen P., Donk K., Wijs I., Kemperman M. et al. 2005 Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 69, 165-174.
123. Yuan Y, Yu F, Wang G, Huang S, Yu R, Zhang X, Huang D, Han D, Dai P. Prevalence of the GJB2 IVS1+1G >A mutation in Chinese hearing loss patients with monoallelic pathogenic mutation in the coding region of GJB2. *J Transl Med.* 2010 Dec 2;8:127.
124. Sırmacı 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.
125. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T. GJB2 and GJB6 gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. *J Genet.* 2009 Dec;88(3):267-72.
126. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJ, Kanlikama M, Ozer E, Cakmak EA, Mumbuc S, Arslan A. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003 Dec;67(12):1331-5.
127. Meşe G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW. Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2004 Aug;115(3):191-9. Epub 2004 Jul 7.
128. Open database: The National Center for Biotechnology Information . [Edited 2012] Available  
from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs111033186&SITE=NcbiHome&submit=Go>

- 129.** Part of a homepage/Web site [Edited 2012]The Ensembl,Genome Browser [Internet]. Available from:[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000165474;r=13:20761609-20767037;t=ENST00000382844;v=rs111033186;vdb=variation;vf=17476084](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000165474;r=13:20761609-20767037;t=ENST00000382844;v=rs111033186;vdb=variation;vf=17476084)
- 130.** Yang JJ, Su MC, Chien KH, Hsin CH, Li SY. Identification of novel variants in the TMIE gene of patients with nonsyndromic hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 May;74(5):489-93. Epub 2010 Mar 4.
- 131.** Choi BY, Ahmed ZM, Riazuddin S, Bhinder MA, Shahzad M, Husnain T, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB. Identities and frequencies of mutations of the otoferlin gene (OTOF) causing DFNB9 deafness in Pakistan. *Clin Genet.* 2009 Mar;75(3):237-43.
- 132.** Chiu YH, Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Lee WY, Liu AY, Hsu CJ. Mutations in the OTOF gene in Taiwanese patients with auditory neuropathy. *Audiol Neurootol.* 2010;15(6):364-74. Epub 2010 Mar 11.
- 133.** Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1557-67.
- 134.** Wattenhofer M, Di Iorio MV, Rabionet R, Dougherty L, Pampanos A, Schwede T, Montserrat-Sentis B, Arbones ML, Iliades T, Pasquadibisceglie A, D'Amelio M, Alwan S, Rossier C, Dahl HH, Petersen MB, Estivill X, Gasparini P, Scott HS, Antonarakis SE. Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J Mol Med (Berl).* 2002 Feb;80(2):124-31. Epub 2001 Dec 18.

## EKLER

### Ek 1. Çalışma kapsamında değerlendirilen ailelerin belirlenmesi için Kayseri ve çevresindeki İşitme Engelliler Okullarında yapılmış anket örneği

Adı Soyadı:
Yaşı/Cinsiyeti:
<b>İLETİŞİM BİLGİLERİ</b>
Adresi:
Telefonu:
Ailede benzer, işitme engelli hasta var mı? (Anne, baba, kardeş, hala, dayı, teyze, amca, kuzen ya da daha uzak akrabalar belirtilmelidir.)
Hastanın anne ve babası akraba mı? (Uzak akraba dahi olsalar belirtilmelidir.)
Tanı konma yaşı:
Konuşarak anlaşabiliyor mu?
Sadece işaret dili ile mi anlaşabiliyor?
Ne kadar duyabiliyor?(Odyometri sonucunu biliyorsanız belirtiniz.)
İşitme cihazı kullanıyor mu ya da koklear implantı var mı? Var ise ne zaman takıldı?
İşitme engelinden başka tanısı konulmuş hastalığı var mı? Var ise nedir?
Hasta zamanında mı doğdu (erken doğum öyküsü var mı)?
Annesi hamileliği sırasında herhangi bir hastalık geçirmiş mi? Geçirmiş ise nedir?
Annesi hamileliği sırasında herhangi bir ilaç kullanmış mı? Kullanmış ise nedir?
Doğum kilosu nedir?
Kan değişimi yapıldı mı?
Ateşli bir hastalık geçirdi mi? Geçirdi ise nedir?
Her hangi bir kaza ya da travma geçirdi mi?
Her hangi bir ameliyat oldu mu?
Nöbet (sara, epilepsi) öyküsü var mı?
Gece körlüğü var mı?
Ekleme istediğiniz her hangi bir şey var mı?

**Ek 2. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (yazılı onay ve bilgilendirme formu) örneği**

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

**YAZILI ONAY FORMU**

KATILIMCININ ADI, SOYADI:

CİNSİYET :

DOĞUM TARİHİ :

Çocuğumun veya benim katılımım sorulan klinik/laboratuar çalışmanın amaç ve işlemleri bana açıklanmıştır.

Bu çalışma ile ilgili olası yararlar ve riskler bana bildirildi. Soru sorma hakkım ve cevapları değerlendirme hakkım vardı.

Bu çalışmaya katılımın gönüllü olduğunu ve çocuğumu veya kendimi istediğim zaman çalışmadan çekebileceğim ve bunu yaptığımda çocuğum veya kendime bir zarar gelmeyeceğini anladım.

Çocuğumla veya benimle ilgili olan verilere ulaşmaya ve düzeltilmesini istemeye hakkım olduğu bana anlatılmıştır.

Ben.....adı.....olan çocuğun velisi olarak bağımsız ve yapılacak işlemler konusunda bilgi aldıktan sonra kendimin/çocuğumun bu araştırmada yer almasını onaylıyorum.

ADRES:

TELEFON NUMARASI:

TARİH:

İMZA:

VELİ İMZASI:

DOKTOR ADI:

TARİH:

İMZA:

ŞAHİT ADI:

TARİH:

İMZA:

## **BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

### **BİLGİLENDİRME**

**Araştırmanın Adı;** Ailesel Non-Sendromik İşitme Kaybının Genetik Temelinin Araştırılması

Bu çalışma bir araştırma olup, Türk toplumunda, her hangi bir hastalık tablosu ile ilişkili olmayan, işitme kaybına başka hiçbir organ sistemi veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği durumlarda gözlenen, ailesel kökenli işitme kaybına; en sık neden olan mutasyonların/genetik değişikliklerin belirlenmesini amaçlamaktadır. İlerleyen dönemlerde işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve bir sonraki kuşaklar için verilecek olan genetik danışmalık hizmetine katkıda bulunabilmek hedefler arasındadır.

Araştırmanın süresi; 12 ay olarak planlanmıştır. Araştırmaya katılması planlanan gönüllü sayısı yaklaşık olarak 100'dür.

Öncelikle proje kapsamına alınacak olan aileler İşitme Engelliler Okulları'nda yapılacak olan anketler ile belirlenecek ve bu ailelerde anne ve babanın akraba olması ve en az iki çocuğun işitme kaybı tanısı almış olması kriterlerine uyulacaktır. Aileler belirlendikten sonra Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na görüşmeye çağrılacaktır. Ayrıntılı klinik değerlendirmeye tabi tutularak, muayene edilen hastalarda Pendred, Usher, Brakio-oto-renal (BOR), Waardenburg, ve Alport gibi sendromlar tespit edildiği takdirde bu aileler çalışmaya dahil edilmeyeceklerdir. Araştırmaya katılan her ailenin ayrıntılı pedigrileri (soy ağacı) çıkarılacaktır. Her bir aile üyesinden (etkilenmiş ve etkilenmemiş kardeşler ve ebeveynler) 10 ml periferik kan örnekleri toplanacak, her bir aileye birer numara verilecek ve standart yöntemlerle periferik kandan DNA izolasyonu yapılacaktır. Elde edilen DNA örneklerinden yurtdışında genetik taramalar yapılacak ve veriler analiz edilerek işitme kaybına neden olan genetik değişiklikler ortaya çıkarılmaya çalışılacaktır.

Araştırma sırasında katılımcıların karşılaşılacağı her hangi bir risk bulunmamaktadır. Araştırmaya katılacak gönüllünün kimliğini ortaya koyacak kayıtlar gizli tutulacak; kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde bile gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

Araştırma Süresince 24 saat ulaşılabilir kişi adı / soyadı / telefonu:

Dr. Aslı Subaşıoğlu UZAK- 533 470 3181



T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr.Aslı Subaşıoğlu Uzak' a ait "TÜRK TOPLUMUNDA AİLESEL NONSENDROMİK İŞİTME KAYBININ GENETİK TEMELİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 28.02.2012

İmza:

Başkan..... Prof. Dr. Muris Dunder ..... İmza

Üye..... Prof. Dr. Yasut Özkul ..... İmza

Üye..... Doç. Dr. Selim Saati ..... İmza

Üye..... Prof. Dr. Mustafa ERKAN ..... İmza

Üye..... Doç. Dr. Hakan Gömür ..... İmza