

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NONSENDROMİK İŞİTME KAYBINDA
2p25 KROMOZOM BANDININ ADAY GEN
AÇISINDAN TARANMASI**

Hülya GÜNDEŞLİ

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NONSENDROMİK İŞİTME KAYBINDA
2p25 KROMOZOM BANDININ ADAY GEN
AÇISINDAN TARANMASI

Hülya GÜNDEŞLİ

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin DİNÇER

ANKARA

2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof. Dr. Şükriye AYTER
Hacettepe Üniversitesi

Danışman Prof. Dr. Pervin Dinçer
Hacettepe Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Şükriye Ayter
Hacettepe Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Meral Özgüç
Hacettepe Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Ediz Demirpençe
Hacettepe Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Engin Yılmaz
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde, tez danışmanım olarak çalışmaya yol gösterici katkılarda bulunan ve özellikle tez yazım aşamasında büyük bir itina ve titizlikle beni en iyi şekilde yönlendiren Sayın Prof. Dr. Pervin Dinçer'e, çalışmaya değerli fikirleri ile katkılarda bulunan tez jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Meral Özgüç'e, Prof. Dr. Şükriye Ayter'e, Prof. Dr. Engin Yılmaz'a ve Prof. Dr. Ediz Demirpençe'ye, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, laboratuvar tekniklerini öğrenmem ve uygulamam aşamasında deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan Uzm. Biol. Burcu Balcı'ya ve tüm asistan arkadaşlarıma, eğitim-öğretim hayatım boyunca büyük bir sevgi, anlayış ve sabırla beni her konuda destekleyen ve her zaman benimle birlikte olacaklarını bildiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Günderli, H. Nonsendromik işitme kaybında 2p25 kromozom bandının aday gen açısından taranması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006. İşitme kaybı dünyada yaklaşık 1000 yenidoğandan birinde görülen sensörinöral bir hastalıktır. İşitme kayıpları genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Prelingual işitme kayıplarının %50'den fazlası genetik faktörlere bağlıdır. Çevresel faktörlerden kaynaklanan işitme kayıpları ise doğum öncesi ve doğum sonrası dönemlerdeki enfeksiyon hastalıklarına ve ototoksik ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal işitme kayıplarının %70'ini nonsendromik, %30'unu sendromik formlar oluşturmaktadır. Nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif, %18'i otozomal dominant, %1-2'si X'e bağlı kalıtılmaktadır. Yakın zamana kadar, otozomal resesif nonsendromik işitme kayıpları için 60 lokus-21 gen, otozomal dominant nonsendromik işitme kayıpları için 56 lokus-21 gen ve X'e bağlı kalıtılanlar için 8 kromozom lokusu-1 gen tespit edilmiştir. Tez çalışmasında, 2p25 kromozom bandına bağlantı gösteren otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı görülen bir ailede D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri arasındaki kromozom aralığında (6.430.934 bç), hastalıktan sorumlu olabilecek aday genlerin belirlenebilmesi hedeflenmiştir. Buna göre, D2S2211 ve D2S162 genetik belirleyicileri çevresinde ilave genetik belirleyiciler (D2S281, D2S1329, D2S2164) *NCBI-Map Viewer* veri bankası aracılığı ile belirlenmiştir. Daha sonra, haplotip analizi ve iki-noktalı LOD skor analizi yapılarak hastalıktan sorumlu aday genlerin bulunabileceği kromozom aralığının daraltılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar D2S319-D2S168 aralığının aday genlerin taranması gereken aralık olduğunu göstermiştir. Buna göre, koklear cDNA kütüphanesi ve veri bankaları (*NCBI-Map Viewer, NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Ensembl, Human Genome Browser, Swiss-Prot, Bioinformatic Harvester, Pfam*) taranarak bu aralıkta nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek 10 adet aday gen belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre belirtilen aralıkta bu ailede otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabileceği düşünülen aday genler: *RNF144, DDEF2, YWHAQ, KIDINS220, SIPL, ID2, OACT2, KCNF1, ATP6V1C2, ROCK2*'dir. Aday genleri belirlemeye yönelik yapılmış olan bu çalışma ileride hastalıktan sorumlu genin tespiti için önemli bir kaynak olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Nonsendromik işitme kaybı, genetik haritalama, aday gen, biyoinformatik, koklear cDNA kütüphanesi.

ABSTRACT

Gundesli, H. Searching of 2p25 cytoband for candidate genes in the nonsyndromic hearing loss. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MS.Thesis in Medical Biology, Ankara, 2006. Hearing loss is a very common sensorineural disorder which is seen approximately one in every 1000 newborns. Hearing loss is caused by both genetic and environmental factors. More than 50% of prelingual deafness is attributable to genetic factors. Environmental causes of hearing loss include pre and postnatal infectious diseases and ototoxic drugs. Hereditary hearing loss is due to 70% nonsyndromic, 30% syndromic forms. Approximately, 80% of nonsyndromic hearing loss has an autosomal recessive, 18% autosomal dominant and 2% X linked mode of inheritance. Recently, for autosomal recessive hearing loss 60 loci-21 genes, for autosomal dominant hearing loss 56 loci-21 genes and for X linked inheritance 8 loci-1 gene have been identified. In this thesis, it is aimed to determine candidate genes which can be responsible for nonsyndromic hearing loss at the interval of D2S319-D2S168 (6.430.934 bp) in an autosomal recessive hearing loss family linked to 2p25. In the extend of our study new markers (D2S281, D2S1329, D2S2164) were added around D2S2211 and D2S162 genetic markers by using *NCBI-Map Viewer* database. After that, by performing haplotype analysis and two-point analysis it was aimed to fine chromosomal interval where related candidate genes could be found. Results, obtained from both haplotype and two-point analysis showed that entire interval of D2S319-D2S168 was responsible for searching disease related candidate genes. In conclusion, by using cochlear cDNA library and electronic databases (*NCBI-Map Viewer, NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Ensembl, Human Genome Browser, Swiss-Prot, Bioinformatic Harvester, Pfam*), 10 candidate genes were found. According to these results, candiate genes which can be responsible for autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in this family are: *RNF144, DDEF2, YWHAQ, KIDINS220, SIPL, ID2, OACT2, KCNF1, ATP6VIC2, ROCK2*. We believe that this study will be a valuable resource for the further works to identify the gene.

Key words: Nonsyndromic hearing loss, gene mapping, candidate gene, bioinformatic, cochlear cDNA library.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İşitme Sistemi	3
2.2. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri	4
2.3. Genetik Haritalama	7
2.4. Aday Gen Belirleme Stratejisi	15
3. BİREYLER ve YÖNTEMLER	19
3.1. Bireyler	19
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Çözeltiler	20
3.2.A. DNA İzolasyonu	20
3.2.B. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA Amplifikasyonu	20
3.2.C. Agaroz Jel Elektroforezi	21
3.2.D. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	22
3.2.D.I. Denatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektroforezi	23
3.2.E. Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi	23
3.2.F. Gümüş Boyama Sonrası Poiakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Fotoğraflarının Eldesi	23
3.3. Yöntemler	24
3.3.A. DNA İzolasyonu	24
3.3.B. Haplotip Analizi	24
3.3.B.I. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24

3.3.B.II. Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.3.B.III. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	25
3.3.B.IV. Gümüş Nitratla Boyama	26
3.3.B.V. DNA Bantlarının Görüntülenmesi	26
3.3.C. İki-noktalı LOD Skor Analizi	26
3.3.D. Aday Genlerin Belirlenmesi	27
4. BULGULAR	29
4.1. Genetik Belirleyicilerin Tespit Edilmesi	29
4.2. Haplotip Analizi	31
4.3. İki-noktalı LOD Skor Analizi	34
4.4. D2S319-D2S168 Kromozom Aralığında Bulunan Aday Genlerin Belirlenmesi	38
5. TARTIŞMA	45
SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54
EKLER	63
EK-1: Veri bankaları internet adresleri	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>ACTG1</i>	“Actin gamma-1”
<i>ADAM17</i>	“A disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis Factor)”
APS	“Amonyum per sülfat”
<i>ATP6VIC2</i>	“ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C isoform 2”
bç	“Baz çifti”
<i>CDH23</i>	“Cadherin-23”
CEPH	“Centre d’etudes du polimorfisme humaine”
CHLC	“Cooperative human linkage centre”
<i>cig5</i>	“Viperin”
<i>C2orf22</i>	“Chromosome 2 open reading frame 22”
<i>CLDN14</i>	“Claudin-14”
cM	“Centimorgan”
CNRS	“Le Centre National de la Recherche Scientifique”
<i>COL11A2</i>	“Collagen Type XI, Alpha 2”
<i>CPSF3</i>	“Cleavage and polyadenylation specific factor 3”
<i>CRYM</i>	“Crystallin”
<i>DDEF2</i>	“Development and differentiation enhancing factor 2”
<i>DFNA5</i>	“Deafness, autosomal dominant nonsyndromic sensorineural, 5”
<i>DIAPH1</i>	“Diaphanous-1”
DFNA	“Autosomal dominant nonsyndromic hearing loss”
DFNB	“Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss”
DFN	“X-linked nonsyndromic hearing loss”
dNTP	“Deoxynucleotide triphosphate”
<i>ESPN</i>	“Espin”
EST	“Expressed sequence tags”
<i>EYA4</i>	“Eye absent 4”
<i>GJB2</i>	“Connexin 26”
<i>GJB6</i>	“Connexin 30”
<i>GJB3</i>	“Connexin 31”

<i>HPCAL1</i>	“Hippocalcin-like 1”
<i>ID2</i>	“Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix- loop-helix protein”
<i>ITGB1BP1</i>	“Integrin beta 1 binding protein1”
<i>KCNF1</i>	“Potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1”
<i>KCNQ4</i>	“K-channel”
<i>KIDINS220</i>	“Likely homolog of rat kinase D-interacting substance of 220kDa”
LOD	“Logarithm of odds”
<i>MYH14</i>	“Myosine Heavy Chain-14”
<i>MYO7A</i>	“Myosine 7A”
<i>MYH9</i>	“Myosine Heavy Chain-9”
<i>MYO6</i>	“Myosine 6”
<i>MYO1A</i>	“Myosine 1A”
<i>MYO7A</i>	“Myosine 7A”
<i>MYO15</i>	“Myosine 15”
<i>MYO3A</i>	“Myozin 3A”
NCBI	“National Centre for Biotechnology Information”
<i>OACT2</i>	“O-acyltransferase (membrane bound) domain containing2”
<i>ODC1</i>	“Ornithine decarboxylase 1”
OMIM	“Online mendelian inheritance in man”
<i>OTOA</i>	“Otoancorin”
<i>OTOF</i>	“Otoferlin”
PAGE	“Poliakrilamid Jel Elektroforezi”
<i>PCDH15</i>	“Protocadherin15”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
<i>PRES</i>	“Prestin”
<i>POU3F4</i>	“POU domain, class 3, transcription factor 4”
<i>POU4F3</i>	“POU domain, class 4, transcription factor 3”
<i>PYK2</i>	“Protein tyrosine kinase 2-beta”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
<i>RNF144</i>	“Ring finger protein 144”
<i>ROCK2</i>	“Rho-associated, coiled coil containing protein kinase”

<i>RRM2</i>	“Ribonucleotide reductase M2 polypeptide”
<i>SDS</i>	“Sodyum dodesil sülfat”
<i>SIPL</i>	“MTCBP-1, Membrane-type 1 matrix metaloproteinase cytoplasmic tail binding protein 1”
<i>SLC26A4</i>	“Solute carrier family 26, member 4”
<i>SNP</i>	“Single Nucleotide Polymorphism”
<i>SOX11</i>	“SRY (sex determining region Y)-box 11”
<i>SSLP</i>	“Simple sequence length polymorphism”
<i>STR</i>	“Short Tandem Repeat”
<i>STRC</i>	“Stereocilin”
<i>STRP</i>	“Short Tandem Repeat Polymorphism”
<i>TAF</i>	“TATA-binding protein and associated factor”
<i>TECTA</i>	“Alpha Tectorin”
<i>TIMIE</i>	“Transmembrane inner ear-expressed gene”
<i>TMC1</i>	“Transmembrane cochlear expressed gene-”
<i>TMPRSS3</i>	“Transmembrane protease serine-3”
<i>TRP</i>	“Transient receptor potential”
<i>TTC15</i>	“Tetratricopeptide repeat domain 15”
<i>WFS1</i>	“Wolframin”
<i>WHRN</i>	“Whirlin”
<i>VNTR</i>	“Variable Number of Tandem Repeat”
<i>YWHAQ</i>	“Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein”

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. TÜBİTAK-CNRS (Proje No:8833) projesinde genom taraması sonrasında dört genetik belirleyici için elde edilen haplotip analiz sonuçları.....	29
4.2. D3S1329, D2S281, D2S2164, D2S162, D2S168 genetik belirleyicilerinin jelde analizleri.....	32
4.3. Tüm genetik belirleyicilerin kullanılmasıyla elde edilen haplotipleri gösteren aile ağacı.....	33

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Nonsendromik işitme kayıplarında tespit edilen genler ve proteinler	6
3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü	25
4.1. TÜBİTAK-CNRS (Proje No:8833) projesinde genom taraması sonrasında dört genetik belirleyici için elde edilen iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları....	30
4.2. Haplotip analizinde kullanılan polimorfik genetik belirleyiciler	31
4.3. Rutgers Fiziksel Haritası	31
4.4. Aileye ait aile ağacı dosyası ve iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları	
A. Aile ağacı dosyası	35
B. İki-noktalı LOD skor analiz sonuçları.....	35
4.5. 15 no'lu bireyin sağlıklı kabul edilmesiyle oluşturulan aile ağacı dosyası ve iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları	
A. Aile ağacı dosyası	36
B. İki-noktalı LOD skor analiz sonuçları.....	37
4.6. 15 no'lu bireyin hasta kabul edilmesiyle oluşturulan aile ağacı dosyası ve iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları	
A. Aile ağacı dosyası	37
B. İki-noktalı LOD skor analiz sonuçları.....	37
4.7. D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan tüm genler.....	40
4.8. D2S319-D2S168 aralığında belirlenen aday genler.....	44

1. GİRİŞ

İşitme kaybı insanlarda yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Yaklaşık olarak 1000 yenidoğandan biri doğumdan itibaren veya çocukluğun erken dönemlerinde bu sorunla karşılaşmaktadır (1).

İşitme kayıplarının %50'den fazlası genetik etmenlere bağlı iken yaklaşık %50'lik bir kısmı da çevresel etmenlere bağlı olarak (yüksek sese maruz kalma, enfeksiyon hastalıkları, ototoksik ilaçlar) ortaya çıkmaktadır.

Genetik işitme kayıpları sendromik ve nonsendromik olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır (2,3). Kalıtsal işitme kayıplarının yaklaşık 2/3'ü nonsendromiktir ve çoğunlukla iç kulak komponentlerinin (koklear) yapı ve işlevinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (2,4).

Bugüne kadar nonsendromik işitme kayıplarından sorumlu 120'nin üstünde kromozom lokusu tespit edilmiş olup bunların 43'ünde gen tespit edilmiştir (5). Nonsendromik işitme kayıplarının %80'i otozomal resesif, %18'i otozomal dominant ve %2'si X'e bağlı kalıtım göstermektedir (2). Hücre iskeleti proteinleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve hücre membran proteinleri gibi farklı çok sayıda protein bu genlerin ürünleridir. Bununla beraber henüz haritalanmamış veya tanımlanmamış birçok genin varlığı düşünüldüğünde, işitme mekanizmasının ne kadar karmaşık bir mekanizma olduğu da ortaya çıkmaktadır.

Otozomal resesif nonsendromik işitme kayıpları ülkemizde de çok sık görülmektedir (6). Bu durumun en temel nedeni akraba evliliklerinin çok yaygın olmasıdır (7). Bu nedenle toplumumuzda bireylerin sosyal gelişimlerini olumsuz yönde etkileyen işitme kayıplarından sorumlu olan kromozom lokuslarını saptamak, sorumlu gen ya da genleri tespit etmek çok büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında nonsendromik işitme kaybı tanısı alan bir ailede 2p25 kromozom aralığında işitme kaybından sorumlu aday genlerin koklear cDNA kütüphanesi ve elektronik veri bankalarından yararlanılarak belirlenmesi planlanmıştır. Bu ailede nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday genlerin araştırılabileceği kromozom aralığının daraltılabilmesi amacı ile öncelikli olarak D2S2211 ve D2S162 polimorfik genetik belirleyicileri çevresine yeni genetik belirleyiciler ilave edilmiştir. 2p25 kromozom bandında bulunan toplam yedi genetik belirleyici (D2S319, D2S281, D2S2211 D2S1329, D2S2164, D2S162, D2S168) için haplotip ve iki-noktalı LOD skor analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen kromozom aralığında (6.430.934 baz çifti) nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday genleri belirlemede koklear cDNA kütüphanesinden ve çeşitli elektronik veri bankalarından yararlanılmıştır.

Tez çalışması sonunda nonsendromik işitme kaybı tanısı alan bir ailede 2p25 kromozom bandında işitme kaybından sorumlu olabilecek aday genler belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Sistemi

Sesleri algılayan duyu organımız kulak, 3 temel kısımdan oluşmaktadır. Bunlar;

- Dış kulak
- Orta kulak
- İç kulak

Dış kulak, kulak kepçesi ve kulak kanalı olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Esas görevi ses dalgalarını almaktır.

Orta kulak, kulak zarı ve birbirine eklemellenmiş 3 tane kemikçikten (çekiç=malleus, örs=incus, ve üzengi=stapes) oluşan hava dolu bir boşluktur. Görevi, dış kulağın aldığı ses dalgalarını iç kulağın perilenfine, dolayısıyla ses alıcılarına iletmektir.

İç kulak, temporal kemik içinde yerleşim gösterir ve 2 alıcı mekanizmaya sahiptir.

- Vestibul ve semisirküler kanallar (periferik vestibüler organ): Vestibular organ, vücut dengesini sağlayan sistemin reseptörlerini taşır.
- Koklea (periferik işitme organı)

Koklea, işitme reseptörlerini (korti organı) taşır ve esas itibariyle kulak kemiği içinde birkaç kıvrım yapmış spiral bir borudur. Kokleada yer alan korti organında tüy hücreleri bulunur. Basilar membran tüy epitel hücrelerine bağlanır. Kokleanın üst bölgesinde ise, içerisinde endolenf sıvısını taşıyan *Scala media* ile perilenf sıvısını taşıyan *Scala vestibuli* bulunmaktadır. Perilenfin kimyasal yapısı serebrospinal sıvıya benzer, tek farkı daha fazla protein taşımasıdır. Endolenfin kimyasal yapısı ise, hücre içi sıvıya benzer, bu nedenle de bol miktarda K^+ taşır.

Dış kulaktaki hava titreşimleri kulak zarını titreştir. Kulak zarının kendine has bir titreşim periyodu yoktur. Bu nedenle ses dalgalarını değiştirmeden kulak kemiklerine ve oval pencere yoluyla da kokleaya iletir. Kokleada perilenfin hareketlenmesiyle basilar membran titreşir. Basilar membran titreşimleri ise ses reseptörü olan tüy hücrelerini etkiler. Bu durum şöyle ifade edilmektedir; basilar membranın yukarı doğru hareketi ile tektoriyal membran ve korti organı aksi yönde kayar ve bu durum tüy hücrelerinin bir yöne eğilmesine neden olur. Tüy hücrelerindeki hareket reseptör membranın iletkenliğini artırır ve K^+ iyonunun endolenf içine pompalanmasıyla reseptör hücrede elektriksel bir değişiklik meydana gelir. Reseptör hücrenin uyarılmasıyla reseptör membran direnci değişir ve endolenften perilenfe doğru bir akım başlar. Bu akım reseptör hücrede reseptör potansiyelini doğurur. Reseptör potansiyeli de reseptör hücreden sinaptik transmitter madde salınmasına ve sensori sinirde uyarın doğmasına neden olur. Sinirsel iletimle birlikte işitme gerçekleşir (8).

Tüm bu bilgiler işitme sisteminin son derece karmaşık bir sistem olduğunu göstermektedir. Böyle karmaşık bir mekanizma, çok sayıda proteinin işitme olayının gerçekleşmesinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

2.2. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri

20. yüzyılın ilk yarısında genetik bilimi ile ilgilenen bilim adamları işitme sisteminin bir kaç gen ürünü ile açıklanabileceği yönünde tartışmalar yapmaktaydı. Bugün 120'den fazla genin işitme kaybından sorumlu olduğu bilinmekte ve hatta bu sayının daha da artacağı tahmin edilmektedir. Özellikle insan genomunda bulunan tüm genlerin yaklaşık %1'inin işitme kaybından sorumlu olduğu belirtilmektedir (9,10).

İşitme kaybı insanlar arasında görülen yaygın bir hastalıktır. Yaklaşık olarak 1000 çocuktan biri doğumdan veya çocukluğun erken dönemlerinden itibaren bu sorunla karşılaşmaktadır (1).

İşitme kaybı klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık olup bu hastalığa neden olan etkenler arasında çevresel faktörler (ses veya ototoksik ilaçlara maruz

kalma), genetik faktörler (çekirdek veya mitokondriyal genlerdeki mutasyonlar) ve gen-çevre etkileşimi yer almaktadır (2).

Genetik etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan işitme bozuklukları tüm işitme bozukluklarının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Genetik işitme kayıpları sadece doğumdan itibaren görülmemekte, çocuğun ilerleyen yaşlarında da belirli derecelerde ortaya çıkabilmektedir.

Kalıtsal işitme kayıpları sendromik ve nonsendromik işitme kayıpları olmak üzere iki kategoride toplanmaktadır.

Sendromik formlar, çocuklardaki işitme kaybının %30'unu oluşturmakta olup diğer sistemlerdeki tıbbi veya fiziksel anormalliklerle bağlantı göstermektedir. Sendromik formlara ait en az 100 genetik lokus saptanmış olup, 50'den fazla gen tespit edilmiştir (11).

Nonsendromik işitme kaybı genetik işitme kayıplarının yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadır ve çoğunlukla iç kulak bileşenlerinin (koklear) yapı ve işlevinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (2,4,5). Bu tip işitme kaybına başka hiç bir klinik ya da laboratuvar bulgusu eşlik etmemektedir.

Bugüne kadar nonsendromik işitme kayıpları için 120'nin üzerinde lokus tespit edilmiş olup 40'dan fazla gen tespit edilmiştir (5). Bu genler hücre iskeleti, ekstrasellüler matriks proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve iyon kanalları gibi farklı işlevlerdeki proteinleri kodlamaktadır (12,13). Nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif (DFNB), %18'i otozomal dominant (DFNA) ve %2'si X'e bağlı (DFN) kalıtılmaktadır (2).

Otozomal resesif geçişli nonsendromik işitme kayıpları ülkemizde de çok sık görülmektedir (6). Bu durumun en temel nedeni ülkemizde akraba evliliklerinin oldukça fazla görülmesidir (7). Bu nedenle toplumumuzda işitme kayıplarından sorumlu olan kromozom lokuslarını saptamak ve genleri tespit etmek çok büyük önem taşımaktadır.

Tablo 2.1. Nonsendromik işitme kayıplarında tespit edilen genler ve proteinler

NONSENDROMİK İŞİTME KAYIPLARINDA TANIMLANAN GENLER VE PROTEİNLER				
	GEN	KODLANAN PROTEİN	KROMOZOM LOKUSU	KAYNAK
EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ				
	<i>TECTA</i>	<i>α-Tectorin</i>	DFNB21	14
	<i>OTOF</i>	<i>Otoferlin</i>	DFNB9	15
	<i>COCH</i>	<i>COCH</i>	DFNA9	16
	<i>TECTA</i>	<i>α-Tectorin</i>	DFNA8/DFNA12	17
	<i>COL11A2</i>	<i>Collagen Type XI, Alpha 2</i>	DFNA13	18
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ				
	<i>POU3F4</i>	<i>POU3F4</i>	DFN3	19
	<i>POU4F3</i>	<i>POU4F3</i>	DFNA15	20
	<i>EYA4</i>	<i>Eye absent 4</i>	DFNA10	21
	<i>TFCP2L3</i>	<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	22
HÜCRE İSKELETİ PROTEİNLERİ				
	<i>MYO7A</i>	<i>Myosine 7A</i>	DFNB2	23
	<i>MYO15</i>	<i>Myosine 15</i>	DFNB3	24
	<i>MYO3A</i>	<i>Myosine 3A</i>	DFNB30	25
	<i>PRES</i>	<i>Prestin</i>	-	26
	<i>MYO6</i>	<i>Myosine 6</i>	DFNB37	27
	<i>DIAPH1</i>	<i>Diaphanous-1</i>	DFNA1	28
	<i>MYH14</i>	<i>Myosine Heavy Chain-14</i>	DFNA4	29
	<i>MYO7A</i>	<i>Myosine 7A</i>	DFNA11	30
	<i>MYH9</i>	<i>Myosine Heavy Chain-9</i>	DFNA17	31
	<i>MYO6</i>	<i>Myosine 6</i>	DFNA22	32
	<i>MYO1A</i>	<i>Myosine 1A</i>	DFNA48	33
	<i>ACTG1</i>	<i>Actin gamma-1</i>	DFNA20/26	34
	<i>ESPN</i>	<i>Espin</i>	DFNB36	35
HÜCRE MEMBRAN PROTEİNLERİ				
	<i>GJB2</i>	<i>Connexin 26</i>	DFNB1	36
	<i>GJB2</i>	<i>Connexin 26</i>	DFNA3	36
	<i>GJB6</i>	<i>Connexin 30</i>	DFNA3	37
	<i>GJB6</i>	<i>Connexin 30</i>	DFNB1	38
	<i>GJB3</i>	<i>Connexin 31</i>	DFNA2	39
	<i>WFS1</i>	<i>Wolframin</i>	DFNA6/DFNA14	40
	<i>KCNQ4</i>	<i>K-channel</i>	DFNA2	41
	<i>SLC26A4</i>	<i>Pendrin</i>	DFNB4	42
	<i>CLDN14</i>	<i>Claudin-14</i>	DFNB29	43
	<i>CDH23</i>	<i>Cadherin-23</i>	DFNB12	44
	<i>STRC</i>	<i>Stereocilin</i>	DFNB16	45
	<i>USH1C</i>	<i>USH1C</i>	DFNB18	46
	<i>OTOA</i>	<i>Otoancorin</i>	DFNB22	47
	<i>PCDH15</i>	<i>Protocadherin15</i>	DFNB23	48
	<i>WHRN</i>	<i>Whirlin</i>	DFNB31	49
	<i>TIMIE</i>	<i>Transmembrane inner ear-expressed gene</i>	DFNB6	50
	<i>TMC1</i>	<i>Transmembrane cochlear expressed gene-1</i>	DFNB7/DFNB11	51
	<i>TMPRSS3</i>	<i>Transmembrane protease serine-3</i>	DFNB8-DFNB10	52
	<i>TMC1</i>	<i>Transmembrane cochlear expressed gene-1</i>	DFNA36	53
YAPISAL PROTEİN	<i>CRYM</i>	<i>Crystallin</i>	-	54
GEN ÜRÜNÜ BİLİNMEYEN				
	<i>DFNA5*</i>	<i>Deafness, Autosomal Dominant Nonsyndromic Sensorineural, 5</i>	DFNA5	55

* DFNA5 olarak isimlendirilen genin ürünü ve işlevi henüz bilinmemektedir.

2.3. Genetik Haritalama

Genetik haritalama, genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimlerinin gösterilmesine yönelik bir yöntemdir. Genetik haritalama, insan genetik hastalıklarının nesiller boyu kalıtımında etkin olan genlerin tespit edilmesi, işlevlerinin ortaya konulması ve ileri süreçte bu hastalıklara yönelik gen tedavisinin gerçekleştirilebilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Genetik haritalamada genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimleri bulunurken çeşitli moleküler genetik teknikler ve istatistiksel analizlerden yararlanılmaktadır. Bilindiği üzere kardeş kromozomlar mayozun I. Profaz aşamasında karşı karşıya gelerek parça değişimine uğrarlar (*crossing-over*). Parça değişimleri sırasında birbirlerine çok yakın yerleşimli genler yavru kuşağa sıklıkla birlikte aktarılırlar. Birbirine uzak yerleşimli genler ise Mendel'in "Bağımsız Ayrılma Kuralı'na" göre rastgele olarak bir arada olabilir ya da ayrılırlar. Böylece yavru kuşaklarda ebeveynlerinde olmayan yeni yapılanmalar ortaya çıkar. Bu olaya rekombinasyon denir (56, 57).

Rekombinasyon, genetik haritalamanın temelini oluşturur. Buna göre, kromozom yerleşimi kesin olarak bilinen bir genetik belirleyici ile hastalık aleli birbirine uzak yerleşimli ise %50 rekombinasyon riski ile birlikte kalıtılmayacaklardır. Buna göre genetik haritalamada çok sayıda rekombinant bireye rastlanması aradığımız genden uzaklaştığımız anlamına gelecektir. Bunun yanı sıra hastalık aleli ile kromozom üzerindeki yerleşimi bilinen genetik belirleyici birbirine yakın yerleşimli ise hastalık aleli ve genetik belirleyici kuşaklar arasında daima birlikte kalıtılacaktır.

Rekombinasyon meydana gelme sıklığı yani rekombinasyon oranı (θ) genetik haritalamada önemli bir faktördür. Rekombinasyon oranları $\theta = 0$ (sıkı bir bağlantı olduğunu gösterir) ve $\theta = 0.5$ (genetik bağlantı olmadığını gösterir) arasında değişir. Eğer rekombinasyon oranı $\theta = 0$ ise çalışmada kullanılan genetik belirleyici ve hastalık arasında sıkı bir bağlantı vardır, nesiller boyu birlikte kalıtılırlardır (57).

Rekombinasyon birimi santimorgan (cM) ile ifade edilir. 1 cM ya da 1 harita ünitesi %1 rekombinasyon sıklığını belirten yani, 100 kişide 1 rekombinant birey olduğunu gösteren genetik harita birimidir. Bu birim sadece genetik belirleyici ile hastalık aleli arasında gözlenen rekombinasyon olasılığını ifade eder. DNA'da 0.7-1 Mb'lık uzunluğa karşılık gelir (57).

Belirli sayıda gerçekleşen mayozda rekombinasyonların tespit edilmesiyle kromozom yerleşimi bilinen bir genetik belirleyici ile aradığımız genin genetik olarak bağlı olup olmadığı belirlenebilir.

Temel olarak istatistiksel analizlere ve moleküler genetik tekniklere dayalı olan genetik haritalamada verilerin son derece belirgin olması gerekir. Buna göre, genetik etkenlere bağlı olduğu düşünülen bir hastalığa ait genin yerleşimini bulabilmek yani geni haritalamak için izlenecek aşamalar vardır. Bunlar;

1. Klinik olarak hastaların aile hikayelerinin alınması ve hastalık fenotipinin en doğru şekilde tanımlanabilmesi,
2. Üzerinde çalışılan hastalığa ait ailedeki kalıtım modelinin mümkün olduğunca kesin olarak belirlenmesidir.

Kalıtım modeli bilgisine bağlı olarak gen haritalama işlevi için hangi metodla çalışılacağı da belirlenmelidir. Bu amaçla yararlanılabilecek 2 ayrı gen haritalama metodu vardır;

- **Model Bağımlı (*parametric*) Metodlar:** Bağlantı (*linkage*) analizi olarak bilinmektedir. Bu tip bir analizin yapılabilmesi için değişmez parametrelere ihtiyaç vardır (56, 57).

I. Analizin yapılabilmesi için kalıtım modeli kesin olarak bilinmelidir. Kalıtım modelinin belirlenmesinde, gen haritalama çalışmalarında istatistiksel

verilerin elde edilmesi amacıyla kullanılan programlardan yararlanılabilir. İki-noktalı LOD skor analizlerinin yapılabildiği *Superlink Pedtool version 0.9 (Bayesian Network)* bu amaçla kullanılabilen bir programdır. Kalıtım modelinin belirlenmesinde *Superlink Pedtool version 0.9*'un "*Segregation Analysis*" programından yararlanır. Burada aileye ait bireyleri, anne-babalarını, bireylerin eşy durumlarını ve hastalıktan etkilenip etkilenmediklerini belirten rakamlar kullanılarak bir aile dosyası oluşturulur ve programa tanıtılır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sıfıra en yakın çıkan değer anlamlı kabul edilir ve bu değere karşılık gelen aileye ait kalıtım modeli 0.99 olasılıkla belirlenir.

II. Çalışmada bir kaç kuşaklı geniş aileler tercih edilmelidir.

III. Yeterli sayıda örnek toplanmasına dikkat edilmelidir. Örneğin; otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa, taşıyıcı olan anne-baba ve tüm çocuklar çalışmaya dahil edilmelidir. Eğer otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa hasta bireyler, varsa eşleri, tüm çocukları ve normal bireylerin sadece kendisi ile çalışılması yeterlidir. Ailedeki bireylerin ölmüş olması, bazı bireylerden örnek toplanamaması ve ailedeki birey sayısının yeterli olmaması istatistik analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu amaçla ailedeki mayoz sayısının genetik haritalama için yeterli olup olmadığını belirleyebilmede çalışmaya başlamadan önce genetik belirleyici bilgileri için simulasyon yapılarak azami LOD skor değeri tahmin edilir. Otozomal resesif kalıtılan durumlarda hastalar için 1 1, sağlıklılar için 1 2 tanımlaması yapılır (1, hastalıkla ilişkili alel) ve LOD skor hesaplanır. Elde edilen LOD skor değerinin 3 ve 3'ün üstünde olması ailenin genetik haritalama için uygun sayıda mayoz içerdiğini göstermektedir (58).

IV. Penetrans; hastalığın bireyde görülme oranı belirlenmelidir.

V. Fenokopi; mutasyon görülmemesine rağmen çevresel etmenler sonucunda benzer fenotipin bireylerde görülme sıklığı belirlenmelidir.

VI. Mutasyonun popülasyonda görülme sıklığı belirlenmelidir.

- **Modelden Bağımsız (*non-parametric*) Metodlar:** Özellikle belirgin bir kalıtım modeline sahip olmayan kompleks hastalıklar için kullanılan metodlardır (56, 57). Bu metod daha önce belirtilen parametrelerden bağımsızdır ve çoğunlukla ilişkilendirme (*association*) çalışmalarında etkindir. İlişkilendirme çalışmalarında hastalık ve genetik belirleyici alelleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmaya çalışılır. Bu metodla yapılan çalışmalarda hastalık aleli ve genetik belirleyicinin kuşaklar arası kalıtımını incelemek yerine hastalığın ortaya çıkmasında etkin olabilecek aday genler belirlenir.

3. Genetik haritalamada kullanılacak genetik belirleyiciler doğru bir şekilde seçilmeli ve mevcut olan genetik belirleyici haritaları etkin olarak kullanılmalıdır.

Genetik haritalamada çeşitli polimorfik genetik belirleyiciler kullanılmaktadır. Bunlar;

RFLP- “Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi”: Restriksiyon enzimi tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan tek baz çifti değişimleridir. Bu polimorfizmleri belirleyebilmek için bakterilerden elde edilen, DNA’da yer alan 4-6 nükleotidlik özgül dizileri tanıyarak bağlanan ve DNA’yı bu özgül dizilerden kesen enzimlerden yararlanılmaktadır. DNA’da meydana gelen mutasyon bir restriksiyon enzimi kesim bölgesini ortadan kaldırıyor veya yeni bir kesim bölgesi oluşturuyorsa DNA’nın bu enzim ile kesilmesi sonucunda ortaya farklı uzunluklarda DNA fragmentleri çıkar. Böylece mutasyonun varlığı ya da yokluğu test edilebilir (56).

VNTR- “Değişen Sayıdaki Ardışık Tekrarlar”: Minisatellit tekrarlarıdır, uzunlukları 9-70 bp arasında değişmektedir. Kodlanmayan bölgelerde bulunurlar (56).

SNP- “Tek Nükleotid Polimorfizmi”: Tek bir nükleotid de meydana gelen baz değişiklikleridir. SNP’ler insan genomunda yaklaşık her 1000 baz çiftinde bir bulunurlar. STR’lere (*Short Tandem Repeat*) oranla heterozigotluk dereceleri düşüktür ve bu nedenle SNP haritalarında genetik belirleyici yoğunluğu çok daha fazladır (56,59). Her ne kadar günümüzde *array* sistemlerinin geliştirilmesiyle SNP kullanımını artsa da, böyle bir çalışmada deney sisteminin uygulanmasındaki zorluklar ve maliyetinin oldukça yüksek olması, SNP’ler yerine, STR’lerin haritalama çalışmalarında tercih edilmesine neden olmaktadır.

STR/STRP/SSLP- “Kısa Ardışık Tekrarlar”: Mikrosatellit tekrarlarıdır, uzunlukları 2-5 nükleotid arasında değişmektedir (56,59). Gen üzerinde rastgele dağılım gösteren ve art arda tekrarlanan dizilerdir. STR’ler genomda ikili, üçlü, dördü, beşli tekrarlar halinde bulunabilirler. Bunlar içinde en sık görülenleri (CA)_n dinükleotid tekrarlarıdır ve insan genomunda ortalama her 3000 bazda bir bulunurlar. Genomda sık bulunmaları ve diğer genetik belirleyicilere oranla heterozigotluk derecelerinin oldukça yüksek olması mikrosatellitleri genetik bağlantı analizleri için çok uygun genetik belirleyiciler haline getirmiştir.

Bir kromozom bölgesinde farklı sayılarda STR tekrarları bulunabilir ve bu tekrar sayılarına bağlı olarak da genetik belirleyicilerin heterozigotluk derecesi değişir. Bir genetik belirleyicinin heterozigotluk yüzdesi (bireylerin heterozigot bulunması yüzdesi) ne kadar yüksekse kullanılan genetik belirleyici o derece bilgi vericidir. Böyle bir durumda iki kromozomu birbirinden ayırt etmek mümkündür ve alel geçişi aile ağacında kolaylıkla izlenebilir. Bu nedenlerle genetik bağlantı analizi çalışmalarının başarılı olabilmesi için alel sayısı 5’ten fazla olan genetik belirleyicilerin kullanılması oldukça önemlidir (59).

İnsan genom projesi kapsamında özellikle 3 kuşaklı ailelerin kullanılmasıyla (*CEPH* aileleri; *Centre d’Etudes du Polymorphisme Humaine*) (60) genomda polimorfik genetik belirleyicilerin tespit edilmesi ve birbirlerine göre kromozomdaki yerleşimlerinin saptanması hedeflenmiştir. Böylece tüm genomu 1-2 cM aralıklarla tarayabilecek haritalar oluşturulmuştur. Birinci kuşak genetik haritalar, 21 CEPH

ailesinin ve çoğunluğu RFLP genetik belirleyicilerinden oluşan 403 adet genetik belirleyicinin kullanılmasıyla oluşturulmuş, tüm insan kromozomlarını içeren ilk genetik haritalardır (61). İkinci kuşak genetik haritalardaki genetik belirleyicilerin büyük çoğunluğu STR (*Short Tandem Repeat*)'lerden olmuştur. Genetik belirleyicilerin büyük çoğunluğu sekiz adet büyük *CEPH* ailesi için genotiplendirilmiştir. Bu aileler 184-188 mayoz içermektedir (59). Bugün yaygın olarak kullanılan ikinci kuşak genetik haritalar;

- *Marsfield* (62)
- *CHLC-Cooperative Human Linkage Center* (63, 64)
- *deCODE* (65)
- *Genethon Map* (66)
- *Rutgers Combined Linkage- Physical Map* (67)

Genetik haritalar kullanılırken dikkat edilecek bazı hususlar vardır.

❖ Haritalar genetik belirleyicilerin kromozomlar üzerindeki sırasını ve birbirlerine göre genetik uzaklıklarını vermelidir. Genotipleme yapılırken kullanılan genetik belirleyicilerin sıralanmasında ve fiziksel harita uzaklıklarının tespitinde yapılabilecek hatalar, gen haritalama çalışmalarını başarısız kılmaktadır. İnsan Genom Projesinden elde edilen veriler doğrultusunda, genetik belirleyiciler arasında hatalı yerleşimlerin yapılmaması amacı ile genetik belirleyicilere ait genetik harita uzaklıkları (cM) yerine, DNA'yı oluşturan bazların sırasını belirten fiziksel harita uzaklıkları (bç=baz çifti) etkin olarak kullanılmaktadır.

❖ Farklı merkezler tarafından oluşturulan genetik haritalar (*Marsfield*, *Genethon*, *deCODE*) farklı sayıda *CEPH* ailesinin kullanılması, çalışma sırasında genotipleme hatalarının yapılabilmesi ve bilgi verici mayoz sayısındaki yetersizlikler nedeniyle birbirleriyle uygunluk göstermeyebilir ve hatalı genetik harita uzaklıkları hesaplanabilir. Bu amaçla oldukça geniş polimorfik genetik belirleyici (N= ~16.000) setine sahip ve yüksek çözünürlüklü bir harita oluşturulmuştur. Birçok genetik belirleyicinin bu haritada belirtilen kromozom yerleşimleri, hem fiziksel harita

uzaklıkları hem de rekombinasyona dayalı bilgilerle desteklenmiştir. Farklı genotip bilgilerinin ve diğer genetik haritaların birleştirilmesiyle oluşan *Rutgers* fiziksel haritası bilgisayar ortamında oluşturulmuş bir harita olan *MAP-O-MAT* sistemi içine dahil edilmiştir. *MAP-O-MAT*, *CRI-MAP* programının kullanılmasıyla genetik belirleyicilerin hesaplanan harita uzaklıklarının ve kromozom üzerindeki yerleşim sıralarının doğruluğunun kontrolünü kolaylaştırmaktadır (67).

Genetik haritalama çalışmasının kullanım alanları:

- **Bilinen Kromozom Lokuslarına Bağlantının Taranması:** Bu yaklaşımda hastalık fenotipinin ortaya çıkmasından sorumlu geni saptamak için öncelikle daha önceden benzer klinik tabloyu gösteren ailelerde, belirlenmiş olan kromozom lokuslarına genetik bağlantının olup olmadığına bakılır. Kromozom lokusu çevresinde veya içinde yerleşmiş polimorfik genetik belirleyiciler kullanılarak aranılan özelliğin bu kromozom lokuslarıyla ilişkili olup olmadığı ortaya konur. Yapılan istatistiksel analizler ile aranılan özellik ve gen arasındaki bağlantının ne derece güçlü olduğu araştırılır. Genetik haritalama sürecinde rekombinant bireylerin varlığı ile kromozom aralığının daraltılması genin tanımlanmasını sağlayabilecektir.

- **Genom Taraması (*Random Genome-Wide Search*):** Hastalığın hangi kromozomda ya da hangi aday gen ile ilişkili olacağına dair bir bilgi yoktur. Bu bilgilere erişebilmek için genomu 10-20 cM aralıklarla tarayan, kromozom üzerinde yerleri belirli genetik belirleyici panelleri kullanılarak tüm genom rastgele taranır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç veren kromozom parçası bulunmaya çalışılır. Eğer tüm genom tarandıktan sonra hastalıkla bağlantılı olabilecek kromozom lokusu/lokusları saptanamamış ise, genomu daha sık aralıklarla tarayan genetik belirleyici panelleri ile çalışılır. Genomu 20 cM aralıkla taramak için yaklaşık 200, 8-10 cM aralıkla taramak için yaklaşık 400 ve 5 cM aralıkla taramak için yaklaşık 750 genetik belirleyici gereklidir (68).

4. İstatistiksel Değerlendirme (İki-noktalı LOD skor Analizi); Genetik bağlantının değerlendirilmesinde LOD skor (*Logarithm of Odds Ratio*) analizi

uygulanır. LOD skor, ilgilenilen hastalık geni ile kromozom yerleşimi bilinen genetik belirleyici arasındaki genetik bağlantının derecesini ifade eder (57, 58).

Buna göre;

$$\text{LOD skor} = 10_{\log} = \frac{\text{Bağlantı Gözlenmesi Olasılığı} \quad \theta < 0.5}{\text{Bağlantı Gözlenmemesi Olasılığı} \quad \theta = 0.5}$$

Bir diğer deyişle, LOD skor; aranılan genin, test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının olmama olasılığına oranıdır. Hastalığın genetik belirleyiciye karşı analizinde iki-noktalı (*two-point analysis*) LOD skor analizinden yararlanır. Elde edilen LOD skor değerlerine göre genetik belirleyiciler ve aranılan gen arasında bağlantı olup olmadığı değerlendirilir.

Analiz sonucunda çıkan değer pozitif doğru arttıkça kromozom yerleşiminin saptanması olasılığı da artar. Eğer bu değer 5 gibi bir sayı ise, aranılan genin test edilen kromozom lokusunda seçilen genetik belirleyiciye bağlantı göstermesi olasılığı, bağlantı olmaması olasılığından 10^5 kez (100.000 kez) daha fazla olacaktır. Sonucun negatif bir değer çıkması, aranılan kromozom lokusundan uzaklaşıldığını gösterirken, 3 ve 3' ün üstünde çıkan değerler anlamlıdır ve genetik bağlantıyı destekler.

Bağlantı Analizleri ve LOD skor değerlerinin hesaplanabilmesi için kullanılan birtakım programlar vardır (59, 69). Bunlar;

- Elston Stewart Algoritması (büyük aile ağaçları ve az sayıda genetik belirleyici kullanıldığında),

I. LINKAGE

II. FASTLINK

- Lander-Green Algoritması (küçük aile ağaçları ve çok sayıda genetik belirleyici kullanıldığında),

I. Mapmaker

II. Genehunter

III. Allegro

IV. Merlin

- Diğer Analiz Programları

I. SUPERLINK (Bayesian network)

II. SIMWALK 2

III. LOKI

2.4. Aday Gen Belirleme Stratejisi

Genetik bağlantı analizi sonucunda LOD skor değerleri pozitif ve özellikle 3 ve 3'ün üstünde olan genetik belirleyicilerin bulunduğu kromozom aralığında yerleşmiş olan tüm genler veri bankaları *NCBI-Map Viewer* ve *Ensembl* aracılığı ile belirlenmektedir. Tespit edilen kromozom aralığında bulunan genlerin aranan fenotipten sorumlu olma ihtimalleri araştırılır ve aday gen/genler belirlenir. Aday genleri belirlemede çeşitli yaklaşımlardan yararlanılabilir. Ancak genel olarak, bir hastalıktan sorumlu olabilecek aday genleri tespit etmede izlenecek strateji sırasıyla aşağıda belirtildiği gibidir:

A. Dokuya özel cDNA kütüphanelerinin araştırılması

Dokuya özel cDNA kütüphaneleri, ifade edilen nükleotid dizilerini (EST-*Expressed sequence tags*) veya cDNA'nın tamamını içermekte olup belirli bir kromozom aralığında bulunan hastalıktan sorumlu aday genlerin tespit edilmesinde çok önemli kaynaklardır.

Dokuya özgül cDNA kütüphanelerinden elde edilecek dizi bilgisinin genom içerisinde benzerlik gösterdiği bölgeler *NCBI-BLAST* programı ile belirlenir. cDNA kütüphanesinden elde ettiğimiz dizi/dizilerin bir gen dizisinin belirli bir kısmı veya tamamı ile %100'lere varan nükleik asit dizisi benzerliği göstermesi bu genin hastalıktan sorumlu aday gen olması olasılığını arttırmaktadır. Hastalarda bu gen dizi analizine alındığında ve mutasyonun saptanması durumunda hastalıktan sorumlu gen

saptanmış olacaktır. Mutasyonun bulunmaması aday genlerin saptanması için elektronik veri bankalarının kullanımını gerektirir.

B. Elektronik veri bankalarının kullanımı

Elektronik veri bankaları özellikle insan genom projesinin tamamlanmasından sonra aday genlerin saptanmasında çok sık başvurulmuş kaynaklar olmuşturlardır.

Genom taraması sonucunda tespit edilen kromozom aralığında bulunan genler, ifade edildikleri dokular ve gen ürünlerinin işlevlerini belirlemek amacıyla elektronik veri bankalarında incelenir ve aday gen olabilme nitelikleri ortaya konur. Bu aşamada taradığımız kromozom aralığındaki genlerin herhangi bir hastalıkla ilişkisi için *NCBI-OMIM*, genin kromozomdaki yerleşimi için *NCBI-BLAST*, *NCBI-Map Viewer*, *Ensembl (EMBL-EBI and Sanger Institute)*, *Human Genome Browser* ve *NCBI-Gene*, ifade edildikleri dokular ve ifade edilme düzeyleri için *NCBI-Gene*, *Ensembl*, *Bioinformatic Harvester*, gen ürününün yapı ve işlev bilgisi için, *NCBI-Protein*, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *NCBI-Conserved Domain*, *Pfam*, *ProDomain* sıklıkla kullanılan veri bankalarıdır. Ayrıca aday gen taraması yapmak üzere daraltılan kromozom aralığında, ilgilendiğimiz dokuda ifade edilip edilmediğini belirleyemediğimiz bir gen var ise bu gene ait EST'lerin tespit edildiği doku bilgisine bakılır. Eğer sorumlu dokuda gene ait bir veya birden fazla sayıda EST tespit edilirse, o genin hastalıkla ilgili dokuda ifade edildiği belirlenmiş olur. Bu amaçla *NCBI-UniGene* veri bankasından yararlanılır.

Böylece genler içerisinde ilgili hastalıktan sorumlu olma ihtimali yüksek olan aday gen/genler, ifade edildiği dokular ve protein ürünlerinin işlevi açısından araştırıldıktan sonra elde edilen bilgiler doğrultusunda seçilir ve bu genler için DNA dizi analizi yapılarak kontrol ve hasta bireyler arasında herhangi bir baz değişikliği olup olmadığına bakılır.

KIAA, FLJ ve LOC kodlu genler henüz gen ürünleri karakterize edilememiş genlerdir. Bu genlerin de elektronik veri bankalarından yararlanılarak aday olabilme niteliklerinin araştırılması gerekmektedir.

KIAA'lar, 4 kb'dan büyük cDNA'lardır, 0-9 arası verilen dört numara ile adlandırılır (KIAA0400 gibi) ve Kazusa cDNA dizi analizi projesinde tanımlanmışlardır. Bu proje ile önceden tanımlanamamış insan gen ifadelerinin tanımlanması ve tanımlanmamış insan gen ifadeleri tarafından kodlanan gen ürünlerinin primer yapılarının tahmini hedeflenmiştir. KIAA'lar proteine kodlanan genlerdir ancak protein ürünleri bilinmemektedir. Bir başka deyişle, gen ifadesi bilgisi ve protein bilgisi arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Gene ait ifade bilgisinin protein bilgisi ile ilişkilendirilebilmesi için cDNA'lara ait gen ürünleri işlevleri açısından aminoasit dizileri düzeyinde bilgisayar analiz programlarına alınır. Böylece, aminoasit dizileri benzerliğinden yararlanılarak kodlanan diziyeye ait protein ürünü belirlenmeye çalışılır. Yaklaşık 10 yıldır süren Kazusa Dizi Analizi Projesi kapsamında birçok gen ifadesi bilgisi tespit edilebilmiştir. Bu şekilde ikinci isimlendirmeleri KIAA kodlu olan birçok gen veri bankalarına girmiştir. Ör: *KIAA0161-RNF144* (70).

FLJ kodlu genler de tıpkı KIAA'lar gibi büyük cDNA dizileridir (71). KIAA'larda olduğu gibi bu diziler için de nükleotid ve aminoasit dizilerinin genomdaki diğer dizilerle olan benzerliğine bakılarak, henüz tanımlanamamış gen ürününün işlevleri ortaya çıkarılmaya çalışılır. Bu nedenle KIAA ve FLJ kodlu genler her ne kadar ürünleri bilinmiyor olsa da proteine kodlanıyor olmaları nedeniyle gen sınıfına alınması gereken nükleotid dizileridir.

Aday gen belirlenmesinde en son aşamada araştırılacak genler LOC kodlu genlerdir (*LOC400942* gibi). Bu genlere ait nükleotid dizileri veri bankaları (*NCBI-GNOMON*) aracılığı ile bilgisayar ortamında belirlenmiştir (72). Bu diziler için kesin olarak tanımlanmış herhangi bir gen ürünü bilgisi veri bankalarında bulunmamaktadır. Bu nedenle LOC genleri hipotetik olarak adlandırılmaktadır. LOC kodlu genlere ait protein ürünleri bilinmiyor olsa da proteini açıklamaya ya da

protein işlevi hakkında çeşitli varsayımlarda bulunmaya yönelik her türlü çalışma genin cDNA dizisi üzerinden yapılabilir. Böyle bir durumda hipotetik bir genin ilgili hastalıktan sorumlu aday gen olup olamayacağını belirlemek bu dizinin işlevlerini belirtilen veri bankaları aracılığıyla cDNA dizisi üzerinden tahmin edebilmekle mümkün olacaktır. Bu amaçla hipotetik genlerin genomda bilinen gen dizileriyle olan nükleotid ve aminoasit dizisi benzerliğine ve bu dizilerin herhangi bir dokuda ifade edilip edilmediklerini belirten EST verilerine bakılır ve LOC kodlu dizinin gen ürünü ve ifade edildiği dokular hakkında bilgi edinilir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda LOC kodlu dizi ya da dizilerin hastalıktan sorumlu olabilecek aday gen listesine alınıp alınmayacağına karar verilir.

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı görülen ve 2p25 kromozom bandına bağlantı gösterdiği tespit edilmiş bir ailede, öncelikle genin bulunabileceği kromozom aralığı daraltılmış ve D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri arasındaki 6.430.934 baz çiftlik kromozom bölgesinde hastalıktan sorumlu olabileceği düşünülen aday genlerin tespiti koklear cDNA kütüphanesi ve elektronik veri bankaları aracılığı ile yapılmıştır.

3. BİREYLER ve YÖNTEMLER

3.1. Bireyler

- Bu tez çalışması kapsamında otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı görülen 6'sı hasta ve 8'i sağlıklı geniş bir aile ile çalışılmıştır.

- Hastaların klinik ve odyolojik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı ve Odyoloji-Konuşma Bozuklukları Bilim Dalı'nda yapılmış ve hastalara bilateral sensörinöral işitme kaybı tanısı konmuştur.

Tüm çalışmalar ailelerden “Bilgilendirilmiş Onam Formu” ve H.Ü. Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'nun onayı alınarak (21.10.2004 tarihli LUT 04/43-23 karar no) gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Çözeltiler

3.2.A. DNA İzolasyonu

- Liziz Tampon (pH 8.2) : Tris-HCl (Sigma) 10 mM
NaCl (Merck) 400 mM
Na₂EDTA (Merck) 2 mM
- %10 SDS (Merck) : Sodyum dodesil sülfat
10 gr/100 ml distile su
- Proteinaz K (Sigma) : 10 mg/ml 1 mM Tris HCl
- Satüre amonyum asetat (Carlo Erba) : Amonyum asetat
74 gr/100 ml distile su
- Tris-EDTA tampon (pH 7.5) : Tris-HCl (Sigma) 10 mM
Na₂EDTA (Merck) 1 mM

3.2.B. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

- Taq DNA polimeraz tampon (10X) (Fermentas) : 750 mM Tris-HCl
(pH 8.3, 25 °C)
200 mM (NH₄)₂SO₄
%0.1 Tween 20
- Taq DNA polimeraz (Fermentas) :5U/μl
- MgCl₂ (Fermentas) :25 mM
- dNTP karışımı (Fermentas) :2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP
2.5 mM dGTP, 2.5 mM dCTP

Haplotip Analizi İçin Kullanılan Primer Dizileri

D2S319, D2S2211, D2S162, D2S168, genom taraması için kullanılan primerlerdir. Haplotip Analizi için kullanılan primer dizileri;

- D2S281** F: 5'-TGC ATG TGT GTT TGT ATA TGT ATT A- 3'
R: 5'-CAT CGT CTT GCA TTA GAC AG- 3'
- D2S1329** F: 5'-TTG TGG AAC CGT TCT CAA AT- 3'
R: 5'-GAA ACT TCC ACC TGG GTT CT- 3'
- D2S2164** F: 5'-GTC ACT ATC AGC CCC AGG- 3'
R: 5'-GAG AGA GCC ATT ACA GAT TCA C- 3'

Bu primerler sırasıyla AFM168xg3 (CA_n), GATA28H06 (GATA), AFMA130WH9 (CA_n) primerleri olup heterozigotluk yüzdeleri dikkate alınarak seçilmişlerdir. Primerlerle ilgili bilgilere *NCBI-Map Viewer* ve *NCBI-UniSTS* veri bankaları aracılığı ile ulaşılmıştır.

3.2.C. Agaroz Jel Elektroföresi

- Agaroz (Sigma) : Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
- Tris-Asetat Tamponu (TAE) (pH 8.0): Tris baz (Applichem) 2 M
: Glasiyal asetik asit (Carlo Erba) 1.14 ml
: Na₂EDTA (Merck) 0.5 M
- Yükleme tamponu : Gliserol (Merck) 5.5 ml
1XTAE tamponu (Merck) 4.5 ml
Orange G boya (Merck) 0.01 gr
- Etidyum bromür : 10 mg/ml distile su
- Moleküler ağırlık belirleyicisi : Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder
(1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400,
300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti)
ΦX174/HaeIII (Sigma)
(1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234,
194, 118, 72 baz çifti)

3.2.D. Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

- %40 Akrlamid/bisakrlamid çözeltisi : Akrlamid (Sigma) 41.5 gr
Bisakrlamid (Sigma) 1 gr
Distile su ile 115 ml'ye tamamlanır.
- Tris-borat tampon (TBE) (pH 8.3) (10X) : Tris baz (Applichem) 0.9 M
Borik asit (Merck) 0.9 M
Na₂EDTA (Merck) 25 mM
- Amonyum persülfat (Merck) (APS) (%10) : 0.1 gr/1 ml distile su
- TEMED (Amresco) : 40 µl/100 ml jel çözeltisi
- Yapıştırıcı Çözelti : Bind silane (Sigma) 50 µl
Glasiyal asetik asit (Carl.E) 50 µl
Etil alkol (%95) (Sigma) 10 ml
- Silikon çözelti (Stratagene) : 2 ml cam üzerine
- Yükleme tamponu (6X) : %40 Sükroz (Sigma)
%0.25 brom fenol mavisi (Sigma)
%0.25 ksilen siyanol (Sigma)
- Moleküler ağırlık belirleyicisi : *Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder*
(1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400,
300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti)
ΦX174/HaeIII (Sigma)
(1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234,
194, 118, 72 baz çifti)

3.2.D.I. Denatüre Edici Poliakrilamid Jelde Haplotip Analizi

- Denatüre edici jel çözeltisi (%7) : Üre 42 gr
Akrilamid/bisakrilamid (%40) 7.5 ml
TBE (10X) 10 ml
%10 APS 350 µl
TEMED 40 µl
Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.2.E. Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi

- Fiksasyon çözeltisi Glasiyal asetik asit (CarloErba) 500 ml
Distile su 1450 ml
- Gümüş nitrat çözeltisi (%1) (Applichem) 1 gr/ml
- Formaldehit (%1) (Merck) 1 ml/L
- Sodyum tiyosülfat (Merck) 10 mg/ml
- Sodyum karbonat çözeltisi (Merck) 30 gr/L

3.2.F. Gümüş Boyama Sonrası Poliakrilamid Jellerdeki DNA Bantlarının Fotoğraflarının Eldesi

- APC (Automatic Processor Compatible) film (Promega)

3.3. Yöntemler

3.3.A. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için yüksek tuz konsantrasyonunda çöktürme yöntemi kullanıldı. 10 ml kan 50 ml'lik tüplere alındı ve eritrositlerin parçalanması amacıyla 40 ml soğuk distile su ilave edilerek 2-3 dk. hızla çalkalandı. Tüpler 15 dk. 2500 rpm'de (680 RCF) oda sıcaklığında santrifüj (*IEC International Santrifuge Model K*) edilerek lökositlerin tüpün dip kısmında toplanması sağlandı. Üst faz atılarak çökelti üzerine 30 ml soğuk distile su eklendi ve çalkalanarak çökelti yıkandı. 2500 rpm'de (680 RCF) 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatant yavaş ve dikkatli bir şekilde döküldü. Çökelti üzerine 3 ml lizis tamponu eklendi ve hücreler karıştırıldıktan sonra üzerine 200 µl %10 SDS, 150 µl Proteinaz K eklendi. Tüpler dikkatli bir şekilde alt üst edilerek 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda karışım üzerine 1 ml satüre amonyum asetat eklenerek 30 sn. hızlı bir şekilde çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyondan sonra 4500 rpm'de (2210 RCF) 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınarak üzerine 15 ml saf etanol eklendi ve DNA'nın toplanması sağlandı. Toplanan DNA %70'lik etanol ile yıkandı ve alkol uçuruldu. DNA, TE tamponu içeren tüpe alındı ve erimesi için bir gece oda ısısında veya 37 °C'lik etüvde bırakıldıktan sonra analiz edilene kadar +4 °C'de saklandı (73).

3.3.B. Haplotip Analizi

3.3.B.I. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, incelenecek DNA bölgesinin o bölgeye özgü oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması işlevidir. Bu amaçla öncelikli olarak her bir oligonükleotid primer için uygun PCR koşulları belirlendikten sonra polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı.

Çalışmamızda kullandığımız polimeraz zincir reaksiyonu için uygulanan protokol Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü

STOK	25 µl İçin Kullanılan	Son Konsantrasyon
10x Tampon	2.5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 µl	1.5 mM
2.5 mM dNTP	1 µl	0.01 mM
Primer“ <i>forward</i> “ 20pmol/ µl	1 µl	20 pmol
Primer “ <i>reverse</i> “ 20pmol/ µl	1 µl	20 pmol
Taq DNA polimeraz 5U/ µl	0.1 µl	0.5 U
Genomik DNA	1 µl	200-300 ng/ µl
dH ₂ O	16.9 µl	
TOPLAM	25 µl	

94°C	5 dak.	} 35 döngü
94 °C	1 dak.	
55 °C	1 dak.	
72 °C	1 dak.	
72 °C	3 dak.	

3.3.B.II. Agaroz Jel Elektrofizi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında %2’lik agaroz jelde PCR ürünleri kontrol edilmiştir. DNA bantlarının büyüklüklerini tespit etmek ve DNA üzerinde doğru bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlamak için ise *50 bp DNA ladder* ve *ΦX174 (HaeIII)* moleküler ağırlık belirleyicileri kullanıldı.

3.3.B.III. Poliakrilamid Jel Elektrofizi

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan hedef DNA bölgesi uygun konsantrasyonlarda yükleme tamponu (*BlueFormamide*) ile karıştırılıp, 94 °C’de 10

dk. denatüre edildikten sonra buz üzerine alınarak %7'lik denatüre edici poliakrilamid jelde 1600 V'da 45 mA'de, 4 saat yürütüldü. DNA bantlarının jelde yürüme süreleri bantların büyüklüklerine göre belirlendi.

3.3.B.IV. Gümüş Nitratla Boyama

Denatüre edici poliakrilamid jeldeki DNA bantları görüntülenebilmesi amacı ile %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisi ile boyandı. Bu işlem için, jel önce %10'luk asetik asit çözeltisinde fiksasyon amacı ile 30 dk. yıkandı. Daha sonra 1500 ml distile su ile iki kez 5 dk. yıkandı ve içine 2 ml formaldehit eklediğimiz % 0.1'lik gümüş nitrat çözeltisinde 30 dk. süreyle boyandı ve “*developer*” çözeltisinde (%3 Na₂CO₃, 2 ml formaldehit, 0.4 ml Na₂S₂O₃) yaklaşık 1-5 dk. yıkanarak bantlar görünür hale getirildi.

3.3.B.V. DNA Bantlarının Görüntülenmesi

Gümüş boyama sonrası denatüre edici poliakrilamid jellerdeki DNA bantları APC film üzerinde görüntüledi. Hasta ve sağlıklı bireylerin alelleri, *CEPH* kontrol bireyi (1347-02) ile karşılaştırılarak numaralandırıldı. Tüm genetik belirleyiciler birlikte değerlendirildikten sonra bireylere ait haplotipler oluşturuldu. Haplotipler incelenerek aile ağacı üzerinde mutant ve mutant olmayan (sağlıklı) haplotipler belirlendi.

3.3.C. İki-noktalı LOD Skor Analizi

Aranılan genin test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının olmama olasılığına oranını (LOD skor değeri) hesaplayabilmek amacı ile *Superlink Pedtool version 0.9* programının iki-noktalı LOD skor analizinden yararlandı. Bu programla hastalığın her bir genetik belirleyiciye karşı LOD skor değerlerinin hesaplanabilmesi için öncelikli olarak aileye ait aile ağacı dosyası (*pedfile*) aşağıda belirtilen kurallara göre oluşturuldu.

Aile ağacı dosyası oluşturulurken, 1. sütunda bireyleri tanıttıcı rakamlar (*id=identification*), 2. sütunda bireylerin babalarını tanıttıcı rakamlar, 3. sütunda bireylerin annelerini tanıttıcı rakamlar, 4. sütunda bireylerin eşey durumlarını belirten rakamlar (1: Erkekler, 2: Dişiler için kullanılır), 5. sütunda bireylerin hastalıktan etkilenip etkilenmediğini belirten rakamlar (0: Hastalıktan etkilenip etkilenmediği bilinmiyor, 1: Sağlıklı, 2: Hasta), geriye kalan sütunlarda ise çalışmada kullanılan genetik belirleyicilere ait alel numaralandırmaları kullanıldı.

LOD skor değerleri *Superlink Pedtool version 0.9* ile hesaplanırken aile ağacı dosyası dışında programa veri girişleri yapıldı. Buna göre, öncelikle hastalığın ailedeki kalıtım modeli otozomal resesif (0.99 olasılıklı) olarak belirtildi. Bunun yanında çalışmada kaç tane genetik belirleyici kullanıldığı ve genetik belirleyicilerin isimleri belirtildi. Ayrıca, hastalığa ait mutant gen frekansı 0.01 olarak kabul edildi.

Yapılan analizlerde 3 ve 3'ün üstünde elde edilen değerler anlamlı kabul edildiğinden bu değerlerin tespit edildiği genetik belirleyicilerle birlikte pozitif değerli genetik belirleyiciler de belirlendi.

3.3.D. Aday Genlerin Belirlenmesi

- cDNA kütüphanelerinin taranması

Aday genleri belirlemeye yönelik olarak, öncelikle gen bankası numarası CB381773–CB38790 ve CB410624–CB410971 olan koklear cDNA kütüphanesinde ve Morton Fetal Koklear EST veri bankasında D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri arasındaki kromozom aralığında herhangi bir EST'nin bulunup bulunmadığı araştırıldı (74,75). Bu amaçla belirtilen aralıkta koklear cDNA kütüphanesinde bulunan EST'ler (C4E11, C15A9, C3G2, C15E10, C3G11, C15E5, C17G5, C2E12) *NCBI-BLAST* programına kopyalanarak genom içinde benzerlik gösterdiği bölgeler incelendi. cDNA kütüphanesinde yer alan DNA dizilerinin insan genomunda bulunan hangi dizilerle %100 benzerlik gösterdiği tespit edilerek EST lerin belirlediğimiz kromozom aralığında olup olmadıkları araştırıldı. Koklear cDNA kütüphanesinde bulunan dizilerin %100 nükleik asit dizisi benzerliği gösterdiği

genler aday gen olarak belirlendi. Ayrıca bu genlerin, ne tip hastalıklarla ilişkili oldukları (*NCBI-OMIM*), sorumlu dokuda ifade edilmeleri, ifade edilme düzeyleri (*NCBI-Gene*, *Human Genome Browser*, *Bioinformatic Harvester*) ve kromozom yerleşimleri (*NCBI-Gene*, *Ensembl*, *Human Genome Browser*), gen ürünlerinin işlevi ve bu işlevin işitme kaybı ile bağlantılı olup olamayacağı bilgisi (*NCBI-OMIM*, *NCBI-Protein*, *NCBI-Conserved Domain*, *Swiss-Prot*, *Pfam*, *Bioinformatic Harvester*) veri bankaları aracılığı ile araştırıldı.

- Elektronik veri bankaları

Aradığımız kromozom bölgesinde (2p25/D2S319-D2S168) bulunan tüm genler, elektronik ortamda veri bankaları (*NCBI-Map Viewer*, *Ensembl*) kullanılarak tespit edildi (Veri bankalarına ulaşılacak internet adresleri EK-1’de verilmiştir).

Koklear cDNA kütüphanesinde EST bilgisine rastlamadığımız fakat aday genleri belirleyeceğimiz kromozom aralığında bulunan genlerin aday gen nitelikleri aşağıdaki veri bankaları aracılığı ile araştırıldı.

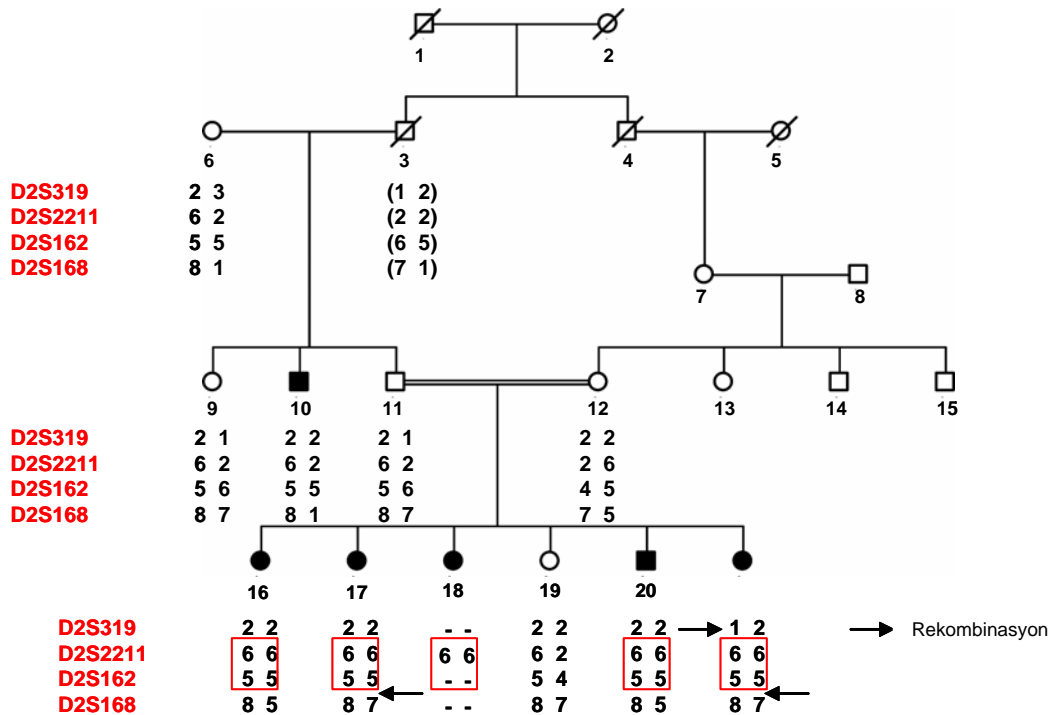
NCBI-OMIM, genlerin herhangi bir hastalıkla ilişkili olup olmadığını belirlemede, *NCBI-Map Viewer*, *Ensembl*, *Human Genome Browser* ve *NCBI-Gene*, genlerin kromozom yerleşimlerini belirlemede, *NCBI-Gene*, *Ensembl*, *Bioinformatic Harvester*, genlerin ifade edildikleri dokular ve ifade edilme düzeylerini tespit etmede, *NCBI-Protein*, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *NCBI-Conserved Domain*, *Pfam*, gen ürünlerinin yapı ve işlev bilgisini tespit etmede kullanılmıştır.

Ayrıca 2p25/D2S319-D2S168 kromozom aralığında otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday genleri tespit etmede gen ürünü henüz tespit edilmemiş FLJ kodlu genler ile LOC kodlu hipotetik genler de aday gen olup olamayacakları yönünde veri bankalarında araştırıldı. Bu aşamada da tespit edilen dizilere ait nükleotid ve aminoasit dizilerinin tüm canlı genomlarında taraması *NCBI-BLAST* programı kullanılarak yapıldı. Böylece belirlenen bu dizilerin (FLJ, LOC) insan genomunda bulunan hangi genlerle yüksek oranda homoloji gösterdiği ya da göstermediği saptandı.

4. BULGULAR

4.1. Genetik Belirleyicilerin Tespit Edilmesi

“Populasyonumuzda sensorinöral işitme kayıplarından sorumlu yeni kromozomal lokalizasyonların ve genlerin tanımlanması” başlıklı TÜBİTAK-CNRS (Proje No: 8833) projesi kapsamında otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı tanısı alan ve akraba evliliğinin görüldüğü bir aile için nonsendromik işitme kaybından sorumlu yeni bir kromozom lokusu bildirilmiştir. TÜBİTAK-CNRS (Proje No: 8833) projesi kapsamında, otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı görülen bu ailede, genom taraması sonrasında D2S319, D2S2211, D2S162, D2S168 genetik belirleyicilerinden ikisi (D2S2211 ve D2S162) için tüm işitme engelli bireylerin homozigot olduğu saptanmış (Şekil 4.1) ve pozitif LOD skorlar (D2S2211: LOD skor=2.10 $\theta=0.05$ / D2S162: LOD skor= 3.09 $\theta= 0.0$) elde edilmiştir (Tablo 4.1). Ayrıca, yapılan çalışma kapsamında D2S319 ve D2S168 genetik belirleyicilerinin bulunduğu kromozom bölgesinde rekombinasyon saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. TÜBİTAK-CNRS (Proje No: 8833) projesinde genom taraması sonrasında dört genetik belirleyici için elde edilen haplotip analiz sonuçları.

Tablo 4.1. TÜBİTAK-CNRS (Proje No: 8833) projesinde genom taraması sonrasında dört genetik belirleyici için elde edilen iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları.

Genetik Belirleyiciler	$\theta= 0.0$	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
D2S319	- ∞	- 0.16	0.36	0.45	0.32	0.13	0.02
D2S2211	-0.05	1.70	2.10	2.03	1.56	0.95	0.32
D2S162	3.09	3.03	2.76	2.42	1.72	1.00	0.35
D2S168	- ∞	-3.06	-1.24	-0.53	-0.03	0.08	0.04

Bu proje sonucunda, D2S2211 ya da D2S162 genetik belirleyicileri için pozitif LOD skor değerlerinin bulunmasıyla birlikte homozigotluğun da saptanması 2p25 kromozom bandında D2S2211 ya da D2S162 genetik belirleyicileri çevresinde nonsendromik işitme kaybından sorumlu yeni bir genin bulunabilme olasılığını arttırdı.

D2S2211 ve D2S162 genetik belirleyicileri çevresine uygun polimorfik genetik belirleyiciler (D2S281, D2S1329, D2S2164) *NCBI-Map Viewer* ve *NCBI-UniSTS* veri bankaları kullanılarak belirlendi. Buna göre, D2S2211 ve D2S162 genetik belirleyicileri çevresinde tespit edilen polimorfik genetik belirleyicilerin genetik harita (cM) ve fiziksel harita (bç) yerleşimleri ve birbirlerine göre uzaklıkları *deCODE*, *Genethon*, *Marsfield* haritaları kullanılarak belirlendi. Genetik belirleyicilerin sıralanmasında heterozigotluk derecelerinin belirlenmesinde *Rutgers Fiziksel Harita* bilgilerinden yararlanıldı. Çalışmada kullanılan tüm genetik belirleyicilerin yerleşimlerinin doğru olduğu ve heterozigotluk derecelerinin 0.5'in üstünde bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Haplotip Analizinde Kullanılan Polimorfik Genetik Belirleyiciler

Polimorfik Genetik Belirleyiciler	Baz aralıkları	deCODE	Genethon	Marsfield
D2S319	4.965.347-4.965.474 bç	7.6 cM	6.00 cM	7.60 cM
D2S281	6.480.316-6.480.562 bç	15.19 cM	12.60 cM	14.10 cM
D2S2211	7.421.978-7.422.231 bç	-	14.00 cM	15.61 cM
D2S1329	7.796.185-7.796.385 bç	19.11 cM	-	15.61 cM
D2S2164	8.177.636-8.177.840 bç	20 cM	17.30 cM	18.42 cM
D2S162	8.810.895-8.811.018 bç	22.73 cM	21.30 cM	20.03 cM
D2S168	11.396.073-11.396.281bç	-	28.60 cM	27.06 cM

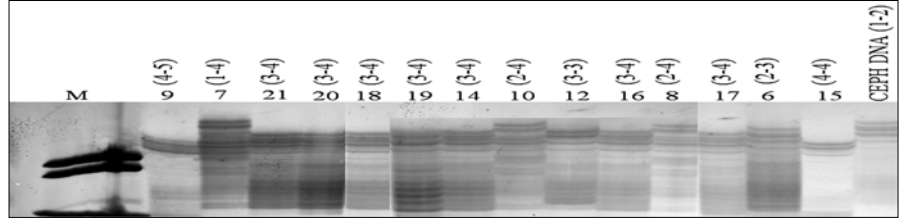
Tablo 4.3. Rutgers Fiziksel Haritası

Genetik belirleyici	Genetik belirleyici tipi	Primer veya SNP referans adı	Bilgi verici mayoz sayısı	Heterozigotluk derecesi	Fiziksel Harita Pozisyonu
D2S319	-	-	-	-	-
D2S281	STS	AFM168XG3	567	0.80	6.608.842 bç
D2S2211	STS	AFMA272YC5	123	0.74	7.421.978 bç
D2S1329	STS	GATA28H06	803	0.69	7.796.185 bç
D2S2164	STS	AFMA130WH9	884	0.81	8.177.636 bç
D2S162	STS	AFM225ZG5	1055	0.86	8.810.895 bç
D2S168	STS	AFM240VF6	159	0.83	11.396.073 bç

4.2. Haplotip Analizi

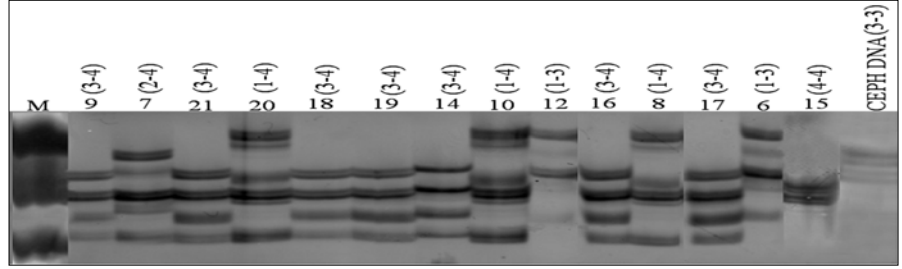
Yaklaşık 6.4 cM'lik kromozom bölgesi üzerinde tespit edilen yedi genetik belirleyici (D2S319, D2S281, D2S2211, D2S1329, D2S2164, D2S162, D2S168) ile yapılan çalışmalar sonrasında aileye ait haplotipler oluşturuldu. Haplotip analizine ait örnek fotoğraflar Şekil 4.2'de, tüm genetik belirleyicilerin kullanılmasıyla elde edilen haplotip analiz sonuçları ise Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

D2S281
(239-255 bç)



M: Φ X174

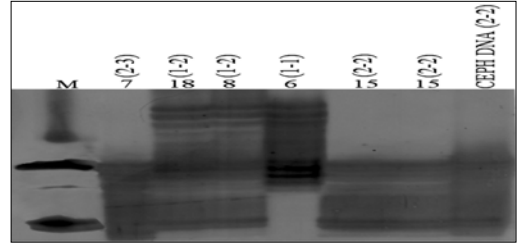
D2S1329
(197-207 bç)



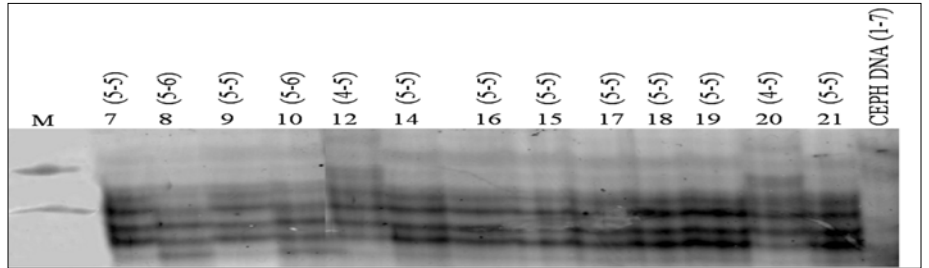
M: Φ X174

D2S2164
(195-207 bç)

M: Φ X174

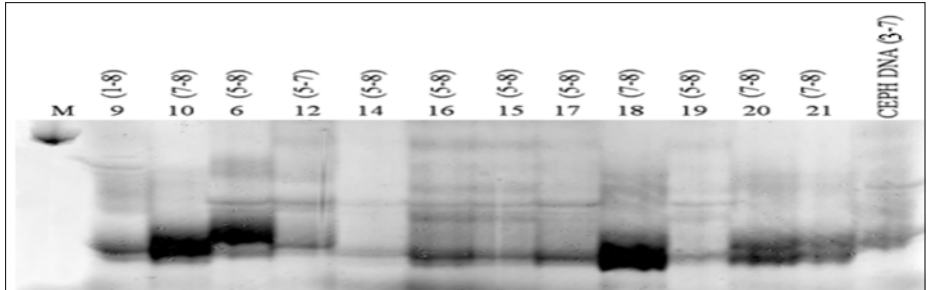


D2S162
(120-144 bç)



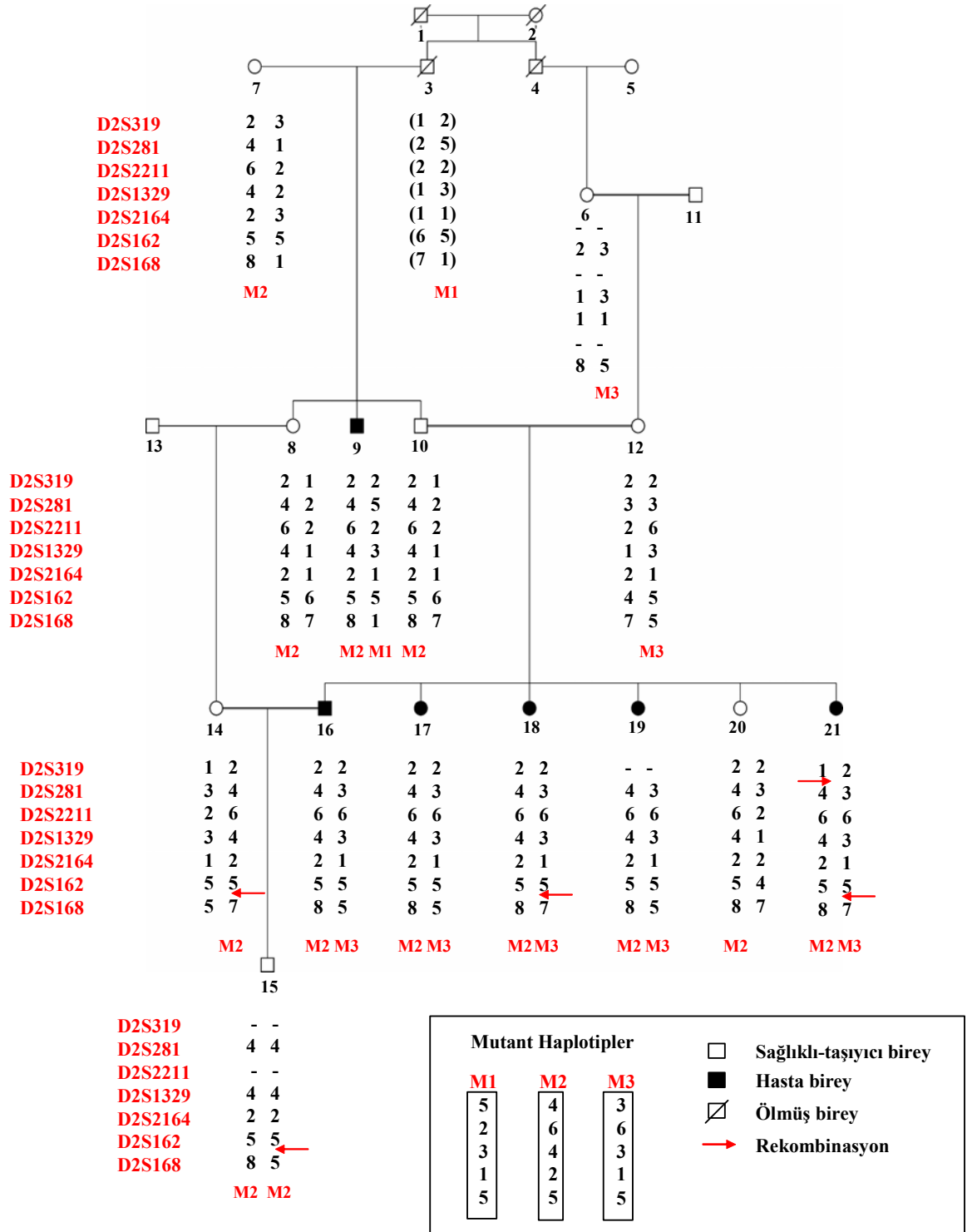
M: 50 bp DNA Ladder

D2S168
(196-216 bç)



M: 50 bp DNA Ladder

Şekil 4.2. D2S1329, D2S281, D2S2164, D2S162 ve D2S168 genetik belirleyicilerinin jelde analizleri (%7'lik denatüre edici PAGE, 1600V, 45 mA, 4 saat).



Şekil 4.3. Tüm genetik belirleyicilerin kullanılmasıyla elde edilen haplotipleri gösteren aile ağacı.

Bireylere ait tüm haplotipler incelendiğinde otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı görülen bu ailede biri (M1) aile içinden gelmek üzere 3 farklı mutant haplotipin bulunduğu tespit edildi. Hasta bireylerde beklenen homozigotluğa rastlanmadı. Şekil 4.3'te 9 no'lu hastanın M1 ve M2 mutant haplotiplerini, 16, 17, 18, 19, 21 no'lu bireylerin M2 ve M3 mutant haplotiplerini, 15 no'lu bireyin ise M2 mutant haplotipini her iki kromozomunda da taşıdığı görülmektedir.

Haplotip analizi sonrasında elde edilen bir diğer bulgu 15 no'lu bireyde görülen fenotip ve genotip uyumsuzluğudur. 15 no'lu birey 14 ve 16 no'lu bireylerin akraba evliliğinden doğan çocuklarıdır ve her iki kromozomunda da mutant haplotipi taşımaktadır. Çocuğun annesi (14 no'lu birey) taşıyıcı olup M2 mutant haplotipini taşımakta, babası ise (16 no'lu birey) hasta ve M2 ve M3 mutant haplotiplerini taşımaktadır. Çocuk (15 no'lu birey) henüz 3 yaşında olup ailesi tarafından işitme kayıplı olmadığı bildirilmiş olmasına rağmen yaşının küçük olması nedeniyle işitme kayıplı olup olmadığını belirtmek mümkün değildir. Ailenin işitme testini yaptırmak istememesi nedeniyle 15 no'lu bireyde odyolojik değerlendirme yapılamamıştır.

4.3. İki-noktalı LOD Skor Analizi

Superlink Pedtool version 0.9 (Bayesian Network) iki-noktalı LOD skor analiz programının kullanılmasıyla her bir genetik belirleyici için LOD skor değerleri hesaplandı. Bunun için öncelikle aile ağacı dosyası oluşturuldu (Tablo 4.4).

İki-noktalı LOD skor analizine göre, en yüksek LOD skor değeri D2S1329 (LOD skor:3.61 θ : 0.0) genetik belirleyicisi için elde edilmiştir. Pozitif LOD skor elde edilen diğer genetik belirleyiciler sırasıyla D2S162 (LOD skor: 3.38 θ : 0.0), D2S2211 (LOD skor: 1.74 θ : 0.05), D2S2164 (LOD skor: 1.55 θ : 0.0) ve D2S281 (LOD skor: 0.86 θ : 0.05) dir.

Mutant haplotipi her iki kromozomunda da taşıyan ancak işitme kayıplı olup olmadığı odyolojik testlerle değerlendirilememiş 15 no'lu birey için Tablo 4.4'de fenotip için belirsiz tanımlaması yapılmıştır. Ancak, hasta ve sağlıklı olma ihtimalleri de göz önünde bulundurularak 2 aile ağacı dosyası daha oluşturulmuş ve LOD skor analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. 15 no'lu bireyin sağlıklı kabul edilmesiyle oluşturulan aile ağacı dosyası ve iki-noktalı LOD skor analiz sonuçları.

A. Aile ağacı dosyası

pedigree: yav

1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	2	1	1	1	2	2	5	2	2	1	3	1	1	6	5	7	1		
4	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	5	2	1	0	0	2	3	0	0	1	3	1	1	0	0	8	5		
7	0	0	2	1	2	3	4	1	6	2	4	2	2	3	5	5	8	1		
8	3	7	2	1	2	1	4	2	6	2	4	1	2	1	5	6	8	7		
9	3	7	1	2	2	2	4	5	6	2	4	3	2	1	5	5	8	1		
10	3	7	1	1	2	1	4	2	6	2	4	1	2	1	5	6	8	7		
11	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	11	6	2	1	2	2	3	3	2	6	1	3	2	1	4	5	7	5		
13	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	13	8	2	1	1	2	3	4	2	6	3	4	1	2	6	5	5	7		
15	16	14	1	1	0	0	4	4	0	0	4	4	2	2	5	5	8	5		
16	10	12	1	2	2	2	4	3	6	6	4	3	2	1	5	5	8	5		
17	10	12	2	2	2	2	4	3	6	6	4	3	2	1	5	5	8	5		
18	10	12	2	2	2	2	4	3	6	6	4	3	2	1	5	5	8	7		
19	10	12	2	2	0	0	4	3	6	6	4	3	2	1	5	5	8	5		
20	10	12	2	1	2	2	4	3	6	2	4	1	2	2	5	4	8	7		
21	10	12	2	2	1	2	4	3	6	6	4	3	2	1	5	5	8	7		

Buna göre 15 no'lu birey sağlıklı kabul edildiğinde (Tablo 4.5), D2S162 için 3.34 θ :0.0 ve D2S1329 için 2.46 θ :0.05; hasta kabul edildiğinde (Tablo 4.6) ise D2S1329 için 4.38 θ :0.0 ve D2S162 için 3.55 θ :0.0 LOD skor değerleri elde edilmiştir. 15 no'lu bireyin her iki durum için elde edilen LOD skor değerleri fenotipin belirsiz olması (Tablo 4.4) durumuyla karşılaştırıldığında, nonsendromik işitme kaybından sorumlu kromozom aralığını değiştirebilecek anlamlı farklılıklar taşımadığı görülmektedir.

4.4. D2S319-D2S168 (6.430.934 bç) Kromozom Aralığında Bulunan Aday Genlerin Belirlenmesi

Aday genleri belirlemede ilk olarak Hollanda, Nijmegen Üniversitesi Otorinolaringoloji bölümünden Dr. Hannie Kremer ve ekibinin oluşturduğu koklear cDNA kütüphanesinden yararlanıldı (74). Koklear cDNA kütüphanesinde D2S319-D2S168 kromozom aralığında bulunan kokleada ifade edilen sekiz EST (C15E10, C17G5, C2E12, C3G2, C4E11, C15A9, C15E5, C3G11) belirlendi.

Bu dizilerin genomda herhangi bir gen dizisi ile ortak diziler içerip içermediği *NCBI-BLAST* programının kullanılmasıyla tespit edildi. Buna göre, bu dizilerden C4E11, C15A9, C3G2 dizilerinin *RNF144* (KIAA0161) genine ait EST'ler olduğu belirlendi. Ayrıca, Morton Araştırma Grubu tarafından hazırlanmış olan koklear EST veri bankasında *RNF144* genine ait 4 EST bilgisi tespit edildi (74-76).

NCBI-Gene, *Ensembl*, *Swiss-Prot* veri bankaları aracılığıyla yapılan araştırmalarda *RNF144* geninin "Ring finger" motifli protein ürününe sahip bir transkripsiyon faktörü olduğu belirlendi.

D2S162-D2S168 polimorfik genetik belirleyicileri arasında bulunan ve koklear cDNA kütüphanesinde yer alan C15E5 ve C15E10 dizileri ile homoloji gösterdiği için *DDEF2* (*Development and Differentiation Factor 2*) geni belirlenen bir diğer aday gen oldu. Ayrıca bu genin özellikle sinyal iletiminde görevli *protein tyrosine kinase 2-beta* (*PYK2*) proteini ile bağlantı gösterdiği, protein-protein

etkileşimlerinde önemli rol oynayan *ankyrin* tekrarlarından oluşan domaine sahip olduğu veri bankalarında tespit edildi (77) (*NCBI-Gene, Ensembl, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

Üçüncü aday gen olarak gen bankası numarası CB381773–CB38790 ve CB410624–CB410971 olan koklear cDNA kütüphanesinden C3G11 dizisi ile %100 benzerlik gösteren ve D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri arasında bulunan *YWHAQ* geni belirlendi (74). Morton fetal koklear EST veri bankasında *YWHAQ* genine ait 10 adet EST bilgisi tespit edildi (75). *YWHAQ* gen ürününün fosfoserin içeren proteinlere bağlanmak yoluyla sinyal iletiminde görev alan 14-3-3 protein ailesine ait olduğu belirlendi ve *NCBI-OMIM*'de yapılan araştırmalarda *YWHAQ* geninin “Amyotrofik Lateral Skleroz” hastalarında yüksek oranda ifade edildiği tespit edildi (78) (*NCBI-Gene, Ensembl, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

D2S319-D2S168 kromozom aralığında bulunan *RNF144, DDEF2* ve *YWHAQ* cDNA kütüphanesinin kullanımı ile tespit ettiğimiz kuvvetli aday genlerdir. Diğer aday genler elektronik ortamda *NCBI-Gene, NCBI-MapView, NCBI-UniGene, Ensembl, Human Genome Browser, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot, Pfam* veri bankaları aracılığı ile belirlenmiştir. Her bir veri bankasından elde edilen bilgiler birbirleriyle karşılaştırılarak bilgilerin doğruluğu test edilmiştir. Aşağıdaki tablo D2S319-D2S168 kromozom aralığında (6.430.934 bç) bulunan tüm genleri göstermektedir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan tüm genler

D2S319-D2S281 (4.965.347-6.480.562 bç)		
	Sitogenetik Band	Açıklama
<i>TTC15</i>	2p25.2	<i>tetratricopeptide repeat domain 15</i>
<i>LOC388923</i>	2p25.2	<i>hypothetical LOC388923</i>
<i>LOC440845</i>	2p25.2	<i>hypothetical gene</i>
<i>SIPL</i>	2p25.2	<i>SIPL protein</i>
<i>SOX11</i>	2p25	<i>SRY (sex determining region Y)-box 11</i>
<i>FLJ30594</i>	2p25.2	<i>hypothetical protein FLJ30594</i>
<i>FLJ41046</i>	2p25.2	<i>FLJ41046 protein</i>
D2S281-D2S2211 (6.480.562-7.422.231 bç)		
<i>LOC391349</i>	2p25.2	<i>similar to phosphoinositide 3 kinase</i>
<i>FLJ42418</i>	2p25.2	<i>FLJ42418 protein</i>
<i>LOC129607</i>	2p25.2	<i>hypothetical protein LOC129607</i>
<i>cig5</i>	2p25.2	<i>viperin</i>
<i>LOC440846</i>	2p25.1	<i>LOC440846</i>
<i>RNF144 (KIAA0161)</i>	2p25.1	<i>Ring finger protein 144</i>
D2S2211-D2S1329 (7.422.231-7.796.385 bç)		
Bu aralıkta herhangi bir gen bulunamadı.		
D2S1329-D2S2164 (7.796.385-8.177.840 bç)		
<i>LOC339788</i>	2p25	<i>hypothetical protein LOC339788</i>
<i>LOC442007</i>	2p25	<i>similar ENSANGP00000014942</i>
D2S2164-D2S162 (8.177.840-8.811.018 bç)		
<i>LOC339789</i>	2p25	<i>hypothetical protein LOC339789</i>
<i>LOC400942</i>	2p25	<i>hypothetical LOC400942</i>
<i>ID2</i>	2p25	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
<i>KIDINS220</i>	2p24	<i>likely homolog of rat kinase D-interacting substance of 220 kDa</i>
D2S162-D2S168 (8.811.018-11.396.281 bç)		
<i>OACT2</i>	2p25.1	<i>O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 2</i>
<i>DDEF2 (KIAA0400)</i>	2p25	<i>development and differentiation enhancing factor 2</i>
<i>ITGB1BP1</i>	2p25.2	<i>integrin beta 1 binding protein 1</i>
<i>CPSF3</i>	2p25.1	<i>cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa</i>
<i>ADAM17</i>	2p25	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor</i>
<i>YWHAQ</i>	2p25.1	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein</i>
<i>TAF1B</i>	2p25	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I</i>
<i>TFCP2L2</i>	2p25.1	<i>transcription factor CP2-like 2</i>
<i>UNQ5830</i>	2p25.1	<i>AILT5830</i>
<i>TIEG2</i>	2p25	<i>TGFB inducible early growth response 2</i>
<i>RRM2</i>	2p25-p24	<i>ribonucleotide reductase M2 polypeptide</i>
<i>FLJ25102</i>	2p25.1	<i>hypothetical protein FLJ25102</i>
<i>HPCAL1</i>	2p25.1	<i>hippocalcin-like 1</i>
<i>ODC1</i>	2p25	<i>ornithine decarboxylase 1</i>
<i>LOC130063</i>	2p25.1	<i>hypothetical LOC130063</i>
<i>FLJ14075</i>	2p25.1	<i>hypothetical protein FLJ14075</i>
<i>ATP6VIC2</i>	2p25.1	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C isoform 2</i>
<i>TXNDC7</i>	2p25.1	<i>thioredoxin domain containing 7 (protein disulfide isomerase)</i>
<i>LOC388924</i>	2p25.1	<i>hypothetical LOC388924</i>
<i>KCNF1</i>	2p25	<i>potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1</i>
<i>FLJ33534</i>	2p25.1	<i>hypothetical protein FLJ33534</i>
<i>FLJ25143</i>	2p25.1	<i>hypothetical protein FLJ25143</i>
<i>C2orf22</i>	2p25.1	<i>chromosome 2 open reading frame 22</i>
<i>ROCK2</i>	2p24	<i>Rho-associated, coiled coil containing protein kinase</i>

D2S319-D2S168 kromozom aralığında bulunan tüm genler veri bankaları aracılığı ile hastalık bilgisi, ifade edildikleri dokular, dokularda ifade edilme düzeyleri ve işlevleri açısından araştırıldı. Bu genlerin kokleada ifade edilip edilmediği bilgisine ulaşmak için elektronik veri bankaları ile birlikte Morton Fetal Koklear EST veri bankasından yararlanıldı. Koklear cDNA kütüphanesi elektronik ortamda tarandı. Daha sonra protein ürünü henüz tanımlanamamış FLJ genleri ve LOC hipotetik genlerinin nonsendromik işitme kaybından sorumlu olma ihtimalleri veri bankalarından elde edilen bilgilerle değerlendirildi (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester*).

D2S319-D2S281 aralığında bulunan, *SIPL (MTCBP-1, Membrane-type 1 matrix metaloproteinase cytoplasmic tail binding protein 1)* geni kemik, lenf nodülleri, kemik iliği, beyin, plasenta, böbrek, akciğer, karaciğer, testis ve prostat da ifade edilmektedir. Ayrıca Morton koklear EST veri bankasında *SIPL* genine ait iki adet EST tespit edildi (75). Bu genin özellikle metal iyonlarının bağlanması işlev gördüğü belirlendi (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester*).

D2S2164-D2S162 genetik belirleyicileri aralığında bulunan *ID2* geninin, kan, kemik, kemik iliği, beyin, kolon, göz, kas, böbrek, larinks, karaciğer, akciğer, lenf nodülü, meme bezi, over, periferik sinir sistemi, plasenta, prostat, deri, uterus, sindirim sistemi ve testislerde ifade edildiği tespit edildi. Morton koklear EST veri bankasında bu gene ait dört adet EST bulunduğu belirlendi (75). *ID2* geninin sıçanlarda bir benzeri olduğu (*Id2*), *Id2* ailesinin *helix-loop-helix* transkripsiyon faktörünü kodladığı ve farklılaşmanın etkisizleştirilmesinde önemli rol oynadığı belirlendi ve *ID2* genin sıçanlarla yapılan deneylerde iç kulaktaki tüy hücrelerinin kaybında rolü olduğu tespit edildi (79).

Aynı aralıkta bulunan *KIDINS220 (Kinase D-interacting substance of 220 kDa)* geni ise beyin yanında kokleada da ifade edilmektedir. Morton Fetal Koklear veri bankasında *KIDINS220* genine ait dört adet EST mevcuttur (75). Ayrıca, insanlarda bulunan bu genin farelerde de bir benzeri olduğu (*Kidins220*) ve *Kidins220* cDNA dizisinin daha önceden karakterize edilmiş hiçbir genle benzerlik

göstermediği tespit edildi (80). Tüm bu bilgilere ilave olarak, *KIDINS220* geninin herhangi bir hastalıkla ilişkisinin kurulamadığı, gen ürününün bir integral membran proteini olduğu, hücre iskeleti proteinleriyle 23 *ankyrin* tekrarlarından oluşan domaini vasıtasıyla etkileşime girdiği veri bankaları aracılığı ile belirlendi (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

D2S162-D2S168 aralığında bulunan *OACT2* geni kan, kemik, beyin, serviks, kolon, göz, kalp, böbrek, larinks, karaciğer, akciğer, lenf nodülleri, meme bezi, over, pankreas, periferik sinir sistemi, plasenta, prostat, dalak, dil, testis, dalak, uterus ve midede ifade edilmektedir. EST bilgileri incelendiğinde, Morton Fetal Koklea'da 2 adet EST tespit edildi (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester*).

D2S162-D2S168 aralığında bulunan *ATP6VIC2* geni V-ATPaz proteinini kodlamaktadır. Bu protein, proteinlerin tasnifi, zimojen etkinleştirilmesi ve reseptör aracılığıyla endositoz gibi hücre içi işlevleri gerçekleştirmektedir. Bu işlevler hücre organellerinin V-ATPaz'a bağlı asidifikasyonu ile gerçekleşmektedir. Ayrıca bu genin en fazla, böbrek, uterus, plasenta ve kolonda ifade edildiği tespit edilmekle birlikte Anne B. Skvorak ve arkadaşları (84) tarafından yayınlanan bir çalışmada ve Morton Fetal Koklear EST veri bankasında *ATP6VIC2* genine ait koklear EST bilgisi olduğu da belirlendi (75, 81-84).

D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan *KCNF1* geni potasyum transportu ve potasyum kanalının işlevinden sorumludur. Ayrıca nörotransmitterlerin serbest bırakılması, kalp atım hızının belirlenmesi, insülin salınması, epitel elektrolit taşınması, yumuşak kas kasılması gibi biyolojik işlevlere sahip olduğu da tespit edildi. Ayrıca bu genin beyinde, kalpte, iskelet kasında, böbrek ve pankreasta ifade edildiği belirlendi. Otozomal dominant işitme kayıplarından sorumlu *KCNQ4* ile aynı protein ailesinden olması ve potasyum homeostazisinden sorumlu olduğu olduğu bilinmesine rağmen *KCNF1* geninin kokleada ifade edildiği bilgisine rastlanmadı (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan *ROCK2* geni veri bankalarında araştırıldığında öncelikli olarak göz, beyin, pankreas, kalp ve deri dokusunda ifade edildiği tespit edildi. Ayrıca *NCBI-UniGene*'den EST bilgilerine bakıldığında bu gene ait iç ve orta kulakta ifade olduğu belirtilen EST bilgisi elde edildi. Bu gen ürününün bir serin/treonin kinaz olduğu, aktin stres fibrillerinin oluşumu ve yumuşak doku kasılması gibi işlevlere sahip olduğu veri bankaları aracılığı ile tespit edildi (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Ensembl, Swiss-Prot*).

D2S319-D2S168 kromozom aralığında bulunan FLJ ve LOC kodlu genler (*FLJ30594, FLJ41046, FLJ42418, FLJ25102, FLJ14075, FLJ33534, FLJ25143, LOC388923, LOC440845, LOC391349, LOC129607, LOC440846, LOC339788, LOC442007, LOC339789, LOC400942, LOC130063, LOC388924*) elektronik veri bankalarında araştırıldığında kokleada ifade edilen EST bulgusuna rastlanmadı.

Sonuçta, tüm bilgiler değerlendirildiğinde tanımladığımız kromozom aralığında (2p25/D2S319-D2S168) Tablo 4.7'de görülen genlerden 10'u otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek aday genler olarak belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. D2S319-D2S168 kromozom aralığında belirlenen aday genler.

<i>RNF144</i> (D2S281-D2S2211)	2p25.1	<i>Ring finger protein 144</i>
<i>DDEF2</i> (D2S162-D2S168)	2p25	<i>Development and differentiation enhancing factor 2</i>
<i>YWHAQ</i> (D2S162-D2S168)	2p25.1	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein</i>
<i>KIDINS220</i> (D2S2164-D2S162)	2p24	<i>Likely homolog of rat kinase D-interacting substance of 220 kDa</i>
<i>SIPL</i> (D2S319-D2S281)	2p25.2	<i>SIPL protein</i>
<i>ID2</i> (D2S2164-D2S162)	2p25	<i>Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
<i>OACT2</i> (D2S162-D2S168)	2p25.1	<i>O-acyltransferase(membrane bound) domain containing 2</i>
<i>KCNF1</i> (D2S162-D2S168)	2p25	<i>Potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1</i>
<i>ATP6V1C2</i> (D2S162-D2S168)	2p25.1	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C isoform 2</i>
<i>ROCK2</i> (D2S162-D2S168)	2p24	<i>Rho-associated, coiled coil containing protein kinase</i>

5. TARTIŞMA

İşitme kayıpları içerisinde genetik işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini oluşturan nonsendromik işitme kayıpları en yaygın görülen formdur. Yapılan çalışmalarda nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif, %18'i otozomal dominant ve %2'si X'e bağlı kalıtılmaktadır (2,4).

Bireylerin sosyal gelişimlerini olumsuz yönde etkilemesi ve tüm dünyada yaygın olarak görülmesi işitme kayıplarının ortaya çıkmasında etkin olan genlerin haritalanması ve tanımlanmasına yönelik yapılacak çalışmaları hızlandırmıştır. Bugün dünyadaki birçok merkezde bu alanda çalışmalar önemle sürmektedir.

2p25 kromozom bölgesinde otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday genlerin belirlenmesine yönelik yapılan bu tez çalışmasında, yedi genetik belirleyici için *Superlink Pedtool version 0.9* programı kullanılarak iki-noktalı LOD skor analizi yapılmış ve buna göre D2S1329 (LOD skor:3.61 θ : 0.0), D2S162 (LOD skor: 3.38 θ : 0.0), D2S2211 (LOD skor: 1.74 θ : 0.05), D2S2164 (LOD skor: 1.55 θ : 0.0) ve D2S281 (LOD skor: 0.86 θ : 0.05) genetik belirleyicileri için pozitif LOD skor değerleri elde edilmiştir. Değişik pozitif LOD skor değerleri elde edilmesinin nedeni genetik belirleyicilerin aile bireyleri için bilgi verici niteliklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, D2S319 için 21 no'lu bireyin ve D2S168 için 14, 15, 18 ve 21 no'lu bireylerin rekombinant alelleri taşımaları, bu genetik belirleyicilerin aranan gen bölgesine uzak olduğunu göstermiş ve bu durum negatif LOD skor değerlerinin elde edilmesini desteklemiştir. Ardarda sıralanmış beş genetik belirleyici için pozitif LOD skor elde edilmesi ve rekombinasyon tespit edilen D2S319, D2S168 genetik belirleyicilerinde rekombinasyonun yerini bilmenin mümkün olmaması, D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığını içeren kromozom bölgesinin bu ailede hastalıktan sorumlu aday genlerin belirleneceği aralık olacağını göstermiştir.

Yapılan tez çalışmasında öncelikli olarak D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan tüm genler *NCBI-Map Viewer* ve *Ensembl* veri

bankaları ile belirlenmiştir. Bu genlerin öncelikli olarak koklea da ifade edilip edilmedikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığını kapsayan koklear cDNA kütüphanesinden yararlanılmıştır. Koklear cDNA kütüphanesinde bulunan EST'ler koklea da ifade olan genlere ait nükleotid dizileridir. Koklea da ifade olduğu bilinen bu dizilerin *NCBI-BLAST* programıyla genomda hangi nükleotid dizileriyle %100 benzerlik gösterdiğine bakılarak bu genlerden hangilerine ait olduğu saptanmıştır ve bu genler en kuvvetli aday genler kategorisine alınmıştır. Bunu takiben, belirtilen kromozom aralığında koklear ifade bilgisi belirlenmemiş genler, gen ürünü işlevleri açısından araştırılmış ve işitme mekanizması ile bağlantılı olup olamayacakları yönünde değerlendirilmiştir. Bu amaçla, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *Pfam* veri bankalarından yararlanılmıştır. Bunun sonucunda koklear ifadesi henüz bilinmeyen ancak işitme mekanizması ile ilişkisi düşünülen genler ve daha önce işitme kaybından sorumlu olduğu tespit edilmiş genlerle aynı protein ailesine dahil olduğu bilinen genler nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek aday genler olarak belirlenmiştir. Ayrıca aday genlerin belirlenmesinde, D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan genler herhangi bir hastalıktan sorumlu olup olmadıkları yönünde *NCBI-OMIM* veri bankası aracılığı ile araştırılmıştır. Tüm bunlara ilave olarak D2S319-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan ancak henüz gen ürünü karakterize edilememiş FLJ kodlu dizilerle, hipotetik LOC kodlu diziler aday gen olup olamayacakları yönünde incelenmiştir. FLJ kodlu diziler gen ifade bilgisinin varlığı nedeniyle LOC kodlu dizilere oranla öncelikli olarak araştırılmalı ve genomdaki diğer dizilerle olan nükleotid ve amino asit dizisi benzerliğine bakılmalıdır. LOC kodlu dizilerin hipotetik olmaları ve biyoinformatik olarak bu dizilerle ilgili etkin yorumlamaların yapılamıyor olması bu dizilerin aday gen olarak en son aşamada değerlendirilmeleri gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, tanımlanan aralıkta çok sayıda EST bulunması 2p25 kromozom aralığında henüz karakterize edilmemiş çok sayıda genin varlığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, *Ensembl*, *Human Genome Browser*, vb. elektronik veri bankalarının sürekli takip edilerek literatüre kazandırılmış olan yeni genlerin nonsendromik işitme kayıplarından sorumlu olup olmayacakları yönünde değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Araştırma sürecinde bilgilerin hızlı, doğru ve etkin bir şekilde elde edilebilmesinde koklear cDNA kütüphaneleri ve elektronik veri bankaları en önemli kaynaklar olmuştur. Yapılan tez çalışmasında birden fazla farklı veri bankalarından yararlanılmış ve farklı veri bankalarının kullanımı elde edilen bilgilerin doğruluğunu desteklemiştir.

Buna göre, D2S281-D2S2211 kromozom aralığında tespit edilen *RNF144* (*KIAA0161*) geninin “*Ring finger*” motifli protein ürününe sahip bir transkripsiyon faktörü olması, gen bankası numarası CB381773–CB38790 ve CB410624–CB410971 olan koklear cDNA kütüphanesinde bulunan üç ayrı EST ile %100 homoloji göstermesi ve Morton Koklear EST veri bankasında dört adet EST bilgisinin bulunması kuvvetli bir aday gen olarak belirlenmesinde önemli rol oynamıştır (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Ensembl, Swiss-Prot*).

İkinci aday gen olarak belirlenen ve D2S162-D2S168 aralığında bulunan *DDEF2* geninin aday gen olabilmesini destekleyen en önemli nedenler arasında, gen bankası numarası CB381773–CB38790 ve CB410624–CB410971 olan koklear cDNA kütüphanesinde bulunan iki adet EST (C15E5 ve C15E10) ile %100 nükleotid dizisi benzerliği göstermesi, özellikle sinyal iletiminde görevli *protein tyrosine kinase 2-beta* (*PYK2*) proteini ile olan ilişkisi, işitme mekanizmasında etkin rol oynayan TRP (*Transient Receptor Potential*) proteinlerinde de bulunan ve bu proteinlerin hücre iskeleti veya başka proteinlerle etkileşiminde önemli rolü olan *Ankyrin* tekrarlarının *DDEF2* proteini domainleri arasında yer alması sayılabilir (74,77,85) (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Ensembl, Swiss-Prot*).

Gen bankası numarası CB381773–CB38790 ve CB410624–CB410971 olan koklear cDNA kütüphanesinde bulunan C3G11 dizisi ile homoloji gösteren ve D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan *YWHAQ* geninin aday gen olmasını destekleyen en önemli nedenler, bu genin kokleada ifade edildiğinin bilinmesi, bu bilginin Morton Koklear EST veri bankasında (76) tespit edilen 10 adet

koklear EST ile desteklenmesi ve gen ürününün fosfozerin içeren proteinlere bağlanmak yoluyla sinyal iletiminde görev alan 14-3-3 protein ailesine ait olmasıdır. Ancak “Amyotrofik Lateral Skleroz” hastalarında bu genin mutant olması ve bu hastalığı taşıyan kişilerde işitme kaybı gibi bir durumun bildirilmemiş olması bu genin aday gen olma derecesini diğer iki gene oranla düşürmektedir (78). Bununla beraber genin sinyal iletiminde görev alan bir protein ürününe sahip olması ve koklear cDNA kütüphanesinde ifade edilen dizilerinin bulunması nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek bir aday gen olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu durum alelik heterojenitenin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Alelik heterojenite bir çok tek gen hastalığında görülmektedir. Birbirlerinden tamamen farklı fenotipler aynı genin farklı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Nonsendromik işitme kayıplarında da alelik heterojenite örneklerine rastlanmıştır. Örneğin, *Connexin-26*, *TECTA*, *MYO7A*, *MYO6*, *TMC1* genleri otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtılan nonsendromik işitme kayıplarına neden olurlar. Ayrıca *SLC26A4*, *COL11A2*, *PCDH15*, *MYO7A*, *USH1C* ve *CDH23* genleri hem sendromik hem de nonsendromik işitme kayıplarına neden olmaktadır (5) (*NCBI-Gene*, *NCBI-UniGene*, *Bioinformatic Harvester*, *Ensembl*, *Swiss-Prot*).

Koklear cDNA kütüphanesinden elde edilen verilerle belirlenen bu üç gen dışında elektronik veri bankaları ile yapılan araştırmalarda D2S2164-D2S162 kromozom aralığında bulunan, beyinde yüksek oranda ifade edilen *KIDINS220* geninin kokleada ifade olduğu *Bioinformatic Harvester*, *NCBI-Gene* ve *NCBI-UniGene* veri bankalarıyla Morton Fetal Kokleada bulunan dört adet EST (N67315.1, B1496897.1, B1495539.1, B1495540.1) bilgisi ile desteklenmiştir. Koklear ifade bilgisinin yanında bu gen ürününün, işitme mekanizmasında görev alan TRP proteinlerinde olduğu gibi *ankyrin* tekrarlarından oluşan domaini vasıtasıyla hücre iskeleti proteinleri ile etkileşime geçmesi nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday gen olma durumunu desteklemektedir (80) (*NCBI-Gene*, *NCBI-UniGene*, *Ensembl*, *Bioinformatic Harvester*).

D2S319-D2S281 kromozom aralığında bulunan *S IPL* genine ait iki EST'nin Morton Koklear EST veri bankasında bulunması bu genin kokleada ifade edildiğini

desteklemiş ancak işitme mekanizması ile gen ürününün işlevi arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Ancak otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek aday gen taraması yaptığımız kromozom aralığında bulunması ve kokleada ifade edildiğinin tespit edilmiş olması *SIPL* geninin aday gen olarak nitelendirilmesini mümkün kılmıştır (75) (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Ensembl, Bioinformatic Harvester*).

D2S2164-D2S162 aralığında bulunan ve Morton Koklear EST veri bankasında dört adet EST bilgisi bulunan *ID2* geni de aday genler arasında yer almaktadır. Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada *Id2* gen ifadesinin iç kulak gelişimi süresince var olduğu ve iç kulaktaki tüy hücrelerinin kaybında bu gen ifadesinin önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular bu genin farklılaşmayı negatif yönde etkilemek suretiyle iç kulaktaki tüy hücrelerinin yeniden oluşumunu engellediğini göstermektedir (79). *ID2* genin sıçanlarla yapılan deneylerde iç kulaktaki tüy hücrelerinin kaybında rolü olduğunun tespit edilmesi ve koklear ifadenin EST verileri ile desteklenmesi bu genin aday genler arasında yer almasının temel sebepleridir (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Ensembl, Swiss-Prot*).

D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan ve kokleada ifade edildiği Morton fetal kokleada bulunan iki adet EST bilgisi ile desteklenen *OACT2*, koklear ifade bilgisi nedeniyle aday gen olarak kabul edilmiştir (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Ensembl, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

Ayrıca, otozomal dominant nonsendromik işitme kayıplarından sorumlu *KCNQ4* geni gibi potasyum kanal protein ailesi üyesi olan *KCNF1* geninin bu ailede otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu aday gen olabileceği düşünülmüştür. *KCNQ4* geninin K⁺ iyonu homeostazisinden ve dış merkezden gelen moleküler sinyallerin karakterize edilmesi yoluyla işitme işlevinin gerçekleşmesinde görevli olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte *KCNF1* geni potasyum taşınmasından ve potasyum kanalının işlevinden sorumludur. Veri bankalarında yapılan araştırmalarda *KCNF1* geninin kokleada ifade edildiğine dair herhangi bir bilgi

bulunmuyor olsa da işitme kaybından sorumlu olduğu bilinen bir gen ile benzer işleve sahip olması ve aynı protein ailesi içinde bulunması D2S2164-D2S162 kromozom aralığında bulunan *KCNF1* geninin de aday gen olarak nitelendirilebileceğini desteklemektedir (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, Ensembl, Swiss-Prot*).

D2S162-D2S168 genetik belirleyicileri aralığında bulunan ve aday gen olarak belirlenen *ATP6VIC2* geninin Anne B. Skvorak ve arkadaşları (84) tarafından yayınlanan bir çalışmada ve Morton Fetal Koklear veri bankasında koklear ifade bilgisi tespit edilmiştir. Yapılan imünohistokimyasal çalışmalarda, *ATP6VIC2* (Vakuolar-ATPaz C2 alt ünitesi) ile aynı protein ailesi içerisinde bulunan *ATP6V1B1* proteinini kodlayan *ATP6V1B1* geninde meydana gelen bir mutasyonun endolenf sıvısının alkali yapıda kalmasına yol açtığı belirlenmiş, bu nedenle de tüy hücrelerinin mekanik ses dalgalarına cevap oluşturamadığını tespit edilmiştir. Bu durum endolenfin asidik özelliğinin vakuolar H⁺-ATPaz tarafından aktif olarak korunmasının işitme işlevinin devamında oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır (81-84). Bu sonuçlar doğrultusunda asidifikasyonda etkin bir rolü olduğu belirtilen V-ATPaz'ı kodlayan *ATP6V1B1* geninde meydana gelen bir mutasyonun sensorinöral işitme kaybına neden olması *ATP6VIC2* geninin de işitme mekanizmasında meydana gelen hasarlardan sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Elde edilen bu bilgiler *ATP6VIC2* geninin aday gen olarak belirlenmesinde ki en önemli etkenler olmuştur.

Aynı aralıkta bulunan *ROCK2* geninin iç ve orta kulakta ifade edildiğini gösteren EST bilgisinin bulunması ve bu genin özellikle sinyal iletiminde görevli proteinlerin fosforile edilmesinden sorumlu serin/threonin kinaz ürününe sahip olması aday gen olarak belirlenmesinde ki en önemli nedenlerdir (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Ensembl, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot*).

DNA dizi analizi sonucunda mutasyonun saptandığı gen, D2S319-D2S168 aralığında otozomal resesif nonsendromik işitme kaybı ile ilişkilendirebileceğimiz bir gen niteliğini kazanacaktır. Belirlenen aday genlerde herhangi bir baz değişikliği saptanamadığı durumda bu kromozom bölgesinde yer alan FLJ ve LOC kodlu

genlerden beyinde yüksek düzeyde ifade edilen *FLJ41046*, *FLJ42418*, *FLJ33534*, *LOC339789* dizileri öncelikli olarak DNA dizi analizine alınabilir ve hastalıktan sorumlu gen olup olmadıkları yönünde incelenebilirler.

Bu genlerin DNA dizi analizine alınarak mutasyon taramasının yapılması nonsendromik işitme kaybından sorumlu genin saptanması için zorunludur. Ancak, aynı kromozom bölgesine bağlantı veren geniş ailelerin bulunması ve bu ailelerde rekombinant bireylerin gözlenmesi durumunda kromozom aralığı daraltılarak DNA dizi analizine alınacak gen sayısı azaltılmış olacaktır.

Tez çalışmasında aday genlerin taranabileceği kromozom aralığının daraltılması amacıyla polimorfik STR genetik belirleyicilerden yararlanılmıştır. Ancak böyle bir çalışmada SNP haplotipleme yaklaşımından da yararlanılabilir. SNP haplotipleme olarak bilinen ve belirlenen kromozom aralığında bulunan çok sayıda SNP içeren kit ve array sistemlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilecek çalışmada aile içinde SNP segregasyonunun incelenmesi ile belirlenen kromozom aralığı daraltılabilir. Ayrıca belirlediğimiz aday genlerin içine düşen SNP'leri kullanarak aday genin bağlantı analizi ile dışlanması sağlanabilir. Ancak bu yöntemin maliyetinin oldukça yüksek olması, kapsamlı bir *array* sistemine sahip olunması gerekliliği ve değerlendirilmesindeki güçlükler birçok laboratuvar da heterozigotluk dereceleri çok daha yüksek olan, daha az sayılarda kullanılan ve her laboratuvar da kolaylıkla çalışılabilen STR'lerin kullanımını öne çıkarmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- D2S2211 ve D2S162 genetik belirleyicileri çevresinde ilave genetik belirleyiciler ile kromozomal aralığın daraltılabilmesi hedeflenmiş ve D2S319-D2S168 aralığına D2S281, D2S1329, D2S2164 genetik belirleyicileri dahil edilmiştir.
- İlave genetik belirleyicilerle yapılan haplotip analizleri sonucunda ailede nonsendromik işitme kaybına neden olan 3 farklı mutant haplotipin (1'i aile içinden 2 tanesi aile dışından gelen) bulunduğu tespit edilmiştir.
- Haplotip Analizi sonrasında *Superlink Pedtool version 0.9 (Bayesian Network)* programı kullanılarak yapılan iki-noktalı LOD skor analizi ile yeni LOD skor değerleri elde edilmiştir (D2S1329; LOD skor: 3.61 θ :0.0 ve D2S162; LOD skor: 3.38 θ :0.0, D2S2211: LOD skor: 1.74 θ : 0.05, D2S2164: LOD skor: 1.55 θ : 0.0 ve D2S281: LOD skor: 0.86 θ : 0.05)
- Haplotip sonuçları ve LOD skor değerleri birlikte değerlendirildiğinde aday genlerin taranacağı kromozom aralığının 4.965.347. baz çiftinden başlayıp 11.396.281. baz çiftinde sonlanan toplam 6.430.934 baz çiftlik bir aralık olduğu belirlenmiştir.
- Aday gen taraması yapılırken koklear cDNA kütüphanelerinden ve internet ortamında bulunan çeşitli veri bankalarından (*NCBI-OMIM, NCBI-Map Viewer, NCBI-UniGene, NCBI-Gene, NCBI-Conserved Domain, Ensembl, Human Genome Browser, Bioinformatic Harvester, Swiss-Prot, Pfam*) yararlanılmıştır.
- Koklear cDNA kütüphanesinde bulunan C4E11, C15A9, C3G2 dizilerinin *RNF144* geni ile, C15E5 ve C15E10 dizilerinin *DDEF2* geni ile, C3G11 dizisinin de *YWHAQ* geni ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir.

- Bu tez çalışması sırasında ortaya konan ve takip edilen gen belirleme stratejisi sonunda D2S319-D2S168 aralığında otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu olabilecek 10 adet aday gen belirlenmiştir (*RNF144, DDEF2, YWHAQ, KIDINS220, SIPL, ID2, OACT2, KCNF1, ATP6VIC2, ROCK2*).
- 10 genin DNA dizi analizi ile incelenmesi ve proteine kodlanan bölgelerindeki baz değişikliğinin saptanması ile nonsendromik işitme kayıplarından sorumlu yeni bir gen tespit edilmiş olacaktır.
- Elektronik veri bankalarının takip edilerek literatüre yeni kazandırılan genlerin de aday gen olup olmayacakları yönünde değerlendirilmeleri gerekmektedir.
- Otozomal resesif nonsendromik işitme kaybından sorumlu yeni bir genin literatüre kazandırılması bu süreçler sonrasında sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Morton, M.E, Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann. NY. Acad. Sci., 630, 16-31, 1991.
2. Xiaoyan, C.L., Rick, A.F., Nonsyndromic hereditary hearing loss. Otolaryngol. Clin. N. Am., 35, 275-285, 2002.
3. Aggarwal, R., Saeed, S.R., The genetics of hearing loss, Hospital Medicine, 66, 1, 32-36, 2005.
4. Grundfast, K., Siparsky, N., Chuong, D., Genetic and molecular biology of deafness, Otolaryngol. Clin. N. Am., 33, 1367-1393, 2000.
5. Van Camp, G., Smith, R.J.H., 18/11/2005. Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>
6. Belgin E., Aktaş F., Böke B., Çağlar A. The Children Population With Sensory-Neural Hearing Loss in Türkiye. Proceedings of the 2nd International Meeting in Audiology for the Mediterranean Countries, 1991.
7. Tuncbilek, E., Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey, Turk. J. Pediatr., 43, 4, 277-279, 2001.
8. Hudspeth, A.J, The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells, Science, 15, 230 (4727), 745-752, 1985.
9. International Human Genom Sequencing Consortium., Finishing the euchromatic sequence of the human genome, Nature, 431, 931-945, 2004.
10. Walter, E.N., The genetics of deafness, Ment. Retard. Dev. Dis. Res. Rev., 9, 109-19, 2003.
11. Hone, S.W., Smith, R.J.H., Genetic screening for hearing loss, Clin. Otolaryngol., 28, 285-290, 2003.
12. Kalatzis, V., Petit, C., The fundamental and medical impact of recent progress in research on hereditary hearing loss, Hum. Mol. Genet., 7, 1589-1597, 1998.
13. Resendes, B.L., Williamson, R.E., Morton, C.C., At the speed of sound: gene discovery in the auditory system, Am. J. Hum. Genet., 69, 923-935, 2001.
14. Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J.S., Loiselet, J., Petit, C., An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21, Hum. Mol. Genet., 8, 3, 409-412, 1999.

15. Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir E., Loiselet, J., Petit, C., A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness, *Nat. Genet.*, 21, 4, 363-369, 1999.
16. Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N., Eavey, R.D., McKenna, M., Nadol, J.B., Jr, Miyamoto, R.T., Linthicum, F.H., Jr, Lubianca Neto, J.F., Hudspeth, A.J., Seidman, C.E., Morton, C.C., Seidman, J.G., Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction, *Nat.Genet.*, 20, 3, 299-303.
17. Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P.K., Hughes, D.C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R.J., Somers, T., Offeciers, F.E., Van de Heyning, P., Richardson, G.P., Wachtler, F., Kimberling, W.J., Willems, P.J., Govaerts, P.J., Van Camp, G., Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment, *Nat. Genet.*, 19,1, 60-62, 1998.
18. McGuirt, W.T., Prasad, S.D., Griffith, A.J., Kunst, H.P., Green, G.E., Shpargel, K.B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R.F., Lynch, E., King, M.C., Brunner, H.G., Cremers, C.W., Takanosu, M., Li, S.W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D.J., Van Camp, G., Smith, R.J., Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13), *Nat. Genet.*, 23, 4, 413-419, 1999.
19. De Kok, Y.J., Van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.H., Cremers, F.P., Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4, *Science*, 3, 267, 5198, 685-688.
20. Vahava, O., Morell, R., Lynch, E.D., Weiss, S., Kagan, M.E., Ahituv, N., Morrow, J.E., Lee, M.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T.B., King, M.C., Avraham, K.B., Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans, *Science*, 20, 279, 5358, 1950-1954, 1998.
21. Wayne, S., Robertson, N.G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C.C., Ryan, A.F., Van Camp, G., Smith, R.J., Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus, *Hum. Mol. Genet.*, 1, 10, 3, 195-200, 2001.
22. Peters, L.M., Anderson, D.W., Griffith, A.J., Grundfast, K.M., San Agustin, T.B., Madeo, A.C., Friedman, T.B., Morell, R.J., Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28, *Hum. Mol. Genet.*, 1, 11, 23, 2877-2885, 2002.
23. Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J., Steel, K.P., Brown, S.D., Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness, *Nat. Genet.*, 16, 2, 188-190, 1997.

24. Wang, A., Liang, Y., Fridell, R.A., Probst, F.J., Wilcox, E.R., Touchman, J.W., Morton, C.C., Morell, R.J., Noben-Trauth, K., Camper, S.A., Friedman, T.B., Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3, *Science*, 280, 5368, 1447-1451, 1998.
25. Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., Lee, M.K., Kanaan M., King, M.C., Avraham, K.B., From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 28, 99, 11, 7518-7523, 2002.
26. Liu, X.Z., Ouyang, X.M., Xia, X.J., Zheng, J., Pandya, A., Li, F., Du, L.L., Welch, K.O., Petit, C., Smith, R.J., Webb, B.T., Yan, D., Arnos, K.S., Corey, D., Dallos, P., Nance, W.E., Chen, Z.Y., Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss, *Hum. Mol. Genet.*, 15, 12, 10, 1155-1162, 2003.
27. Ahmed, Z.M., Morell, R.J., Riazuddin, S., Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M.M., Mohiddin, S.A., Fananapazir, L., Caruso, R.C., Husnain, T., Khan, S.N., Riazuddin, S., Griffith, A.J., Friedman, T.B., Wilcox, E.R. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37, *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 5, 1315-1322, 2003.
28. Lynch, E.D., Lee, M.K., Morrow, J.E., Welsh, P.L., Leon, P.E., King, M.C., Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*, *Science*, 14, 278, 5341, 1223-1224, 1997.
29. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C, Ficarella R, Declau F, Pusch CM, Nurnberg P, Melchionda S, Zelante L, Ballana E, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Savoia ANonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4), *Am. J. Hum. Genet.*, 74, 4, 770-776, 2004.
30. Liu, X.Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K.P., Brown, S.D., Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene, *Nat. Genet.* 17, 3, 268-269, 1997.
31. Lalwani, A.K., Goldstein, J.A., Kelley, M.J., Luxford, W., Castelein, C.M., Mhatre, A.N., Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9, *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 5, 1121-1128, 2000.
32. Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M.L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K.B., Gasparini, P., MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 3, 635-640, 2001.

33. Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R.E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K.B., Gasparini, P., Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss, *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 6, 1571-1577, 2003.
34. Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A.T., Morell, R.J., Elfenbein, J.L., Fisher, R.A., Leal, S.M., Smith, R.J., Friderici, K.H., Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26), *Am. J. Hum. Genet.*, 73, 5, 1082-1091, 2003.
35. Naz, S., Griffith, A.J., Riazuddin, S., Hampton, L.L., Battey, J.F., Jr, Khan, S.N., Riazuddin, S., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction, *J. Med. Genet.*, 41, 8, 591-595, 2004.
36. Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., Leigh, I.M., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness, *Nature*, 387, 6628, 80-83, 1997.
37. Grifa, A., Wagner, C.A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M.D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P., Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus, *Nat. Genet.*, 23, 1, 16-18, 1999.
38. Del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M.A., Del Castillo, F.J., Alvarez, A., Telleria, D., Menendez, I., Moreno, F.A., Deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment, *N. Eng. J. Med.* 346, 4, 243-249, 2002.
39. Xia, J.H., Liu, C.Y., Tang, B.S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H.P., Zhang, B.R., Xie, W., Hu, D.X., Zheng, D., Shi, X.L., Wang, D.A., Xia, K., Yu, K.P., Liao, X.D., Feng, Y., Yang, Y.F., Xiao, J.Y., Xie, D.H., Huang, J.Z., Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment, *Nat. Genet.*, 20, 4, 370-373, 1998.
40. Bernalova, I.N., Van Camp, G., Bom, S.J., Brown, D.J., Cryns, K., DeWan, A.T., Erson, A.E., Flothmann, K., Kunst, H.P., Kurnool, P., Sivakumaran, T.A., Cremers, C.W., Leal, S.M., Burmeister, M., Lesperance, M.M., Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss, *Hum. Mol. Genet.*, 10, 22, 2511-2508, 2001.
41. Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T.J., KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness, *Cell*, 96, 3, 437-446, 1999.

42. Li, X.C., Everett, L.A., Lalwani, A.K., Desmukh, D., Friedman, T.B., Green, E.D., Wilcox, E.R., A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness, *Nat. Genet.*, 18, 3, 215-217, 1998.
43. Wilcox, E.R., Burton, Q.L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T.N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N.A., Morell, R.J., Kachar, B., Wu, D.K., Griffith, A.J., Riazuddin, S., Friedman, T.B., Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29, *Cell*, 104, 1, 165-172, 2001.
44. Bork, J.M., Peters, L.M., Riazuddin, S., Bernstein, S.L., Ahmed, Z.M., Ness, S.L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C.R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S.N., Kaloustian, V.M., Li, X.C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W.E., Liu, X.Z., Wistow, G., Smith, R.J., Griffith, A.J., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Morell, R.J., Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23, *Am. J. Hum. Genet.*, 68, 1, 26-37, 2001.
45. Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, T.P., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Laine, S., Popot, J.L., Moreno, F., Mueller, R.F., Petit, C., Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus, *Nat. Genet.*, 29, 3, 345-349, 2001.
46. Ouyang, X.M., Xia, X.J., Verpy, E., Du, L.L., Pandya, A., Petit, C., Balkany, T., Nance, W.E., Liu, X.Z., Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness, *Hum. Genet.*, 111, 1, 26-30, 2002.
47. Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X.Z., Nouaille, S., Nance, W.E., Kanaan, M., Avraham, K.B., Tekaia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C., Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9, 6240-6245, 2002.
48. Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S.L., Guo, Y., Sabar, M.F., Sieving, P., Riazuddin, S., Griffith, A.J., Friedman, T.B., Belyantseva, I.A., Wilcox, E.R., PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23, *Hum. Mol. Genet.* 12, 24, 3215-3223, 2003.
49. Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R.H., Rump, A., Hardisty, R.E., Blanchard, S., Coimbra, R.S., Perfettini, I., Parkinson, N., Mallon, A.M., Glenister, P., Rogers, M.J., Paige, A.J., Moir, L., Clay, J., Rosenthal, A., Liu, X.Z., Blanco, G., Steel, K.P., Petit, C., Brown, S.D., Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31, *Nat. Genet.*, 34, 4, 421-428, 2003.

50. Naz, S., Giguere, C.M., Kohrman, D.C., Mitchem, K.L., Riazuddin, S., Morell, R.J., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Deshmukh, D., Riazuddin, S., Griffith, A.J., Friedman, T.B., Smith, R.J., Wilcox, E.R., Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus, *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 3, 632-636, 2002.
51. Kurima, K., Peters, L.M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P.S., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Riazuddin, S., Deininger, P.L., Hampton, L.L., Sullivan, S.L., Battey, J.F. Jr, Keats, B.J., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Griffith, A.J., Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function, *Nat. Genet.*, 30, 3, 271-284, 2002.
52. Scott, H.S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S.Q., Radhakrishna, U., Papasavvas, M.P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S.E., Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness, *Nat. Genet.*, 27, 1, 59-63, 2001.
53. Kurima, K., Peters, L.M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P.S., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Riazuddin, S., Deininger, P.L., Hampton, L.L., Sullivan, S.L., Battey, J.F., Jr, Keats, B.J., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Griffith, A.J., Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function, *Nat. Genet.* 30, 3, 277-284, 2002.
54. Satoko, A., Toyomasa, K., Akihiko, S.H., Shin-ichi, U., Yasuhiro, I., Tatsuhiko, T., Yusuke, N., Identification of *CRYM* as a Candidate Responsible for Nonsyndromic Deafness, through cDNA Microarray Analysis of Human Cochlear and Vestibular Tissues, *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1, 73-82, 2003.
55. Van Laer, L., Huizing, E.H., Verstreken, M., Van Zuijlen, D., Wauters, J.G., Bossuyt, P.J., Van de Heyning, P., McGuirt, W.T., Smith, R.J., Willems, P.J., Legan, P.K., Richardson, G.P., Van Camp, G., Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5, *Nat. Genet.*, 20, 2, 194-197, 1998.
56. Akarsu, N.A., Çakır, B., Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilir genetik yöntemler: IV-A. Hastalık geni haritalaması, *3P Dergisi*, 12, Ek.1, 31-49, 2004.
57. Vink, J.M., Boomsma, D.I., Gene finding strategies, *Biological Psychology*, 61, 53-71, 2002.

58. Ott, J., Analysis of human genetic linkage, 3rd edition, The John Hopkins University Press, New York, 1999.
59. Leal, S.M., Müller-Myhsok, B., Nothnagel, M., 4-8/07/2005, Basic gene mapping linkage analysis course, Max Delbrück Centre for Molecular Medicine, Berlin, Germany.
60. Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J., A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites, *Nature*, 380, 6570, 152-154, 1996.
61. Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S., A genetic linkage map of the human genome, *Cell*, 51, 2, 319-337, 1987.
62. Broman, K.W., Murray, C.J., Sheffield, R.L., Weber, J.L., Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination, *The American Journal of Human Genetics*, 63, 861-869, 1998.
63. Murray, J.C., Buetow, K.H., Weber, J.L., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Manion, F., Quillen, J., Sheffield, V.C., Sunden, S., Duyk, G.M., et al., A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC), *Science*, 265, 5181, 2049-2054, 1994.
64. Sheffield, V.C., Weber, J.L., Buetow, K.H., Murray, J.C., Even, D.A., Wiles, K., Gostier, J.M., Pulido, J.C., Yandava, C., Sunden, S.L., et al., A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps, *Hum. Mol. Genet.*, 4, 10, 1837-1844, 1995.
65. Kong, A., Gudbjartsson, D.F., Sainz, J., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Richardsson, B., Sigurdordottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., et al., A high-resolution recombination map of the human genome, *Nat. Genet.*, 31, 241-247, 2002.
66. Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., Weissenbach, J., Genethon human genetic linkage map, *Nat. Genet.*, 2 Spec No, 246-339, 1994.
67. Kong, X., Murphy, K., Raj, T., He, C., White, P.S., Matise, T.C., A combined linkage-physical map of the human genome, *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 6, 1143-1148, 2004.
68. Akarsu, N.A., Lüleci, G., Gen haritalaması:ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl yorumlanıyor?, *DEU Tıp Fakültesi Dergisi Özel Sayısı*, 29-40, 2002.

69. North Shore LIJ Research Institute, 16/02/2006, An alphabetic list of genetic analysis software, <http://linkage.rockefeller.edu/soft/>.
70. Suyama, M., Nagase, T., Ohara, O., HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA Sequencing project, *Nucleic Acid Research*, 27, 1, 338-339, 1998.
71. Sugano, S., FLJ cDNA project in Japan, *Transcriptome 2002: From functional genomics to systems biology*, 2002.
72. Brent, M.R., Genome annotation past, present, and future: How to define an ORF at each locus, *Genome Research*, 15, 1777-1786, 2005.
73. Milder, S.A., Polesky, H.F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc. Ac. Res.*, 28, 1215, 1998.
74. Luijendijk, M.W., Van de Pol, T.J., Van Duijnhoven, G., Den Hollander, A.I., Ten Caat, J., Van Limpt, V., Brunner, H.G., Kremer, H., Cremers, F.P., Cloning, characterization, and mRNA expression analysis of novel human fetal cochlear cDNAs, *Genomics*, 82, 4, 480-490, 2003.
75. Robertson, N.G., Khetarpal, U., Gutierrez-Espeleta, G.A., Bieber, F.R., Morton, C.C., Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening, *Genomics*, 23, 1, 42-50, 1994.
76. Morton, C.C., 2002, <http://hearing.bwh.harvard.edu/estinfo.HTM>.
77. Kondo, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y., Sabe, H., A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpha/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration, *Mol. Biol. Cell*, 11, 4, 1315-1327, 2000.
78. Malaspina, A., Kaushik, N., De Bellerocche, J., A 14-3-3 mRNA is up-regulated in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord, *J. Neurochem.*, 75, 6, 2511-2520, 2000.
79. Taylor, R., Forge, A., Id2 protein during regeneration of hair cells in the newt inner ear, *Fens Forum, Abstract*, 2, 226.18, 2004.
80. Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchel, M.P., Naven, E.R., Schiavo, G., Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 51, 40048-40056, 2000.
81. Dou, H., Finberg, K., Cardell, E.L., Lifton, R., Choo, D., Mice lacking the B1 subunit of H⁺-ATPase have normal hearing, *Hear. Res.* 180, 76-84, 2003.

82. Stankovic, K.M., Brown, D., Alper, S.L., Adams, J.C., Localization of pH regulating proteins H⁺ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in guinea pig inner ear, *Hear. Res.*, 114, 21–34, 1997.
83. Karet, F.E., Finberg, K.E., Nelson, R.D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S.A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C.W., Di Pietro, A., Hoffbrand, B.I., Winiarski, J., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Dusunsel, R., Goodyer, P., Hulton, S.A., Wu, D.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Cunningham, M.J., Jha, V., Lifton, R.P., Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.*, 21, 84–90, 1999.
84. Skvorak, A.B., Weng, Z., Yee, A.J., Robertson, N.G., Morton, C.C., Human cochlear expressed sequence tags provide insight into cochlear gene expression and identify candidate genes for deafness, *Hum. Mol. Genet.*, 8, 3, 439-452, 1999.
85. Corey, D., Garcia-Anoveros, J., Holt, J.R., Kwan, K.Y., Lin, S., Vollrath, M.A., Amalfitano, A., Cheung, E.L.M., Derfler, B.H., Duggan, A., Géléoc, G.S.G., Gray, P.A., Hoffman, M.P., Rehm, H.L., Tamasauskas, D., Zhang, D.S., TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells, *Nature*, 432, 7018, 723-730, 2004.

EKLER

EK-1

Veri bankalarına ait internet adresleri aşağıda verilmiştir:

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (*NCBI kapsamında bulunan, NCBI-Gene, NCBI-Map Viewer, NCBI-UniSTS, NCBI-UniGene, NCBI-Protein, NCBI-Conserved Domain gibi çok sayıdaki veri bankasına bu adresten ulaşılabilir*).

Ensembl : <http://www.ensembl.org/>

Human Genome Browser : <http://genome.ucsc.edu/>

Bioinformatic Harvester : <http://harvester.embl.de/>

Swiss-Prot : <http://www.expasy.org/>

Pfam : <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

Rutgers Fiziksel Harita: <http://www.compgen.rutgers.edu/mapomat/>