

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALITIMSAL ve NON-SENDROMİK İŞİTME
KAYBI OLGULARININ ADAY LOKUSLARDAKİ
MUTASYONEL ANALİZİ**

SAİT TÜMER

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALITIMSAL ve NON-SENDROMİK İŞİTME
KAYBI OLGULARININ ADAY LOKUSLARDAKİ
MUTASYONEL ANALİZİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAİT TÜMER

Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç. Dr. OĞUZ ALTUNGÖZ

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2005.KB.SAG.016 sayı ile desteklenmiştir.

“KALITIMSAL ve NON-SENDROMİK İŞİTME KAYBI OLGULARININ ADAY LOKUSLARDAKİ MUTASYONEL ANALİZİ” isimli bu tez çalışması 15.01.2007 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Yard. Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bülent ŞERBETÇİOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Zeynep SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Tabloların Listesi.....	v
Şekillerin Listesi.....	vii
Kısaltmalar.....	ix
Teşekkür.....	x
Özet (Türkçe).....	1
Özet (İngilizce).....	2
Giriş ve Amaç.....	3

1.GENEL BİLGİLER 5

1.1 İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması.....	5
1.2 Sendromik İşitme Kayıplarında Genetik Değişimlere Genel Bakış.....	7
1.3 Non-sendromik İşitme Kayıpları.....	8
1.3.1 Non-sendromik İşitme Kayıplarında Belirlenen Genlerin İşlevleri.....	8
1.3.2 Potasyum Döngüsü Ve Endolenf Dengesi İçin Önemli Genler.....	9
1.3.3 Hücre İskeleti Proteinlerini Kodlayan Genler.....	12
1.3.4 Korti Organındaki Yapısal Proteinlerini Kodlayan Genler.....	12
1.4 <i>GJB2</i> ; Gap Junction Protein; Connexin 26.....	13
1.4.1 Connexin Grubu Proteinlerin Genel Yapısı.....	13
1.4.1.1 Farklı Connexin Tipleri.....	15
1.4.1.2 Diğer Connexin Genlerinde Gözlenen Mutasyonlar.....	16
1.4.1.3 Connexin Genleri Üzerinde Gözlenen Farklı Mutasyonlar.....	17
1.4.2 Connexin 26 Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı.....	18
1.4.3 Connexin 26 Proteinin Kulak İçindeki Yerleşimi.....	19
1.4.4 Connexin 26 Proteinin İşitmedeki Rolü.....	20
1.4.5 Connexin 26 Geni Üzerinde Saptanan Mutasyon ve Polimorfizmler.....	22
1.4.5.1 Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren <i>GJB2</i> Mutasyonları.....	22
1.4.5.2 Otozomal Resesif Kalıtım Gösteren <i>GJB2</i> Mutasyonları.....	23
1.4.5.3 Polimorfizmler (<i>Single Nucleotide Polymorphism, SNP</i>).....	23
1.5 Mitokondriyal Mutasyonlar ve İşitme Kaybı.....	24

1.5.1 Mitokondriyal Mutasyonlar	24
1.5.2 A1555G Mutasyonu	26
1.5.3 A7445G Mutasyonu	28
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
2.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı	30
2.2 Olguların İşitme Kayıplarının Belirlenmesi	30
2.3 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	31
2.3.1 Kullanılan Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	33
2.3.2 Diğer Kimyasallar.....	34
2.3.3 DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol.....	34
2.3.4 İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması.....	36
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	37
2.4.1 Connexin 26 İkinci Ekzonun Tamamının Çoğaltılması	37
2.4.2 35delG Enzim Kesimiyle Saptanması İçin Tasarlanan Yöntem	38
2.4.3 Mitokondriyal Genomda A1555G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin Amplifikasyonu	39
2.4.4 Mitokondriyal Genomda A7445G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin Amplifikasyonu	40
2.4.5 PCR' da Kullanılan Komponentler ve PCR'ın Hazırlanışı	40
2.4.6 PCR şartları	42
2.4.6.1 Connexin 26 İkinci Ekzon Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri	42
2.4.6.2 35delG ve Pozitif Kontrol Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri.....	43
2.4.6.3 A1555G ve A7445G Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri.....	45
2.4.7 PCR'ların Agaroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar	46
2.4.8. PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülemesi	47
2.5. Restriksiyon Enzim Kesimleri.....	48
2.5.1 35delG Mutasyonunu Saptamak İçin Kısıtlayıcı Enzim Kesim Deneyi	48
2.5.2 Mitokondri Genomu A1555G Mutasyonu İçin Enzim Kesim Deneyi.....	48
2.5.3 Mitokondri Genomu A7445G Mutasyonu İçin Enzim Kesim Deneyi.....	49
2.6 Agaroz Jel Elektroforezi ile Kesim Ürünlerinin Analiz Edilmesi.....	50

2.6.1 35delG Mutantı ve Pozitif Kontrol Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi	50
2.6.2 Mitokondri Genomu A1555G Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi	51
2.6.3 Mitokondri Genomu A7445G Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi	52
2.7 DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları	53
2.7.1 Örneklerin Dizi Analizinin Yapılması.....	53
2.7.2 Kramotogramların Değerlendirilmesi.....	54
3.BULGULAR	55
3.1 Olgu Grubunun Oluşturulması ve Soyağaçlarının Çıkarılması.....	55
3.1.2 Proband Olgulardan DNA İzolasyonu ve Ölçümleri.....	55
3.1.3 Proband Olguların PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Kontrolü	56
3.1.3.1 Cx-26 2. Ekzonun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması.....	56
3.1.3.2 35delG İçin PCR Amplifikasyonu ve Ürününün Saptanması	57
3.1.3.3 Mitokondriyal Genomda A1555G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin PCR Amplifikasyonu ve Ürününün Saptanması	57
3.1.3.4 Mitokondriyal Genomda A7445G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin PCR Amplifikasyonu ve Ürününün Saptanması	58
3.1.4. DNA Dizi Analizi Verileri	59
3.1.5 Restriksiyon Enzim Kesimi ve Sonuçların Değerlendirilmesi	63
3.1.5.1 35delG Mutasyonunu Restriksiyon Enzim Kesim Sonuçları.....	63
3.1.5.2 Mitokondri Genomu A1555G Mutasyonu Enzim Kesim Sonuçları	64
3.1.5.3 Mitokondri Genomu A7445G Mutasyonu Enzim Kesim Sonuçları.....	65
3.2 Kontrol Grubunun Oluşturulması ve DNA Dizi Analizi.....	66
3.2.1 Cx-26 İkinci Ekzonun Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	66
4.TARTIŞMA.....	68
4.1 Olgu Grubunun ve Çalışılacak Gen Bölgelerin Seçilmesinde Öngörülen Hedefler ve Yöntemlerin Oluşturulmasında İzlenen Stratejiler	68
4.2 Connexin 26 Geni İkinci Ekzonunda Saptanan Mutasyonların Değerlendirilmesi.....	70
4.3 Connexin 26 Geninde Saptanan cSNP Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi.....	78

4.4 Ülkemizde GJB2 Geniyle İlgili Çalışmalar ve Saptanan Değişimler.....	79
4.5 Çalışma Grubunda Saptanan Mutasyonların Kalıtım Örüntüsü	81
4.6 Genetik Sürüklenme (Gene Drift), “Founder Effect” ve “Assortative Mating” Etkisinde Cx-26 Mutasyonlarının Toplumsal Olarak Değerlendirilmesi.....	82
4.7 Olgu Grubunda Mitokondri Genomundaki Mutasyonlara Yönelik Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	84
4.8 İşitme Kaybı Bulunmayan Kontrol Grubunda Cx-26 Geni İkinci Ekzonda Saptanan Değişimler	85
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
Ek-1	91
Ek-2	97
Ek-3	99
Ek-4	107
KAYNAKLAR.....	114

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 İşitme kayıplarının sınıflandırılması.....	5
Tablo 1.2 GENDAF grubuna göre işitme kayıplarının sınıflandırılması	6
Tablo 1.3 Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri	7
Tablo 1.4 Connexin 26 (GJB2) için tanımlanmış sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar	8
Tablo 1.5 Connexin genleri, ekspresyonu ve kalıtsal hastalıkları	16
Tablo 1.6 Connexin 31 (GJB3) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar	16
Tablo 1.7 Connexin 30 (GJB6) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar	17
Tablo 1.8 Connexin 43 (GJA1) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar	17
Tablo 1.9 İşitme kaybı ve diğer hastalıklarla ile ilişkili mitokondriyal mutasyonlar	25
Tablo 1.10 A1555G mutasyonunun işitme kayıplı çeşitli toplumlarda görülme sıklığı.....	28
Tablo 1.11 A7445G mutasyonunun işitme kayıplı çeşitli toplumlarda görülme sıklığı.....	29
Tablo 2.1 25 ve 50 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	42
Tablo 2.2 Optimize edilen PCR ısıl değişkenleri	42
Tablo 2.3 BseLI enziminin kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler ve miktarları..	48
Tablo 2.4 Alw26I enziminin kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler	49
Tablo 2.5 XbaI enzim kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler ve miktarları.....	49
Tablo 3.1 Seksen sekiz probandin işitme kaybı aralıklarına göre dağılımı ve bu aralıklardaki yüzdeleri	55
Tablo 3.2 Cx-26 geninin ikinci ekzonunda dizi analizinin verilerine göre mutasyon ve SNP saptanan olgular.....	60
Tablo 3.3 Probandlarda saptanan mutasyonların olgu grubun içindeki yüzdeleri ve allelik frekansları. 74 ailede saptanan mutasyon oranları.....	61
Tablo 3.4 Probandlarda saptanan SNP'lerin olgu grubun içindeki allelik frekansları	61
Tablo 3.5 Probandlarda saptanan tüm değişimlerin oranı	61
Tablo 3.6 Mutasyon saptanan olgularda aile DNA dizi analizi verileri	62
Tablo 3.7 35delG restriksiyon enzim kesimi aile sonuçları.....	64

Tablo 3.8 Kontrol grubunun DNA dizi analizlerinde saptanan mutasyon, SNP ve literatürde tanımlanmamış değişimlere ait veriler	67
Tablo 4.1 Olguların öyküleri ve kalıtım şekilleri	71
Tablo 4.2 Ülkelere göre 35delG mutasyonu taşınma sıklığı.....	73
Tablo 4.3 Ülkemizde işitme kaybı olan olgularda saptanan GJB2 mutasyon ve polimorfizmlerin oranlarının bu çalışma ile karşılaştırılması.....	80
Tablo 4.4 İşitme kaybı görülen ailelerin 35delG ve diğer mutasyonlar bakımından kalıtım modelleri.....	81
Tablo 4.5 Ülkelere göre 167delT mutasyon dağılımları.....	83
Tablo 4.6 Ülkelere göre 235delC mutasyonu taşınma sıklığı.....	83
Tablo 4.7 Ülkemizde yapılan çalışma sonuçları	84
Tablo 4.8 Kontrol grubunda (171 birey) saptanan nükleotid değişimler ve bu değişimlerin allelik frekanslarına ait sayısal veriler	86
Tablo E.1 Non-sendromik işitme kaybında tutulum gösteren genlerden şu ana kadar tanımlananlar	91
Tablo E.2 Cx-26 (<i>GJB2</i>) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili otozomal dominant mutasyonlar	93
Tablo E.3 Cx-26 (<i>GJB2</i>) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili otozomal resesif mutasyonlar	93
Tablo E.4 Cx-26 (<i>GJB2</i>) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili kalıtımı bilinmeyen mutasyonlar	95
Tablo E.5 Cx-26 geninde gözlenen polimorfizmler	96

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Patojenik Cx mutasyonlarının, Cx biyogenezi ve fonksiyonuna etkileri.....	9
Şekil 1.2 Non-sendromik olgularda iç kulak koklea kesitinde etkili olan gen ürünlerine bazı örnekler	11
Şekil 1.3 Connexinler ve gap junction organizasyonu	14
Şekil 1.4 Connexin 26 protein alanları.....	14
Şekil 1.5 Kokleada potasyum iyon döngüsü ve gap junction'lar	15
Şekil 1.6 Connexin 30'da 342-kb delesyon	17
Şekil 1.7 Connexin 26 geninin yerleşimi ve bazı mutasyonlar	18
Şekil 1.8 Connexin geni yapısı.....	19
Şekil 1.9 13. kromozom üzerinde connexin grubu genlerin yerleşimi.....	20
Şekil 1.10 İç kulaktaki potasyum döngüsü.....	21
Şekil 1.11 Mitokondriyal DNA'da işitme kaybıyla ilişkili mutasyonların yerleşimleri ve etkiledikleri proteinler	26
Şekil 1.12 12SrRNA geninde A1555G mutasyonunun konumu.....	27
Şekil 1.13 A7445G mutasyonunun tRNA üzerindeki konumunun şematik görünümü	29
Şekil 2.1 Projede yürütülen çalışma algoritmasının şematik çizimi	32
Şekil 2.2 Cx-26 2. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi	37
Şekil 2.3 Modifiye primerin mutant allelde oluşturduğu enzim kesim bölgesi	38
Şekil 2.4 35delG bölgesi ve pozitif kontrol için için primer oturma bölgeleri	39
Şekil 2.5 A1555G için primer oturma bölgeleri.....	39
Şekil 2.6 A7445G için primer oturma bölgeleri.....	40
Şekil 2.7 Cx-26 primer seti optimizasyon deneyi elektroforez jel görüntüleri	43
Şekil 2.8 35delG ve pozitif primer seti optimizasyon deneyi jel görüntüleri.....	44
Şekil 2.9 35delG ve pozitif primer seti optimizasyon deneyi jel görüntüleri.....	45
Şekil 2.10 A1555G ve A7445G primer seti optimizasyon deneyi jel görüntüleri	46
Şekil 2.11 BseLI enziminin kesim bölgeleri	48
Şekil 2.12 Alw26I enziminin kesim bölgeleri.....	49
Şekil 2.13 XbaI enziminin kesim bölgeleri	50
Şekil 2.14 35delG'nin BseLI enzim kesimi sonrasında mutant ve mutant olmayan kesim ürünlerinin şematik görünümü	50

Şekil 2.15 BseLI enzim kesimi sonrasında oluşabilecek kesim ürünlerinin %3.5'luk jel görüntüsünün şematik çizimi.....	51
Şekil 2.16 A1555G mutasyonunun Alw26I enzimi ile kesim ürünlerinin görünümü.....	52
Şekil 2.17 Alw26I enzim kesimi sonrasında oluşabilecek kesim ürünlerinin %2.5'luk jel görüntüsünün şematik çizimi.....	52
Şekil 2.18 A7445G mutasyonunun XbaI enzimi ile kesim ürünlerinin görünümü.....	53
Şekil 2.19 XbaI enzim kesimi sonrasında oluşabilecek kesim ürünlerinin %2.5'luk jel görüntüsünün şematik çizimi.....	53
Şekil 3.1 Bazı olgulara ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 3.2 İkinci ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	57
Şekil 3.3 35delG ve pozitif kontrol (PK) PCR amplifikasyonlarının jel görüntüsü.....	57
Şekil 3.4 mtDNA A1555G değişimi için PCR amplifikasyonu jel görüntüsü.....	58
Şekil 3.5 mtDNA A7445G değişimi için PCR amplifikasyonu jel görüntüsü.....	58
Şekil 3.6 35delG mutasyonu için tasarlanmış restriksiyon enzim kesimi analiz sonuçları elektroforez jel görüntüsü.....	63
Şekil 3.7 A1555G restriksiyon enzim (Alw26I) kesimi sonrası jel görüntüsü	65
Şekil 3.8 A7445G restriksiyon enzim (XbaI) kesimi sonrası jel görüntüsü.....	65
Şekil 4.1 Cx-26 proteini üzerinde 35delG mutasyonunun hücre zarındaki konumu	74
Şekil 4.2 Cx-26 proteini üzerinde 247delTTC mutasyonunun hücre zarındaki konumu... 74	
Şekil 4.3 Cx-26 proteini üzerinde 299delAT ve 358delGAG mutasyonların hücre zarındaki konumu	75
Şekil 4.4 Cx-26 proteini üzerinde G88A (I30V), C269T (I90P), G380A (R127H) mutasyonların hücre zarındaki konumu	77

KISALTMALAR

bp: Baz Çifti.

Cx-26: Connexin 26.

DFN: Cinsiyete bağlı lokus.

DFNA: Otozomal dominant lokus.

DFNB: Otozomal resesif lokus.

EC: Hücre dışı.

ER: Endoplazmik Retikulum.

GENDAF: European Thematic Network on Genetic Deafness

GJA: Alfa connexinler.

GJB: Beta connexinler.

GJC: Gamma connexinler.

GJP: Gap junction plak.

IC: Hücre içi.

OD: Optik dansite.

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

PPK: Palmoplantar keratoderma.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

TBE: Tris-Borat-EDTA.

TE: Tris EDTA.

TG: Trans-golgi ağı.

U/PR: Ubikutinasyon/protozomal degradasyon.

TEŞEKKÜR;

Bilimsel birikimlerini düzlüğe çıkmam için her zaman birer basamak olarak hiçbir kısıtlama yapmadan sunan, bu süreç içerisinde kişisel ve bilimsel eğitimimin her karesinde desteği ile var olan değerli danışman Hocam; Yard. Doç. Dr. Oğuz Altungöz'e teşekkür ederim.

Projenin oluşumunda, hastaların seçilmesinde, odyolojik çalışmaların yapılmasındaki katkılarından dolayı başta; Doç. Dr. Bülent Şerbetçioğlu ve Uzm. Dr. Günay Kırkım olmak üzere tüm İşitme-Konuşma-Denge Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca kanların alınmasında yardımlarından dolayı KBB servis hemşirelerine sonsuz teşekkürler.

Hoşgörülü yaklaşımları ile huzurlu bir ortamda çalışmamızı temin eden Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam; Prof. Dr. Meral Sakızlı' ya, fikir ve yardımlarını aldığım bölümümüzün değerli öğretim üyelerine ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Maddi-manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli anne-babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

ÖZET

KALITIMSAL ve NON-SENDROMİK İŞİTME KAYBI OLGULARININ ADAY LOKUSLARDAKİ MUTASYONEL ANALİZİ

Sait Tümer

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Balçova-İzmir
sait.tumer@deu.edu.tr

Populasyonlarda görülme sıklığı 1/1000'den daha fazla olan non-sendromik sensörinöral işitme kayıplarından sorumlu birincil gen, connexon gap junction proteini alt birimini kodlayan Cx-26 genidir. Özellikle bu geninin ikinci ekzonunda 35delG mutasyonunun Avrupa toplumlarında görülme sıklığı işitme kayıplı olgular için %70'in üzerindedir. Bunun yanı sıra mitokondriyal genomdaki mutasyonlar, çeşitli aminoglikozidlerin çocukluk çağında uzun süre kullanılmasına bağlı olarak işitme kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, odyolojik ölçümler kriter alınarak doğuştan duyu yitimi olan 88 proband ve aileleri seçildi. Her bir hastanın öyküleri alınarak soyağaçları çizildi. Tüm probandların Cx-26 ikinci ekzon bölgesi PCR ile çoğaltılarak DNA dizi analizi yapıldı. Mutant probandların ailelerinde de mutasyonlar aynı yolla saptandı. 35delG için *Bse*LI enzimi kullanılarak doğrulandı. Mitokondriyal DNA'da ise A1555G ve A7445G noktalarını içeren bölgeler PCR ile çoğaltılarak sırasıyla, Alw26I ve XbaI enzimleri ile kesim analizi yapıldı. Ayrıca işitme kaybı olmayan populasyondan seçilen 171 bireyde Cx-26 ikinci ekzon polimorfizmleri DNA dizi analizi ile incelendi. Olgu grubunun %26.6'sında mutasyon, %7.96'sında polimorfizm belirlendi. Saptanan mutasyonlar; 35delG (%18.18), G380A (%2.28), A88G (%1.14), 247delTTC (%1.14), T269C (%1.14), 299delAT (%1.14), 358delGAG (%1.14), polimorfizmler; G79A (%5.68), G457A (%1.14), C570T (%1.14) şeklinde saptandı. Mitokondri genomunda yapılan çalışmada herhangi bir mutasyon saptanmadı. Kontrol grubunda dokuz SNP %15.78 sıklıkta belirlendi. En sık gözlenen polimorfizmler G79A (%5.26) ve G457A (%4.68) olarak belirlendi. Sonuç olarak; Ege bölgesi ve çevresinin işitme kaybı olgularında ilk kez Cx-26 ikinci ekzonu incelendi. Olgu grubunda bir olguda 247delTTC aday mutasyon, kontrol grubunda ise G647C ve C292T değişimleri aday SNP olarak saptandı.

ANAHTAR KELİMELER

İşitme kaybı, Gap Junction, Connexin 26, 35delG, A1555G, A7445G.

ABSTRACT

MUTATIONAL ANALYSES OF THE HEREDITARY AND NON-SYNDROMIC HEARING LOSS CASES IN CANDIDATE LOCI

Sait Tümer

Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylul University School of Medicine.

Balcova-IZMIR/TURKIYE

sait.tumer@deu.edu.tr

Mutations of Cx-26 gene, which is coding the subunit of connexon gap junction protein, is primarily responsible for non-syndromic, sensorineural hearing loss. The incidence of it has been reported to be more than 1/1000 in various populations. Especially, 35delG mutation in the second exon of this gene frequency is over 70% among individuals with hearing loss in Europe. In addition to this mutation, mitochondrial genome has several targets for genetic defects associated with hearing loss in people with a long period aminoglycoside exposure during childhood. Eighty-eight probands and their kindred with hereditary and congenitally hearing loss diagnosed by audiological measurement were included in the study. The pedigrees of each kindred were prepared according to their family history. PCR amplifications followed by DNA sequence analyses of this gene were carried out in genomic DNA samples from each proband. The detected mutations were also searched in family members of probands similarly. 35delG change was confirmed by using BseLI restriction enzyme. The positions of 1555 and 7445 in mitochondrial DNA were tested by restriction enzyme analysis, using Alw26I and XbaI enzymes respectively. Furthermore, the control group consisted of 171 people without hearing loss was investigated by DNA sequence analyses on this gene for genetic variations and polymorphisms. Among the cases with hearing loss, 26.6% displayed mutations while 7.96% had polymorphisms. The detected mutations were as follows: 35delG (%18.18), G380A (2.28%), A88G (1.14%), 247delTTC (1.14%), T269C (1.14%), 299delAT (1.14%), 358delGAG (1.14%). Besides, G79A (5.68%), G457A (1.14%), C570T (1.14%) polymorphisms have also been detected. No mutation has been found in mitochondrial genome for the corresponding positions. The frequency of 9 different SNPs was 15.78% in the control group. The most frequent SNPs were G79A (5.26%) and G457A (4.68%). In conclusion, this is the first study of this gene by DNA sequence analysis approach in cases with hearing loss in the Aegean region of Turkey. A novel mutation, 247delTTC in one proband and two novel SNPs (G647C, C292T) in the control group were detected.

KEY WORDS

Hearing Loss, Gap Junction, Connexin 26, 35delG, A1555G, A7445G.

GİRİŞ ve AMAC

İşitme kayıpları popülasyonda sık rastlanan, sendromlarla veya non-sendromik seyreden hastalıklardır. Duyu yitimi gözlenen hastalar yaş bakımından geniş bir dağılım gösterse de, genelde konuşma öncesi (pre-lingual) dönemden gelen işitme kayıpları daha yaygındır ve sendromik olgulara daha az sıklıkta rastlanmaktadır. İşitme duyusu kulakla sınırlandırılmamalı, konuşmanın gelişmesine de etkisi olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Pre-lingual veya konjenital işitme kaybı en sık rastlanan duyuusal yitim olup, her 1000 yeni doğanda 1 gözlenebilmektedir. Bu olguların yaklaşık %50-60'ının genetik bir kökeni olduğu sanılmaktadır (1,2). Kalıtsal işitme kaybı olgularının yaklaşık %77-88'i otozomal resesif, %10-20 dominant ve %1'den az cinsiyete bağlı kalıtım şeklinde olmaktadır (2,3).

Ülkemizde işitme kaybı ile ilgi yapılan çalışmalar, tüm bölgeleri kapsamak yerine sınırlı kalmıştır. Bu çalışma bölgesel anlamda, Ege ve çevresinin işitme kayıplı bireylerindeki mutasyonların saptanması ve genel popülasyon hakkında daha kapsamlı bilgilere ulaşılması noktasında, boşluğun gidermesi amaçlanmıştır. Normal popülasyondan alınan grubun çalışmaya dahil edilmesiyle, toplumumuz için Cx-26 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) ve işitme kaybı olmayan örnek evrende mutant allel frekanslarının saptanması hedeflenmiştir.

İlginç bir şekilde, saptanan mutasyonlar etnik kökenle ve coğrafik dağılımla birliktelik göstermektedir. Bazı mutasyon tiplerinin etnik kökene özgü olduğu düşünülmektedir (3). *GJB2* geninde gözlenen mutasyonların etnik kökenle ilişkilendirilmesinde, gen sürüklenmesi (*gene drift*) ve yakın akraba evliliklerinin yanısıra popülasyonun rastlantısal eşleşme yerine, (*random mating*) seçici eşleşme (*assortative mating*) durumuna kayması (*linguistic homogamy*) şeklinde bir düşünce hakimdir. Bu tür eğilimlerin toplumlara göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Ancak işitme kayıplı bireylerin birbirleri ile evlendirildikleri popülasyonda mutasyona uğramış gen frekansının artması kaçınılmazdır (4).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, ülkemizin mozaik etnik yapısı, yakın akraba evliliklerinin fazlalığı, kapalı küçük popülasyonların kendi içlerindeki gen alışverişi göz önüne alındığında, kalıtsal hastalıkların neden fazla olduğu anlaşılabilir. Bu bağlamda, elde edilen verilerin genele yorumlanmasında ve mutasyon sıklıklarının saptanmasında bölgesel açığın kapatılması ve mevcut veri birikimine katkı yapılması hedeflenmiştir.

Pre-lingual, non-syndromik olgularda en sık rastlanan mutasyon bir “gap junction” protein kompleksinin alt birimini kodlayan *GBJ2* geninde gözlenip, genin kodladığı connexin 26 proteinini etkilemektedir (2,5,6). Bu güne kadar 13q11 kromozom bandında yerleşim gösteren bu gende 100’ den fazla mutasyon bildirilmiştir (<http://davinci.crg.es/deafness/>).

Kıtasal olarak Avrupa ve Asya geçişinde bulunan ülkemiz birçok genetik geçişin etkisi altındadır. Bu çalışmada, tüm populasyonlarda mutasyonlarına en sık rastlanan gen olan connexin 26 (*GJB2*) incelenmiştir. Çalışmada birincil hedef olarak seçilen bu genin ifade edilen ikinci ekzonu merceğe altına alınmıştır. Yöntemsel bir yaklaşım olarak daha sınırlı bir restriksiyon enzim kesimi analizi yerine, bu bölgede tümüyle DNA dizi analizi gerçekleştirilmesi öngörülmüştür. Çünkü, bu ekzon üzerindeki 681 bp uzunluğundaki bir alanı kapsan bu bölgedeki olası SNP’lerin ve herhangi bir bazda değişimin ve daha önce ülkemizde bilinmeyen olası yeni mutasyonların saptanması amaçlanmıştır.

Mitokondriyal mutasyonlara bağlı işitme kayıpları farklı bir biyokimyasal süreçle seyretmektedir. Mutasyonu taşıyan bireyler uzun süreli aminoglikozid türevi bir antibiyotik ile tedavi edildiğinde duyu yitimleri olabilmektedir. Mitokondriyal mutasyonların kalıtım ile oluşan işitme kayıpları toplumlara göre %1 ila 20 arasında değişmektedir (3,7). Özellikle, İspanya (8), Japonya (9), Moğolistan (10) gibi ülkelerde farklılıklar göstermektedir.

Başta gentamisin olmak üzere, aminoglikozid türevi antibiyotikler, ülkemizde sıkça kullanılan bir ilaç türüdür. Mitokondriyal mutasyonlar ile ilgili çalışmalar ülkemizde yeterli düzeyde değildir. Oluşturulan hasta evreni en sık rastlanan iki tip (A1555G ve A7445G) mutasyon bakımından incelenmiş ve adı geçen mutasyonların populasyonumuzdaki görülme sıklığı hakkında verilere ulaşılması amaçlanmıştır.

Özet olarak bu çalışmada: connexin 26 ve mitokondriyal mutasyonların işitme kaybı açısından incelenmesi; ülkemizde bu konuda sınırlı olan çalışmalara katkı sağlanması, bölgesel olarak hastalarda bulunan mutasyonların tanımlanması ve en önemlisi, en sık rastlanan mutasyonların saptanmasıyla, çalışmanın prenatal dönemde yapılacak moleküler tanı testlerine enformatik bir zemin hazırlaması hedeflenmiştir.

1.GENEL BİLGİLER

Duyu yitimi gözlenen olgular odyolojik bulgularına bakılarak değerlendirilmektedir. Ancak; işitme duyusu birçok hücrel ve moleküler bileşenin rol aldığı bir işlev olarak düşünüldüğünde sadece odyolojik kıstasların yeterli olmadığı görülebilir. Bireyin genotipi, mikro ve makro hücrel çevre, moleküler yapı düzeyinde etkileşimler gibi birçok bileşen, ortak bir paydada buluşarak işitme işlevinin olağan şekilde yerine getirilmesini sağlar.

1.1 İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması

Farklı kıstaslar göz önüne alınarak işitme kayıpları bir çok şekilde, sınıflandırılmaktadır. İki farklı kıstasa göre yapılan ana sınıflandırma türleri Tablo 1.1’de verilmiştir (11);

Tablo 1.1 İşitme kayıplarının sınıflandırılması

A. Odyolojik fenotipe göre sınıflandırma				
1.Tip	2.İlerleme	3.Frekans	4.Şiddet	5.Başlangıç
Sensorinöral	Progresif	Düşük	Hafif	Konjenital
Konduktiv	Non-progresif	Orta	Orta derece	Çocukluk
Mixed	Fluctuate	Yüksek	Yüksek derece Ağır Çok ileri	Erişkin

B.Etkene göre sınıflandırma			
1.Genetik nedenler (%50-60)		2.Genetik olmayan etkenler (%40-50)	
1a. Fenotip	1b. Kalıtsal	1c. Multigenik**	
Sendromik (%30-40)	Otozomal resesif (%70-80)	Kromozomal anomaliler	Terotojen etkiler (CMV, Rubella) Prematüre
Non-sendromik (%60-70)	Otozomal dominant (%10-20) Cinsiyete bağlı (%1-2) Mitokondriyal (%0-20)*	Trizomi 13;18;21 Mozaik trizomi 8 Turner sendromu 22q11 delesyonu	Postnatal enfeksiyon (menenjit, cititis media) Ototoksik ilaçlar Akustik veya kranial travma

* Mitokondriyal mutasyon sıklığı etnik gruplara göre değişkenlik göstermektedir (7).

Genetik nedenli işitme kayıplarının farklı bir sınıflandırma kategorisi, “*European Workshop on Genetic Hearing Loss*” başlıklı çalışmada yapılmıştır. Bu sınıflandırma Tablo 1.2’de verilmiştir [(12)(<http://www.gendaf.org>)];

Tablo1.2 GENDAF grubuna göre işitme kayıplarının sınıflandırılması (<http://www.gendaf.org>).

Grup	Derece	Aralık(dB)
0	Normal	<20
1	Hafif	21-40
2	Orta	41-70
3	İleri	71-95
4	Çok İleri	95>

Etkenlere göre yapılan sınıflandırmada, non-sendromik olgularda genetik etken %50-60’lık grubu oluşturmaktadır. Cx-26 gen bozuklukları bu grubun altında % 60-70 gibi geniş bir olgu potansiyelini kapsamaktadır. Kalıtsal non-sendromik hastaların soyağaçlarında en sık otozomal resesif kalıtım örüntüsü gözlenmektedir (2,7,11)

Sendromik ve non-sendromik olgularda gözlenen mutasyonlar çok çeşitlilik göstermektedir. Bu güne kadar işitme kaybı ile ilgili birçok lokus saptanmıştır. Bu lokusların özel isimlendirmeleri kalıtım örüntüsü göz önüne alınarak yapılmaktadır ve;

- DFNA: Otozomal dominant lokus
- DFNB: Otozomal resesif lokus
- DFN: Cinsiyete bağlı lokus

şeklinde sınıflandırılmaktadır (7,11,13). Yukarıda belirtilen kalıtım tipleri sendromik veya non-sendromik olgularda gözlenen mutasyona uğramış genlerin kalıtım şeklini belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin, non-sendromik grup pre-lingual, post-lingual ve late-onset olarak gruplara ayrılmakta, pre-lingual olgularda en sık DFNB1 (*GJB2*) tutulum göstermektedir (1,6,14,15). DFNB için bulunan lokus sayısı 35’den fazla olup bunlardan 16’sında ilgili genler ve kromozom yerleşimleri tanımlanmıştır (13,16).

1.2 Sendromik İşitme Kayıplarında Genetik Değişimlere Genel Bakış

Sendromik işitme kaybı görülen olgularda hastalık sadece işitmedeki sorunla kalmaz, kliniğe yansıyan çeşitli semptomlar da gözlenebilir. Bu güne kadar 400'den fazlası tanımlanmış hastalıklardan en yaygın olarak gözlenenlerden bazıları: Branchio-oto-renal Sendrom, Usher Sendromu, Waardenburg Sendromu, Pendred Sendromu ve Alport Sendromu'dur (3,7,13).

Kalıtımsal işitme kayıplarının yaklaşık olarak % 30'u diğer organ ve yapı sistemlerini de etkileyen sendromik olgulardır (17). Sendromik olgularla ilişkisi tanımlanan genlerin bazıları ve kalıtım şekilleri Tablo 1.3'de verilmiştir (7).

Tablo 1.3'de verilen hastalık örneklerinde, tutulum gösteren genlerde çeşitli mutasyonlar gösterilmiştir. Ayrıca, ilginç olarak aynı gen üzerinde farklı mutasyonlar gözlenmekte ve bu mutasyonlar ya sendromik ya da non-sendromik olarak kliniğe yansımaktadır. Pandred Sendromunda *SLC26A4* geninde gözlenen iki farklı mutasyon, farklı sonuçlara yol açmaktadır. Başka bir örnek olarak; *CDH23* ve *USH1C* genlerindeki farklı mutasyonlar Usher Sendromu Tip 1'e veya non-sendromik işitme kaybına neden olmaktadır (17).

Tablo 1.3 Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri .

Sendrom	Kalıtımı	Gen	Kodladığı molekül	Lokalizasyon
Waardenburg tip1	Otz.Dom.	<i>PAX3</i>	Transkripsiyon faktörü	2q35-q37
Waardenburg tip2	Otz.Dom.	<i>MITF</i>	Transkripsiyon faktörü	3p14.1-p12.3
Waardenburg tip4	Otz.Dom.	<i>EDN3</i>	Endothelin-3, ligand	20q13.2-q13.3
Treacher Collins	Otz.Dom.	<i>TCOF1</i>	Nükleolar fosfoprotein	5q31.3-q33.1
Branchio-oto-renal	Otz.Dom.	<i>EYA1</i>	Transkripsiyon faktörü	8q13.1
Jarvel and Lange-Nielsen	Otz.Res.	<i>KCNQ1</i>	İyon kanalı	11p15.5
Pendred Sendromu	Otz.Res.	<i>SLC26A4</i>	Anyon transporter	7q31
Alport Sendromu	X e bağlı	<i>COL4A5</i>	Kollagen alfa 5	Xq22
	Otz.Res.	<i>COL4A3</i>	Kollagen alfa 3	2q35-q37
Usher tip 1B	Otz.Res.	<i>MYO7A</i>	Tip 7 myosin	11q13.5
Usher tip 1C	Otz.Res.	<i>USH1C</i>	PDZ domain protein	11p15.2-p14
Usher tip 1D	Otz.Res.	<i>CDH23</i>	Cadherin	10q21-q22
Usher tip 1E	Otz.Res.	<i>PCD15</i>	Protocadherin	10q21-q22

Genelde non-sendromik olguların yarısından fazlasında mutasyona uğradığı belirlenen *GJB2*, sendromik olgularda da çeşitli mutasyonlar (Tablo 1.4) ile karşımıza çıkmaktadır (7,11).

Tablo 1.4 Connexin 26 (*GJB2*) için tanımlanmış sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar. (IC: hücre içi EC: hücre dışı) (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Dominant mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	G12R	G34C	12. kodon Gly→Arg	IC1
2	S17F	C50T	17. kodon Ser→Phe	IC1
3	D50N	G148A	50. kodon Asp→Gln	EC1
4	N54K	Tanımlanmamış	54. kodon Asn→Lys	EC1
5	G59A	C176G	59. kodon Glu→Arg	EC1
6	D66H	G196C	66. kodon Asp→His	EC1
7	R75W	C223T	75. kodon Arg→Trp	EC1
8	R75Q	G224A	75. kodon Arg→Gln	EC1

1.3 Non-sendromik İşitme Kayıpları

Bu grubu oluşturan hastalarda yalnızca işitme kayıpları gözlenmekte, diğer organ ve sistemler tutulumu gözlenmemektedir. Non-sendromik olgular ile ilişkisi saptanan 70'den fazla lokus haritalanmış ve işitmeyi denetleyen 26 gen belirlenmiştir (13). Bu lokuslarda rastlanan mutasyonlar farklı kalıtım şekilleri (Otozomal dominant, resesif, cinsiyete bağlı, mitokondriyal) göstermektedir (6,11,13). Haritalanan bu genlerden, 33'ü resesif (DFNB1-33), 41'i dominant (DFNA1-44) ve 5'i cinsiyete bağlı (DFN1-5) kalıtım göstermektedir (2,3). Bu genlerin ürünleri arasında; iyon kanalları, membran proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve yapısal proteinler sayılabilir. Bu grupta gözlenen işitme kayıpları kalıtım şekillerinin yanı sıra, hastalığın başlangıcına göre de “pre-lingual” (konuşma öncesi dönem) veya “post-lingual” (konuşma sonrası dönem) olarak gruplanmaktadır (13).

1.3.1 Non-sendromik İşitme Kayıplarında Belirlenen Genlerin İşlevleri

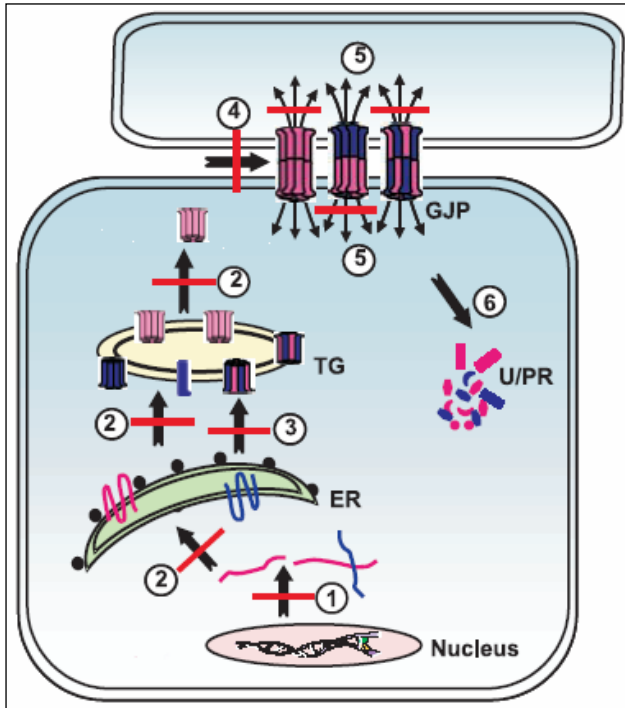
Ek 1 Tablo E.1'de non-sendromik işitme kaybı ile ilgili gen lokusları ve gen ürünlerinin işlevleri genel olarak verilmiştir. Özet olarak: iyon ve küçük moleküllerin hücreler arasında geçişini sağlayan gap junction ve potasyum iyon kanalları; yapısal işlevlerde rol alan *MYO7A*,

alfa-tektörin ve kollagen; gen düzenleyici proteinler, başlıca transkripsiyon faktörleri, *POU* gen ailesinden *EYA4* sıralanabilir (11,13).

1.3.2 Potasyum Döngüsü Ve Endolenf Dengesi İçin Önemli Genler

İşitme Kaybıyla İlişkili Connexin Genleri (*DFNB1*, *DFNA2*, *DFNA3*)

Hücrelerin birbirleri ile ilişkileri, doku homeostazı, uyaranlara eş zamanlı yanıt, çoğalma ve denetim sistemleri “gap junction” lar ile sağlanmaktadır (18,19). Bu yapılardan birisi de “connexon” olup, altı connexin alt biriminin bir araya gelmesiyle iki hücre arasında “gap junction” oluştururlar (18). Connexin proteinlerinde gözlenen mutasyonlar işitme kayıplarının en önemli nedenini oluşturmakla birlikte farklı organ ve dokularda da tutulum gösteren tipleri saptanmıştır (19). İşitme kaybıyla ilişkili olan connexin proteinleri; Cx26, Cx30, Cx43 ve Cx31’dir (3,20,21).



Şekil 1.1 Patolojik connexin mutasyonlarının, connexin biyogenezi ve fonksiyonuna etkileri. ER: Endoplazmik Retikulum; TG: trans-golgi ağı; GJP: gap junction plak; U/PR: ubiquitinasyon/protozomal degradasyon; **1)** Resesif nonsense veya frameshift mutasyon yoluyla prematür protein translasyonu ve proteinin kaybı (Örn:Cx26, 35delG). **2)** Missense mutasyon protein katlanmasını ve / veya homomerik hemikanalların oligomerizasyonu ve stabilizasyonunu engellemektedir. Bu durumda mutant protein plazma membranına taşınmaz (Örn: Cx26, C64S). **3)** Dominant missense mutasyon ile mixed connexonların fonksiyonunun ve / veya oluşumunun bozulması veya mutant proteinin connexonun potansiyel özelliğini değiştirmesi (Örn:Cx32, R142W). **4)** Ekstrasellüler halkada oluşan dominant

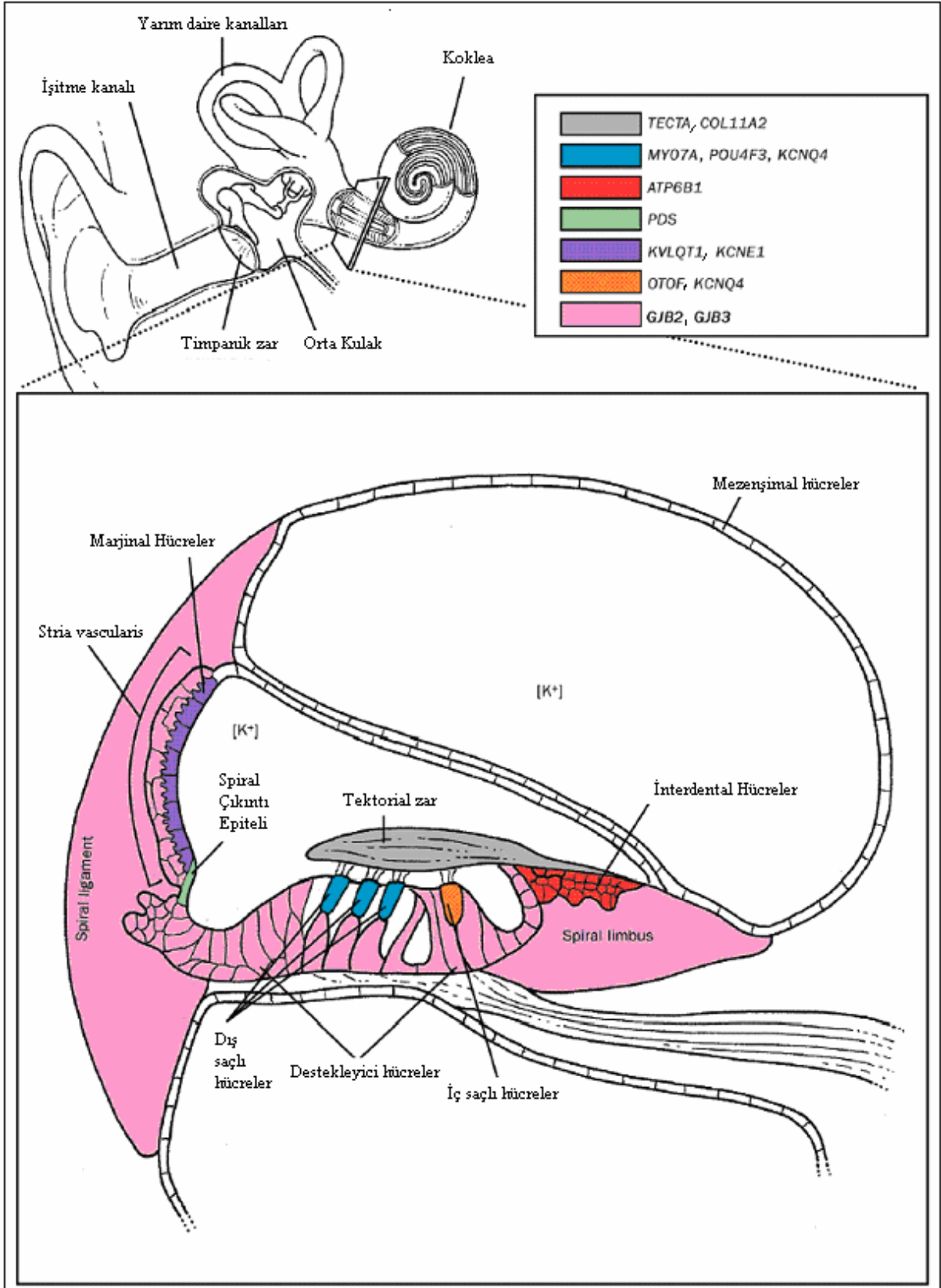
mutasyonlar hücreler arası kapıların oluşumunu etkiler (Örn: Cx26, W44C, E42del, R75W). **5)** Mutasyonlar; geçirgenliği, por büyüklüğünü, iyon seçiciliğini veya gap junction kanalının kinetiğini bozabilmektedir (Örn: Cx26, V74L). **6)** Mutasyonların teorik olarak protein degradasyonunu engelleyebileceği düşünülmektedir (26).

Söz edilen connexin tiplerinde gözlenen mutasyonların kalıtımı otozomal dominant veya otozomal resesif şekilde olmaktadır (20,22-25). Örneğin DFNA3 lokusunda gözlenen birçok mutasyon (G59A, DE42, R75W) otozomal dominant olarak kalıtılmakta ve bazıları ise çeşitli sendromik olgularla ilişkilendirilmektedir (7,23).

Bu grup içerisinde en sık mutasyonu gözlenen gen *GBJ2* geni olup, 100 den fazla mutasyonu saptanmıştır (<http://davinci.crg.es/deafness/>). Bu mutasyonlar arasında en sık rastlanan 35delG mutasyonu olup, tüm *GBJ2* gen mutasyonlarının %70-80'ini oluşturmaktadır (5,12,13). Etnik olarak bu mutasyonun taşıyıcılığı farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Avrupa ve Akdeniz toplumlarında yüksek oranda rastlanmasına karşın Asyalı ve Aşkenaz'larda bu oran düşüktür (3,12,13,16,25,27).

KCNQ4 Geni (DFNA2)

KVLQT1 ve *KCNE1* genleri heterodimerik bir kanal olan voltaj kapılı potasyum kanalının alt birimlerini oluşturan proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerde görülen mutasyonlar otozomal resesif olarak kalıtılarak, Jervelle, Lange-Nielsen sendromuna neden olmaktadır (3). Bu potasyum kanalı *stria vascularis* de bulunmaktadır. *KCNQ4* protein ürünü dış saçlı hücrelerin bazo-lateral yüzeylerinde yer almaktadır. Bu kanalın potasyum iyon döngüsünü dış saçlı hücrelerde başlatıcı yönde etkilediği düşünülmektedir. *KCNQ4* geninde saptanan mutasyonların; *late-onset*, progresif, sensorinöral işitme kayıplı olgularda otozomal dominant (DFNA2) olarak kalıtıldığı belirlenmiştir (11) Ayrıca birçok ailede *missense* mutasyonları saptanmıştır (23).



Şekil 1.2 Non-sendromik olgularda iç kulak koklea kesitinde etkili olan gen ürünlerine bazı örnekler (11)

Tight Junction Claudin-14 (DFNB29)

CLDN14 geni iki geniş Pakistanlı ailede yapılan çalışmalar neticesinde haritalanmıştır. *Claudin-14* ekspresyonu korti organı içerisinde *sensory* epitelde ekspresse edilmektedir. Bu protein, endolenf ile etrafındaki doku arasında elektrokimyasal gradiyent oluşumunu sağlayan bir “*tight junction*” dır (28).

PDS (Pendrin) Geni (DFNB4)

Bu gen Pendred sendromu ile ilişkili olmakla birlikte, *PDS* geninde mutasyon taşıyan olguların %15’i pre-lingual, non-sendromik olarak saptanmıştır (11). *PDS* geninin protein ürünü *SLC226A4* bir anyon taşıyıcısıdır ve klorür ve iyodür anyonlarını sodyumdan bağımsız olarak taşımaktadır (7,11). Endolenfatik kanalda ifade edilen protein endolenfin düzenlenmesini ve rezopsiyonunu sağlamaktadır. Proteindeki mutasyonun Endolenfatik sıvıdaki homeostazı bozduğu ileri sürülmektedir (11).

1.3.3 Hücre İskeleti Proteinlerini Kodlayan Genler

Konvansiyonel Olmayan Myosinler (DFNA11, DFNB2, DFNB3)

Konvansiyonel olmayan myosinler moleküler motor proteinlerdir, aktin filamentleri ile işlev göstermektedirler. Konvansiyonel myosinlerden farklı olarak, Konvansiyonel olmayanlar *non-muscle* hücrelerde bulunurlar. Kulakta *stereocilia* ve saçlı hücrelerin *cuticular* düzleminde yer alırlar (7,11). İlk olarak mutasyonu farelerde tanımlanmış, resesif mutasyonla kalıtıldığı gösterilmiştir. *myosin VIIa* mutasyonu ise ilk olarak Usher Sendromu tip 1B’de gösterilmiştir (11,23,29,30). Bu mutasyon resesif (DFNB2) veya dominant (DFNA11) kalıtım göstermektedir. Ayrıca *myosin 15* Balinese ailesinde ve *shaker-2* farelerde saptanmış resesif aktarılan mutasyon ile işitme kaybına neden olmaktadır (11).

1.3.4 Korti Organındaki Yapısal Proteinlerini Kodlayan Genler

TECTA Alfa-Tectorin Geni (DFNA8/DFNA12, DFNB21)

Tektorial membran, iç kulak ekstrasellüler matriksi ile *sensory* saçlı hücrelerin *stereocilia* kısmı ile kontak kurmaktadır. Bu yapılar sesin iletimi işleminde rol almaktadır. *Alfa-tectorin* tektorial membranın majör kollagen olmayan komponentidir (31). Bu gende gözlenen mutasyonlar pre-lingual otozomal dominant işitme kayıplarına neden olmaktadır. Ayrıca farklı bir mutasyon tipi ise pre-lingual otozomal resesif olarak gözlenmektedir (11,32).

1.4 GJB2; Gap Junction Protein; Connexin 26.

“*Gap junction*” lar hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rolleri bulunan yapılar olup, doku homeostazı, hücreler arasında uyarıların iletilmesi, küçük moleküllerin aktarılması (< 1000 Da), çoğalma, gelişme gibi kilit görevler üstlenmektedir (2,19,33,34). Protein ürünü 26 kDa olup, ilk olarak karaciğerden saflaştırılmıştır (35).

1.4.1 Connexin Grubu Proteinlerin Genel Yapısı

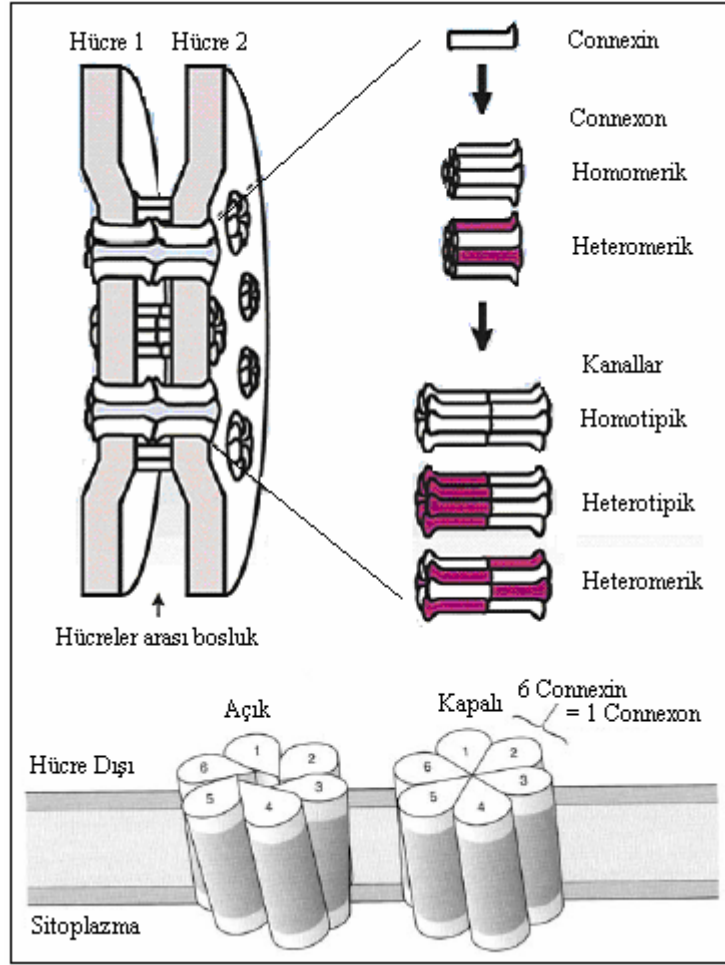
Connexin grubu proteinler, “gap junction”ları oluşturan birimler olup altı kopya connexin “*connexon*” denilen kanalı yapmaktadır. Her bir connexin iki ekstrasellüler halka içermektedir. Bu yapılar karşı hücredeki aynı halkalar ile birleşerek kanalı oluşturmaktadır (Şekil 1.3). Ekstrasellüler halkaların amino asit dizileri yüksek korunumlu olmakla birlikte, sitoplazmik alan dizilerinde tiplere göre farklılıklar içermektedir (18,36).

Connexon kanalında bulunan connexin proteinleri özdeş olursa “homomerik”, farklı olursa; “heteromerik” connexon oluşmaktadır. Kanallarda bu oluşuma göre homotipik, heterotipik ve heteromerik kanal şeklinde farklı isimler almaktadır (21,19,36).

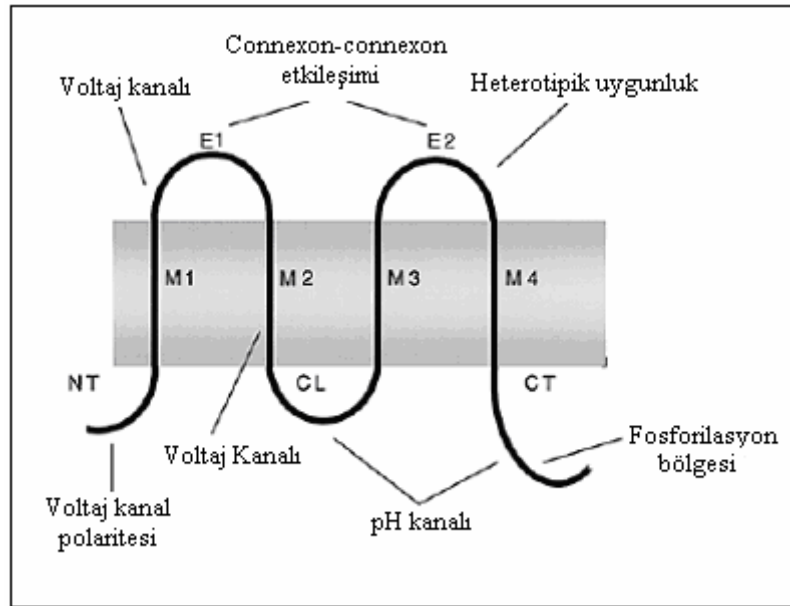
Bu güne kadar tanımlanmış 20’den fazla insan connexin geni bulunmaktadır. Genel olarak connexin genleri protein ürünlerinin moleküler ağırlıklarına göre üç grupta toplanmaktadır (21,26);

- Alfa connexinler: 37 kDa’dan büyük connexinler (*GJA*)
- Beta connexinler: 32 kDa’dan küçük connexinler (*GJB*)
- Gamma connexinler (*GJC*).

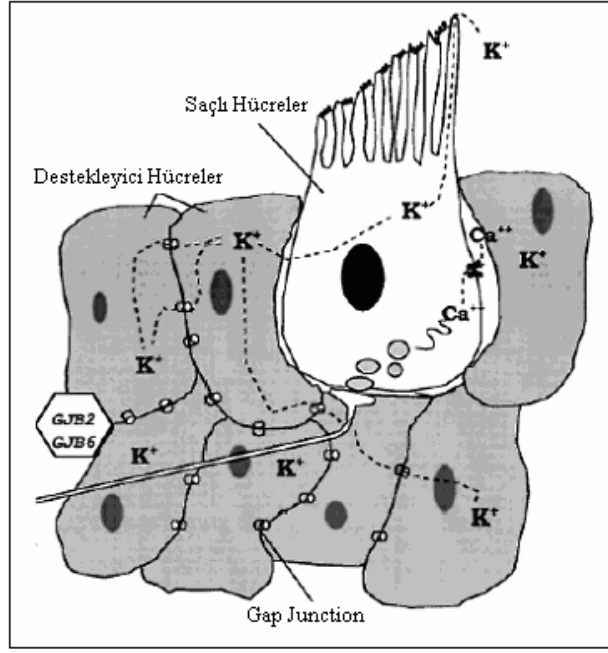
Connexin 26 proteininde dört zargeçer alan (M1-M4), iki ekstrasellüler alan (E1-E2), bir sitoplazmik alan (CL), bir N-terminal alan (NT) ve bir C-terminal alan (CT) bulunmaktadır (Şekil 1.4) (19,33,34,37).



Şekil 1.3 Connexinler ve gap junction organizasyonu (19).



Şekil 1.4 Connexin 26 protein alanları (M1-4; zargeçer alan, E1-2; ekstrasellüler bölge, CL; sitoplazmik alan, NT; N-terminal alan, CT; C-terminal alan)(19).



Şekil 1.5 Kokleada potasyum iyon döngüsü ve gap junction'lar (34).

Potasyum döngüsünde; potasyum kanalı (*KCNQ4*), anyon taşıyıcısı (*SCL26A4*) ve 4 gap junction (*GJB2*, *GJB3*, *GJB4*, *GJA1*) görev almaktadır. Connexon ve gap junctionları oluşturan kanallar hücrelerin zarına yerleşerek bitişik hücrenin benzer veya farklı yapıdaki connexonu ile birleşip kanaldan küçük moleküllerin geçmesine olanak sağlarlar (38,39).

1.4.1.1 Farklı Connexin Tipleri

İnsanlarda tanımlanan connexin genlerinden birçoğunda gözlenen mutasyonların çeşitli hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca farklı connexin proteinlerin farklı dokularda ifade edildikleri saptanmıştır. Connexin tiplerinden bazıları ve ifade edildiği dokularla ilgili bilgiler Tablo 1.5'de verilmiştir (21).

Tablo 1. 5 Connexin genleri, ekspresyonu ve kalıtsal hastalıkları (21).

Gen	Ekspresyon	Kalıtsal Hastalık
<i>GJB7</i> (Cx25)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>GJB2</i> (Cx26)	Koklea, deri, karaciğer, plasenta, meme	DFNB1, DFNA3, KID sendromu, Ichthyosis
<i>GJB6</i> (Cx30)	Koklea, deri, beyin	Sağırılık, DFNB1, DFNA3
<i>GJB4</i> (Cx30.3)	Deri	Eritrokeratoderma çeşitleri
<i>GJB3</i> (Cx31)	Deri, plasenta	Sağırılık, DFNA2, Eritrokeratoderma çeşitleri
<i>GJB5</i> (Cx31.1)	Deri	Bilinmiyor
<i>GJE1</i> (Cx31.3)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>GCJ1</i> (Cx31.9)	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>GJB1</i> (Cx32)	Karaciğer, oligodendrosit, schwann hücreleri	Charot-Marie-Tooth hastalığı
Cx32.4	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Cx36	Nöronlar	Bilinmiyor
<i>GJA4</i> (Cx37)	Endotelyum	Bilinmiyor
<i>GJA5</i> (Cx40)	Kalp, endotelyum	Bilinmiyor
Cx40.1	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>GJA1</i> (Cx43)	Kalp, lens, beyin, adrenal bezler	Oküloodontodijital displazi
<i>GJA7</i> (Cx45)	Kalp, düz kas, nöronlar	Bilinmiyor
<i>GJA3</i> (Cx46)	lens	Konjenital katarakt
<i>GJA12</i> (Cx47)	Spinal kord, beyin	Bilinmiyor
<i>GJA8</i> (Cx50)	Lens	Konjenital katarakt
Cx62	Overler	Bilinmiyor

1.4.1.2 Diğer Connexin Genlerinde Gözlenen Mutasyonlar

Non-sendromik işitme kayıpları ile ilişkili farklı connexin genlerinde gözlenen mutasyonlar Tablo 1.6, 1.7 ve 1.8’de verilmiştir;

Tablo 1.6 Connexin 31 (*GJB3*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Dominant Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	R180X	C538T	180. kodon Arg→Stop	EC2
2	E183K	G547A	183. kodon Glu→Lys	EC2
Resesif Mutasyonlar				
1	141del Ile	423-425del ATT	141. kodon del Ile	TM3
2	I141V	A423G	141. kodon Ile→Val	TM3
3	P223T	C667A	223. kodon Pro→Thr	IC3

Tablo 1.7 Connexin 30 (*GJB6*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Dominant Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	T5M	C14T	5. kodon Thr→Met	IC1
2	63delG	63delG	frameshift	

Tablo 1.8 Connexin 43 (*GJA1*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili mutasyonlar (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

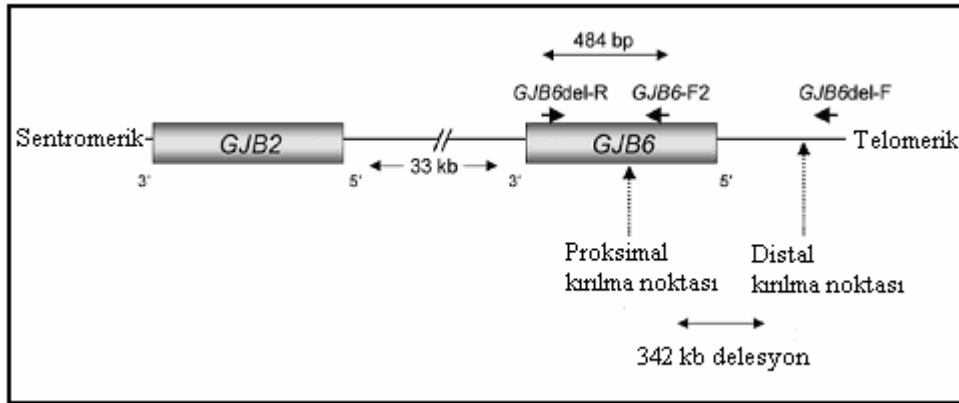
Resesif Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	L11F	C31T	11. kodon Leu→Phe	IC1
2	V24A	T71C	24. kodon Val→Ala	TM1

1.4.1.3 Connexin Genleri Üzerinde Gözlenen Farklı Mutasyonlar

Connexin genlerinde nokta mutasyonlarından ve nükleotid delesyonlarından başka, büyük alanları kapsayan delesyonlara da rastlanmaktadır. Bu tür delesyonlar kalıtım örüntüleri açısından da farklılık gösterip dominant negatif kalıtılmaktadır (40).

GJB6 Geninde 342-kb Delesyon

Connexin 26 genine 35-kb uzaklıkta yerleşimi olan *GJB6* geninde gözlenen ve genin 5' ucunu kapsayacak şekilde telomerik yönde 342-kb delesyon saptanmıştır (Şekil 1.6) (40).

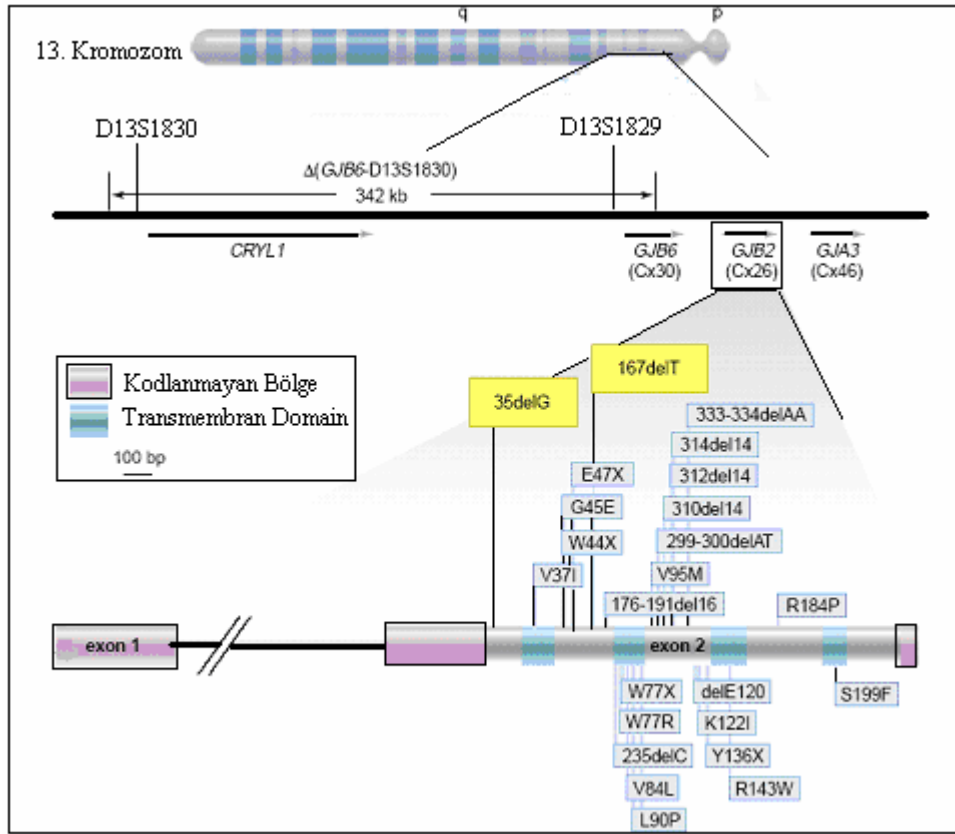


Şekil 1. 6 Connexin 30'da 342-kb delesyon (40).

Gap junction yapısına giren connexin 30'da görülen bu delesyon nedeniyle kanal formasyonu bozulmakta ve işitme kayıpları gözlenmektedir. Bunun yanısıra Cx-26'da 35delG mutasyonu ile birlikte görülen durumlarda bulunmaktadır (40,41).

1.4.2 Connexin 26 Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı

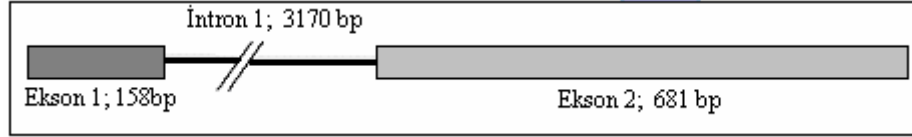
GJB2 13q11-12 kromozomun bandında yerleşmiş olup *GJB6* ve *GJA3* genleri arasında yer almaktadır (Şekil 1.7). İlk olarak Kelsell ve arkadaşları (5) tarafından; palmoplantar keratoderma (PPK) ve işitme kaybı olan bir ailede Cx26 üzerinde missense mutasyon (M34T) saptanmış, bu mutasyonun otozomal dominant kalıtıldığı ve PPK ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Farklı iki ailede bulunan mutasyonlar aynı kromozom bandında (13q11-12) tanımlanmış ve böylece gen haritalanmıştır (5).



Şekil 1. 7 Cx-26 geninin yerleşimi ve bazı mutasyonlar (16).

Gen iki ekzon ve bir introndan oluşmaktadır. Ekzon 1; 158 bazdan oluşur ve transkript edilmez. İki ekzon arasında 3170 baz uzunluğunda geniş bir intron bölgesi bulunmaktadır.

Ekzon 2 ise 681 bazdan oluşur ve gen ürününü oluşturan kısım bu bölgedir (Şekil 1.8) (6,18, NCBI Gen Bank).



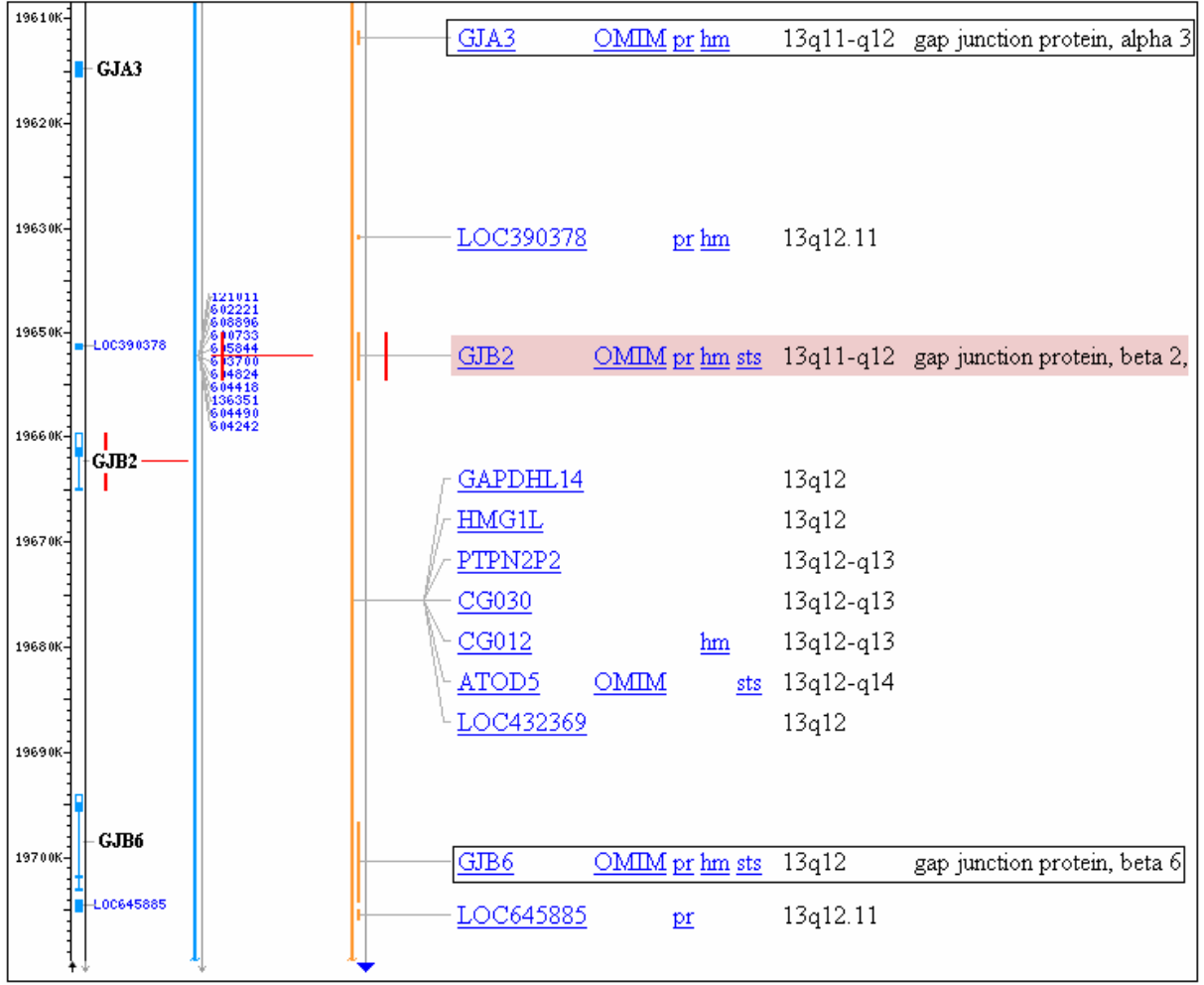
Şekil 1. 8 Connexin geni yapısı.

Deneysel çalışmalarda yüksek korunumlu promotör bölge, insan Cx-26 geniyle fare arasında % 81 oranında özdeşlik göstermektedir. Buna ilaveten, altı GC kutusu, iki GT kutusu ve bir adet TTAAAA kutusu, bir adet YY1 benzeri bağlanma bölgesi ve konsensus “*mammary gland factor*” bağlanma bölgesi içermektedir. Fare beta-casein geni ile “ortolog” dur (18).

13. kromozom q11-12 bölgesinde yerleşim gösteren Cx-26 geni sentromerik yönde *GJA3* ve telomerik tarafta ise *GJB6* arasında yer alır. Bu genlerden *GJB2* ve *GJB6* kokleada ifade edilmektedir. Fare ve insanda bu üç genin farklı kromozomlarda bulunabilmesine rağmen ardışık gruplar halinde yer alması, evrimsel açıdan korunumlu bir alan olabileceğini göstermektedir (Şekil 1.9). Bunun yanısıra başka grup connexin genlerinin de gruplar halinde lokuslarda yerleşik olduğu bilinmektedir (42).

1.4.3 Connexin 26 Proteinin Kulak İçindeki Yerleşimi

Deneysel çalışmalarda ratların koklealarında Cx26 ekspresyonunun varlığı immünokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir. Cx26 proteininin koklea içerisinde; *non-sensory* epitel hücreler, *spiral limbusun* interdental hücreleri, iç *sulcus* hücreleri, korti organının destekleyici hücreleri, dış *sulcus* hücreleri ve spiral ligamentin kök ödevi gören hücrelerinde saptanmıştır. Bunun yanısıra kokleadaki bağlayıcı dokular da örneğin; spiral ligament ve *spiral limbusdaki* birçok fibrosit hücreleri, *stria vascularis*deki bazal ve intermediat hücreler, *scala vestibuli* boyunca uzanan mezenkimal hücrelerde de gösterilmiştir (Şekil 1.2 ve 1.10) (2,23,43).



Şekil 1.9 13. kromozom üzerinde connexin grubu genlerin yerleşimi (NCBI, Mapviewer).

Kulak iç yapısına bakıldığında Cx-26 hem daha fazla alanda hem de çeşitli görevi olan birçok koklear hücre tipinde ifade edilmekte veya rol almaktadır. Bu bakımdan proteine yansıyacak herhangi bir değişimin işitmeyi yüksek oranda etkileyebileceği öngörülebilir (11,23).

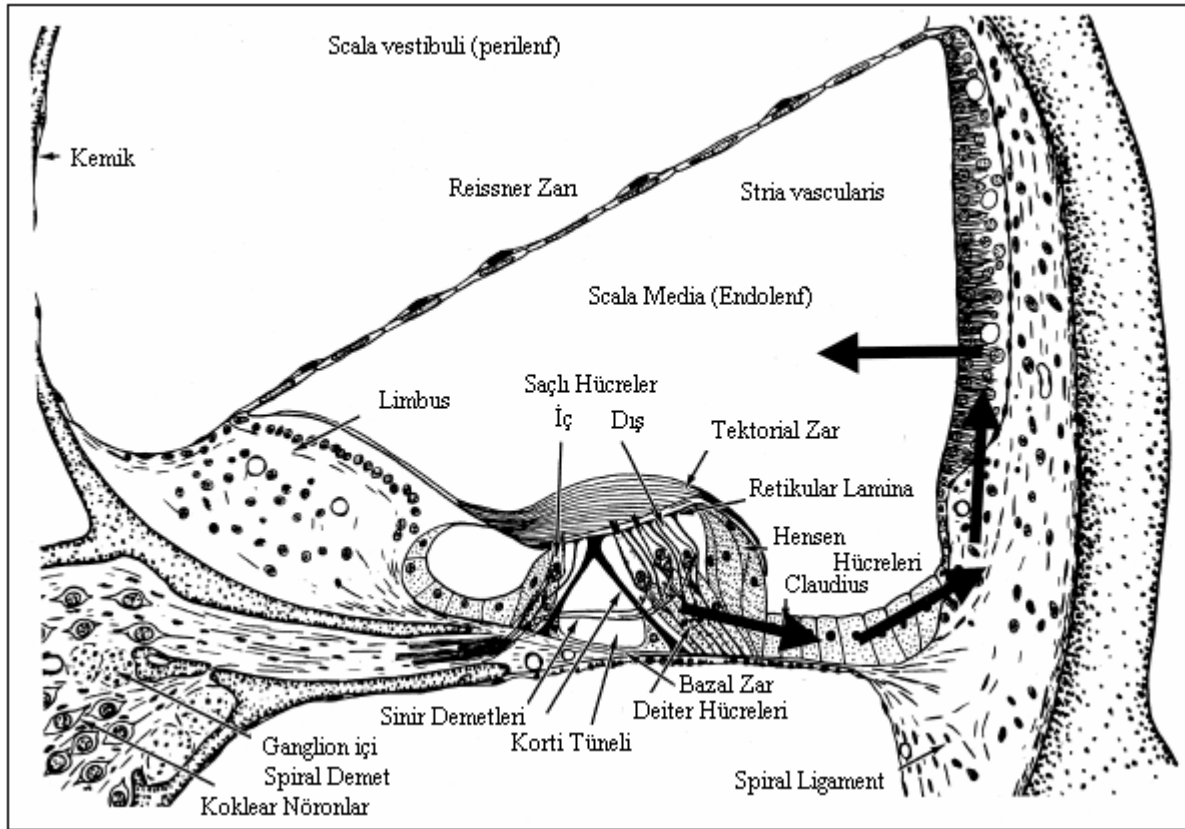
1.4.4 Connexin 26 Proteinin İşitmedeki Rolü

Cx-26 proteinin non-sendromik duyu yitimlerindeki rolü tam olarak bilinmemesine karşın, iç kulaktaki sensory epitelin üzerinde gap junction iletişimleri açısından iyonik çevrenin düzenlenmesinde görevleri olduğu gösterilmiştir. Cx-26'nın duyu iletimi sırasında K^+ iyonlarının dolaşımında major rol aldığı önerilmektedir (21).

Saçlı hücrelerin bazo lateral yüzeyleri perilenf ile çevrelemiştir. Bu bölgenin iyonik kompozisyonu hücre dışı sıvı kompartımanı ile benzerdir. Tek bir saçlı hücre endolenf içine gömülü halde olup, çevresindeki sıvıda ve içeride yüksek K^+ ve düşük Na^+ iyon konsantrasyonu bulunmaktadır (2,11,21).

Duyu sinyalleri endolenf ve saçlı hücrelerde K^+ iyon derişiminin artmasını uyarır ve K^+ iyonları korti organının intersitial boşluğuna gider. K^+ iyonları buradan korti organının destekleyici hücrelerinin voltaj kapılı potasyum kanalları boyunca ilerler ve tekrar endolenfe geri döner. Her duyu iletiminde saçlı hücrelerde artan iyon konsantrasyonu bu sistem sayesinde bir siklus halinde sürdürülür (21).

Cx-26 geninin tamamen susturulduğu fare modeli çalışmalardan sonuç elde edilememiştir. Çünkü Cx-26 fare gelişiminin erken safhalarında önemli roller almaktadır. Bu gen bakımından nakavt fareler embriyonik letaldır (43).



Şekil 1. 10 İç kulaktaki potasyum döngüsü (2).

Çalışmalar Cx-26'yı nakavt etmekten çok deneysel mutasyonlar oluşturmaya yönelmiştir. Deneysel modellerin histolojik kesitlerinden elde edilen bilgilere göre saçlı

hücrelerde hasarlar ve ölümler gözlenmiş ve bu bölgede K⁺ iyonlarının sirkülasyona giremediği için birikmesinin bu hasara neden olabileceği öngörülmüştür (21). İkinci olarak; dominant negatif Cx-26 mutant R75W transgenik fare modeli kullanılan çalışmada, farelerin çeşitli dönemlerinden koklear kesitler incelenmiştir. Bu mutasyonu taşıyan farelerde ileri derecede işitme kaybı oluşmaktadır. İki haftalık farelerde korti kanalı ve destekleyici saçlı hücrelerde belirgin hasarlar gözlenmiş, yedi haftalık olanlarda ise bu hasarın gittikçe ağırlaştığı, tüm yapının bozulduğu gösterilmiştir (21).

Buna göre, Cx-26 potasyum sirkülasyonunda önemli görevler almakta ve eksikliğinde özellikle endolenf'de gömülü halde bulunan saçlı hücrelerde hasarlar meydana gelmekte ve neticede çeşitli derecelerde işitme kayıpları oluşmaktadır (2,11,21,25).

1.4.5 Connexin 26 Geni Üzerinde Saptanan Mutasyon ve Polimorfizmler

Farklı birçok toplumda yapılan çalışmalarda Cx-26 geni üzerinde farklı yapı ve tipte mutasyonlara rastlanmıştır. Rapor edilen tüm mutasyonları kapsayan veri tabanında 100'den fazla mutasyon ve polimorfizm bulunmaktadır (<http://davinci.crg.es/deafness/>). Non-sendromik olgularda kalıtım şekli olarak en sık otozomal resesif (% 85), ikinci otozomal dominant (% 12-15), ve daha nadir olarak da X'e bağlı (% 1-3) kalıtım örüntüsü görülmektedir (2). Bu çalışmanın temelinde odaklandığı *GJB2* geni otozomal yerleşimlidir (13q11 kromozom bandı) ve bu nedenle bu lokus için cinsiyet-kalıtım ilişkisi söz konusu değildir.

1.4.5.1 Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren GJB2 Mutasyonları

Ek-1 Tablo E.2'de saptanmış dominant mutasyonlar verilmiştir. Örneğin C202F mutasyonu bir Fransız ailede 5 kuşak boyunca taşındığı ve mutasyonu tek allelde taşıyan bireylerde hafif şiddetten orta dereceye kadar, ilerleyici tipte işitme kaybı gözleendiği rapor edilmiştir. Bu mutasyon dördüncü zargeçer alan üzerinde yer almakta ve connexin oligomerizasyonunu bozmaktadır (23).

1.4.5.2 Otozomal Resesif Kalıtım Gösteren GJB2 Mutasyonları

Cx-26 geni üzerinde “<http://davinci.crg.es/deafness/>” internet adresindeki veri bankasına girişi yapılan 92 resesif mutasyon bulunmaktadır. Bunun yanısıra son yıllarda yapılan çalışmalarda saptanan farklı mutasyonlar da göz önüne alındığında bu sayı 100’ü aşmış durumdadır. Mutasyonlar, amino asit değişimleri ve proteinin yerleşimi Ek-1 Tablo E.3’te verilmiştir.

1.4.5.3 Polimorfizmler (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

İnsan DNA’sında gözlenen polimorfizmlerin % 90’ ı tek nükleotid polimorfizmleridir (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Genomik DNA üzerinde gözlenen polimorfizmler; popülasyon genetiği, ilaç çalışmaları, adli tıp çalışmaları, kanser ve genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bakış açıları oluşturmaktadır (44).

SNP, DNA üzerinde allelerin herhangi birinde tek bir bazın değişmesidir. Normal popülasyondaki allellerden bu değişimle ayrılır ve mutasyonlardan farklı olarak allelik frekansı %1’in üzerindedir. Allelik frekansın %1’in altında olduğu durumları SNP yaklaşımı ile açıklamak mümkündür. Bazı araştırmacılar SNP’lerin hastalığa yatkınlık gösterebileceğini dikkate alamamaktadırlar. Fakat, bunların resesif hareket eden, düşük penetrans gösteren dominant veya riskli alleller ile ilişkili olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir (44).

Cx-26 geni üzerinde birçok polimorfizm saptanmıştır. Genel olarak toplumlarda görülen polimorfizmler ve işitme kaybı ile birliktelik göstermeyen değişimler Ek-1 Tablo E.5’te verilmiştir.

M34T Polimorfizmi

Connexin 26 proteinin 34. kodonunda 101. timin yerine sitozin gelmesiyle oluşur. Polimorfizm olarak tanımlanmasına karşın işitme kayıplarında etkin olabileceği düşünülmektedir. İlk olarak önerilen DFNA3 lokusunda dominant olarak kalıtıldığı ve işitme kaybına neden olduğu yönündedir (45). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar bu mutasyonun benign polimorfizm olduğunu düşündürmüştür. Fakat ilginç olarak bazen heterozigot ve nadir olarak homozigot bireylerde işitme kayıpları tespit edilmiştir (6). Genel popülasyonda

homozigot M34T (-/-) bulunma sıklığı; Fransa'da % 0.9-2.3 (N=244), Birleşik Krallık (BK) ve İrlanda'da % 4.0 (N=630), Japonya'da % 0 (N=159) olarak hesaplanmıştır. İşitme kayıplı bireylerde homozigot (M34T -/-) taşınma sıklığı; Fransa için % 3.6 (N=96), BK ve İrlanda'da % 4.0 (N=173), Japonya'da % 0 (N=74) olarak belirtilmektedir (6).

M34T mutasyonu için heterozigot olan bireylerde işitme kaybı gözlenmezken, homozigot mutasyon işitme kaybına yol açmaktadır. Bu durum dominant kalıtım gösteren mutasyonun dominant-negatif şekilde fenotipe yansıdığı göstermektedir. Connexin 26 genin 5' UTR bölgesinde görülen 10 bp'lik delesyonun M34T ile ortak bir noktası olduğu düşünülmektedir (21).

1.5 Mitokondriyal Mutasyonlar ve İşitme Kaybı

Hücrelerde yüzlerce sayıda bulunan mitokondri, oksijenli solunumunda rol oynayan bir organeldir. Her bir mitokondride ise 2 ila 10 kopya mitokondriyal DNA yer almaktadır. İnsan mitokondriyal genomu 16,569 bp uzunlukta olup çift iplikli ve kapalı halkasal yapıdadır. Mitokondriyal DNA'dan 13 farklı mRNA transkripti üretilmektedir. Bunun yanı sıra genomda iki rRNA ve 22 tRNA geni bulunmaktadır (46-48).

Mitokondriyal DNA olağan dışı durumlar haricinde yalnızca maternal geçiş gösterir. Annede bulunan mitokondriyal bir mutasyon ileri kuşaklara aktarılır ve bu kuşaklarda dışı olanlar kendinden sonra gelen kuşağa aktarırken erkek bireyler mutasyonu aktaramaz (47-48).

Mutasyon taşıyan mitokondriler homoplazmik veya heteroplazmik olarak gruplandırılmaktadır. Mutasyon bakımından homoplazmik olan bireylerde mutasyon tüm mitokondrilerin tüm halkasal DNA'larında bulunmaktadır. Heteroplazmik olanlarda ise mutasyon heterojen olarak taşınmaktadır (47-48).

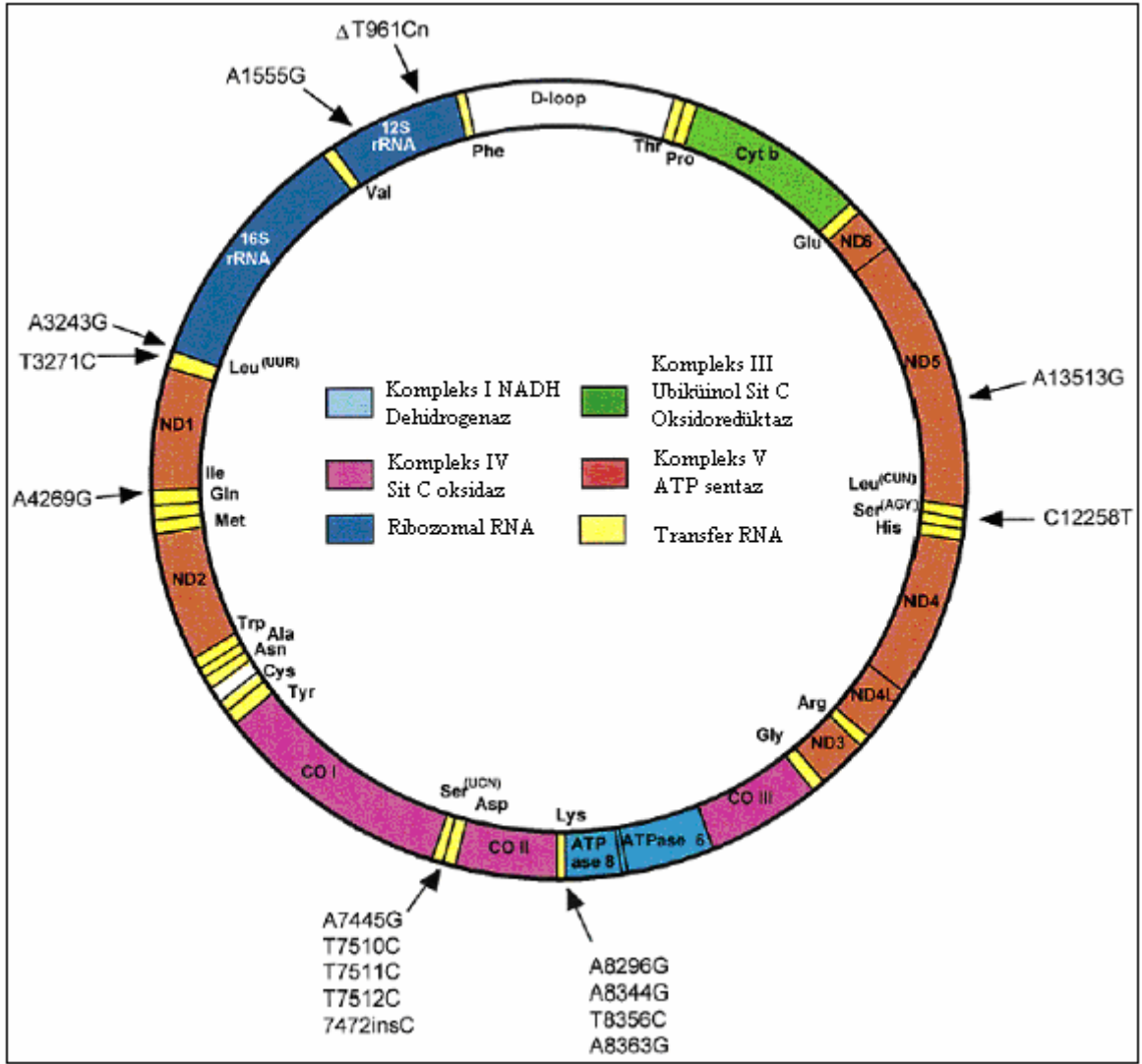
1.5.1 Mitokondriyal Mutasyonlar

Mitokondriyal DNA üzerinde görülen mutasyonlara sendromik ve non-sendromik olgularda rastlanmaktadır. Genel olarak sendromik olgularda tRNA genleri tutulum gösterirken, non-sendromik olgularda daha sık olarak 12S rRNA geninde mutasyon gözlenmektedir (Tablo 1.9) (49).

İç kulakta yerleşim gösteren dış saçlı hücreler çok fazla ATP' ye gereksinimi olan hücrelerdir. Çünkü Na⁺ ve K⁺ iyon dengesi burada ATP pompası ile sağlanmaktadır. RNA genleri üzerinde oluşabilecek herhangi bir mutasyona bağlı olarak ATP sentezinde bir azalma olmaktadır. Bu bozukluk mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonunu etkilemektedir. Dış saçlı hücreler ve *stria vascularis* bu eksiklikten hücre hasarı ve hatta hücre ölümüne varan oranlarda etkilenmekte ve işitmedeki işlevini yapamamaktadır (48).

Tablo 1.9 İşitme kaybı ve diğer hastalıklarla ilişkili mitokondriyal mutasyonlar (49). (Hom; Homozigot, Het; Heterozigot)

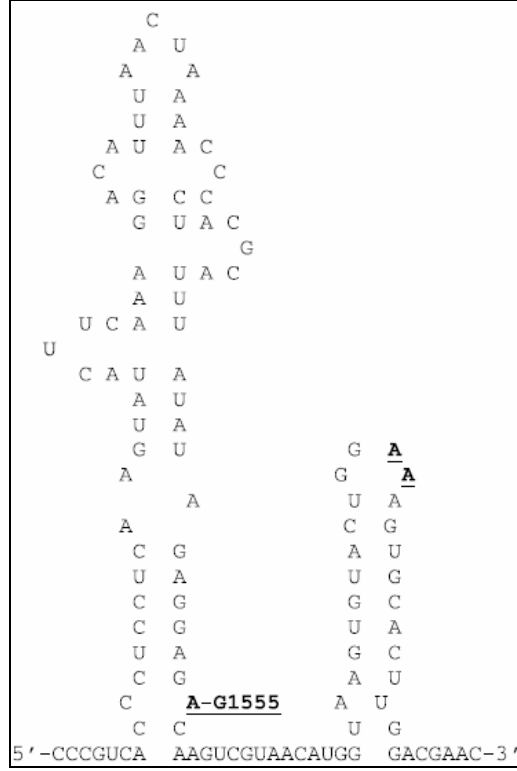
Sendrom	Mutasyon	Gen	Homoplazmi Heteroplazmi
	Δ T961Cn	12S rRNA	Hom/Multiplazmi
	A1555G	12S rRNA	Hom
	A7445G	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
Non-sendromik	7472insC	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
	T7510G	tRNA ^{Ser(UCN)}	Het
	T7511G	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
	T7512G	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
Send. işitme kaybı+Palmoplantar keratoderma	A7445	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
	T7512C	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
Myoklonik epilepsi, ataksi işitme kaybı	7472insC	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hom/Het
	A3243G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Het
Diabet ve işitme kaybı	T3271C	tRNA ^{Leu(UUR)}	Het
	A8296G	tRNA ^{Lys}	Het
Myoklonik epilepsi ragged red fibers	A8344G	tRNA ^{Lys}	Het
Myoklonik epilepsi ragged red fibers/MELAS	T8356C	tRNA ^{Lys}	Het
	A4269G	tRNA ^{Ile}	Het
Kardiyomyopati+işitme kaybı	G8363A	tRNA ^{Lys}	Het
Diabet ve işitme kaybı/Retinitis pigmentosa	C12258T	tRNA ^{Ser(AGY)}	Het
MELAS	A13513G	ND5	Het
Kearns-Sayre Sendromu	Çeşitli delesyonlar/duplikasyonlar		Het



Şekil 1. 11 Mitokondriyal DNA’da işitme kaybıyla ilişkili mutasyonların yerleşimleri ve etkiledikleri proteinler (49).

1.5.2 A1555G Mutasyonu

Maternal kalıtım göstermesi nedeniyle dikkat çekmiş olan mutasyona ilk olarak non-sendromik işitme kaybı olduğu bilinen Arap-İsrail pedigrilerinde rastlanmış, mtDNA üzerinde olduğunun tanımlanmasıyla açıklık kazanmıştır. Mutasyon genel olarak homoplazmik olarak gözlenmektedir (50-52). Mitokondriyal DNA üzerinde, 12S rRNA kodlayan bölgede 1555. adenin yerine guanin nükleotidi gelmesiyle oluşmaktadır (Şekil 1.12) (46,49).



Şekil 1. 12 12SrRNA geninde A1555G mutasyonunun konumu (53).

Bilinen çevresel ajanlardan, aminoglikozid türevi antibiyotikler A1555G mutasyonu taşıyanlar üzerinde etkilidir. Mutasyon, 12S rRNA'nın yüksek korunumlu bölgesinde, aynı zamanda bakterilerde de aminoglikozidlerin bağlandığı noktada olmaktadır. Bu bölgede meydana gelen mutasyon ribozomun aminoglikozid duyarlılığını değiştirmekte ve bakterilerde antibiyotiğe karşı dirençlilik sağlamaktadır (54,55). Mutasyona uğrayan 1555. nükleotid bakterilerdeki 12S rRNA'ya çok benzemektedir. Aminoglikozidler mutant 12S rRNA'ya bağlanarak iç kulakta ototoksik etkilere neden olmaktadır (56,57).

Nükleer genler, mtDNA haplotipleri, çevresel ajanlar, doku-spesifik etkiler gibi birçok faktör bağımsız veya birlikte klinik ekspresiviteyi etkilemektedir. Epidemiolojik bilgiler ve biyokimyasal çalışmalar, A1555G mutasyonu taşıyan işitme kayıplı ailelerin semptomatik ve asemptomatik üyeleri arasındaki fenotipik farkın, nükleer faktörlerden kaynaklandığını düşündürmektedir (54,58). Bağlantı (*linkage*) analizi yapılan A1555G mutasyonu taşıyan birçok ailede nükleer genlerin ya bir multigen ya da 8. kromozomda bir lokusta olduğu düşünülmektedir (59). Son yapılan çalışmalara göre, 8p23.1'de yerleşim gösteren mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1'in mitokondriyal rRNA modifikasyonunda rol aldığı

gösterilmiştir. tRNA ve rRNA modifikasyonları ile ilişkili olarak nükleer *MTO1*, *GTPBP3*, *TIMM8A* gen ürünleri tanımlanmıştır (60,61).

A1555G mutasyonu farklı toplumlardaki görülme sıklığı değişkenlik (Tablo 1.10) göstermektedir.

Tablo 1.10 A1555G mutasyonunun işitme kayıplı çeşitli toplumlarda görülme sıklığı.

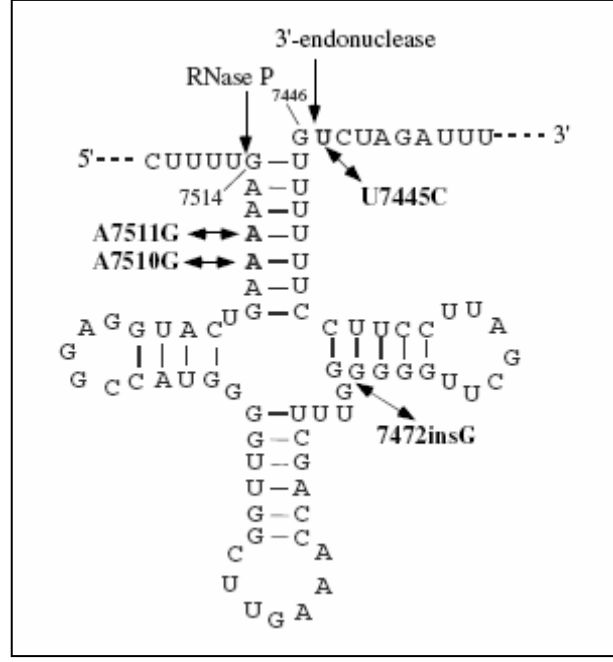
Ülke	Görülme sıklığı *	Referans
Brezilya	4/203 (Kişi)	62
Endonezya	4/75 (Kişi)	56
İngiltere	0/75 (Kişi)	63
İspanya	6/21 (Aile)	64
İtalya	2/128 (Kişi)	65
Tunus	1/100 (Aile)	66
Türkiye	3/168 (Kişi)	57

(*) Mutasyon taşıyan birey veya aile sayısı/Toplam birey veya aile sayısı

1.5.3 A7445G Mutasyonu

Mitokondriyal genomda tRNA^{Ser(UCN)} geninde gözlenmektedir (Şekil 1.13). İlk olarak bir İskoç ailede tanımlanan bu mutasyon, Yeni Zelanda ve Japonya’da farklı ailelerde doğrulanmıştır. A1555G mutasyonundan sonra en sık rastlanan tiptir. Homoplazmik mitokondriler taşıyan bireylerde non-sendromik işitme kaybı gözlenmektedir. Ancak bazen deride çeşitli lezyonlarla birlikte de görülmektedir. Mutasyonun penetransı toplumlara göre değişmektedir (46,57).

Lenfoblastoid hücrelerde yapılan çalışmalara göre, mutasyon varlığında ilgili proteinden kaynaklanan tRNA metabolizması bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle mitokondride protein sentezinde düşme gözlenmiştir. Kompleks I (NADH dehidrogenaz) ile ilişkili olan *ND6* mRNA düzeyleri bu mutasyon varlığında azalmakta ve sonuç olarak koklear hücrelerde ATP sentezini etkilemektedir (67).



Şekil 1.13 A7445G mutasyonunun tRNA üzerindeki konumunun şematik görünümü (65).

A7445G mutasyonu farklı toplumlardaki görülme sıklığı değişkenlik (Tablo 1.11). göstermektedir;

Tablo 1.11 A7445G mutasyonunun işitme kaybılı çeşitli toplumlarda görülme sıklığı.

Ülke	Görülme sıklığı *	Referans
Brezilya	0/203 (Kişi)	62
İngiltere	0/75 (Kişi)	63
İtalya	2/115 (Kişi)	65
Tunus	0/100 (Aile)	66
Türkiye	0/168 (Kişi)	57

(*) Mutasyon taşıyan birey veya aile sayısı/Toplam birey veya aile sayısı

2.GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı

Bu çalışmaya İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, İşitme, Konuşma ve Denge Ünitesi'nde işitme kaybı tanısı konulmuş, belirli kriterleri taşıyan bireyler dahil edildi. Hastanın doğuştan gelen bir işitme kaybının olması (prelingual), başka herhangi bir sistemik ve patolojik bozukluğunun olmaması (non-sendromik) ve işitme kaybının sensorinöral kaynaklı olması hasta seçme kriterlerini oluşturdu. Hastaların ve ailelerinin işitme kaybı ölçümleri aynı birimde yapıldı. Kriterlere uyan ailelerin öyküleri alınarak soy ağaçları oluşturuldu. Çalışmanın amacı çalışmaya katılan toplam 240 kişiye açık bir dille anlatıldı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yerel Etik Komitesinden 22.02.2005 tarihinde onay verdiği bilgilendirilmiş onam formu ile izinleri alındı (Ek 2). Tüm bireylerden DNA izolasyonunda kullanılmak üzere 2 ml periferik kan alındı ve deneysel çalışma yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

Ayrıca kontrol grubu evreni için, Yard. Doç. Dr. Çiğdem Eresen' den sağlanan 171 işitme kaybı olmadığı bilinen, farklı bir çalışmaya ait DNA örnekleri kullanıldı. Kontrol grubunun oluşturulmasındaki hedefler; yeni saptanabilecek değişimlerin tanımını yapmak (mutasyon veya polimorfizm), işitme kaybı olmayan bireylerde ülkemiz için polimorfizm sıklıkları hakkında fikir sahibi olmak ve seçilen evrendeki heterozigot mutasyon taşıyıcıların belirlenmesini sağlamak olarak tespit edilmiştir.

2.2 Olguların İşitme Kayıplarının Belirlenmesi

Odyometrik testler, ses yalıtımlı odalarda (Industrial Acoustic Company) gerçekleştirildi. Interakustik AC40 klinik odyometre, TDH 49MX 41/AR standard kulaklık kullanıldı. Kemik yolu işitme eşik ölçümleri B-71 vibratör kullanılarak yapıldı.

Saf Ses İşitme Testleri

Havayolu işitme eşikleri 250-8000 Hz arasında, kemik yolu işitme eşikleri ise 250-4000 Hz arasında frekanslarda ölçüldü. Saf ses işitme testi en az üç yaşındaki olgularda,

ebeveynlerde ve probandin üç yaş üstü kardeşlerinde kulaklık takılarak yapıldı. Üç yaşın altındaki olgularda ise, serbest alanda “Warble tone noise” ve konuşma testi kullanılarak işitme değerlendirilmiştir.

Beyinsapı İşitsel Uyarılmış Potansiyel Testi (BİUP)

ICS “Medical Chartr” cihazı kullanılarak 0-6 ay arasındaki olgularda 12 msn, daha büyük yaştaki olgularda 10 msn kayıt aralığında 100-3000 Hz frekansta klik uyarana ile BİUP kayıt edildi. Olguların sağ ve sol kulakları ayrı ayrı 21.1 sn tekrarlama sıklığında, verilen uyarana karşı ortaya çıkan 1024 yanıt averajlanarak ardı ardına ikişer kez elde edilen dalga formları bilgisayara kaydedildi. Kayıtlama sırasında altın kaplama dört yüzey elektrot kullanıldı. İpsilateral mastoide negatif, vertekse pozitif, alında toprak elektrot yerleştirildi. Elektrotlar arası empedans farkının 3 k Ω 'un altında tutulmasına dikkat edildi. Beşinci dalganın 70 dB nHL ve daha yüksek şiddetle, normal şiddet latens eğrisi dışında elde edilen olgular ileri derece işitme kaybı kabul edildi.

Transient Evoked Oto-Akustik Emisyon (TEOAE)

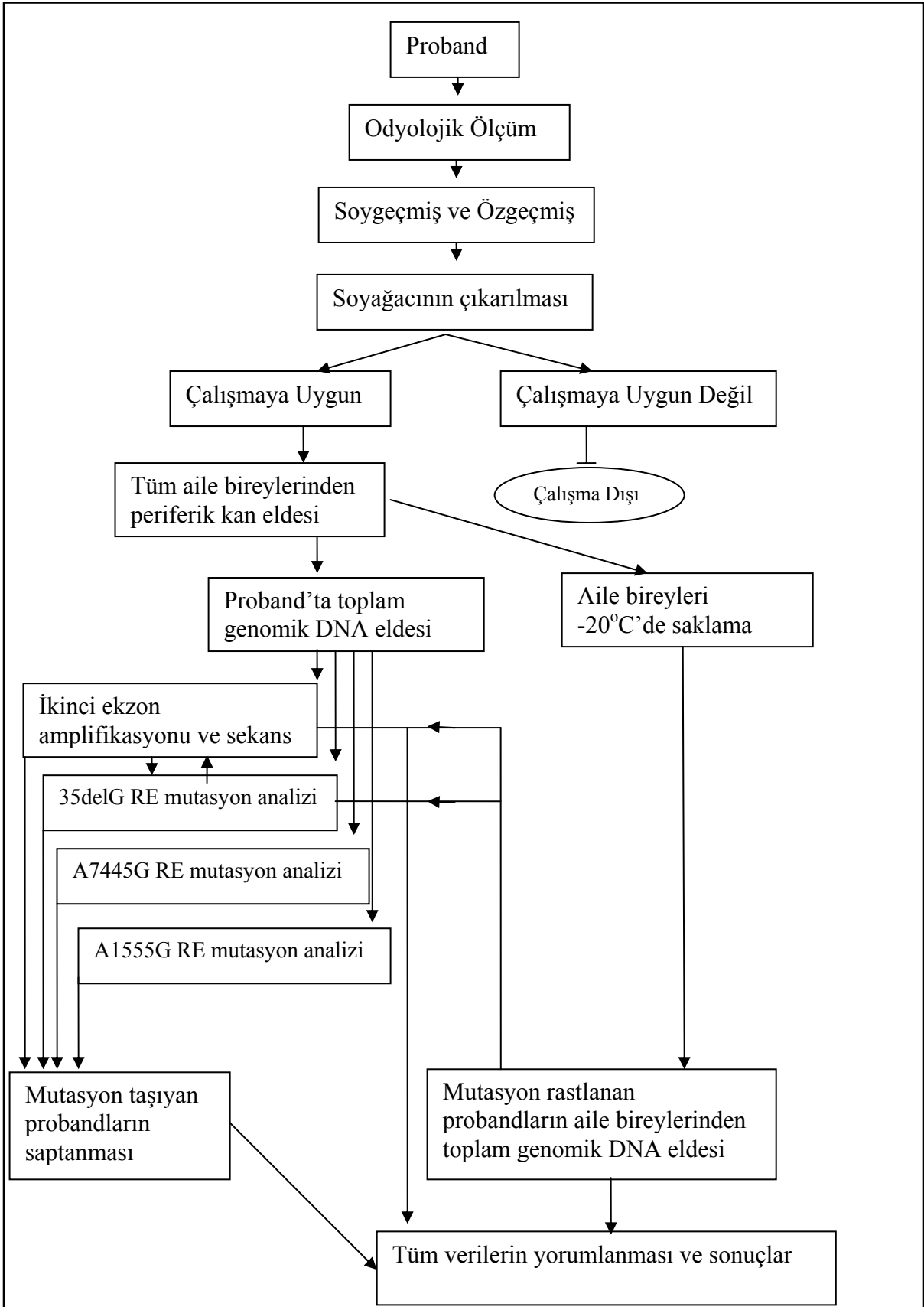
Otodinamik ILO 288 oto-akustik emisyon cihazı ile 80 dB SLP \pm 2 alterne klik uyarılar kullanılarak, hızlı tarama modunda sessiz odada her bir kulağın oto-akustik emisyonları kaydedildi. 260 yanıtın ortalaması 800-4000 Hz kayıtlama aralığında kaydedildi. İşitme kayıplılarda 30 dB μ L'yi aşkın işitme kayıplarında, 3 dB SLP'den daha düşük amplitüdü emisyon kaydedilir veya hiçbir frekans bandında emisyon gözlenmez.

Akustik Admittansmetri

Akustik admittansmetri testleri, Interacoustics AZ-7 admittansmetri ile yapıldı. Tüm olguların orta kulak basınçları ile ipsilateral ve kontralateral akustik reflekslerinin olup olmadığı belirlenmiştir.

2.3 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda, moleküler çalışmaya uygun nitelikte (nükleaz içermeyen) kimyasallar ve 18 mega-ohm/cm kalitesinde distile su kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin tamamı uygun şartlarda steril edildi.



Şekil 2.1 Projede yürütülen çalışma algoritmasının şematik çizimi.

2.3.1 Kullanılan Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları

1 M Tris-Cl 50 ml

6.055 g Tris-Base (Sigma, T-8524) analitik terazide tartılıp distile su ile 40 ml'ye tamamlanarak çözüldü. pH değeri 8.0 olacak şekilde derişik HCl kullanılarak ayarlandı ve 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti 0.22 mikronluk enjektör filtre kullanılarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA 100 ml

18.36 g EDTA (Sigma, E-5134) analitik terazide tartılıp yaklaşık 80 ml distile suda çözüldü. Çözme işlemi sürekli karıştırılarak ve pH: 8.0 olacak şekilde 5 M NaOH kullanılarak yapıldı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 SDS 100 ml

10.0 g SDS toz (Sigma L-4390) analitik terazide tartılıp üzerine 80 ml distile su ilave edildi. Isıtıcı karıştırıcı 65⁰C'de çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 mikronluk enjektör filtre kullanılarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K (20 mg/ml)

100 mg Proteinaz K (Sigma, P-2308) üzerine 5 ml deiyonize distile su ilave edilerek 20 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Stok çözelti 250 mikrolitre halinde ayrılıp -20 ⁰C'de derin dondurucuda saklandı.

5 M Amonyum Asetat 100 ml

38.5 g Amonyum Asetat (Merck, CC671215) analitik terazide tartılıp üzerine 80 ml distile su ilave edildi. Karıştırıcıda tamamen çözüldükten sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti 0.45 mikronluk enjektör filtre kullanılarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

10X Tris EDTA (TE) 50 ml

- 100 mM Tris-Cl (pH:8.0).....10 ml
- 10 mM EDTA (pH:8.0).....2 ml
- dH₂O..... 38 ml

Çözelti otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı. DNA çözmek amacıyla bu çözelti 10 kat steril distile su ile dilüe edilerek (1X) kullanıldı.

Lizis Çözeltisi

- 1 M Tris-Cl.....0.5 ml (10 mM Tris-Cl, pH: 8.0)
- 0.5 M EDTA.....10 ml (0.1 M EDTA, pH: 8.0)
- %10'luk SDS.....20 ml (% 2.5 SDS)
- dH₂O.....19.5 ml

2.3.2 Diğer Kimyasallar

- Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol(25:24:1) pH:8.0 (Applichem, A0889.0100)
- Kloroform (Sigma, C2432)
- Etanol %99 (Carlo Erba,67-17-5)
- 20X SSC (Amresco, 0794-1)

2.3.3 DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol

Sambrook, J. (68) tarafından tanımlanmış olan Fenol-Kloroform ekstraksiyonu ve tuz persipitasyonu metodu modifiye edilerek uygulandı. Protokol genel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Bu üç aşama üç günde uygulandı.

1.Gün

1. -20 °C'de saklanan kan örnekleri oda sıcaklığında bırakılarak ergimesi sağlandı.
2. Erimiş olan kan örnekleri (her bir çalışma için en fazla 10 hasta) iyice homojenize edildikten sonra 750 µl alınıp 1.5 ml mikrotüpe aktarıldı.
3. 1X SSC tamponundan her bir örnek tüpüne 600 µl eklendi ve yavaşça vortekslendi.

4. Örnekler 5200 rcf hız ve +4 °C sıcaklıkta, 5 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5417R).
5. Santrifüjden çıkan örneklerin üst fazları en fazla 750 µl olacak şekilde çekilip atıldı.
6. Bu aşamada üçüncü basamak tekrarlandı, fakat tampon miktarı artırıldı. Dipte pellet oluşumu izlendi ve yıkamalar üst fazın berraklaşması ile bitirildi (dört-beş yıkama). Her yıkama aynı devirde yapıldı ve her seferinde üst faz daha fazla atılarak daha çok tamponla yıkama yapıldı.
7. Son yıkama ile pellete kadar üst faz atıldı ve tüp kapatılıp vortekslendi.
8. Pelletin üzerine 450 µl lizis tamponu eklendi ve yavaş hareketlerle karıştırıldı.
9. Örnekler önceden 55 °C'ye ısıtılmış su banyosuna (Grant, LTD6/20) bir taşıyıcı ile yerleştirilerek 1 saat inkübe edildi. Bu aşamada tüplerin kapakları sıkı kapatılıp parafilmle yalıtıldı.
10. İnkübasyon sonunda her bir örnek üzerine son derişimi 0.5-1 mg/ml olacak şekilde 5 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklendi ve el hareketleri ile yavaşça karıştırıldı.
11. Kapakları parafilm ile kapatılan örnekler aynı su banyosuna 55 °C'de 1 gece bırakıldı.

2. Gün

12. Su banyosundan çıkarılan tüpler üzerine tüp içindeki sıvının hacmi kadar olacak şekilde, 1:1 oranında (500 µl) Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1) çeker ocak altında eklendi.
13. Örnekler taşıyıcı içerisinde el hareketleri ile yavaşça 10 dakika süt kıvamına gelinceye kadar karıştırıldı.
14. Örnekler 5200 rcf hız ve +4 °C sıcaklıkta, 15 dakika santrifüj edildi.
15. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üstteki sulu faz, alttaki sarı renkli faza girilmeden önceden uçları biraz daha açılıp steril edilmiş olan pipet uçları ile yeni bir mikrotüpe alındı.
16. Yeni mikrotüpe aktarılan sulu faz üzerine yine 1:1 oranında Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1) çeker ocak altında eklendi.
17. Örnekler taşıyıcı içerisinde el hareketleri ile yavaşça 10 dakika süt kıvamına gelinceye kadar karıştırıldı ve 14. ve 15. basamaktaki gibi işlemlendi.
18. Yeni tüpe alınan faz üzerine 1:1 oranında kloroform eklendi ve Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol ekstraksiyonunda olduğu gibi işlemlendi.

19. Santrifüj sonrasında yeni tüpe aktarılan faz üzerine 140 µl 5M Amonyum Asetat çözeltisi ve -20 °C’de önceden soğutulmuş 650 µl %99 Etanol eklendi.
20. DNA ipliklerinin çökmesi için tüp yavaş el hareketleri ile karıştırıldı.
21. Tüm tüplerde DNA gözlemlendikten sonra, DNA verimini artırmak için örnekler 30 dakika için -20 °C’ye kaldırıldı.
22. Bu süre içerisinde her örnek için yeni mikrotüpelere 400 µl %70 etanol konuldu. DNA’ların saklanması için vida kapaklı contalı tüplere içine 100 µl 1X TE tamponu konuldu.
23. -20 °C’den çıkarılan örneklerdeki DNA steril plastik öze (Elkay, 510-5101STR) yardımı ile alındı ve önceden hazırladığımız %70 etanol de yıkanarak oda sıcaklığında 5 dakika kurumaya bırakıldı.
24. Kurutulan özelerin DNA tutan kısımları tüpler içerisinde bulunan TE tamponuna gelecek şekilde kesilerek kapatıldı.
25. Tüm örnekler sıkıca kapatıldıktan sonra 37 °C’de etüvde 1 gece çözülmeye bırakıldı.

3. Gün

26. Çözülen DNA’nın spektrofotometrik ölçümü yapıldı ve stok DNA olarak -20 °C’ye kaldırıldı.

2.3.4 İzole Edilen DNA’nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması

DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerler ile hesaplanmaktadır. 260 nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) değeri solüsyon içerisinde 50 µg/ml çift iplikli DNA içerdiği kabul edilmektedir. 260 nm’deki OD değeri kullanılarak her bir örneğin konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplandı (68).

DNA konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50 \times \text{dilüsyon faktörü}$ (30)

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak değerlendirildi. Uygun saflıktaki DNA’nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8 olmalıdır (68).

Elde edilen DNA'ların saflık ve miktarlarının belirlenmesi için 1:30 dilüsyon ile örnekler hazırlandı. Her örnekten 10 µl alınarak 290 µl 1X TE tamponu ile 300 µl tamamlandı. Bu karışım örneklerinin optik dansitesi (OD), spektrofotometrede (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 UV/Visible) 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. Hesaplamalar yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı. Ayrıca tüm DNA örnekleri %1'lik Agaroz jelde yürütülerek intakt olup olmadıkları kontrol edildi. PCR reaksiyonlarında kullanılan tüm DNA örnekleri, yukarıda belirtilen standartlar uygun olarak hazırlandı.

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

5 farklı primer seti kullanılarak connexin 26 üzerinde üç; mitokondriyal genom üzerinde iki bölge çoğaltıldı. Primerler için uygun koşul ve ısıl profiller laboratuvarında çeşitli koşullar kullanılarak optimize edildi.

2.4.1 Connexin 26 İkinci Ekzonun Tamamının Çoğaltılması

Kelsell, D.P. 'nin (5) kullandığı ileri ve geri primerler kullanıldı. Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 777 bazdan oluşmaktadır.

```
1 gatttaatcc tatgacaaac taagttgggt ctgtcttcac ctgttttggg gaggttggt
61 aagagttggt gtttgctcag gaagagattt aagcatgctt gcttaccag actcagagaa
121 gtctccctgt tctgtcctag ctatgttctt gtgttggttg cattcgTCTT TTCCAGAGCA
181 AACCGCCcag agtagaat ggattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggggtgtaac
241 aaacactcca ccagcattgg aaagatctgg ctcaccgtcc tcttcatttt tcgcattatg
301 atcctcgttg tggctgcaa ggaggtgtgg ggagatgagc aggccgactt tgtctgcaac
361 accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctcccacatc
421 cggctatggg ccctgcagct gatcttcgtg tccagcccag cgctcctagt ggccatgcac
481 gtggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtgaa
541 ttaaggaca tcgaggagat caaaaccag aaggtccgca tcgaaggctc cctgtggtgg
601 acctacacaa gcagcatctt cttccgggtc atcttcgaag ccgccttcat gtacgtcttc
661 tatgtcatgt acgacggctt ctccatgcag cggctggtga agtgcaacgc ctggccttgt
721 cccaacactg tggactgctt tgtgtcccgg cccacggaga agactgtctt cacagtgttc
781 atgattgcag tgtctggaat ttgatcctg ctgaatgtca ctgaattgtg ttatttgcta
841 attagatatt gttctgggaa gtcaaaaaag ccagtttaac gcattgcca gttgtagat
901 taagaaatag acagcatgag aggGATGAGG CAACCCGTGC TCAgctgtca aggctcagtc
961 gccagcattt cccaacacaa agattctgac cttaaattgca accatttgaa acccctgtag
```

Şekil 2.2 Connexin 26 ikinci ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

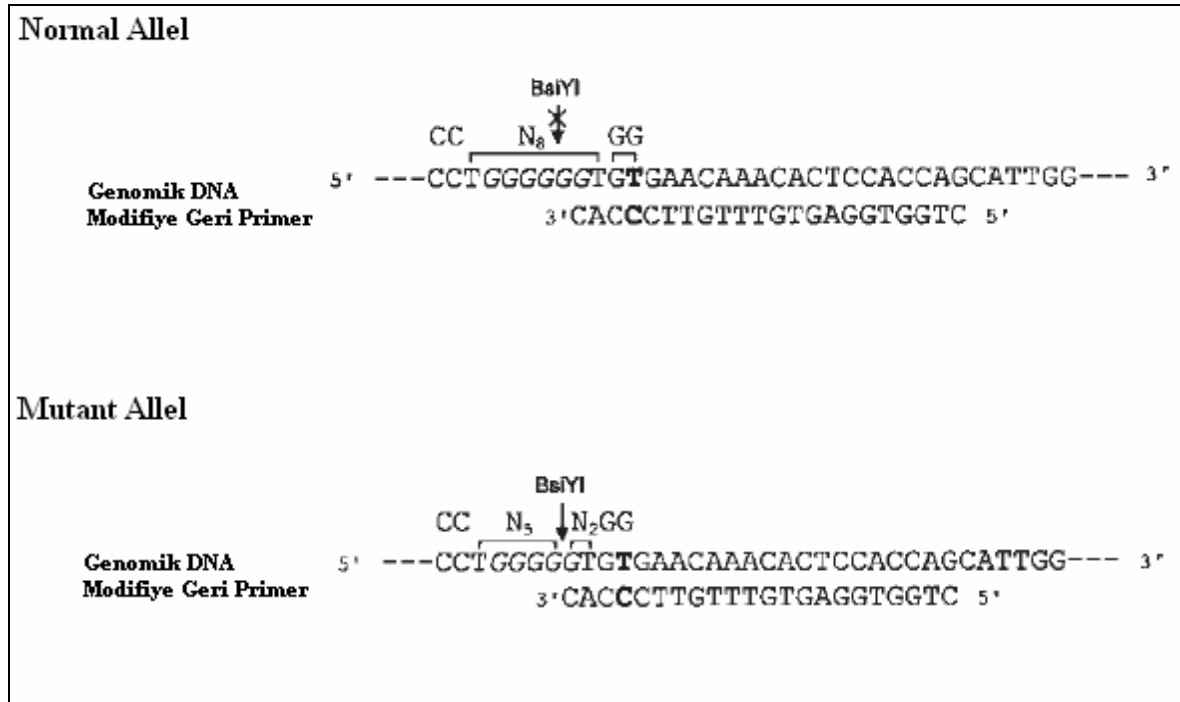
Primerler NCBI sekans servisinden sağlanan HUMGAPJUNC lokusundaki M86849 kodlu “Homo sapiens connexin 26 (*GJB2*) mRNA, complete cds.” kullanılarak doğrulandı (Şekil 2.2).

-Cx-26 İleri Primer: 5'-TCT TTT CCA GAG CAA ACC GCC-3'

-Cx-26 Geri Primer: 5' TGA GCA CGG GTT GCC TCA TC-3'

2.4.2 35delG Mutasyonunun Enzim Kesimiyle Saptanması İçin Tasarlanan Yöntem

Strom, K. grubunun (69) kullandığı iki set primer kullanıldı. Grubun tasarladığı primerlerden 35delG mutasyon olası bölgeyi amplifiye eden geri primerde modifikasyon yapıldı (207 bp) (Şekil 2.3). Mutasyonun varlığı durumunda modifiye bazın enzim kesim bölgesi oluşturması amaçlandı. İkinci primer seti ise yine Cx-26 geni içerisinde enzim kesim bölgesi taşımakta olup pozitif kontrol olarak kullanıldı (153 bp). Primerler NCBI sekans servisinden sağlanan HUMGAPJUNC lokusundaki M86849 kodlu “Homo sapiens connexin 26 (*GJB2*) mRNA, complete cds.” kullanılarak doğrulandı (Şekil 2.4).



Şekil 2.3 Modifiye primerin mutant allelde oluşturduğu enzim kesim bölgesi (69).

- 35delG İleri Primer: 5'-GGT GAG GTT GTG TAA GAG TTG G-3'
- 35delG Geri Primer: 5'-CTG GTG GAG TGT TTG TTC C*CA C-3' (*modifiye baz)
- Pozitif Kontrol İleri Primer: 5'-GGG AGA TGA GCA GGC CGA CT-3'
- Pozitif Kontrol Geri Primer: 5'-ACG TGC ATG GCC ACT AGG AGC-3'

```

1 gatttaatcc tatgacaaac taagttgggt ctgtcttcac ctgttttGGT GAGGTTGTGT
61 AAGAGTTGGt gtttgctcag gaagagattt aagcatgctt gcttaccag actcagagaa
121 gtctccctgt tctgtcctag ctatgttctt gtgtttgtgt cattcgtctt ttccagagca
181 aaccgccag agtagaagat ggattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggGTG TGAAC
241 AAACACTCCA CCAGcattgg aaagatctgg ctcaccgtcc ttttcatttt tcgcattatg
301 atcctcgttg tggctgcaa ggaggtgtgG GAGATGAGC AGGCCGACTt tgtctgcaac
361 accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctcccacatc
421 cggctatggg ccctgcagct gatcttcgtg tccagcccag cGCTCCTAGT GGCCATGCAC
481 GTggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga

```

Şekil 2.4 35delG bölgesi (italik olan baz modifiye T yerine C) ve pozitif kontrol için (altı çizgili olan primer) için primer oturma bölgeleri.

2.4.3 Mitokondriyal Genomda A1555G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin Amplifikasyonu

Karin, M.D. grubunun (70) çalışmasında kullandığı ileri ve geri primerler kullanıldı. Primerler dahil çoğaltılan ürün büyüklüğü 642 bazdan oluşmaktadır. Primerler NCBI sekans servisinde sağlanan “MITOMAP Human mtDNA Cambridge Sequence” ile doğrulandı (Şekil 2.5).

```

1261 ccgccatctt cagcaaacc tgatgaaggc tacaagtaa gcgcaagtac ccacgtAAAG
1321 ACGTTAGGTC AAGGTGtagc ccatgagggt gcaagaaatg ggctacattt tctaccccag
1381 aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaagggt ggatttagca gtaaacAag
1441 agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgccgt caccctctc
1501 aagtatactt caaggacat ttaactaaa cccctacgca tttatataga ggagAcaagt
1561 cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgta gcttaacaca
1621 aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaaccta
1681 gccccaaacc cactccacct tactaccaga caaccttagc caaaccttt acccaaataa
1741 agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgcaa gggaaagatg
1801 aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaacccc tataccttct gcataatgaa
1861 ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga cccccgaac cagacgagct
1921 acctaagaac agctaaaaGA GCACACCCGT CTATGTAGca aaatagtggg aagatttata

```

Şekil 2.5 A1555G için primer oturma bölgeleri. İtalik ve altı çizgili baz 1555. bazdır. Koyu ve büyük harfle yazılanlar primerlerdir.

-A1555G İleri Primer: 5'-AAA GAC GTT AGG TCA AGG TG-3'
-A1555G Geri Primer: 5'-CTA CAT AGA CGG GTG TGC TC-3'

2.4.4 Mitokondriyal Genomda A7445G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin Amplifikasyonu

Karin, M.D. grubunun (70) çalışmasında kullandığı ileri ve geri primerler kullanıldı. Primerler dahil çoğaltılan ürün büyüklüğü 478 bazdan oluşmaktadır. Primerler NCBI sekans servisinden sağlanan "MITOMAP Human mtDNA Cambridge Sequence" ile doğrulandı (Şekil 2.6).

-A7445G İleri Primer: 5'- CCC GAT GCA TAC ACC ACA TG -3'
-A7445G Geri Primer: 5'- AGG GCA TAC AGC ACT AGG AA -3'

```
7141 atttcactat catattcatc ggcgtaaadc taactttctt cccacaacac tttctcggcc
7201 tatccggaat gccccgacgt tactcggact acCCCGATGC ATACACCACA TGaaacatcc
7261 tatcatctgt aggetcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcattgattt
7321 gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaacctgg
7381 agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccgta tacataaaat
7441 ctagAcaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagccaa ccccatggcc
7501 tccatgactt tttcaaaaag gtattagaaa aaccatttca taactttgtc aaagttaaatt
7561 tataggctaa atcctatata tcttaatggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc
7621 tacttcccct atcatagaag agcttatcac ctttcatgat cagccctca taatcatttt
7681 ccttatctgc TTCCTAGTCC TGTATGCCCT tttcctaaca ctcaacaaca aactaactaa
7741 tactaacatc tcagacgctc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgcatcat
```

Şekil 2.6 A7445G için primer oturma bölgeleri. İtalik ve altı çizgili baz 7445. bazdır. Koyu ve büyük harfle yazılanlar primerlerdir.

2.4.5 PCR'da Kullanılan Komponentler ve PCR'in Hazırlanışı

Primerlerin Hazırlanması: (MWG-Biotech AG)

Tüm primerler firmanın önerdiği doğrultuda 100 pmol/µl olarak steril distile su ile çözüldü. Çözülen primerler ana stok olarak kullanıldı. Ara stok olarak her primer 25 pmol/µl olacak şekilde 1:3 oranında steril distile su ile seyreltildi. Hazırlanan ara stoklar 25 µl hacimlerde bölünerek ana stoklarla birlikte -20°C'ye kaldırıldı.

DNA Taq Polimeraz Enzimi (5U/ μ l): Fermentas (Cat No: EP0402)

PCR reaksiyonuna; 25 μ l için 0.75 ünite, 50 μ l için 1.5 ünite olacak şekilde eklendi.

10X Taq Tamponu ($MgCl_2$ 'siz) (NH_4) $_2$ SO_4 veya KCl 'li: Fermentas (Cat No: EP0402)

PCR reaksiyonuna toplam hacimde 1X olacak şekilde ve primerlere uygun (NH_4) $_2$ SO_4 veya KCl 'li) tampon kullanıldı. Bu tampon Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.

dNTP'ler (100 μ mol/ml): Fermentas (Cat No: T-R071, A-R0141, G-R0161, C-R0151)

100 mM'lık her bir dNTP'den (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 10 μ l alındı (toplam 40 μ l). Üzerine 460 μ l steril distile su ilave edildi. Karışım 100 μ l halinde tüplere bölünüp eksi 20°C'ye kaldırıldı. PCR reaksiyonunda bu stoktan (2mM dNTP) alınıp kullanıldı.

25 mM $MgCl_2$: Fermentas (Cat No: EP0402)

PCR reaksiyonu başına toplamda primere göre optimizasyonlar yapılarak 1 ila 4 mM arası eklendi. Bu çözelti Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.

PCR'in Hazırlanışı:

Toplam reaksiyon hacmi 25 veya 50 μ l olacak şekilde Tablo 2.1'deki bileşenler sırasıyla 0,2 μ l steril ve enzimlerden arındırılmış tüplere kondu. Çoklu PCR çalışmalarında bu bileşenlerden su ve kalıp DNA hariç diğerleri karışım halinde hazırlanıp reaksiyonlara eklendi. Her bir PCR reaksiyon grubu için mutlaka iç kontrol olarak su ile deney kontrol edildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler sürekli buz üzerinde tutuldu.

PCR reaksiyonları Tablo 2.1'deki miktarlara göre kuruldu. Çoklu PCR reaksiyonları kurulurken ilk olarak H $_2$ O ardından kalıp DNA eklendi. Hazırlanan reaksiyon karışımına Taq polimeraz enzimi en son eklendi. Karışım iyice homojenize edildikten sonra tüplere dağıtıldı. Her bir tüpte köpürtülmeden iyice pipetaj yapıldı ve hızla cihaza yerleştirildi. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (PTC-100, MJ Research, Thermal Cycler) yapıldı.

Tablo 2.1 25 ve 50 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	50 µl rx	25 µl rx
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			34.75 µl	17.35 µl
10X Taq tamponu	10X	2X	5.0 µl	2.5 µl
2 mM dNTP Karışımı	100 mM	2 mM	5.0 µl	2.5 µl
İleri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	1.0 µl	0.5 µl
Geri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	1.0 µl	0.5 µl
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	0.75U	0.25 µl	0.15 µl
25 mM MgCl ₂	25 mM	1-4 mM	2.0 µl	1.0 µl
DNA Kalıp		10 pg-1µg	1.0 µl	0.5 µl

2.4.6 PCR şartları

Her bir primer seti için optimizasyon deneyleri yapıldı. Primere göre ise Taq polimeraz tamponu ((NH₄)₂SO₄ veya KCl 'li) ve MgCl₂ miktarları belirlendi. Optimal PCR ısıl değişkenleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 Optimize edilen PCR ısıl değişkenleri.

Primerler→	Cx-26 İkinci Ekzon		35delG,Pozitif Kontrol		A1555G ve A7445G	
Basamaklar ↓	Isı	Süre	Isı	Süre	Isı	Süre
Başlangıç	95°C	5 dakika	95°C	5 dakika	95°C	5 dakika
30 DÖNGÜ	Denatürasyon	95°C	95°C	1 dakika	95°C	30 saniye
	Annealing	58°C	58°C	1 dakika	58°C	30 saniye
	Uzama	72°C	72°C	1 dakika	72°C	30 saniye
Son Uzama	72°C	7 dakika	72°C	5 dakika	72°C	7 dakika
Bekleme	4°C	-	4°C	-	4°C	-

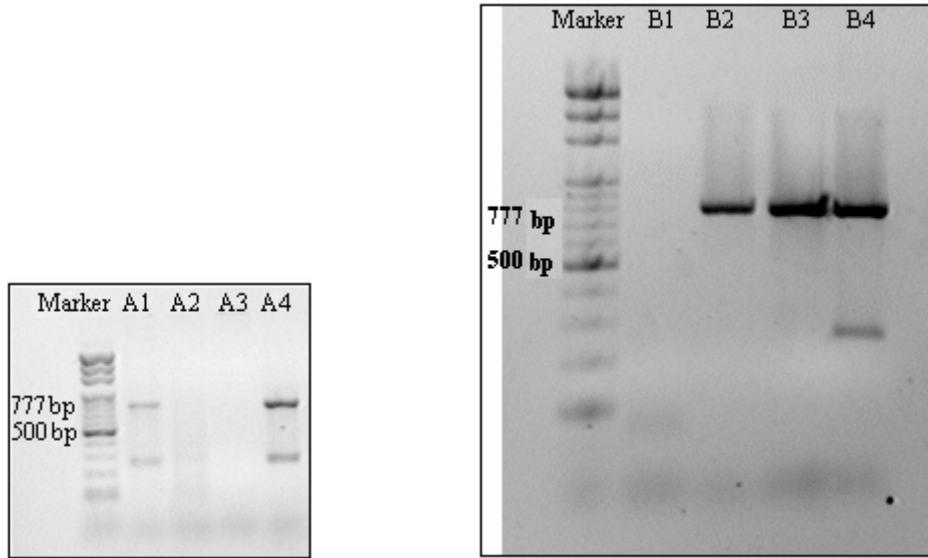
2.4.6.1 Connexin 26 İkinci Ekzon Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri

Primerlerin en iyi çalıştığı MgCl₂ miktarı, tampon türünü ve ısıl değişkenleri belirlemek için bir seri deney yapıldı. Reaksiyona katılan bileşenler Tablo 2.1 baz alınarak ve

25 µl hacinde kuruldu. Isıl profiller Tablo 2.2'deki şekilde uygulandı. Deney şartları aşağıda verilmiştir;

- A1. KCl taq tamponu + 0.5 mM MgCl₂
- A2. KCl taq tamponu + 0.7 mM MgCl₂
- A3. KCl taq tamponu + 1.1 mM MgCl₂
- A3. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- B1. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 0.5 mM MgCl₂
- B2. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 0.7 mM MgCl₂
- **B3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1.1 mM MgCl₂**
- B4. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂

Bu deney sonucunda elde edilen jel görüntüleri Şekil 2.7'de verilmiştir. Bu verilere göre Cx-26 primer seti B3 koşulunda optimize edilmiştir.



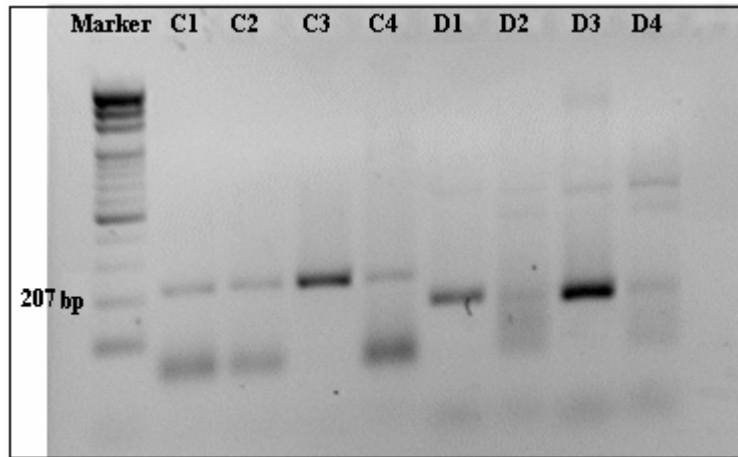
Şekil 2.7 Cx-26 primer seti optimizasyon deneyi elektroforez jel görüntüleri (Marker 100bp).

2.4.6.2 35delG ve Pozitif Kontrol Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri

Primerlerin en iyi çalıştığı MgCl₂ miktarı, tampon türünü ve ısıl değişkenleri belirlemek için bir seri deney yapıldı. Reaksiyona katılan bileşenler Tablo 2.1 baz alınarak ve 25 µl hacinde kuruldu. Isıl profiller Tablo 2.2'deki şekilde uygulandı. Deney şartları aşağıda verilmiştir;

- C1. KCl taq tamponu + 2 mM MgCl₂
- C2. KCl taq tamponu + 4 mM MgCl₂
- C3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2 mM MgCl₂
- C4. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 4 mM MgCl₂
- D1. KCl taq tamponu + 2 mM MgCl₂
- D2. KCl taq tamponu + 4 mM MgCl₂
- D3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2 mM MgCl₂
- D4. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 4 mM MgCl₂

C koşulları 35delG, D koşulları pozitif kontrol primer seti için yapılan deneylerdir. Bu deney sonucunda elde edilen jel goruntuleri Şekil 2.8’de verilmiştir. Bu deney sonucunda taq tamponu ((NH₄)₂SO₄ içeren tampon seçildi.



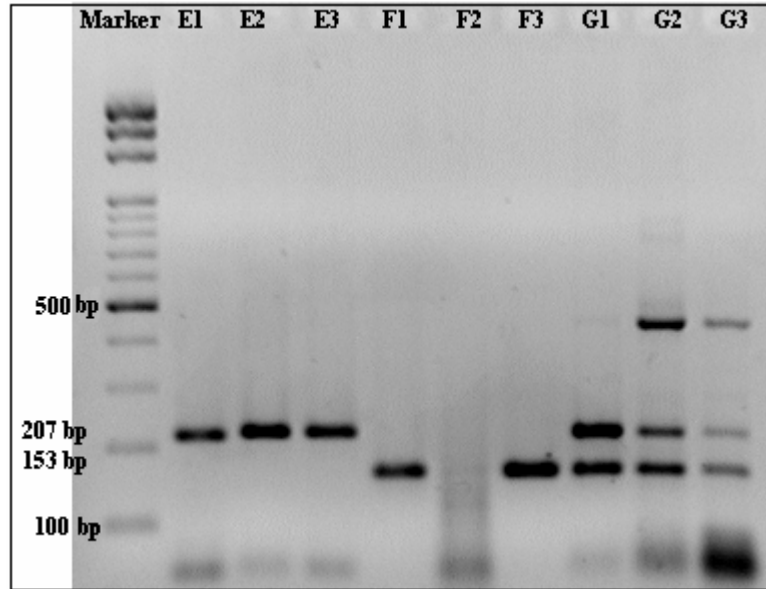
Şekil 2.8 35delG ve pozitif primer seti optimizasyon deneyi elektroforez jel goruntuleri (Marker 100bp).

Deneyden elde edilen veriler MgCl₂ miktarını belirleyemediği için çalışma sadece ((NH₄)₂SO₄ taq tamponu ve multipleks PCR ile iki primer aynı anda çalışıldı. E grubunda; 35delG primer seti, F grubunda; pozitif kontrol primer seti ve G grubunda ise multipleks olarak iki primer setide kullanıldı (Şekil 2.9). Koşullar;

- E1. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1 mM MgCl₂
- **E2. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂**
- E3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2 mM MgCl₂

- F1. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1 mM MgCl₂
- F2. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- **F3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2 mM MgCl₂**
- **G1. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1 mM MgCl₂**
- G2. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- G3. (NH₄)₂SO₄ taq tamponu + 2 mM MgCl₂

Sonuç olarak; 35delG primer çifti en uygun E2 koşulunda, pozitif kontrol primer çifti F3 koşulunda ve multipleks olarak iki primer seti G1 koşulunda optimize edilmiştir.



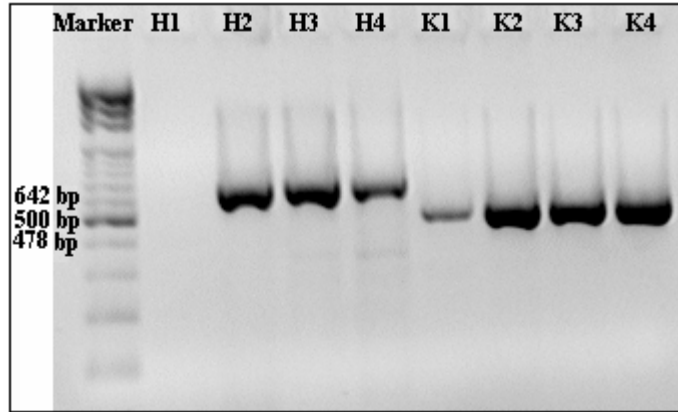
Şekil 2.9 35delG ve pozitif primer seti optimizasyon deneyi elektroforez jel görüntüleri (Marker 100bp).

2.4.6.3 Mitokondriyal A1555G ve A7445G Primerleri İçin Optimizasyon Deneyleri

Primerlerin en iyi çalıştığı MgCl₂ miktarı, tampon türünü ve ısıl değişkenleri belirlemek için bir seri deney yapıldı. Reaksiyona katılan bileşenler Tablo 2.1 baz alınarak ve 25 µl hacinde kuruldu. Isıl profiller Tablo 2.2'deki şekilde uygulandı. Deney şartları aşağıda verilmiştir;

- H1. KCl taq tamponu + 1 mM MgCl₂
- H2. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- **H3. KCl taq tamponu + 2 mM MgCl₂**
- H4. KCl taq tamponu + 3 mM MgCl₂
- K1. KCl taq tamponu + 1 mM MgCl₂
- K2. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- **K3. KCl taq tamponu + 2 mM MgCl₂**
- K4. KCl taq tamponu + 3 mM MgCl₂

H koşulunda A1555G için primer seti, K koşulunda ise A7445G için primer çifti kullanıldı. Taq tamponu için bir önceki deney sonuçlarına göre KCl'li tampon seçildi. Deney sonucunda oluşan elektroforez jel görüntüsüne (Şekil 2.10) göre deney H3 ve K3 koşullarında optimize edildi.



Şekil 2.10 A1555G ve A7445G primer seti optimizasyon deneyi elektroforez jel görüntüleri

2.4.7 PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı:

54 gr Tris-Base (Sigma, T-8524) ve 27.5 gr Borik Asit (Sigma, B-0394) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) (Sigma, E-5134) ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Jel hazırlamada ve elektroforez tankına 0.5X TBE hazırlanılarak kullanıldı.

Yükleme Tamponu (Loading Buffer) 6X:

100 bp DNA ağırlık belirteci yanında üretici firma tarafından verilen (GeneMark, GM100-LC) tampon kullanıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanışı:

PCR ürününün boyutuna göre (777 bp için % 1.5, Restriksiyon enzim kesimleri için % 3'lük) çeşitli yüzdelerde jel hazırlandı. Örneğin % 2'lik jel için 0.60 gr agaroz (Promega, V312A) tartılarak 200 ml'lik erlen içerisine aktarıldı. Üzerine son hacmi 30 ml olacak şekilde 0.5 X TBE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Çeşme suyu altında el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutulan jel içerisine 1.3 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edilerek karıştırıldı.

Hazırlanan jel, yatay mini jel yatağı (Thermo, EC330) içerisine döküldü ve içine yükleme kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak örnek yüklenmesi için elektroforez tankına (Thermo, EC330) yerleştirildi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

Tanka yerleştirilen jelin üzerini 1-2 mm geçecek şekilde 0.5 X TBE tamponu ilave edildi. PCR ürününden 5µl, yükleme tamponundan 1 µl alınarak iyice karıştırıldı. Karışım jelde oluşturulan kuyulara sırayla yüklendi. Jele yüklenen PCR ürünleri 80 V sabit gerilim (güç kaynağı; ATTA-crospower 500) ve 25-30 mA akım koşullarında, 100 bp DNA ağırlık belirteci (GeneMark, GM100-LC) ile birlikte yürütüldü.

2.4.8. PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülemesi

Molekül ağırlığına ve jelin agaroz derişimine bağlı olarak 45-75 dakika yürütülen PCR ürünleri, ultraviyole ışık (~304 nm) altında transilüminatörle (Eagle Eye) nitel olarak saptandı. Amplikon DNA dizisine göre sırasıyla;

- Cx-26 Ekzon 2 için 777 bp (Şekil 2.7)
- 35delG için 207 bp (Şekil 2.9)
- 35delG pozitif kontrol için 153 bp (Şekil 2.9)
- A1555G için 642 bp (Şekil 2.10)
- A7445G için 478 bp (Şekil 2.10)

uzunluklarında beklenen PCR ürünleri, amplikon boyutlarıyla ağırlık belirteçlerinin saptama sınırları içinde örtüşecek şekilde elde edildi.

2.5. Restriksiyon Enzim Kesimleri

2.5.1 35delG Mutasyonunu Saptamak İçin Kısıtlayıcı Enzim Kesim Deneyi

Enzim kesimi için BseLI (Fermentas, cat no: ER1201) restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzim tepkimesinde üretici firmanın sağladığı tampon çözelti kullanıldı. Kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2.3’de verilmiştir. Enzimin kesim için özgül olarak tanıdığı nükleotid dizisi Şekil 2.11’de görülmektedir.



Şekil 2. 11 BseLI enziminin kesim (!) bölgeleri.

Tablo 2. 3 BseLI enziminin kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler ve miktarları.

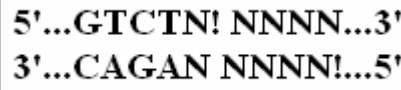
Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Son hacim
PCR ürünü	-	-	10.0 µl
Distile Su	-	-	15.0 µl
10X Tampon	10X	1X	2.2 µl
BseLI Enzimi	10 U/µl	10 U	1.0 µl

0.2 µ ml’lik tüplerde hazırlanan reaksiyonlar 55 °C’de 4 saat süreyle kesim için ısıtılma döngü cihazına yerleştirildi.

2.5.2 Mitokondri Genomu A1555G Mutasyonu İçin Kısıtlayıcı Enzim Kesim Deneyi.

Enzim kesimi için Alw26I (Fermentas, cat no: ER0031) restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzim tepkimesinde üretici firmanın sağladığı tampon çözelti kullanıldı. Kullanılan bileşenler

ve miktarları Tablo 2.4’de verilmiştir. Enzimin kesim için özgül olarak tanıdığı nükleotid dizisi Şekil 2.12’de görülmektedir.



Şekil 2. 12 Alw26I enziminin kesim (!) bölgeleri.

0.2 µ ml’lik tüplerde hazırlanan reaksiyonlar 37 °C’de 8 saat süreyle kesim için ısıtılma döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 2. 4 Alw26I enziminin kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Son hacim
PCR ürünü	-	-	1.4µl
Distile Su	-	-	160 µl
10X Tampon	10X	1X	2.2 µl
BseLI Enzimi	10 U/µl	11U	1.1 µl

2.5.3 Mitokondri Genomu A7445G Mutasyonu İçin Kısıtlayıcı Enzim Kesim Deneyi.

Enzim kesimi için XbaI (Fermentas, cat no: ER0681) restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzim tepkimesinde üretici firmanın sağladığı tampon çözelti kullanıldı. Kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2.5’de verilmiştir. Enzimin kesim için özgül olarak tanıdığı nükleotid dizisi Şekil 2.13’de görülmektedir. 0.2 µ ml’lik tüplerde hazırlanan reaksiyonlar 37 °C’de 8 saat süreyle kesim için ısıtılma döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 2. 5 XbaI enzim kesimi için reaksiyona ilave edilen bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Son hacim
PCR ürünü	-	-	1.4µl
Distile Su	-	-	16.0 µl
10X Tampon	10X	1X	2.2 µl
BseLI Enzimi	10 U/µl	11U	1.1 µl

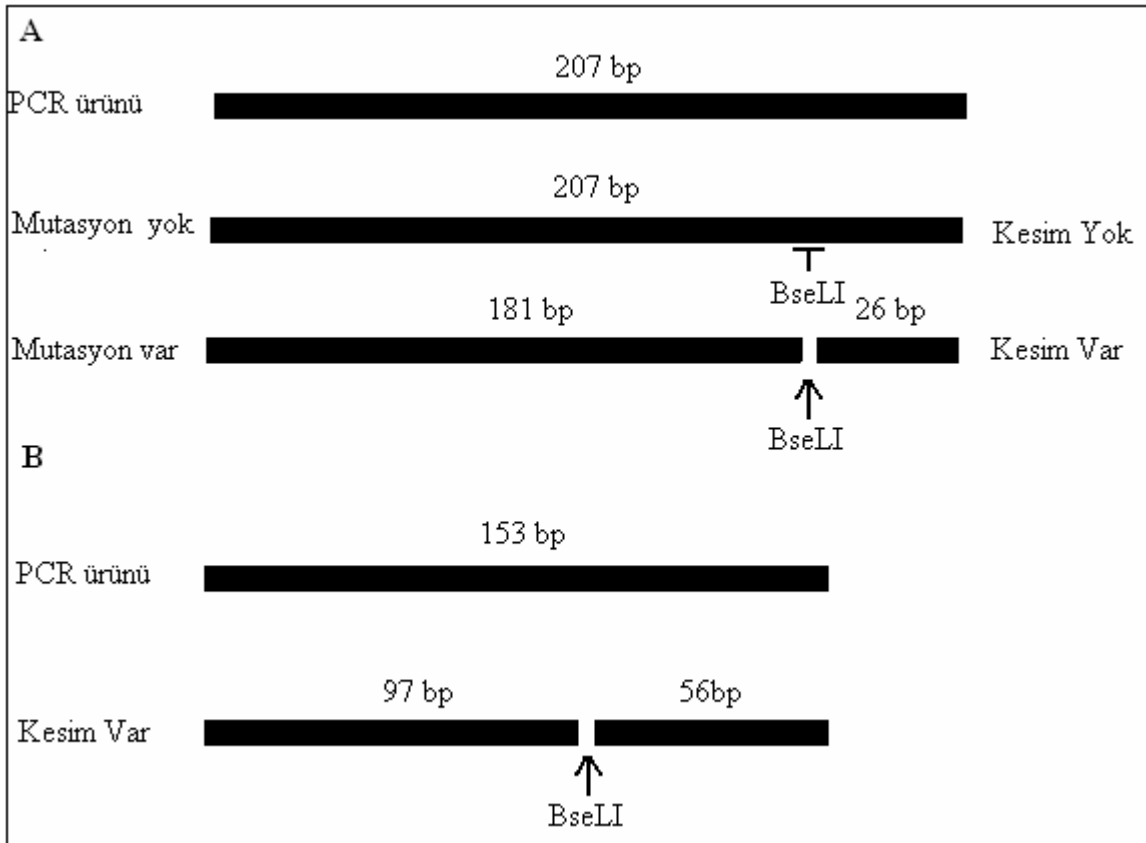


Şekil 2. 13 XbaI enziminin kesim (!) bölgeleri.

2.6 Agaroz Jel Elektroforezi ile Kesim Ürünlerinin Analiz Edilmesi

2.6.1 35delG Mutantı ve Pozitif Kontrol Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi

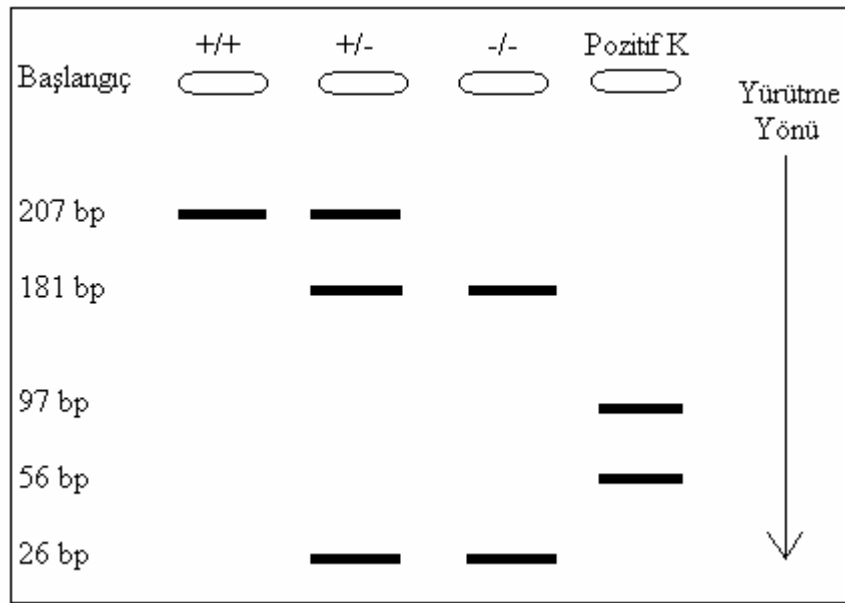
Kesim ürünleri için % 3.5 (w/v) agaroz içeren jeller kullanıldı. Tepkime ürünlerinden, 9 µl yükleme tamponundan 1 µl alınıp iyice karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yüklenerek 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte yürütüldü. Jel yaklaşık olarak 70-80 dakika yürütülüp bantlar görüntü analiz sistemi ile saptandı.



Şekil 2. 14 A.35delG'nin BseLI enzim kesimi sonrasında mutant ve mutant olmayan kesim ürünlerinin şematik görünümü. B. Pozitif kontrolde kesim sonrası ürünlerin görünümü.

Beklenilenle uyumlu olarak, 35delG homozigot olgularda 181 ve 26 bp; heterozigot olgularda 207, 181, 26 bp uzunluklarda PCR ürünleri gözlemlendi (Şekil 2.14). Mutasyonun varlığı bu enzime özgül kesim bölgelerinin oluşmasına neden olmaktadır. Negatif olgularda yalnızca 207 bp bant gözlemlendi.

Ayrıca kontrol primerinin çoğalttığı 153 bp ise her olguda 97 bp ve 56 bp veya 99 bp ve 54 bp olarak kesildiği gözlemlendi (Şekil 2.15). Bu kesim bölgesi enzim tepkimesinin gerçekleştiğini gösteren bir iç kontrol olarak kullanıldı ve her deney için enzimin kesim yaptığı doğrulandı (69).

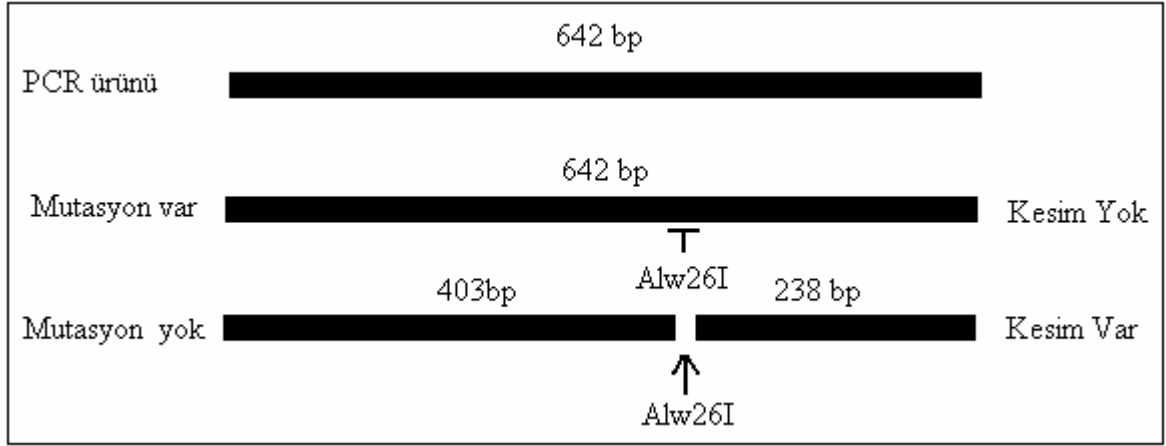


Şekil 2. 15 BseLI enzim kesimi sonrasında oluşabilecek kesim ürünlerinin %3.5'lük jel görüntüsünün şematik çizimi.

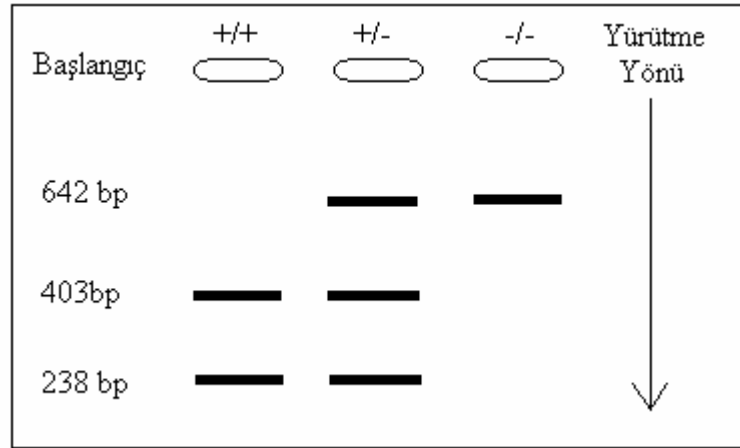
2.6.2 Mitokondri Genomu A1555G Mutantı Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi

Kesim ürünleri için % 2.5'lük (w/v) agaroz içeren jeller kullanıldı. Kesilen ürünlerden 7 µl yükleme tamponundan 1 µl alınıp iyice karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yüklenerek 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte yürütüldü. Jel yaklaşık olarak 50-60 dakika yürütülüp bantlar görüntü analiz sistemi ile saptandı.

Kullanılan enzim mutasyon taşımayan PCR ürünlerini kesmektedir (403 ve 238 bp). Eğer olgu homozigot mutant ise enzim kesim yapmamakta (642 bp), heterozigot ise 642, 403 ve 238 bp bantların görülmesi beklenmektedir (Şekil 2.16 ve 2.17). Restriksiyon kesim analizi Karin ve ark.'dan (70) uyarlandı.



Şekil 2. 16 A1555G mutasyonunun Alw26I enzimi ile kesim ürünlerinin şematik görünümü.

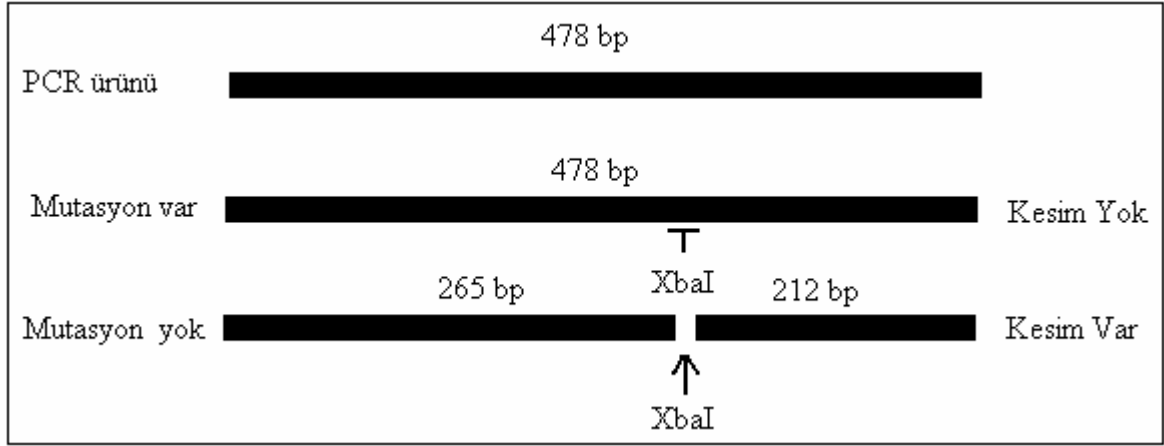


Şekil 2. 17 Alw26I enzim kesiminde oluşacak kesim ürünlerinin %2.5'luk jel görüntüsünün şematik çizimi.

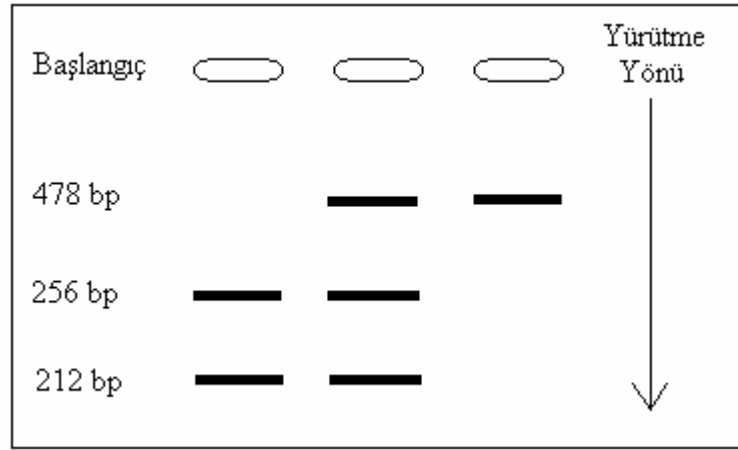
2.6.3 Mitokondri Genomu A7445G Mutantı Enzim Kesimlerinin Değerlendirilmesi

Kesim ürünleri için % 2.5'luk (w/v) agaroz içeren jeller kullanıldı. Kesilen ürünlerden 7 µl yükleme tamponundan 1 µl alınıp iyice karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yüklenerek 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte yürütüldü. Jel yaklaşık olarak 50-60 dakika yürütülüp bantlar görüntü analiz sistemi ile saptandı.

Kullanılan enzim mutasyon taşımayan PCR ürünlerini kesmektedir (265 ve 212 bp). Eğer olgu homozigot mutant ise enzim kesim yapmamakta (478 bp), heterozigot ise 478, 265 ve 212 bp bantların görülmesi beklenmektedir (Şekil 2.18 ve 2.19). Restriksiyon kesim analizi Karin ve ark.'dan (70) uyarlandı.



Şekil 2. 18 A7445G mutasyonunun XbaI enzimi ile kesim ürünlerinin şematik görünümü.



Şekil 2. 19 XbaI enzim kesiminde oluşabilecek kesim ürünlerinin %2.5'lük jel görüntüsünün şematik çizimi.

2.7 DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları

Tüm probandların, Cx-26 ikinci ekzon bölgesi 50 µl reaksiyon kurularak amplifiye edildi. %2'lik agaroz jelde yürütülen örneklerde 777 bp'de keskin ve temiz bant paterni gözlemlendi.

2.7.1 Örneklerin Dizi Analizinin Yapılması

Örnekler "Macrogen, (Güney Kore)" firmasına gönderilerek DNA dizi analizi hizmeti alınarak sağlandı. Gönderilen PCR ürünleri saflaştırma işleminden sonra ilk olarak ileri primerler kullanılarak Otomatize Sekans Cihazı 3730xl ile dizi analizi gerçekleştirildi. İkinci

aşamada; sonuçlara göre mutasyonlu olan bireylerin tekrar amplifikasyonları yapılarak geri primerler ile doğrulandı. Özetle; mutasyon taşıyan her bir olgu iki yönlü olarak, Cx-26 geni ikinci ekzon bakımından dizgilendi.

2.7.2 Kromatogramların Değerlendirilmesi

Dizi analizi yaptırılan şirket tarafından gönderilen veri formatları (pdf, gif ve metin) kullanılarak çeşitli analiz yöntemlerinden yararlanıldı. Sırasıyla bu yöntemler;

Blast(Karşılaştırma) Analizi

Metin formattaki veri kullanılarak her hasta dizisi için NCBI sekans servisinden sağlanan HUMGAPJUNC lokusundaki M86849 kodlu “Homo sapiens connexin 26 (*GJB2*) mRNA, complete cds.” kullanılarak “blast” (karşılaştırma) yapıldı. Karşılaştırma için internet ortamındaki “<http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblast2.html>” adresi kullanıldı. Blast analizi sadece nükleotid düzeyinde yapıldı. Bu işlemde blast programına girilen Cx-26 geni ile sekanstan gelen her bir dizi karşılaştırıldı. Heterozigot veya homozigot baz değişimlerinin saptanmasının yanısıra dizi aralarına giren (*insertion*) bazlarında gösterilmesi sağlandı.

Dizi Analiz Programı

Program olarak “Chromas 1.62 (Helensvale, Avustralya)” kullanıldı. Veri olarak “gif” formatı tercih edildi. Bu formattaki grafik verileri üzerinden heterozigot baz değişimleri tanımlandı. Özellikle heterozigot delesyon mutasyonlarının belirlenmesinde ve dizilerin çıkartılmasında bu program kullanıldı.

Standart Analiz

Gönderilen veri formatlarından “pdf” ile bilgisayar ortamında tarandı. Heterozigot mutasyonların yerleşimleri doğrulandı. Delesyon heterozigot mutasyonlarının belirlenmesinde bu yöntem tercih edildi. Manuel olarak yapılan bu işlem ile heterozigot değişimlerin grafik olarak görünümü saptandı. Cx-26 geninde mutasyon veya polimorfizm taşıyan bireylere ait kromatogram görüntüleri Ek-3 ve Ek-4’de verilmiştir.

3.BULGULAR

3.1 Olgu Grubunun Oluşturulması ve Soyağaçlarının Çıkarılması

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, KBB Anabilim Dalı, İşitme-Konuşma-Denge Ünitesi'ne başvuran işitme kaybı dışında herhangi bir hastalığı olmayan olgular ve aileleri çalışma grubunu oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil edilen ailelerde; proband, ebeveynler ve kardeşlerden EDTA'lı "vacutainer" tüplere ikişer ml periferik kan alındı. İşitme kaybı saptanan hastalardan soyağacı bilgileri, probanda ait soygeçmiş ve özgeçmiş bilgileri yine aynı birim tarafından alındı. Tüm bu veriler her aile için katalog haline getirildi. Duyu yitimlerinin kalıtım modelleri bu kataloglardan çıkartıldı. Çalışmaya 74 aileden toplam 240 birey dahil edildi. Bu bireyler arasında, yaşları 1 ila 17 arasında değişen 88 ilk olgu çalışma grubunun 47'si (%53.4) dişi, 41'i (%46.6) erkek bireyden oluşmaktadır.

İşitme kayıplı bireyler "GENDAF" grubunun yaptığı sınıflandırmaya göre derecelenerek gruplandı. Olguların % 75'ini dördüncü grup hastalar, çok ileri duyu yitimi, oluşturdu. Diğer gruplarla ilgili bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

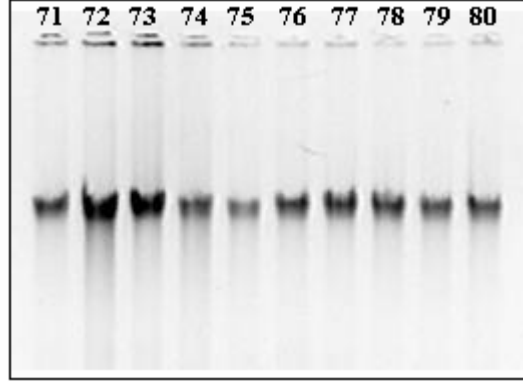
Tablo 3.1 Seksensekiz probandın işitme kaybı aralıklarına göre dağılımı ve bu aralıklardaki yüzdeleri.

Grup	Derece	Aralık (dB)	Hasta Sayısı	Oranı (%)
1	<i>Hafif</i>	21-40	1	1.14
2	<i>Orta</i>	41-70	11	12.50
3	<i>İleri</i>	71-95	10	11.36
4	<i>Çok İleri</i>	95>	66	75.00
Toplam			88	100

3.1.2 Proband Olgulardan DNA İzolasyonu ve Ölçümleri

Çalışma grubundaki bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 2 ml kan örneği DNA izolasyonu için -20°C'de saklandı. Öncelikle probandlara ait kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Proband grubunda mutasyon saptanan olguların diğer aile bireylerinde de(ebeveynler, çocuklar) DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinin

safliklari ve konsantrasyonlari spektrofotometrik olarak ölçülüp hesaplandı. Ayrıca, tüm DNA örnekleri % 1'lik (w/v) agaroz jelde yürütülüp trans-ilüminatörde görüntülenerek elde edilen genomik DNA'nın moleküler ağırlık aralığı saptandı ve spektrofotometrik bulgular teyid edildi (Şekil 3.1).



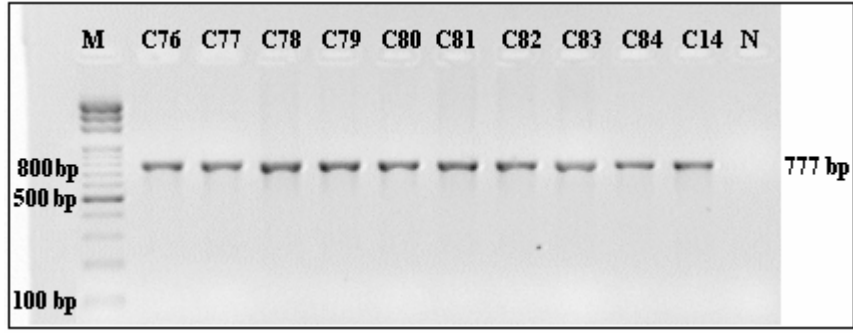
Şekil 3.1 Bazı olgulara ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

3.1.3 Proband Olguların PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Kontrolü

Spektrofotometrik ölçümler ve jel görüntülerine göre uygun saflık ve konsantrasyonda olan DNA'lar PCR'da kalıp olarak kullanıldı. PCR deneyleri, optimize edilen reaksiyon ve ısı koşullarında yapıldı.

3.1.3.1 Connexin 26 İkinci Ekzonun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

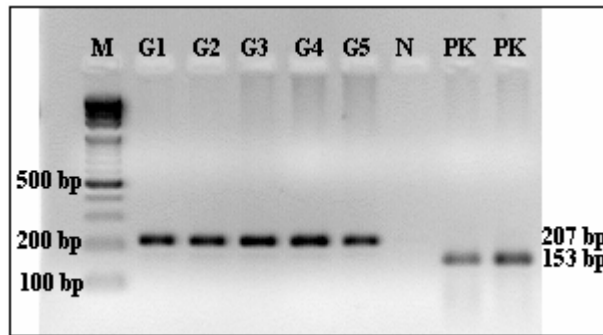
İkinci Ekzon 777 bp'lik alan amplifiye edildi. Öncelikle 88 bireyden oluşan ilk olgu grubuna ait bireylerin PCR ürünlerinde DNA dizi analizi yaptırıldı. Bu verilere göre aile çalışmalarına geçildi. Şekil 3.2'de, ekzon iki PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.2 İkinci ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.

3.1.3.2 35delG Mutasyonu İçin PCR Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

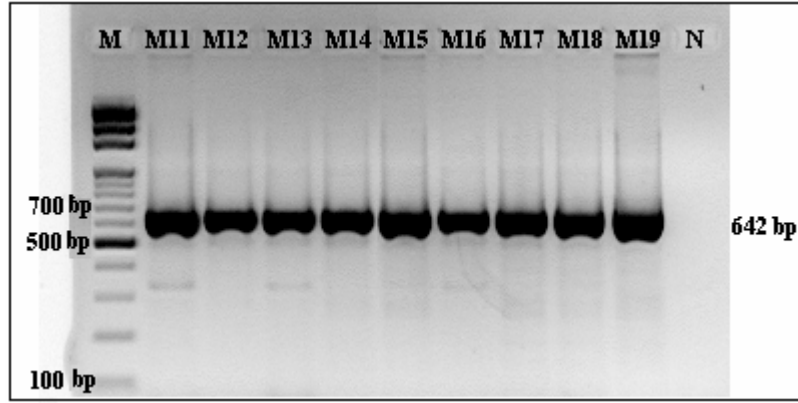
İki set primer kullanılarak, olası 35delG mutasyon bölgesi (207 bp) ve yine Cx-26 geni içerisinde enzim kesim bölgesi taşıyan 153 bp uzunluğundaki alan pozitif kontrol olarak amplifiye edildi. Öncelikle, 88 ilk olgu grubunun PCR ürünleri restriksiyon enzim kesimleri için hazırlandı. Enzim kesimleri sonuçlarına göre 35delG mutasyonu saptanan bireylerin diğer aile üyeleri de bu çalışmaya eklenerek ilgili gen bölgesi amplifiye edildi. Şekil 3.3’de, PCR ürünlerinin % 2.5’luk (w/v) agaroz jeldeki görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.3 35delG ve pozitif kontrol (PK) PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.

3.1.3.3 Mitokondriyal Genomda A1555G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin PCR Amplifikasyonu ve Ürününün Saptanması

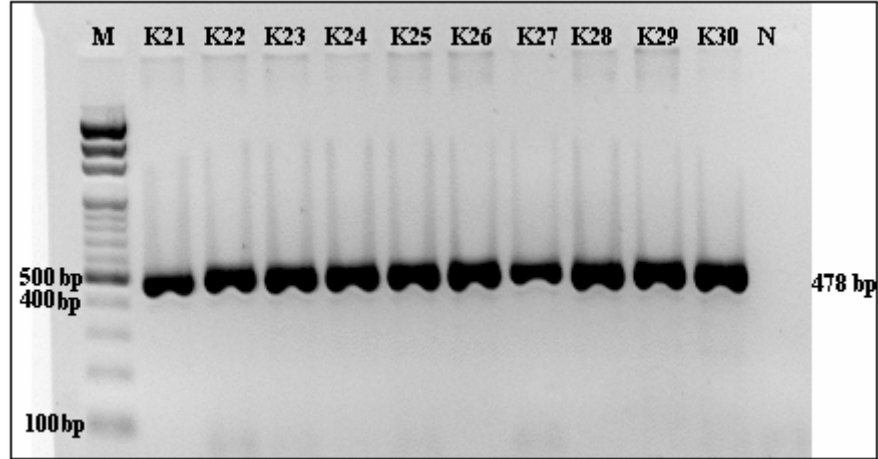
Seksenkiz bireyden oluşan ilk olgu grubu için ilgili bölge PCR’la çoğaltılarak restriksiyon enzim kesimleri için hazırlandı. Çoğaltılan alan 642 baz çiftinden oluşmaktadır. Şekil 3.4’de, bazı örneklere ait PCR ürünlerinin % 2’lik (w/v) agaroz elektroforez jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.4 mtDNA A1555G değişimi için PCR amplifikasyonu elektroforez jel görüntüsü.

3.1.3.4 Mitokondriyal Genomda A7445G Değişiminin Saptanması İçin İlgili Bölgenin PCR Amplifikasyonu ve Ürününün Saptanması

Seksensekiz bireyden oluşan ilk olgu grubu için ilgili bölge PCR'la çoğaltılarak restriksiyon enzim kesimleri için hazırlandı. Çoğaltılan alan 478 baz çiftinden oluşmaktadır. Şekil 3.5'de, bazı örneklere ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz elektroforez jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.5 mtDNA A7445G değişimi için PCR amplifikasyonu elektroforez jel görüntüsü.

3.1.4. DNA Dizi Analizi Verileri

Probandların DNA dizi analizi değerlendirme sonuçları Tablo 3.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Buna göre en sık 35delG olmak üzere 10 farklı nükleotid değişimi saptandı (Ek 3 ve 4). Bu verilerden yola çıkılarak, nükleotid değişimi belirlenen probandların aileleri de 35delG için enzim kesimi ve olası diğer mutasyonları saptamak amacıyla DNA dizi analizi için hazırlandı.

Tablo 3.2 Cx-26 geninin ikinci ekzonunda dizi analizinin verilerine göre mutasyon ve SNP saptanan olgular

Hasta Kodu	Değişim Adı	Tanımı	Etkisi	Protein Bölgesi	Türü
1	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
2	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
14	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
15	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
18	G380A/+	R127H	127. aa Arg→His	IC2	Mutasyon
19	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	Mutasyon
22	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
25	G457A/ G457A	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
26	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
27	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
28	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
30	299delAT/+	del AT	Frameshift (299-300)	IC2	Mutasyon
32	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
34	C570T/+	V190I	190. aa Val→Val	EC2	SNP
38	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
41	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
43	T269C/+	L90P	90. aa Leu→Pro	TM2	Mutasyon
45	358delGAG/+	del120E	120. aa Glu del	IC2	Mutasyon
52	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
55	A88G/+	I30V	30. aa Ile→Val	IC1	Mutasyon
59	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
60	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
61	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
62	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
63	35delG/35delG	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
70	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
79	35delG/+	30-35 delG	Frameshift	IC1	Mutasyon
83	G380A/+	R127H	127. aa Arg→His	IC2	Mutasyon
84	247delTTC/+	del83F	83. aa Phe del	TM2	Mutasyon
88	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP

Olgu grubunda saptanan mutasyon ve SNP'lerin oranları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3 Probandlarda (88 olgu) saptanan mutasyonların olgu grubun içindeki yüzdeleri ve allelik frekansları. 74 ailede saptanan mutasyon oranları

Mutasyon	Olgu Sayısı	Toplam Oran (%)		Allelik Frekans (%)	
35delG/+	9	10.23	18.18	5.11	13.06
35delG/35delG	7	7.95		7.95	
A88G/+	1	1.14		0.57	
247delTTC/+	1	1.14		0.57	
T269C/+	1	1.14		0.57	
299delAT/+	1	1.14		0.57	
358delGAG/+	1	1.14		0.57	
G380A/+	2	2.28		1.14	
Toplam Olgu	23	26.60		17.05	
Toplam Aile	21 (74 Ailede)	28.38			-

Tablo 3.4 Probandlarda (88 olgu) saptanan SNP'lerin olgu grubun içindeki allelik frekansları.

SNP	Olgu Sayısı	Toplam Oran (%)		Allelik Frekans (%)	
G79A/+	5	5.68		2.84	
G457A/ G457A	1	1.14		1.14	
C570T/+	1	1.14		0.57	
Toplam	7	7.96		4.55	
Toplam Aile	6 (74 Ailede)	8.11			-

Tablo 3.5 Probandlarda (88 olgu) saptanan tüm değişimlerin oranı.

Olgu Sayısı	Toplam Oran (%)
30	34,56

Mutasyon gözlenen olguların (35delG dışında) ailelerinde Cx-26 ikinci ekzonları için DNA dizi analizi yapıldı. Buna göre (Tablo 3.6) nükleotid değişiminin geçtiği ebeveynler tespit edildi ve soyağaçları ile birleştirilerek kalıtım modeli ile ilgili yorum yapıldı.

Tablo 3.6 Mutasyon saptanan olgularda aile DNA dizi analizi verileri
(A; anne, B; baba, Ç; çocuk; İK İşitme kaybı)

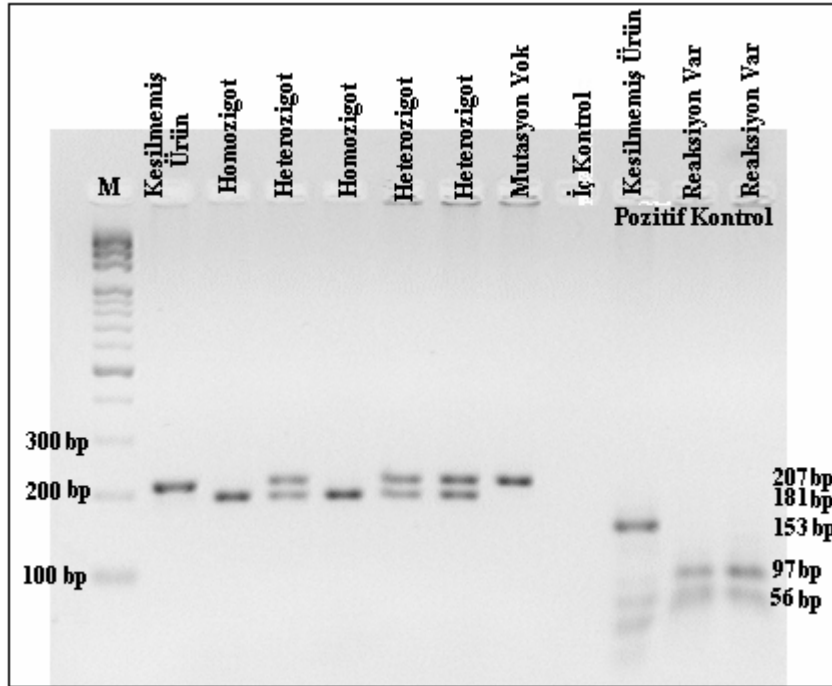
Aile	Olgu		SNP	Fenotip
	No	Mutasyon		(İşitme Kaybı)
	18	G380A/+	-	Var
1	18A	-	-	Yok
	18B	G380A/+	G478A/+	Yok
	30	299delAT/+	-	Var
2	30Ç	-	-	Yok
	30B	299delAT/+	-	Yok
	30A	-	-	Yok
	43	T269C/+	-	Var
3	43Ç	T269C/+	-	Yok
	43B	T269C/+	-	Yok
	44A	-	-	Yok
	45	358delGAG/+	-	Var
4	45B	-	G457A/+	Yok
	45A	358delGAG/+	-	Yok
	55	A88G/+	-	Var
5	55Ç	A88G/+	-	Yok
	55B	-	-	Yok
	55A	A88G/+	-	Yok
	83	G380A/+	-	Var
6	83B	G380A/+	-	Yok
	83A	-	-	Yok
	84	247delTTC/+	-	Var
7	84Ç	247delTTC/+	-	Var

3.1.5 Restriksiyon Enzim Kesimi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Probandların DNA dizi analizlerinde 35delG değişimi olan olgular için diğer aile bireylerinde PCR amplifikasyonları yapılarak enzim kesimi uygulandı. Ayrıca mitokondri genomunda görülen iki nokta mutasyonu da enzim kesimi yoluyla analiz edildi.

3.1.5.1 35delG Mutasyonu Restriksiyon Enzim Kesim Sonuçları

Çalışmada kullanılan enzim mutant PCR ürününü kesmektedir. Bu çalışmayla, dizi analiziyle 35delG mutasyonu saptanan olguların genotipleri homozigotluk ve heterozigotluk yönünden doğrulandı. Dizi analizinde elde edilen kromatogram sonuçlarının, enzim kesimleriyle tam örtüştüğü gözlemlendi. Bunun yanısıra ebeveynler, işitme kaybı olan ve olmayan kardeşlerde de reaksiyon kuruldu. Şekil 3.6'da mutasyonu taşımayan, bir alleli ve her iki alleli de mutant olan olgulara ait elektroforez jel görüntüsü verilmiştir. Bu veriler doğrultusunda ailelerin mutasyon taşıyıcılıkları ve kalıtım modelleri hakkında çıkarımlar yapıldı (Tablo 3.7).



Şekil 3.6 35delG mutasyonu için tasarlanmış restriksiyon enzim kesimi (BseLI) analiz sonuçları elektroforez jel görüntüsü. Enzim mutasyon varlığında kesim yapacak şekilde seçilmiştir. Homozigot mutasyon taşıyıcılığı durumunda 181 bp tek bant, heterozigot durumda 207 ve 181 bp halinde iki bant görülmektedir. Mutasyon yok ise kesim olmamaktadır. (207 bp). Pozitif kontrol kesimlerinde ise her şartta kesim olması beklenmekte, 97 ve 56 bp kesim ürünleri izlenmektedir.

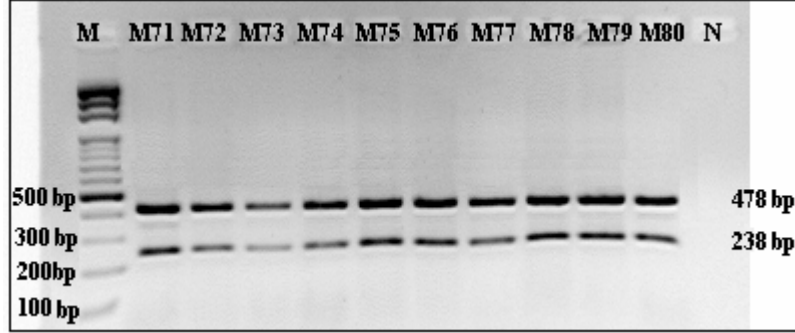
Tablo 3.7 35delG restriksiyon enzim kesimi aile sonuçları, genotipik ve fenotipik durumları (A; anne, B; baba, Ç; çocuk, koyu yazılanlar proband).

Hasta		Fenotip		Hasta		Fenotip	
Aile	Kodu	35delG RE	(İşitme Kaybı)	Aile	Kodu	35delG RE	(İşitme Kaybı)
1	14	Heterozigot	Var	9	52	Heterozigot	Var
	14B	Negatif	Yok		52B	Heterozigot	Yok
	14A	Heterozigot	Yok		52A	Negatif	Yok
2	15	Homozigot	Var	10	59	Homozigot	Var
	15A	Negatif	Yok		59B	Heterozigot	Yok
3	22	Homozigot	Var		59A	Heterozigot	Var
	22 B	Heterozigot	Yok	11	60	Homozigot	Var
	22A	Heterozigot	Yok		60B	Heterozigot	Yok
4	26	Homozigot	Var	12	60A	Heterozigot	Yok
	26B	Heterozigot	Yok		61	Homozigot	Var
	26A	Heterozigot	Yok		62	Heterozigot	Var
5	28	Heterozigot	Var	13	63	Homozigot	Var
	28B	Heterozigot	Yok		61A	Heterozigot	Yok
	28A	Negatif	Yok		61B	Heterozigot	Yok
6	32	Heterozigot	Var	14	70	Heterozigot	Var
	32Ç	Negatif	Yok		70A	Heterozigot	Yok
	32B	Negatif	Yok		70B	Negatif	Yok
	32A	Heterozigot	Yok	79	Heterozigot	Var	
7	38	Heterozigot	Var	14	80Ç	Negatif	Var
	38B	Heterozigot	Yok		80A	Negatif	Var
	38A	Negatif	Yok				
8	41	Heterozigot	Var				
	41B	Heterozigot	Yok				
	41A	Negatif	Yok				

3.1.5.2 Mitokondri Genomu A1555G Mutasyonu Enzim Kesim Sonuçları

Seksensekiz probandın 1555. nükleotidi içeren PCR ürününün enzim kesimi yapıldı. Enzim yabanıl tür ürünleri kesmektedir. Mutasyon varlığında kesim gerçekleşmemektedir.

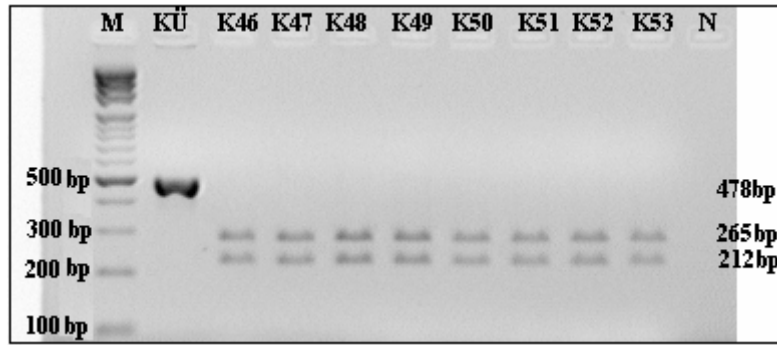
Hiçbir olguda A1555G mutasyonu saptanmadı. Sonuçlara ait jel görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7 A1555G restriksiyon enzim (Alw26I) kesimi sonrası elektroforez jel görüntüsü. Enzim mutasyon taşımayan ürünleri kesmektedir. Tüm olgular negatif (N; iç kontrol).

3.1.5.3 Mitokondri Genomu A7445G Mutasyonu Enzim Kesim Sonuçları

Seksensekiz probandın 7445. nükleotidi içeren PCR ürününün enzim kesimi yapıldı. Enzim yabancı tip ürünleri kesmektedir. Mutasyon varlığında kesim gerçekleşmemektedir. Hiçbir olguda A74445G mutasyonu saptanmadı. Sonuçlara ait jel görüntüsü Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8 A7445G restriksiyon enzim (XbaI) kesimi sonrası elektroforez jel görüntüsü. Enzim mutasyon taşımayan ürünleri kesmektedir. Tüm olgular negatif. (KÜ; kesilmemiş ürün, N; iç kontrol).

3.2 Kontrol Grubunun Oluşturulması ve DNA Dizi Analizi

Kontrol grubunun hazır halde bulunan DNA örneklerinden Cx-26 ikinci ekzon, PCR'la amplifiye edildi. Ürünler, diğer olgularda da olduğu gibi elektroforez jel görüntüleri ile teyid edilip, DNA dizi analizi yaptırıldı.

3.2.1 Connexin 26 İkinci Ekzonun Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi Sonuçları

Kontrol grubunda bulunan her birey için öncelikle tek yönlü DNA dizi analizi ve değerlendirilmesi yapıldı. İlk değerlendirme sonuçlarına göre, herhangi bir nükleotid değişimi görülen bireylerin diğer taraftan da DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda gözlenen değişimler Tablo 3.8'da verilmiştir.

Tablo 3.8 Kontrol grubunun DNA dizi analizlerinde saptanan mutasyon, SNP ve literatürde tanımlanmamış değişimlere ait veriler.

No	Örnek Kodu	Değişim	Tanımlı	Etkisi	Protein Bölgesi	Türü
1	S 4	G478A/+	G160S	160. aa Gly→Ser	EC2	SNP
2	S 11	G647C/+	R216I	216. aa Arg→Ile	IC3	Tanımsız
3	S 14	T101C/+	M34T	101. aa. Met→Ther	TM1	SNP
4	S 16	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
5	S 24	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
6	S 30	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
7	S 66	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
8	S 67	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
9	S 70	G79A /+ A341G/+	V27I E114G	27. aa Val→Ile 114. aa Gly→Glu	TM1 IC2	Mutasyon
10	S 72	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
11	S 86	T269C/+	L90P	90. aa Leu→Pro	TM2	Mutasyon
12	S 87	G457A/+ C493T/+	V153I R165W	153. aa Val→Ile 165. aa Arg→Trp	TM3 EC2	Mutasyon
13	S 89	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP
14	S 92	G478A/+	G160S	160. aa Gly→Ser	EC2	SNP
15	S 93	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
16	S 105	C292T/+	R98L	98. aa Arg→Leu	IC2	Tanımsız
17	S 115	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
18	S 127	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
19	S 130	G79A/+ A341G/+	V27I E114G	27. aa Val→Ile 114. aa Gly→Glu	TM1 IC2	Mutasyon
20	S 135	G478A/+	G160S	160. aa Gly→Ser	EC2	SNP
21	S 143	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
22	S 151	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
23	S 165	G457A/+	V153I	153. aa Val→Ile	TM3	SNP
24	S 177	G79A/+	V27I	27. aa Val→Ile	TM1	SNP

4.TARTIŞMA

4.1 Olgu Grubunun ve Çalışılacak Gen Bölgelerin Seçilmesinde Öngörülen Hedefler ve Yöntemlerin Oluşturulmasında İzlenen Stratejiler

Doğuştan gelen işitme kayıplarında, erken dönemde tedaviye başlanmadığı takdirde bireyin konuşma işlevi de bu kayba bağlı olarak gelişme göstermez. Dünya üzerinde yaklaşık 70 milyon insanın bu nedene bağlı olarak sözel iletişimleri etkilenmiş durumdadır (11). Birçok faktörün (genetik, çevresel) bir araya gelmesiyle oluşan ve kişinin toplumsal olarak farklı bir çerçevede değerlendirilmesine neden olan bu hastalığın kişiye olan yükünün çeşitli yöntemlerle azaltılması gerekmektedir. Bu noktada ailelerin yeteri kadar bilinçli olması ve daha da önemlisi tanının neonatal dönemde konulması gerekmektedir. Böylelikle hastanın fiziksel ve psikolojik koşullarının daha iyi seviyede olması öngörülmektedir (71,72).

Bu çalışmada, olgu grubu kıstasları belirlenirken iki önemli nokta, non-sendromik ve sensörinöral işitme kaybı, ön planda tutuldu ve bu kıstaslara uyan bireyler çalışmaya dahil edildi. Hasta evrenini oluşturan grupta, işitme kaybı dışında başka hastalığı olmamasına özen gösterildi. Grubun şekillendirilmesinde, işitme kaybı olguları içerisinde en sık gözlenen grup olması ve grubun erken yaşlarda tedaviye yanıt vermesi belirleyici kıstaslar oldu. Hastalığın etkenine göre yapılan sınıflandırmada, genetik nedenlere bağlı işitme kayıplarının % 60-70 gibi yüksek bir oranını non-sendromik hastaların oluşturduğu bilinmektedir (2,7,11). Bu bulgular eşliğinde oluşturulan çalışma evrenimizden sapan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Hastalığın genetik nedenlere dayandırılması için her aileden alınan ayrıntılı soygeçmiş ve özgeçmişler, bilinen ve belirlenen ölçütlerde soyağaçlarına yansıtıldı. Bu aşamada, öykülerinde genetik nedenli işitme kaybı olmadığını öngördüğümüz olgular çalışma dışı bırakıldı. İşitme kayıplarının genetik nedenlerden bağlı olamayan grubu tüm non-sendromik olguların % 40-50'sini oluşturmaktadır (7).

İşitme işlevinin herhangi bir basamağında rolü olduğu bilinen üç temel kategori bulunmaktadır. Bu kategoriler; DFNA, DFNB, DFN'dir ve 40'dan fazla gen haritalanmıştır (7,13,38). Non-sendromik olgularda en sık DFNB1 (*GJB2*; Cx-26) tutulum göstermektedir. Bu gen üzerinde 70'den fazla mutasyon bildirilmiştir (1,6,14,15). Özellikle rat kokleası immünohistokimya çalışmalarından elde edilen veriler, iç kulakta yaygın bir ifade potansiyeli olan *GJB2* geni ürünü olan Cx-26 proteinini işaret etmektedir (2,23,43).

Cx-26 proteini connexon yapısına diğer connexinler ile birlikte girerek “gap junction” yapılarını oluşturmaktadır. Bu “gap junction” yapılarının saçlı hücreler üzerinden iyon taşınmasında rol aldığı bilinmektedir (19,21,36). Bu bölgede oluşacak bir hasarın işitme kaybına neden olabileceği çeşitli deney sistemleri ile gösterilmiştir (21).

Bu veriler eşliğinde çalışılması hedeflenen gen Cx-26 olarak belirlendi. Bu genin çalışılmaya değer görülmesinde en önemli noktalar; gen ifadesinin yaygın olarak görülmesi, non-sendromik olgular içerisinde en sık mutasyonu gösterilen gen olması, girdiği “gap junction” yapılarının kilit noktalarda önemli görevler alması ve bu gen bakımından nakavt edilen embriyoların letal olmaları sayılabilir.

Farklı bir düzenek yoluyla ve işitme kaybına neden olan mitokondriyal DNA mutasyonlarına sendromik ve non-sendromik olgularda rastlanmaktadır. Ekstra kromozomal genomda taşınan bu mutasyonlar çevresel bir ajana (aminoglikozid türevi antibiyotikler) maruz kalmadığı sürece sessizliğini korumaktadır (49). Toplumlarda en sık gözlenen iki mutasyon; A1555G (12S rRNA) ve A7445G (tRNA^{Ser(UCN)}) değişimleridir (54,55).

Çalışmamızda bu iki mutasyon bölgesinin de çalışılması hedeflendi ve bu lokuslar tüm probandlarda analiz edildi. Ülkemizdeki işitme kayıplı bireylerde ekstra kromozomal mutasyonlar yalnızca bir araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir (73). Çalışmamızla olgu evreni genişletilmiş ve böylece, toplumumuzda mitokondriyal mutasyonların işitme kayıplarındaki rolüne ilişkin daha kapsamlı ve informatif veri elde edilmiştir. Ülkemizde antibiyotiklerin çoğu zaman bilinçsizce kullanıldığı göz öne alındığında çalışmanın bu ayağının önemi kavranabilir (Klinisyenlerle kişisel iletişim).

İki ekzonu bulunan Cx-26 geninin çalışılan ikinci ekzonun tamamı DNA dizi analizi yöntemiyle incelendi. Böylelikle gen üzerinde olabilecek herhangi bir değişimin her noktada saptanması sağlandı. Nitekim, birçok araştırmacı bu yöntem ile yeni mutasyonları tanımlamışlardır (1,22,45,74,75).

Olgu gruplarında 35delG mutasyonunun yüksek çıkabileceği öngörülerek, bu mutasyonun probandların DNA dizi analizi sonuçlarına göre ailelerde de çalışılması planlandı. Modifiye bir primer eşliğinde amplifiye edilip restriksiyon enzimi ile kesim prensibine dayanan yöntem kullanıldı (69). Aynı zamanda 35delG mutasyonunu taşıyan probandlarda sonuçların bir sağlaması olarak bu yöntem tercih edildi. Bu yöntemin kullanılmasıyla, 35delG mutasyonunu taşıyan probandların soyağacı bilgileri ile birlikte karşılaştırılarak kalıtım örüntüleri hakkında çıkarımlar yapılmıştır.

Mitokondriyal mutasyonların belirlenmesinde de restriksiyon enzim kesim yöntemi tercih edildi. Birçok araştırmacı tarafından kullanılan ve aynı mutasyon bölgeleri için etkin olarak çalıştığı bilinen enzimler tercih edildi (56,57,62,66,70). Sonuç olarak, enzimin özgülüğüne bağlı olarak PCR ürününü kesip kesmemesine göre mutasyon var veya yok şeklinde sonuçlar elde edildi.

4.2 Connexin 26 Geni İkinci Ekzonunda Saptanan Mutasyonların Değerlendirilmesi

DNA dizi analizi sonuçlarına göre Cx-26 geni ikinci ekzonunda probandlarda birçok farklı değişimler saptandı. Hastalardan alınan bilgiler doğrultusunda hazırlanan soyağaçları ve aile öyküsü ile ilgili veriler, tüm sonuçlar ile birlikte değerlendirilerek her aile için kalıtım örüntüsü çıkarıldı. Tablo 4.1’de tüm veriler özetlenmiştir.

Probandlarda gözlenen mutasyonlar; dört farklı nükleotid delesyonu (35delG, 247delTTC, 299delAT, 358delGAG) ve üç farklı nükleotid değişimi (A88G, T269C, G380A)’dir.

35delG Mutasyonu

Bu çalışmada en sık olarak saptanan 35delG heterozigot ve homozigot mutasyonların tüm olgular arasındaki oranı % 18.18, allelik frekansı % 13.06 (176 allel için) olarak hesaplandı. Toplam 16 olgunun (14 aile) bu mutasyonu taşıdığı belirlendi (Probandlar; 14, 15, 22, 26, 28, 32, 38, 41, 52, 59, 60, [61, 62, 63], 70 ve 79). Ülkemizde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada saptanan oranın, 35delG mutasyonunu taşıyan bireyler için uyumlu olduğu gözlemlendi. Ülkemiz Avrupa, Asya, Akdeniz üçgeni arasında yer aldığı için, etnik açıdan bu bölgelerin özelliklerini taşımaktadır. Cx-26 için yapılan mutasyon çalışmalarında en sık rastlanan mutasyon 35delG olup, tüm olgular içindeki oranı % 17.5 ila % 21.7 arasında bulunmuştur (74-77). Ancak, Beyazıt ve ark. (78) bu oranı % 7.1 olarak belirtmişlerdir. Buna neden olarak, çalışma evreninin 14 aileden oluşturulması gösterilebilir (78).

Tablo 4.1 Olguların öyküleri ve kalıtım şekilleri (A; Anne, B; Baba , SÇ; Sağlam Çocuk, ATİK; Akustik travmaya bağlı işitme kaybı, YFİK; yüksek frekans işitme kaybı, İK; işitme kaybı, L; sol kulak, R; sağ kulak, N; normal, OR; Otozomal Resesif, deN; *de nova*, “-“ gözlenmedi veya yok anlamında).

Aile No	Olgu No	Mutasyon	İK Grubu	Akrabalık İlişkisi	Öykü İK	Kalıtım Şekli
1	14	35delG/+	4			
	14B	-	- ATİK	-	-	OR
	14A	35delG/+	-			
2	15	35delG/35delG	4			OR ?
	15A	-	-	-	-	deN ?
3	22	35delG/35delG	4			
	22 B	35delG/+	-	-	Anne tarafında menenjitte bağlı İK	OR
	22A	35delG/+	-			
4	26	35delG/35delG	4			
	26B	35delG/+	- ATİK	-	Ebeveynlerin ailelerinde İK	OR
	26A	35delG/+	-			
5	28	35delG/+	4			
	28B	35delG/+	-	-	-	OR
	28A	-	-			
6	32	35delG/+	4			
	32SÇ	-	-	-	Çocuklar ayrı yumurta ikizi	OR
	32B	-	- YFİK	-		
	32A	35delG/+	-			
7	38	35delG/+	4			
	38B	35delG/+	-	-	Ebeveynlerin ailelerinde İK	OR
	38A	-	-			
8	41	35delG/+	4			
	41B	35delG/+	- YFİK	-	-	OR
	41A	-	-			
9	52	35delG/+	4			
	52B	35delG/+	- ATİK	-	Anne tarafında bir bireyde ileri yaş İK	OR
	52A	-	-			
10	59	35delG/35delG	4			
	59B	35delG/+	-	1.derece	Baba tarafında menenjitte bağlı İK	OR
	59A	35delG/+	L2RN			
11	60	35delG/35delG	4			
	60B	35delG/+	-	1.derece	Ebeveynlerin ailelerinde İK	OR
	60A	35delG/+	-			
12	61	35delG/35delG	4			
	62	35delG/+	LNR1/2			
	63	35delG/35delG	L3R4	1.derece	-	OR
	61A	35delG/+	-			
13	70	35delG/+	4			
	70A	35delG/+	-	1.derece	Anne tarafında ateşli hastalık öyküsüne bağlı İK'lı bir birey	OR
	70B	-	-			

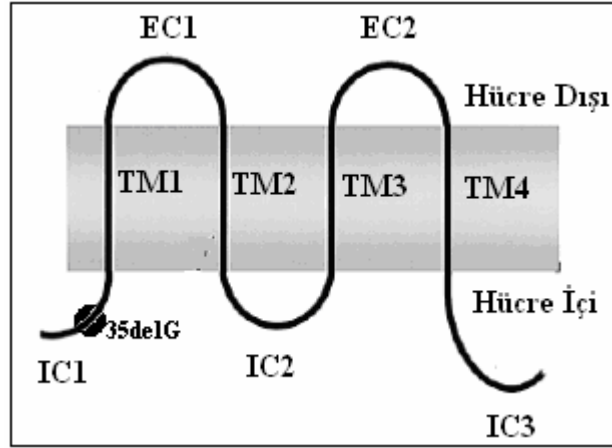
Aile No	Olgu No	Mutasyon	İK Grubu	Akrabalık İlişkisi	Öykü İK	Kalıtım Şekli
14	79	35delG/+	4		Ebeveynler	OR ?
	80	-	4	-	İK'lı ve	deN ?
	80A	-	4		ailelerinde İK	
15	18	G380A/+	4			
	18A	-	-	1.derece	-	OR
	18B	G380A/+	-			
16	30	299delAT/+	4		Anne tarafında	
	30Ç	-	-	2.derece	iki bireyde İK	OR
	30B	299delAT/+	-			
	30A	-	-			
17	43	T269C/+	3			
	43Ç	T269C/+	-	-	-	OR
	43B	T269C/+	-			
	44A	-	-			
18	45	358delGAG/+	4			
	45B	-	-	-	Bilürubin artışı	OR
	45A	358delGAG/+	-			
19	55	A88G/+	4		Anne tarafında	
	55Ç	A88G/+	-	1.derece	ateşli hastalık	OR
	55B	-	-		öyküsüne bağlı	
	55A	A88G/+	-		İK'lı iki birey	
20	83	G380A/+	4		Ebeveynlerin	
	83B	G380A/+	-	2.derece	ailelerinde İK	OR
	83A	-	-			
21	84	247delTTC/+	4		Anne İK'lı ve	
	84Ç	247delTTC/+	4	-	İK'lı bireyler	OR?

Avrupa toplumlarında yapılan çalışmalarda; olgu grubunda 35delG mutasyonun oranı değişkenlik göstermektedir. Çek'lerde yapılan çalışmada 156 kişilik işitme kayıplı evrende 66 bireyde (% 42.31) (1), Fransız'larda yapılan diğer bir çalışmada bu oranın % 52.17 (184 de 96 birey) (79), Macaristan'da % 46 (212 de 97 olguda) (80) ülkemize oranla daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 duyu yitimi olan olgulardan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 72.44 (2218 allel) olarak bildirilmiştir (81).

Ancak 35delG mutasyonunun toplumdaki (rasgele seçilmiş bireyler için) taşınma sıklıklarına bakıldığı zaman bu oranın Avrupa , Amerikan beyaz ırktaki taşınma sıklığının %1.3 ila 2.8 arasında olduğu rapor edilmiştir (27). Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar, popülasyonda taşınma sıklığının % 1.3 ila %1.8 aralığında olduğunu ortaya koymuştur (27,37). Tablo 4.2'de mutasyon taşınma sıklığının ülkelere göre dağılımı vermiştir.

Tablo 4.2 Ülkelere göre 35delG mutasyonu taşınma sıklığı (27), # (6), * (75), ** (34).

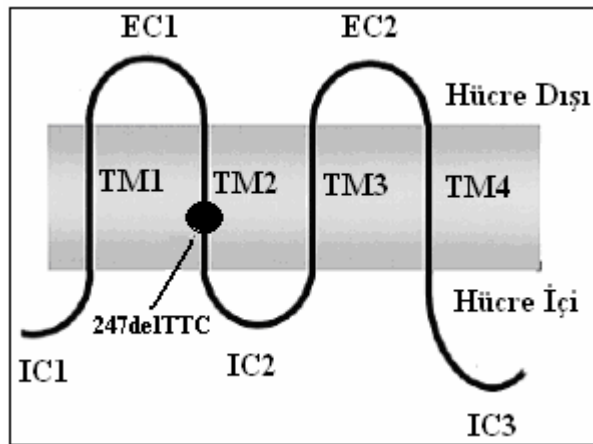
Ülke	Saptanan/Çalışma	Taşınma sıklığı %
Türkiye	4/150 (5/429*) (12/674#)	2.6 (1.17*) (1.78#)
Danimarka	2/95	1.05
Norveç	1/190	0.53
Estonya	5/113	4.42
Almanya	4/200	2.0
Belçika	1/190 (9/360#)	0.53 (2.5#)
Hollanda	2/89	2.25
Fransa	2/296 (14/512#)	0.67 (2.73#)
Çek Cumhuriyeti	4/195	2.05
Slovenya	1/182	0.55
Bulgaristan	1/157	0.64
Portekiz	4/179	2.23
İspanya	5/200	2.5
İtalya	12/371 (6/150#)	3.23 (3.54*) (4.0#)
Malta	4/144	2.78
Yunanistan	12/400	3.0 (3.54*)
Lübnan	7/300	2.33
Tunus	3/236	1.28
İran	2/59 (59**)	3.39 (3.4**)
Irak	1/115	0.87
Yemen	0/13	0
Askenazi Amerika	0/89	0
Arap	1/58	1.72
Mısır	0/95 (1/94#)	0 (1.3#)
Beyaz ırk (Kuzey Avrupa)	1826**	2.8
Beyaz ırk (Güney Avrupa)	1444**	1.3
Avrupa (Toplam)	64/3270#	1.96#
Beyaz ırk (Amerika)	560**	2.5
Beyaz ırk (Belçika)	360**	2.5
Beyaz ırk (İspanya ve İtalya)	280**	3.2
Beyaz ırk (Yunan)	395**	3.5
Asyalı	53**	0
Afrikalı Amerikan	173** (0/190#)	0 (0#)
Avustralya	10/1000#	1.0#
Brezilya	6/620#	0.973#
İsrail Ashkenazi	1/467#	0.21#
Kore	1/100#	1.0#
Umman	0/280#	0#
Polonya	3/150#	2.0#
Rusya	12/560#	2.14#



Şekil 4. 1 Cx-26 proteini üzerinde 35delG mutasyonunun hücre zarındaki konumu. Mutasyon birinci hücre içi alanında yer almaktadır (IC1).

247delTTC Mutasyonu

İkinci saptanan delesyon 247. nükleotidden itibaren 248. ve 249. nükleotidlerin delesyonu, “247delTTC” bir proband (84. proband) ve kardeşinde heterozigot olarak saptandı. Ailede annenin işitme kayıplı olduğu babanın ise işitme bakımından normal olduğu bilinmektedir. Anneye ait kan örneğinden DNA izolasyon aşamasında çıkan problemler nedeniyle sonuç alınamadı. Babaya ait kan ise alınamamıştır. Literatürde ve işitme kayıplarında gözlenen mutasyonlar ile ilgili veri tabanında bu mutasyona rastlanmamıştır. Proteinde 83. kodonda bulunan “Fenilalanin” amino asitin delesyonuna neden olan bu mutasyon ikinci zargeçer alanında yer alması bakımından önemlidir (Şekil 4.2).

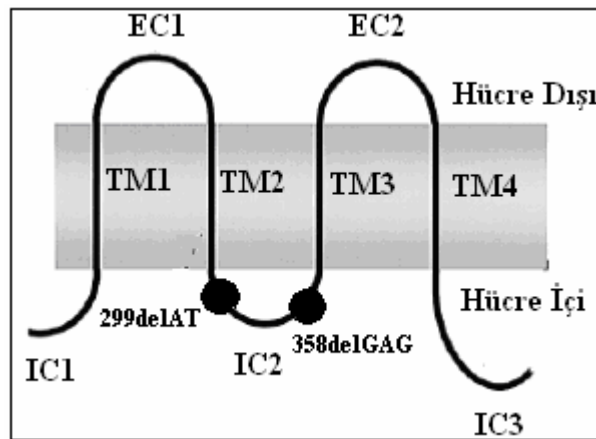


Şekil 4. 2 Cx-26 proteini üzerinde 247delTTC mutasyonunun hücre zarındaki konumu. Mutasyon ikinci zargeçer alanında yer almaktadır (TM2).

299delAT Mutasyonu

Diğer bir mutasyon 299. ve 300. nükleotidlerin (AT) delete olmasıyla çerçeve kayması biçiminde oluşmaktadır. Çalışmamızda bir olguda (30. proband) saptanan heterozigot 299delAT mutasyonu, heterozigot mutasyon taşıyıcısı baba tarafından iki çocuğundan sadece probanda aktarıldığı, ancak babanın işitme kaybının olmadığı belirlenmiştir. Ailede sadece probandın işitme kayıplı olup, olgunun anne tarafında işitme kaybı olan bireyler bilinmektedir. Babanın olgu gibi heterozigot mutasyon taşıyıcısı olmasına karşın fenotipe yansıyan bir değişimin olmaması “compound heterozigotluk” veya gap junction yapısına katılan proteinin normal allelden oluşmuş olabileceği öngörülmektedir. Kanal normal oluşumuna katılan connexinlerin herhangi birinin mutasyonu taşıyan allelden translasyonu durumunda, yapı oluşumundan kaynaklı problemler oluşabilecek ve işitme kayıpları gözlenebilecektir. Compound heterozigotluk durumunda ise, kanal yapısına katılan Cx-26’dan farklı bir connexin proteininde bir gen defekti olması olasıdır. Bu durumda iç kulaktaki dengelerin bozulmasına neden olacaktır.

İkinci hücre içi Cx-26 protein bölgesinde (Şekil 4.3) gözlenen bu mutasyona toplumumuzda rastlanmıştır. Beyazıt ve ark. 14 aile ile yaptıkları çalışmada homozigot mutasyon taşıyan birey bildirmiştir (78). Japonya’da 23 ailede yedi olgu (82), Amerika’da 234 işitme kayıplı olguda 5 bireyde rapor edilmiştir (12). Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 işitme kayıplı olgulardan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 0.13 (4 allel) olarak bildirilmiştir (81).



Şekil 4.3 Cx-26 proteini üzerinde 299delAT ve 358delGAG mutasyonların hücre zarındaki konumu. Mutasyonlar ikinci hücre içi protein alanında yer almaktadır (IC2).

358delGAG Mutasyonu

Proteinde 120. amino asitin (Glutamik asit) kaybına neden olan bu mutasyon 358., 359. ve 360. (GAG) nükleotidlerin yitimi ile oluşmaktadır. Amino asidin hücre membranındaki yerleşimine göre ikinci hücre içi alanında (IC2) yer almaktadır (Şekil 4.3). Bu çalışmada bir olguda (45. proband) saptanan heterozigot 358delGAG mutasyonu probanda bu mutasyonu heterozigot taşıyan anne ile aktarılmıştır. Anne ve babanın işitmeleri normaldir. 299delAT mutasyonu taşıyan aileye benzer olarak burada da compound heterozigotluk veya kanal yapısına katılan proteinlerin durumu farklı bir bakış açısı ortaya koymaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda 409 olgu içerisinde 3 bireyde homozigot olarak bu mutasyon rapor edilmiştir (57,74,75). Çek'lerde 156 işitme kayıplı bireyde bir olguda (1), İsveç toplumunda ise 34'de bir olguda rapor edilmiştir (83). Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 olgudan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 0.75 (23 allel) bildirilmiştir (81). Bu allelin frekansının % 1' in altında olması çalışılan tüm popülasyonlardaki bu değişimin mutasyon olduğunu göstermektedir.

A88G (I30V) Mutasyonu

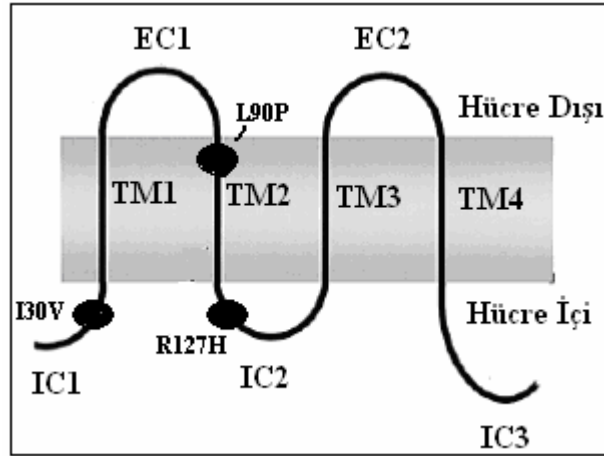
Genin ikinci ekzonunun 88. nükleotidinde adenin yerine guanin nükleotidinin geçmesi ile oluşmaktadır. Proteinde 30. amino asitte izolösin (I) yerine valin (V) amino asiti gelmektedir (Şekil 4.4). Çalışmamızda bir olguda (55. proband) heterozigot saptadığımız A88G değişimi, mutasyonu heterozigot olarak taşıyan, işitme kaybı olmadığını bildiğimiz anne tarafından iki çocuğuna da aktarılmıştır. Ancak proband dışında ailede işitme kayıplı birey bulunmamaktadır.

Ülkemizde daha önce rapor edilen olgu bulunmamaktadır. Tayvanlı'larda yapılan çalışmada 324 işitme kayıplı olgudan sadece bir bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Araştırmacı tarafından, aday mutasyon olarak gösterilen I30V mutasyonu; goril, orangutan, gibbon maymunu, alyanaklı maymun, inek ve fare genomları ile yapılan Cx-26 gen analizlerine göre, 30. kodon izolösin tüm bu organizmalarda korunumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu mutasyona 432 kişilik kontrol grubunda da rastlanmamıştır (84). Bu nedenle ilgili bölge oluşan değişimin fenotipe yansımaları olasıdır.

T269C (L90P) Mutasyonu

Cx-26 geninin 269. nükleotidinde timin yerine sitozin nükleotidinin geçmesiyle proteine yansıyan mutasyonla, 90. amino asiti olan lösin yerine prolin gelmektedir (Şekil 4.4). Çalışmamızda bir olguda (43. proband) heterozigot saptadığımız T269C değişimi, mutasyonu heterozigot olarak taşıyan, işitme kaybı olmadığını bildiğimiz baba tarafından iki çocuğuna da aktarılmıştır. Ancak proband dışında ailede işitme kayıplı birey bulunmamaktadır.

Tekin ve ark. 256 olgu içerisinde bir bireyde bu mutasyonu rapor etmişlerdir (57). Amerika’da 88 olguda iki (85), Macaristan’da 212’de bir (80), Çek’lerde 156 olguda iki bireyde (1) T269C mutasyonu bildirilmiştir. Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 olgudan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 1.86 (57 allel) olarak bildirilmiştir (81). *Xenopus* yumurtalarında yapılan çalışmalarda T269C mutasyonunun, fonksiyon göstermeyen connexin kanalı oluşumuyla tüm “gap junction” kanal yapısını bozduğu gösterilmiştir (86).



Şekil 4.4 Cx-26 proteini üzerinde G88A (I30V), C269T (I90P), G380A (R127H) mutasyonların hücre zarındaki konumu. Mutasyonlar sırasıyla; birinci hücre içi protein alanında (IC1), ikinci zargeçer alanında (TM2) ve ikinci hücre içi protein alanında (IC2) yer almaktadır

G380A (R127H) Mutasyonu

Proteinin 127. amino asitinde arginin yerine histidin amino asitinin gelmesiyle oluşmaktadır (Şekil 4.4). Bu ifade değişimine neden 380. guanin nükleotidi yerine adenin gelmesidir. Bu çalışmada iki olguda (18. ve 83. probandlar) R127H mutasyonu heterozigot olarak belirlendi. Onsekizinci probandın ailesinde başka işitme kayıplı birey saptanmadı ve mutasyonun heterozigot olarak babadan aktarıldığı, ayrıca ailede akraba evliliği öyküsü olduğu belirlendi. Diğer probanda ise, ebeveynlerde işitme kayıplı birey olmadığı saptandı.

Mutasyonun heterozigot olarak babadan aktarıldığı, ayrıca ailede akraba evliliği öyküsünün yanısıra ebeveynlerin ailelerinde işitme kayıplı bireyler saptandı.

Uyguner ve ark. 60 olgu içerisinde bir bireyde heterozigot olarak bu mutasyonu saptamışlardır (75). A.B.D’de 88 olguda yedi (85), Macaristan’da 212’de bir (80), Sudan’da 183 olguda bir bireyde (22) G380A mutasyonu bildirilmiştir. Çek’lerde 156 olguda bir birey polimorfizm olarak rapor edilmiştir (1) Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 olgudan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 0.07 (2 allel) olarak bildirilmiştir (81).

HeLa hücre hatlarında yapılan çalışmalarda mutasyonun kanalın olağan oluşumunu etkilemediği gösterilmiş ve bunun fenotipik etkisi olmayan bir mutasyon veya polimorfizm olduğu düşünülmüştür (86). Farklı olarak, N2A iletişim eksikliği olan hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, G380A mutasyonu taşıyan Cx-26 gen ürünlerinin bu hücrelerin membranlarına ait hücre-hücre temas alanlarında yerleşim gösterdiği, ancak verilen nörobiyotinlerin iletiminde büyük düşüşler gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu verilerden elde edilen çıkarım, bu mutasyona bağlı olarak iç kulaktaki iyonik bileşenlerin (K^+) dolaşımındaki aksamalardan dolayı işitme kayıpları olduğu yönündedir (35).

Çalışmamızdaki bu olguların tartışmalı G380A mutasyonuna bağlı işitme kaybı olabileceği düşünülmektedir. Tóth ve ark. aynı durumdaki bir ailede mikrosatellit belirteçlerden yararlanarak yaptıkları çalışmada bu değişimin mutasyon olduğunu ifade etmişlerdir (80).

4.3 Connexin 26 Geninde Saptanan cSNP Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

Olgu grubumuzda mutasyonların yanısıra üç farklı nükleotid değişimi belirlenmiştir. Bunlar; G79A, G457A, C570T polimorfizmleridir.

G79A (V27I)

Cx-26 geninin 79. nükleotidinde guanin yerine adenin; protein ürününde ise 27. amino asit olan valin yerine izolösin geçmektedir. Bu çalışmada beş probandda G79A polimorfizmi saptanmıştır. Aynı zamanda, işitme kaybı olmayan kontrol grubunda da polimorfizm sıklığı yüksek olduğu saptandı. Bu polimorfizm özellikle Asya toplumlarında yaygın olarak gözlenmektedir. Tayvan’da normal bireylerden oluşan kontrol grubunda, 864 allelden 319’unda bu polimorfizmin varlığı rapor edilmiştir (84). Japonya, Kore, Moğolistan’da bu

SNP'nin bulunma sıklığı % 54-55 civarındadır (57). Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da saptanan oran Avrupa toplumlarından yüksektir (57). Avrupa toplumlarında bu mutasyonun sıklığı düşüktür. Beyaz ırkta yapılan bir çalışmada işitme kaybı olmadığı bilinen 96 kişilik kontrol grubunda 1 bireyde saptanmıştır (25). Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 olguluk çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 0.33 (10 allel) olarak bildirilmiştir (81). Her ne kadar Avrupa toplumlarında bu değişim allelik frekanstan hareketle mutasyon olarak tanımlanabilse de (% 1' in altında), Asya toplumlarındaki % 50' leri aşan oranların varlığı, değişimin "founder effect" ya da genetik sürüklenme ile belirli popülasyonlarda birikim göstermiş olabileceğini düşündürmektedir..

G457A (V153I)

Bu değişimi çeşitli araştırmacılar mutasyon sınıfına da konulmaktadır. Örneğin Fransa'da yapılan bir çalışmada 159 ailede bir probandda heterozigot G457A değişimi saptanmış, olgunun işitme kaybının orta derecede olduğu bildirilmiştir (79). Tayland'da yapılan diğer bir çalışmada ise 166 olguda üç heterozigot mutasyon taşıyan, sporadik, ileri derecede işitme kaybı olan bir birey bildirilmiştir (87). Farklı olarak Çek'lerde 156 olguda beş bireyde heterozigot polimorfizm (1), Sudan ve Kenya'da 183 olguda iki bireyde polimorfizm olarak bildirilmiştir (22). Tüm Avrupa ülkelerini kapsayan 1,531 olgudan oluşan çalışmada allelik frekans; 3,062 allelde % 0.16 (5 allel) olarak bildirilmiştir (81).

Çalışmamızda bir olguda heterozigot G457A değişimi saptandı. Ülkemizde bu değişim bildirilmemiştir. Bunun yanısıra, kontrol grubunda da polimorfizm sıklığı yüksek saptandı.

C570T (V190I)

Polimorfizmlerin bildirildiği veri tabanında polimorfizm olarak rapor edilen bu değişime, çalışmamızda bir olguda tek allelde saptandı. Ülkemizde bu değişim bildirilmemiştir. Kontrol grubunda da V190I değişimi saptanmamıştır.

4.4 Ülkemizde *GJB2* Geniyle İlgili Çalışmalar ve Saptanan Değişimler

Ülkemiz Avrupa-Asya geçişinde ve göç yolları üzerinde yer aldığından her iki toplumunda popülasyon havuzunda bulunan mutasyon ve polimorfizmleri barındırmaktadır. Buna karşın, Asya ve Yahudi popülasyonlarda sıklıkla görülen, sırasıyla 235delC ve 167delT

Tablo 4.3 Ülkemizde işitme kaybı olan olgularda saptanan GJB2 mutasyon ve polimorfizmlerin oranlarının bu çalışma ile karşılaştırılması. İtalik yazılan ve altı çizilmiş değişimler polimorfizmdir. Kalın yazılmış değişimler ise bu çalışmada gösterilen değişimlerdir.

Referans→ Mutasyon	(78) (Aile)	(76) (Kişi)	(57) (Kişi)	(75) (Kişi)	(74) (Aile)	Bu Çalışma	Toplam Oranı (%)	Bu Çalışma Oran(%)
35delG -/-	1/14	48/235	37/256	13/60	20/93	7/88	18.09	7.95
35delG +/-	-	5/235	21/256	2/60	-	9/88	5.08	10.23
35delG/167delT	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
35delG/236_239 delTGCA insAGATCCG	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
35delG/G79A	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
35delG/T269C	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
35delG/P184R	-	-	-	-	1/93	-	1.07	-
35delG/310del14	-	-	-	-	1/93	-	1.07	-
35delG/P173S	-	-	-	-	1/93	-	1.07	-
35delG/Q80K	-	-	-	-	1/93	-	1.07	-
G71A -/-	-	-	-	1/60	3/93	-	2.61	-
G71A +/-	-	-	-	1/60	-	-	1.67	-
<u>G79A +/-</u>	-	-	3/256	-	-	5/88	1.17	5.68
<u>G79A -/-</u>	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
<u>V27I;E114G/+</u>	-	-	1/256	-	-	-	0.39	-
A88G +/-	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
247delTTC +/-	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
299-300delAT -/-	1/14	-	-	-	-	-	-	-
299-300delAT +/-	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
310del14 -/-	-	-	-	-	1/93	-	1.07	-
233delG -/-	-	-	-	1/60	-	-	1.67	-
A239G -/-	-	-	-	1/60	-	-	1.67	-
T269C +/-	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
120delE -/-	-	-	1/256	1/60	1/93	-	0.73	-
120delE +/-	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
G380A +/-	-	-	-	1/60	-	1/88	1.67	2.28
M163V +/-	1/14	-	-	-	-	-	-	-
<u>G457A +/-</u>	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14
<u>C570T +/-</u>	-	-	-	-	-	1/88	-	1.14

mutasyonları saptanamamıştır. Ülkemiz bu bağlamda beyaz ırk, Avrupa toplumunda sık gözlenen 35delG mutasyonun yanısıra, Asya toplumlarında sık rastlanan G79A polimorfizmlerini barındıran karma bir populasyon havuzuna sahiptir.

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi ülkemizde çeşitli mutasyonlar ve polimorfizmler bildirilmiştir. Ege ve çevresinde ilk kez yapılan bu çalışmada, bir olguda aday mutasyon (247delTTC) saptanmıştır. Verilere genel olarak bakıldığında ülkemiz için ilk tanımlananlar hariç mutasyon sıklıkları benzerlik göstermektedir.

4.5 Çalışma Grubunda Saptanan Mutasyonların Kalıtım Örüntüsü

İşitme kayıplı olan olgularda saptanan mutasyonların, iki olgu dışında otozomal resesif olarak kalıtıldığı saptanmıştır (Tablo 4.1). Onbeş nolu olgunun 35delG mutasyonu için homozigot olduğu ve annenin bu mutasyonu taşımadığı saptanmıştır. Ancak bu olguda babanın kan örneğinden genomik DNA elde edilemediğinden, kalıtım örüntüsü tam olarak belirlenememiştir. Bu olguda annenin mutasyonu taşıyor olması, *de nova* mutasyon olasılığını akla getirmektedir (Tablo 4.1). Diğer bir olgu ise 79. proband, heterozigot 35delG mutasyonu taşıyan bireydir. Bu olgunun ailesinin tamamı işitme kayıplı olmasına rağmen anne ve diğer kardeşinde mutasyon saptanmamıştır. Babanın kan örneğindeki sorunlar nedeniyle genotipi bilinmemesine karşın olasılıkla bu delesyon babadan probanda aktarılmıştır. Diğer bir olasılık ise babada da bu mutasyona rastlanmayıp, *de nova* bir mutasyon olmasıdır (Tablo 4.1).

Tablo 4.4 İşitme kaybı görülen ailelerin 35delG ve diğer mutasyonlar bakımından kalıtım modelleri, akrabalık ilişkileri ve işitme kaybı öykülerinin sayısal olarak değerlendirilmesi. İK; işitme kaybı, OR; otozomal resesif.

Kriterler	35delG	Diğer	Toplam
Aile Sayısı	14	7	21
Akrabalık İlişkisi	4	4	8
İK Öyküsü	8	4	12
Akrabalık İlişkisi+ İK Öyküsü	3	3	6
İK Öyküsü ve Akrabalık yok	5	2	7
Kalıtım Modeli OR	12	7	19
Kalıtım Modeli <i>de nova</i>	2	0	2

Tablo 4.4’de mutasyon belirlenen tüm aileler bazında işitme kayıplarının akraba evlilikleri ve aile öyküleri ile ilişkilendirilmesinde önemli olduğu görülmektedir. 14 ailede işitme kaybı öyküsü ya da akrabalık ilişkisi gözlenmektedir. Bu bulgu mutasyonların resesif aktarılmasını açıklamaktadır. 35delG mutasyonu içinde akraba ilişkileri ve aile öykülerinin oldukça fazla olduğu görülmektedir.

4.6 Genetik Sürüklenme (Gene Drift), “Founder Effect” ve “Assortative Mating” Etkisinde Cx-26 Mutasyonlarının Toplumsal Olarak Değerlendirilmesi

35delG, 167delT ve 235delC mutasyonları dünya toplumlarında % 70 civarında Cx-26 üzerinde gözlenmekte ve mutasyonlar olup, bu mutasyonların görülme sıklıkları etnik kökenlere göre anlamlı bir farklılık göstermektedir. Farklı populasyonlarda farklı sıklıklarda gözlenmesine karşın, bu mutasyonların daha yaygın olarak öne çıkmasını açıklayan birkaç görüş bulunmaktadır. Bu yaklaşımlara göre; mutasyonel “hot spot”, gen sürüklenmesi (*gene drift*) ve “founder effect” kavramları ile açıklanmaktadır (4). Buna göre;

- 35delG: % 70 oranında Avrupa ve toplumlarında (27),
- 167delT: % 40 oranında Yahudi toplumlarında (15),
- 235delG: % 80 oranında Asya toplumlarında görülmektedir (88).

A.B.D’de işitme kayıplı olmayan populasyonda yapılan çalışmalar, Cx-26 geninde gözlenen tüm gen kusurları için taşınma sıklığının %3.5 düzeyine kadar çıktığını göstermiştir. Tüm bu yaklaşımların yanısıra işitme kayıplı bireylerin birbirleri ile seçimli olarak birleşmesi, gen havuzunda bu patolojik allellerin artmasında neden olmuştur. Örneğin, Bali Adaları Benkala bölgesinde *MYO15* geninin mutasyon prevalansı duyu yitimi olan olgularda % 2’dir. İşitme kaybı olmayanlarda bu gene ait mutasyonların taşınma sıklığı % 17’dir. Benkala’daki DNFB3 insidansı dünyaya göre 20 kattan daha fazladır. Bu durumun açıklaması ise; bölgenin ada modeli olması nedeniyle kısmi izolasyon ve işitme kayıplı bireylerin birbiriyle evlendirmeleri (“*assortative mating*”) sayılabilir. Bu örnekten de anlaşılacağı gibi toplumdaki mutasyon sıklıkları genetik kurallara uymaksızın yüksek çıkmaktadır. Bilindiği üzere, allelik frekansı populasyonlarda %1’in üzerinde gözlenen değişimleri SNP kategorisine

almaktayız. Ancak bu noktada özellikle “*assortative mating*” ve “*founder effect*” kavramlarına bağlı olarak frekans aralığı yukarı doğru çıkmaktadır (4).

Ülkemiz bir geçiş bölgesi üzerinde yer alması nedeniyle genetik çeşitliliğe açık bir populasyon havuzu barındırmaktadır. Ancak, beyaz ırkta birçok genetik nedene bağlı olarak sık görülen 35delG mutasyonuna benzer sıklıkta rastlanılmasına karşın diğer ırklara özgü 167delT ve 235delC mutasyonları saptanmadı. Tablo 4.5 ve 4.6’da ülkelere ait mutasyon sıklıkları verilmiştir.

Tablo 4.5 Ünelere göre 167delT mutasyon dağılımları (6); *(34)

Populasyon	Evren	Yüzde
Beyaz ırk*	50	0
Beyaz ırk (Amerika)*	271	0
Ashkenazi*	546	4
Afrikalı Amerikan*	171	0
Asyalı*	52	0
Fransa	119	0
İsrail Ashkenazi	113/467	24.2
İsrail Ashkenazi	20/268	7.46
İtalya	150	0
Japonya	209	0
Kore	100	0
Umman	280	0
İspanya	130	0
Türkiye	674	0
Amerika Ashkenazi	22/546	4.03
Amerika Ashkenazi	40/1012	3.95
Amerika Ortabatı	96	0

Tablo 4.6 Ünelere göre 235delC mutasyonu taşınma sıklığı (6); *(34)

Populasyon	Evren	Yüzde
Japonya *	50	0
Japonya*	96	2.1
Japonya*	203	1.0
Fransa	119	0
İsrail Ashkenazi	467	0
İtalya	150	0
Kore	100	1
İspanya	130	0

Beyaz ırkta Cx-26 üzerinde en yaygın olarak gözlenen 35delG mutasyonunun, bir “hot spot” bölge olabileceği öngörülmüştür. İkinci ekzonun 30-35. nükleotidleri arasında altı G

tekrarı olması, DNA polimeraz alfa için bir hata noktası olduğunu düşündürmüş ve bu bağlamda yapılan çalışmalarda *mutasyonel hot spot* kavramı ön planda tutulmuştur (25).

Ancak, diğer araştırmalar göstermiştir ki; 35delG bir “hot spot” mutasyondan çok “founder effect” ile populasyonda frekansı artmış bir mutasyondur. Birçok SNP belirteci kullanılarak yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen veriler bu bulguyu doğrulamaktadır (89,90).

Asya toplumlarında sık gözlenen 235delC mutasyonu için, beyaz ırkta gözlenen 35delG mutasyonunun taşınma durumu benzerlik göstermektedir. Beş farklı SNP belirteci ile yapılan bağlantı analizlerine göre, 235delC mutasyonu atasal bir mutasyon olup “founder effect” ile bu topluma özgül bir mutasyon haline gelmiştir (91).

Ülkemiz açık bir şekilde de görüleceği üzere beyaz ırkta gözlenen mutasyonları ve polimorfizmleri taşımaktadır. Özellikle G79A polimorfizmini yüksek oranda taşımaktadır. A88G mutasyonu daha önce bir Asya toplumunda tanımlanmış olması bakımından da ilginçtir.

4.7 Olgu Grubunda Mitokondri Genomundaki Mutasyonlara Yönelik Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Günümüze kadar ülkemizde mitokondriyal mutasyonların işitme kaybı ile ilişkisine yönelik yalnızca bir araştırma vardır. Buna göre işitme kayıplı olgular içerisinde A1555G ve A7445G mutasyonunun görülme sıklığı sırasıyla % 1.8 ve % 0’dır. Bir probandda ailesel olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7) (73).

Tablo 4.7 Ülkemizde yapılan çalışma sonuçları (73).

Mutasyon	Çalışılan kişi	Pozitif olgu	Oranı (%)
A1555G	168	3	1.8
A7445G	168	-	-

Bu mutasyonlar toplumlara göre % 1 ila 20 arasında olmaktadır (3,7). Özellikle, İspanya (8), Japonya (9), Moğolistan (10) gibi ülkelerde yüksek sıklıkta gözlenmektedir.

Çalışmamızda, 88 probandin tamamında yapılan A1555G ve A7445G mutasyon analizlerine tüm olgularda bu noktalarda bir değişime rastlanmamıştır.

4.8 İşitme Kaybı Bulunmayan Kontrol Grubunda Cx-26 Geni İkinci Ekzonda Saptanan Değişimler

Kontrol grubu olarak alınan 171 birey işitme duyusu bakımından herhangi bir problemi olmayan bireylerden oluşmaktadır. Çift yönlü DNA dizi analizi sonuçlarına göre dokuz farklı değişim saptanmıştır. Bu sonuçlara göre; belirlenen dokuz farklı değişimden ikisi literatürde olmayan değişimler (G647C ve C292T), üçü daha önceden mutasyon olarak bildirilmiş değişimler (G79A+A341G, T269C ve C493T) diğer dört değişim ise polimorfizm olarak tanımlanmış değişimlerdir (G478A, T101C, G79A ve G457A) (Tablo 3.8 ve 4.8).

Literatürde Tanımlı Olmayan Değişimler

Literatürde tanımlanmamış değişimlerden G647C bir olguda heterozigot olarak saptandı. Proteinde hücre içi alan üçte yer alan 216. amino asiti bazik argininin yerine nötral izolösin geçmektedir. İkinci olarak; C292T değişimi de bir olguda heterozigot olarak tanımlandı. Proteinde hücre içi alan ikide yer alan 98. amino asiti bazik arginin yerine nötral lösin geçmektedir. Bu iki aday SNP'de de bazik amino asitin yerine nötral başka bir amino asit geçmektedir.

Cx-26 proteinin hücre içinde kalan kısımlarında gözlenen bu değişimlerin, total protein yük dengesi değiştiği için minimal konformasyonel bir değişimin kaçınılmaz olduğu düşünülebilir.

Literatürde Mutasyon Olarak Tanımlanmış Değişimler

G79A+A341G değişimlerinin aynı bireyde birlikte görülmesi durumunda allel patolojik rapor edilmiştir (Ek1, Tablo E3). Tek başına G79A sık gözlenen bir SNP olup Uzakdoğu ülkelerinde taşınma sıklığı % 54-55 civarındadır (57). Çalışmamızda, iki kontrol DNA'sında heterozigot olarak saptandı. G79A değişiminde 27. amino asitte valin yerine izolösine geçmekte ve total yük değişmemektedir. Ancak 341. nükleotidde olan değişimde ise 114. amino asitte negatif yüklü glutamik asit yerine nötral glisin geçmektedir.

Tablo 4.8 Kontrol grubunda (171 birey) saptanan nükleotid değişimler ve bu değişimlerin allelik frekanslarına ait sayısal veriler.

Değişim	Birey Sayısı	Taşınma Sıklığı (%)	Allelik Frekans (%)
G79A	9	5.26	2.63
T101C	1	0.58	0.29
T269C	1	0.58	0.29
C292T	1	0.58	0.29
A341G	2	1.17	0.59
G457A	8	4.68	2.35
C493T	1	0.58	0.29
G478A	3	1.76	0.88
G647C	1	0.58	0.29
Toplam	27	15.78	7.90

Mutasyon olarak tanımlanan diğer bir değişim T269C (L90P) olup, bir kontrol DNA'sında heterozigot olarak saptandı (Ek1, Tablo E3). Değişimin, Avrupa toplumları kapsayan çalışmada işitme kayıplı olgulardaki allelik frekansın % 1.86 (3062 de 57 allel) olarak saptanması (81) ve *Xenopus* yumurtalarında yapılan çalışmalarda kanal yapısını bozduğu gösterilmesi (86) mutasyona yakın olduğunun göstergesidir. Olgu grubumuzda da bir bireyde heterozigot gözlenen bu mutasyonu taşıyan heterozigot ebeveyninde işitme kaybı saptanmamış olması yönüyle değerlendirildiğinde, kontrol grubuna ait bu birey içinde benzer bir durumun olabileceği düşünülebilir.

Proteinde 165. amino asit olan pozitif yüklü arjinin yerine nötral triptofanın geçtiği C493T değişimi (Ek1, Tablo E3), kontrol DNA'ların birisinde heterozigot ve aynı bireyde yine heterozigot G457A değişimi ile birlikte saptanmıştır. Rickard ve grubunun yaptığı bir çalışmada; Sri Lankalı bir olgunun C493T değişimi için heterozigot olduğu saptanmıştır. Olguda orta-ileri (3.grup) işitme kaybı rapor edilmiştir. Aynı ailede işitme kayıplı (3. grup) babada da heterozigot olarak taşınan bu değişimin dominant olarak kalıtıldığı düşünülmektedir. Ayrıca 40 normal bireyde bu değişime rastlanmamıştır (92).

İkinci hücre dışı alanda yüksek korunumlu bölgede yer alan bu amino asitin değişimi mutasyon olasılığını kuvvetlendirmekle birlikte, Rickard' ın çalışmasındaki kontrol sayısının

az olası tatmin edici değildir. Bizim çalışmamızda saptanan bu değişimde fenotipe yansıyan herhangi bir anormalliğin olmaması; eksik penetrans dominant kalıtım, ekspresite farklılığı veya fenotipe yansımayan mutasyon şeklinde yorumlanabilir.

Diğer Polimorfizmler

Diğer çalışmalarda SNP olarak tanımlanmış olan değişimlerden dördü (G79A, T101C, G457A ve G478A) bu çalışmanın kontrol grubunda da tanımlandı (Ek1, Tablo E5). Olgu grubunda belirlenen iki SNP (G79A ve G457A) bakımından, kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir.

Allelik frekans bakımından yüksek bulunan G79A değişimi ile ilgili olgu grubunda gözlenen SNP'ler kısmında genel bilgiler verildi. İlave olarak; Snoeckx ve çalışma grubunun verilerinde tüm Avrupa'da allelik frekansı % 0.33 (3062 de 10 allel) olarak rapor edilmiştir (81). Diğer taraftan, Asya kökenli ülkelerde bu oranın % 50'lere ulaştığı bilinmektedir (84). Avrupa ülkelerine göre daha fazla rastlanan bu değişimi, ülkemizin konumuna ve populasyon çeşitliliğine dayandırmak mümkündür. Özellikle korunumlu gen bölgelerinde görülen bu tür polimorfizmleri ortak bir geçmişe, coğrafyaya, gen havuzuna atıfta bulunmak olasıdır. Tayvan'da populasyonun yarısından fazlasında görülen bu SNP'yi genetik sürüklenme veya "founder effect" ile açıklamak mümkündür.

Kontrol grubunda belirlenen ikinci SNP, T101C (M34T) tartışmalı bir konumdadır. Bu değişim ilk saptandığında mutasyon olarak rapor edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalarda ile benign polimorfizm olduğunu düşündürmüştür. Fakat ilginç olarak bazen heterozigot ve nadir olarak homozigot bireylerde işitme kayıpları tespit edilmiştir (6). Snoeckx ve çalışma grubunun verilerinde ise tüm Avrupa için allelik frekans % 4.01 (3062 de 123 allel) gibi yüksek oranda saptanmıştır (81). Ülkemizde M34T amino asit değişimi sadece kontrol grubunda bir bireyde heterozigot gözlemlendi. M34T polimorfizminin ülkemizde düşük düzeyde gözlenmesi, G79A için yapılan tartışma ile uyumlu görünmektedir.

Allelik frekansı bakımından G79A polimorfizminden sonra ikinci sırada yer alan G457A (V153I) polimorfizmi çeşitli çalışmalara göre mutasyon olarak da bildirilmiştir. Bu çalışmalar ile ilgili detaylar olgu grubunda görülen polimorfizmler kısmında belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda sekiz bireyde heterozigot olarak saptanan bu değişimin (Allelik Frekans; 2.35; Taşınma Sıklığı; 4.68) polimorfizm olduğu teyid edilmiştir.

Kontrol grubunda saptanan son değişim G478A (G160S) tartışmalı olmasına rağmen polimorfizme yakın durmaktadır. Çalışmamızda üç bireyinde tek allelinde gözlenen bu SNP ülkemiz için ilk kez bildirilmiştir. Fransa’da yapılan çalışmada bir olguda heterozigot ve ileri işitme kaybı ile birlikte rapor edilmiştir (79). Sudan ve Kenya’da yapılan çalışmada bir olguda heterozigot saptanmış ancak tartışmalı bırakılmıştır (22). Avrupa toplumlarını kapsayan çok merkezli çalışmada hiçbir olguda rastlanmaması bakımından ilginçtir (81). Bu çalışmada kontrol grubunda 0.88 allelik frekansında saptanan bu değişimin benign bir mutasyon olduğu belirlenmekle birlikte; literatürde işitme kaybı fenotipiyle birlikte rapor edilen az nadir olgu, bu mutasyonun eksik penetrans ya da düşük ekspressivite özelliği gösteren bir kalıtım örüntüsü olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre popülasyonumuzda bazı SNP’lerin ön plana çıktığını görmekteyiz. Özellikle G79A değişiminde % 5.26 (n=171) taşınma sıklığı gen havuzunun profili açısından önemli ip uçları vermektedir. Buradan açılımla, gen havuzumuzun oluşumunda atasal faktörlerin, “founder effect” ve gen sürüklenmesinin izlerini görmekteyiz.

SONUÇ ve ÖNERİLER

İşitme kayıplarının görülme sıklığının 1/1000'den daha sık gözlenmesi ve bu hastalıktan muzdarip birey ve ailelerinin yaygınlaştığı gerçeğine dayanarak, özellikle ülkemiz için bu tür çalışmalardan elde edilecek verilerin doğrudan işitme kayıplı bireylerde olmasa da, sonraki kuşaklar için önemli bir önleyici tıp açılımı getireceği kanısındayız. Populasyondaki gen havuzunun tanınmasına yardımcı olan bu tür çalışmaların birikimi, ulusal mutasyon veri tabanların oluşumuna katkıda bulunacağı görüşündeyiz. Böylelikle, toplanan verilerin sonraki kuşaklarda oluşabilecek işitme kayıplarının önceden belirlenmesi ve yaşam koşullarını daha iyi olması sağlanabilecektir. Ülkemizde işitme kaybına yol açan ve en sık bulunan mutasyonlara ilişkin moleküler epidemiyolojik verilerin güvenilir olarak belirlenmesi, familial işitme kaybı bulunan olguların perinatal analizinin yapılabilirliğini ortaya koyacaktır. Böylece, prenatal ya da postnatal genetik analiz için endikasyon oluşturan lokuslar ve aynı lokus içindeki mutasyon türlerinin anlamlı bir panel haline getirilmesi mümkün olacaktır.

Elde ettiğimiz veriler iki bakımdan önemlidir. İlki, Ege bölgesi ve civarını kapsayan bu çalışma bu coğrafyadaki boşluğu doldurmaktadır. Verileri diğer çalışmalar ile birlikte değerlendirdiğimizde, mozaik populasyonumuzun yansımaları görmekteyiz. İkinci olarak, kontrol grubunda yaptığımız çalışma populasyonumuzdaki polimorfizmlere kaynak olacak konumdadır. Ülkemiz için yapılan çalışmalarda, olgu gruplarının yanısıra bu tür kontrol gruplarının da çalışılması verileri sağlamlaştırmaktadır.

Literatürde yeni tanımlanan bir delesyon (247delTTC) ve iki aday SNP (G647C ve C292T) bakımından da ilginçtir. Olgu sayısının 88, kontrol sayısının 171 olduğu bu çalışmada ayrıca ülkemiz için birçok yeni mutasyon ve SNP tanımlanmıştır.

Bulguların çalışma grubumuzdaki olgulara çok fazla bir katkı sağlamasa da, tek çocuklu ailelerde ikinci bir çocuk aşamasında genotipik durumları hakkında bilgi sahibi olmaları ve bu doğrultuda bilinçlenmeleri bakımından önemlidir. Ayrıca, olgulardaki Cx-26 ekzon iki değişimlerinin belirlenmesi, bu bireylerin kendi ailelerini kurduklarında aydınlanmış bir bilinçle hareket etmelerini sağlayacaktır. Bu noktada işitme kayıplı bireylerin ve ailelerinin bilgilendirilmesi ve bilinçlenmesi sağlanmıştır.

Duyu yitimlerinden sorumlu birçok gen ve bu genler üzerinde birçok mutasyon tanımlanmış durumdadır. Bu çalışma işitme kayıplarından en fazla sorumlu tutulan Cx-26 geni ekzon iki ile sınırlı kalmış gözükse de, bu gen üzerinde saptanan değişimlerin oranı

diğerlerine göre oldukça yüksek hatta en fazla mutasyon görüldür. Bunun yanısıra düşük düzeyde mitokondri genomunda görülen değişimlerin de işitme kayıplarındaki rolü bilinmesine karşın çalışmamızda mtDNA'da mutasyon saptanmamıştır.

İşitme kayıplarının bu iki önemli sorumlusunun yanısıra Cx-26 ile aynı lokusta bulunan ve birlikte hareket eden diğer iki gap junction proteini Cx-30 ve Cx-46 üzerindeki değişimlerde önemlidir. Özellikle Cx-30 kapsayacak şekilde 342 kb'lik delesyonların işitme kayıplarına neden oldukları bilinmektedir. Olgu grubunun bu delesyon bakımından incelenmesi mutasyona rastlanmayan grup hakkında bilgi verecektir. Yine, Cx-26 kodlanmayan birinci ekzonu ve intronik bölgedeki değişimlerin belirlenmesi de aynı derecede önemlidir.

Özellikle heterozigot olgularda görülen işitme kayıplarının açıklanmasında literatür yetersiz kalmakta, nitekim açıklamalarımızda yetersiz durmaktadır. Bu olguların ebeveynlerinin heterozigot olmasına rağmen probandlardaki gibi işitme kayıplı olmaması, bu durumun klasik genetik ile açıklanmasını olanaksız kılmaktadır. Bu bağlamda, olasılıkla protein-protein, protein-gen etkileşimleri devreye girmektedir. Bu olasılıkların deneysel olarak test edilmesi, bulanık olan kavramların açıklanmasına yardımcı olacaktır.

Özet olarak; çalışmanın bizim popülasyonumuzdaki polimorfizm ve mutasyonlara atıfta bulunması bakımından ve indeks olguların literatüre kazandırılması bakımından anlamlı olduğu görüşündeyiz. Bahsi geçen diğer açılımların da hayata geçirilmesi durumunda, işitme kayıplarının ortada kalan kısımlarına, yeni fikirler oluşturabileceğimiz kanısındayız. Veri birikimleri neticesinde işitme kayıplarının daha fetüs aşamasında belirlenebileceği ve önlemlerin önceden alınarak, bireylerin en az düzeyde mağdur olmalarına olanak sağlanacaktır. Tüm bu temennilerin gerçekleşmesinde ulusal verilerin doğru kullanımı ve yeterli teknik ve sistematik alt yapı çalışmaları ile mümkün olacaktır.

EK-1

Tablo E.1 Non-sendromik işitme kaybında tutulum gösteren genlerden şu ana kadar tanımlananlar. (7,13,11,38) (<http://davinci.crg.es/deafness/>).

<i>Otozomal Dominant non-sendromik lokuslar</i>				
Lokus	Lokalizasyon	Gen	Kodladığı molekül	İşitme kaybı grubu
DFNA1	5q31	<i>HDIA1</i>	Aktin polimerizasyonu	Post-lingual sensorinöral, progresif
DFNA2	1p33-p35	<i>GJB3</i>	Gap junction protein	Post-lingual
		<i>KCNQ4</i>	Voltaj kapılı potasyum kanalı	Post-lingual
DFNA3	13q12	<i>GJB2</i>	Gap junction protein	Pre-lingual
		<i>GJB6</i>	Gap junction protein	Pre-lingual
DFNA4	19q13.33(?)	<i>MYH14</i>	Sınıf 2 Non-muscle myosin ağır zinciri	Sensorinöral
DFNA5	7p15	<i>DFNA5</i>	Bilinmiyor	Post-lingual
DFNA6/14	1p16.3	<i>WFS1</i>	Zargeçer protein	Pre-lingual Sensorinöral
DFNA8/12	11q22-q24	<i>TECTA</i>	Tectorial memb yapısal elemanı	Bilinmiyor
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i>	Olasılıkla ECM proteini	Post-lingual sensorinöral, progresif
DFNA10	6q22.23	<i>EYA4</i>	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual, progresif
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i>	Motor molekül myosin	Post-lingual
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i>	Yapısal molekül	Pre-lingual non-progresif, sensorinöral
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i>	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual, progresif
DFNA17	22q12.2-13.3	<i>MHY9</i>	Non-muscle myosin ağır zinciri	Post-lingual, progresif
DFNA20/26	17q25.3	<i>ACTG1</i>	Alfa aktin	Sensorinöral, progresif
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	Motor molekül myosin	Post-lingual, sensorinöral
DFNA28	8q22	<i>TFCP2L3</i>	Transkripsiyon faktörü	Post-lingual, sensorinöral, progresif
DFNA36	9q13-q21	<i>TMCI</i>	Zargeçer protein	Post-lingual
DFNA38	4p16	<i>WFS1</i>	Wolframin proteini	Post-lingual, progresif
DFNA39	4q21	<i>DSPP</i>	Sialofosfoprotein	Sensorinöral, progresif
DFNA48	12q13-q14	<i>MYO1A</i>	Unconventional myosins	Post-lingual

Tablo E.1 (devam) Non-sendromik işitme kaybında tutulum gösteren genlerden şu ana kadar tanımlananlar. (7,13,11,38)

Otozomal Resesif non-sendromik lokuslar				
Lokus	Lokalizasyon	Gen	Kodladığı molekül	İşitme kaybı grubu
DFNB1	13q11-12	<i>GJB2</i>	Gap junction protein	Pre-lingual, sensorinöral
		<i>GJB6</i>		
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Motor molekül myosin	Pre-lingual
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15</i>	Motor molekül myosin	Pre-lingual
DFNB4	7q31	<i>PDS</i>	Klorit-iyot tranport proteini	Pre-lingual
DFNB6	3p14-p21	<i>TMIE</i>	156 aa protein	Pre-lingual
DFNB7/11	1q21-q23	<i>TMCI</i>	Zargeçer protein	Pre-lingual
DFNB8/10	21q22.3	<i>TMPRSS3</i>	Trnsmemb.Serin proteaz	Pre-lingual
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i>	Sinaptik vezikül elemanı	Pre-lingual
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>	Hücre adezyon proteini	Pre-lingual
DFNB16	15q15	<i>STRC</i>	protein-stereocilin	Pre-lingual, sensorinöral
DFNB18	?	<i>USH1C</i>	PDZ-domain-containing protein, harmonin	Pre-lingual, sensorinöral
DFNB21	11q23-25	<i>TECTA</i>	Tectorial memb yapısal elemanı	Pre-lingual, sensorinöral
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i>	Anchoring protein	Pre-lingual
DFNB23	10q21.1	<i>PCDH15</i>	Protochaderin 15	Pre-lingual
DFNB29	21q22	<i>CLND14</i>	Tight junction protein	Pre-lingual
DFNB30	10p12.1	<i>MYO3A</i>	Sınıf 3 myosin	Pre-lingual, progresif
DFNB31	9q32-34	<i>WHRN</i>	Whirlin proteini	Pre-lingual, sensorinöral
DFNB36	1p36.3	<i>ESPN</i>	Calcium-insensitive actin-bundling protein	Bilinmiyor
DFNB37	6q13	<i>MYO6</i>	Unconventional myosin	Konjenital
Cinsiyete bağlı non-sendromik lokuslar				
Lokus	Lokalizasyon	Gen	Kodladığı molekül	İşitme kaybı grubu
DFN1	Xq22	<i>DDP</i>	Mitokondriyal import protein	Post-lingual
DFN3	Xq21.1	<i>POU3F4</i>	Transkripsiyon faktörü	Konjenital

Tablo E.2 Connexin 26 (*GJB2*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili otozomal dominant mutasyonlar (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Dominant Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein Bölgesi
1	delE42	125delAGG	142. kodon (Glu) Delesyonu	EC1
2	W44S	G131C	44. kodon Trp→Ser	EC1
3	W44C	G132C	44. kodon Trp→Cis	EC1
4	R75Q	G224A	75. kodon Arg→Gln	EC1
5	R143Q	G428A	143. kodon Arg→Gln	TM3
6	M163L	A487C	163. kodon Met→Leu	EC2
7	D179N	G535A	179. kodon Asp→Asn	EC2
8	R184Q	G551A	184. kodon Arg→Gln	EC2
9	C202F	G605T	202. kodon Cys→Phe	TM4

Tablo E.3 Connexin 26 (*GJB2*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili otozomal resesif mutasyonlar (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Resesif Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	IVS1 G+1A	G-3172A	Splice site	-
2	G-3170A	G-3170A	Splice site	-
3	M1V (p.0)	A1G	Protein ürünü yok	IC1
4	T8M	C23T	8. kodon Tre→Met	IC1
5	31del14	31-45del14 nt	Frameshift	IC1
6	31del38	31-69del38 nt	Frameshift	IC1
7	G12V	G35T	12. kodon Gly→Val	IC1
8	35delG	30-35delG	Frameshift	IC1
9	30delG	30-35delG	Frameshift	IC1
10	35insG	30-35insG	Frameshift	IC1
11	35delG	30-35delG	Frameshift	IC1
12	K15T	A44C	15. kodon Lys→Thr	IC1
13	51del12insA	51-63 12 nt del ve insA	Frameshift	IC1
14	S19T	G56C	19. kodon Ser→Thr	IC1
15	I20T	T59C	20. kodon Ile→Thr	IC1
16	W24X	G71A	24. kodon Trp→Stop	TM1
17	V27I, E114G	G79A+A341G	27. kodon Val→Ile ve 114. kodon Glu→Gly	TM1+IC2
18	R32C	C94T	32. kodon Arg→Cis	IC1
19	R32H	G95A	32. kodon Arg→His	IC1
20	R32L	G95T	32. kodon Arg→Leu	IC1
21	V37I	G109A	37. kodon Val→Ile	TM1
22	A40E	C119A	40. kodon Ala→Glu	EC1
23	A40G	C119G	40. kodon Ala→Gly	EC1
24	W44X	G132A	44. kodon Trp→Stop	EC1
25	G45E	G134A	45. kodon Gly→Glu	EC1
26	E47X	G139T	47. kodon Glu→Stop	EC1
27	E47K	G139A	47. kodon Glu→Lys	EC1
28	167delT	167delT	Frameshift	EC1
29	Q57X	C169T	57. kodon Gln→Stop	EC1
30	176-191del16nt	176-192del 16nt	Frameshift	EC1
31	C64X	C192A	64. kodon Cys→Stop	EC1

No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
32	Y65X	C195G	65. kodon Tyr→Stop	EC1
33	Y65X	C195A	65. kodon Tyr→Stop	EC1
34	W77R	T229C	77. kodon Trp→Arg	TM2
35	W77X	G231A	77. kodon Trp→Stop	TM2
36	235delC	233-235delC	Frameshift	TM2
37	L79P	T236C	79. kodon Leu→Pro	TM2
38	Q80X	C236T	80. kodon Gln→Stop	TM2
39	Q80P	A239C	80Gln→Pro	TM2
40	Q80R	A239G	80. kodon Gln→Arg	TM2
41	I82M	C246G	82. kodon Ile→Met	TM2
42	V84L	G250C	84. kodon Val→Leu	TM2
43	S85P	T253C	85. kodon Ser→Pro	TM2
44	A88S	G262T	88. kodon Ala→Ser	TM2
45	L90V	C268G	90. kodon Leu→Val	TM2
46	L90P	T269C	90. kodon Leu→Pro	TM2
47	269insT	269insT	Frameshift	TM2
48	M93I	G279A	93. kodon Met→Ile	TM2
49	V95M	G283A	95. kodon Val→Met	IC2
50	Y97X	Tanımlanmamış	97. kodon Tyr→Stop	IC2
51	290-291insA	Frameshift	Frameshift	IC2
52	H100Y	C298T	100. kodon His→Tyr	IC2
53	299-300delAT	299del AT	Frameshift	IC2
54	H100L	A299T	100. kodon His→Leu	IC2
55	302del3	302delAGA	102delLys	IC2
56	E101G	A302G	101. kodon Glu→Gly	IC2
57	310del14	314-328del 14 nt	Frameshift	IC2
58	312del14	312-326del 14 nt	Frameshift	IC2
59	314del14	310-324del 14 nt	Frameshift	IC2
60	333-334delAA	333-335del AA	Frameshift	IC2
61	S113R	T339G	113. kodon Ser→Arg	IC2
62	delE120	360del GAG	119-120del Glu	IC2
63	K122I	A365T	122. kodon Lys→Ile	IC2
64	Q124X	C370T	124. kodon Gln→Stop	IC2
65	R127H	G380A	127. kodon Arg→His	IC2
66	W133X	G398A	133. kodon Trp→Stop	IC2
67	Y136X	C408A	136.kodon Tyr→Stop	IC2
68	S139N	G416A	139.kodon Ser→Gln	IC2
69	R143W	C427T	143.kodon Arg→Trp	TM3
70	E147K	G439A	147.kodon Glu→Lys	TM3
71	E147X	G439T	147.kodon Glu→Stop	TM3
72	469delG	469delG	Frameshift	EC2
73	486insT	486insT	Frameshift	EC2
74	R165W	C493T	165.kodon Arg→Trp	EC2
75	504insAAGG	504ins AAGG	Frameshift	EC2
76	509del14	509-523del 14 nt	Frameshift	EC2
77	509insA	509insA	Frameshift	EC2
78	515del17	515-532del 17 nt	Frameshift	EC2
79	W172X	G516A	172.kodon Trp→stop	EC2
80	C174R	T520C	174.kodon Cys→Arg	EC2
81	P175T	C523T	175. kodon Pro→Thr	EC2
82	V178A	T533C	178. kodon Val→Ala	EC2
83	R184W	C550G	184. kodon Arg→Trp	EC2
84	R184P	G551C	184. kodon Arg→Pro	EC2

No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
85	572delT	572delT	Frameshift	EC2
86	S199F	C596T	199. kodon Ser→Phe	TM4
87	605ins46	605-651ins 46 nt	202. kodon Stop	TM4
88	I203K	TC608AA	203.kodon Ile→Lys	TM4
89	N206S	A617G	206. kodon Gln→Ser	IC3
90	631delGT	631-632del GT	Frameshift	IC3
91	L214P	T641C	214. kodon Leu→Pro	IC3
92	645-648delTAGA	645del TAGA	frameshift	IC3

Tablo E.4 Connexin 26 (*GJB2*) için tanımlanmış non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili kalıtımı bilinmeyen mutasyonlar (<http://davinci.org.es/deafness/>)

Kalıtımı Bilinmeyen Mutasyonlar				
No	Mutasyon Adı	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
1	IVS1-12C>T	Exon 2C-12T	Bilinmiyor	?
2	N54I	A161T	54. kodon Asn→Ile	EC1
3	V84A	T251C	84. kodon Val→Ala	TM2
4	T123N	C368A	123. kodon Thr→Asn	IC2
5	E129K	G385A	129. kodon Glu→Lys	IC2
6	Y155X	T465A	155. kodon Tyr→Stop	TM3
7	M163V	G487A	163. kodon Met→Val	EC2
8	A171T	G511A	171. kodon Arg→Tre	EC2
9	F191L	T571C	191. kodon Phe→Leu	TM4
10	A197S	G589T	197. kodon Ala→Ser	TM4

Tablo E.5 Connexin 26 geninde gözlenen polimorfizmler (<http://davinci.crg.es/deafness/>)

Polimorfizm	Açıklama	Frekans	Protein bölgesi
Exon1 -493del10	493-503del10bp 5' exon1	?	5' UTR
T-3558C	T-3558C	?	5' UTR
C-15T	C-15T	?	5' UTR
V27I	G79A	?	TM1
I30I	T90A/C	?	TM1
M34T	T101C	1.72%	TM1
A40A	A120C	?	EC1
R127H	G380A	?	IC2
S72C	C215G	?	EC1
Q80Q	G240A	?	TM2
F83L	C249G	3/200 kontrol kromozom	TM2
L89L	C267A	?	TM2
R104R	A310C	1/420 kromozom	IC2
E114G	A341G	?	IC2
T123A	A367G	?	IC2
I128I	C384T	1%	IC2
V153I	G457A	4/367 kontrol (1%)	TM3
G160S	G468A	2/200 kontrol kromozom	EC2
C169Y	G506A	?	EC2
V182V	G546?	?	EC2
V190V	C570T	Tanımlanmamış	EC2
I203T	T608C	?	TM4
C/T at 682	C682T	?	3' UTR
C/T at 765	C765T	?	3' UTR
<i>Hastalıkla bağlantısı bilinmeyen değişiklikler</i>			
IVS1-12C>T	C-12T exon 2	Bilinmiyor	?
N54I	A161T	Tanımlanmamış	EC1
H73R	A218G	?	EC1
V84A	T251C	?	TM2
S85Y	C254A	Tanımlanmamış	TM2
R98Q	G293A	?	IC2
313-314delAA	313del AA	Tanımlanmamış	IC2
314delA	314del A	Tanımlanmamış	IC2
360delG	360del G	Tanımlanmamış	IC2
T123N	C368A	?	IC2
R127C	C379T	?	IC2
E129K	G385A	?	IC2
Y155X	T465A	?	TM3
M163V	G487A	1/192 NSHL kromozom	EC2
A171T	G511A	Tanımlanmamış	EC2
F191L	T571C	Tanımlanmamış	TM4
A197S	G589T	1/730 etkilenmiş kromoz.	TM4
K224Q	A670C	?	IC3

EK-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Çalışma Başlığı: Kalıtsal ve non-sendromik işitme kaybı olgularının aday lokuslardaki mutasyonel analizi.

İşitme kaybı toplumlarda çok sık rastlanan, konuşma geriliği ve bozukluğu ile kendini gösteren bir rahatsızlıktır. Bu rahatsızlık ailesel olarak veya çeşitli antibiyotiklerin gebelik öncesi ve gebelik sırasında kullanılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Hastalık anne veya babadan geçebilmektedir. Ancak, anne ve babada herhangi bir işitme kaybı yoksa ve çocuk işitme kayıplıysa, akrabalarından (dede, amca, teyze, hala vs.) herhangi birinde işitme kaybı bulunabilir ve rahatsızlık yine ailesel yolla geçmektedir. Fakat akrabalarda işitme kaybı yoksa bunun antibiyotik ilaç kullanımının neden olduğu düşünülmektedir. Hastanızda var olan işitme kaybının olası nedenleri konusunda bu çalışma size yardımcı olacaktır. İşitme kaybı konusunda bilinçlenmeniz, diğer çocuklarınızda önceden önlem alınmasına yardımcı olacaktır.

Yapmayı düşündüğümüz bu çalışmada işitme kaybı olan bebek, çocuk veya erişkinlerden ve bu bireylerin anne babalarından 5 ml toplardamar kanı alınıp hücreler ayrıştırılarak genetik inceleme yapılacaktır. Analiz sonrası gerekli veriler elde edildikten sonra sizden alınan kan imha edilecektir. İşitme kayıplarına ilişkin testler DEÜ Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı İşitme-Konuşma-Denge Ünitesinde yapılacaktır. Genetik inceleme ise DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yürütülecektir.

Bu çalışmada size herhangi bir ilaç verilmeyecek ve görmekte olduğunuz tedavi değiştirilmeyecektir. Bu işlemin kan alınması dışında sizin üzerinizde hiçbir etkisi olmayacaktır. Kan alınması sırasında en sık görülen yan etkiler, kolunuzda iğne yerinde ağrı ve morarmadır.

Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmaktasınız. Çalışmaya katılmamakta veya çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu çalışmaya katılmamanız veya başladıktan sonra herhangi bir noktada ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ücret ödenmeyecek ve sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

Bu çalışmada yer aldığımız süre içindeki kayıtların yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız her zaman kesinlikle gizli tutulacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız çalışmayı yürüten araştırmacılara, kurumun etik komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz (örneğin yaş...) yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri yayınlanabilir, ancak herhangi yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılmayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum ve bu formun bir kopyasını aldım.

Gönüllünün (Velayet sahibinin);

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Adres/Tel:

İmza:

*Hasta küçük çocuk ise velayet sahibi belirtilecektir.

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Sorumluları

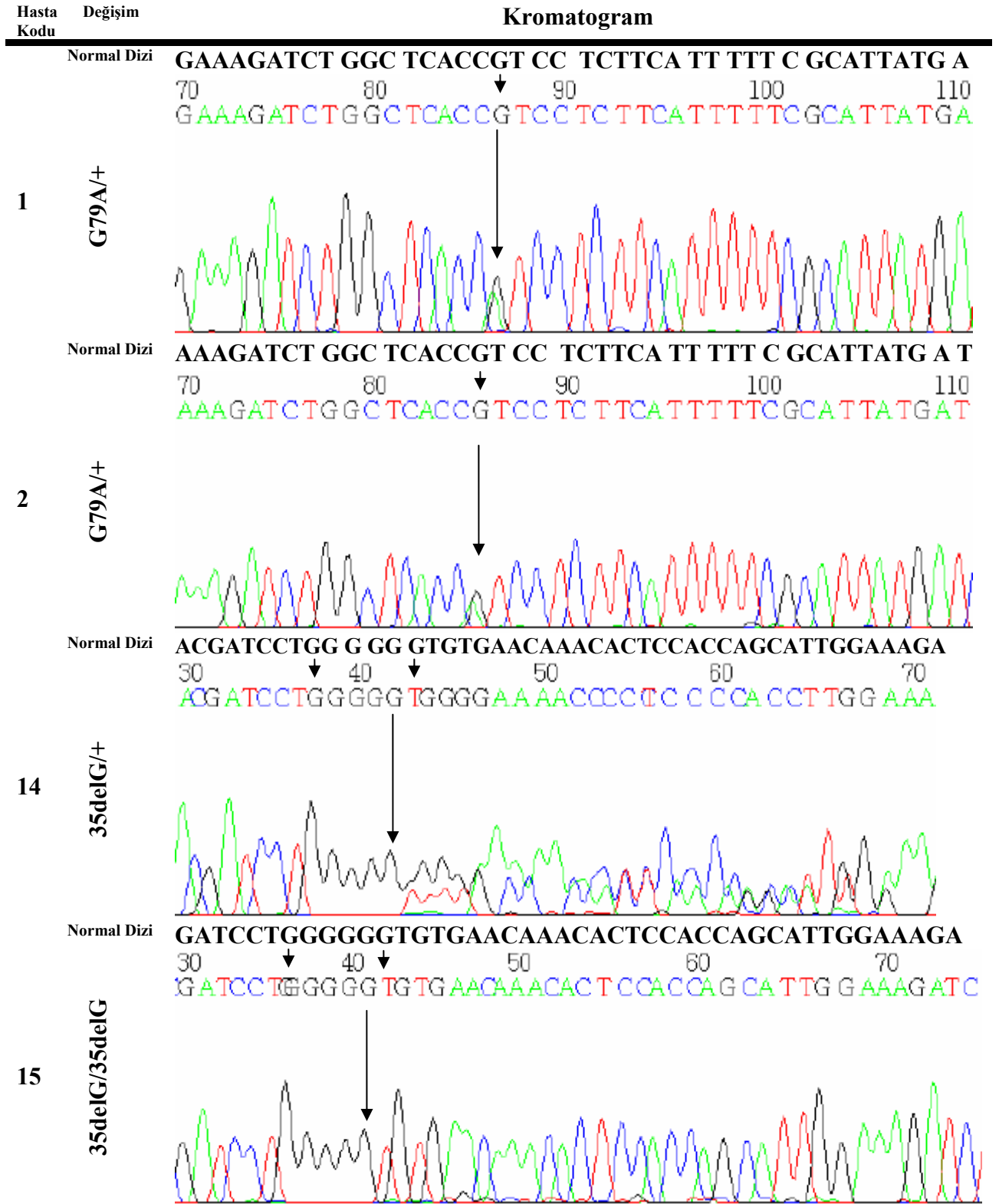
Yard. Doç. Dr. Oğuz Altungöz
Tel: 0 232 412 46 05

Doç. Dr. Bülent Şerbetçioğlu
Tel: 0 232 412 3255

Ar. Gör. Sait Tümer
Tel: 0 232 412 46 21

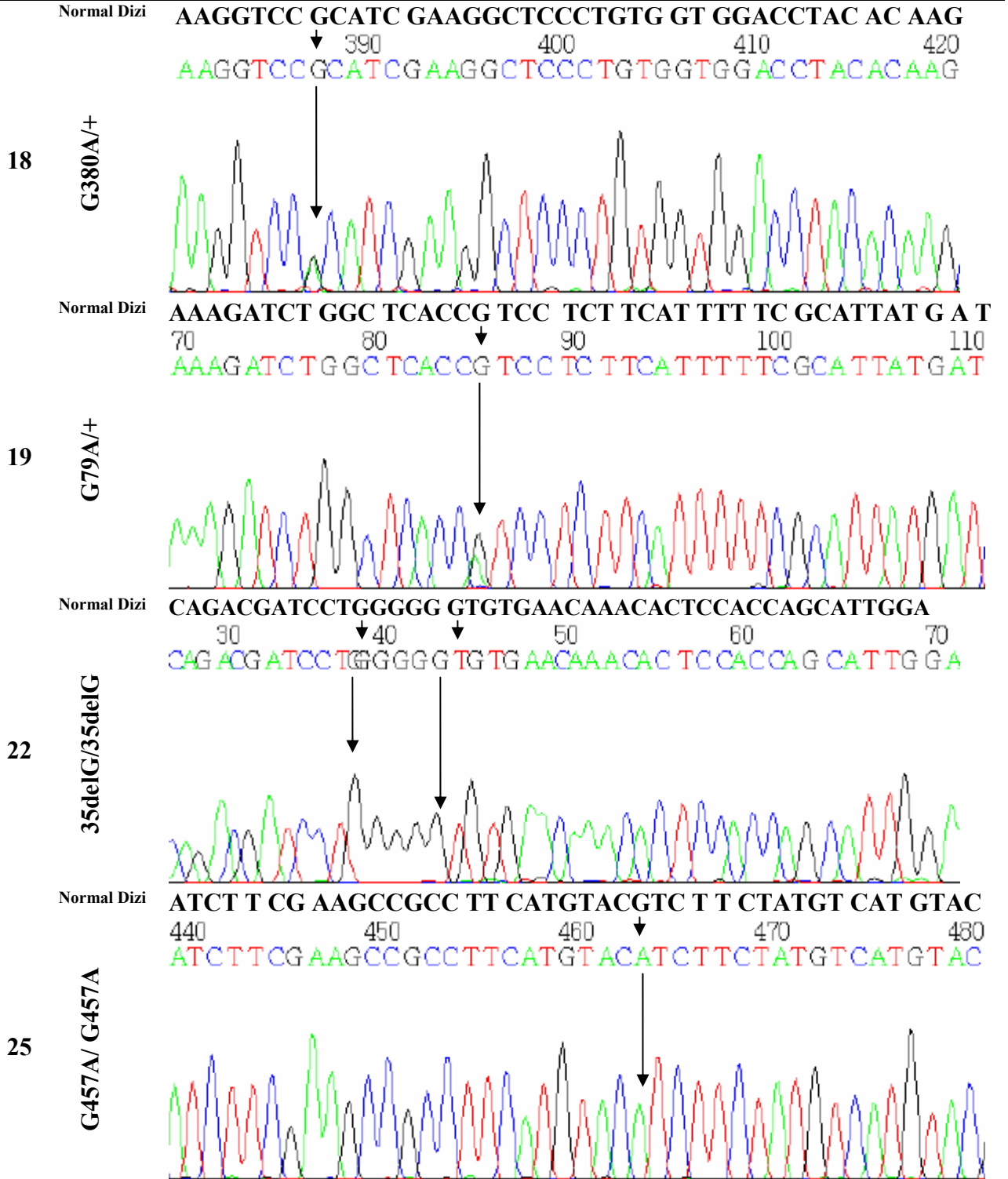
Dr. Odyolog Günay Kırkım
Tel: 0 232 412 32 92

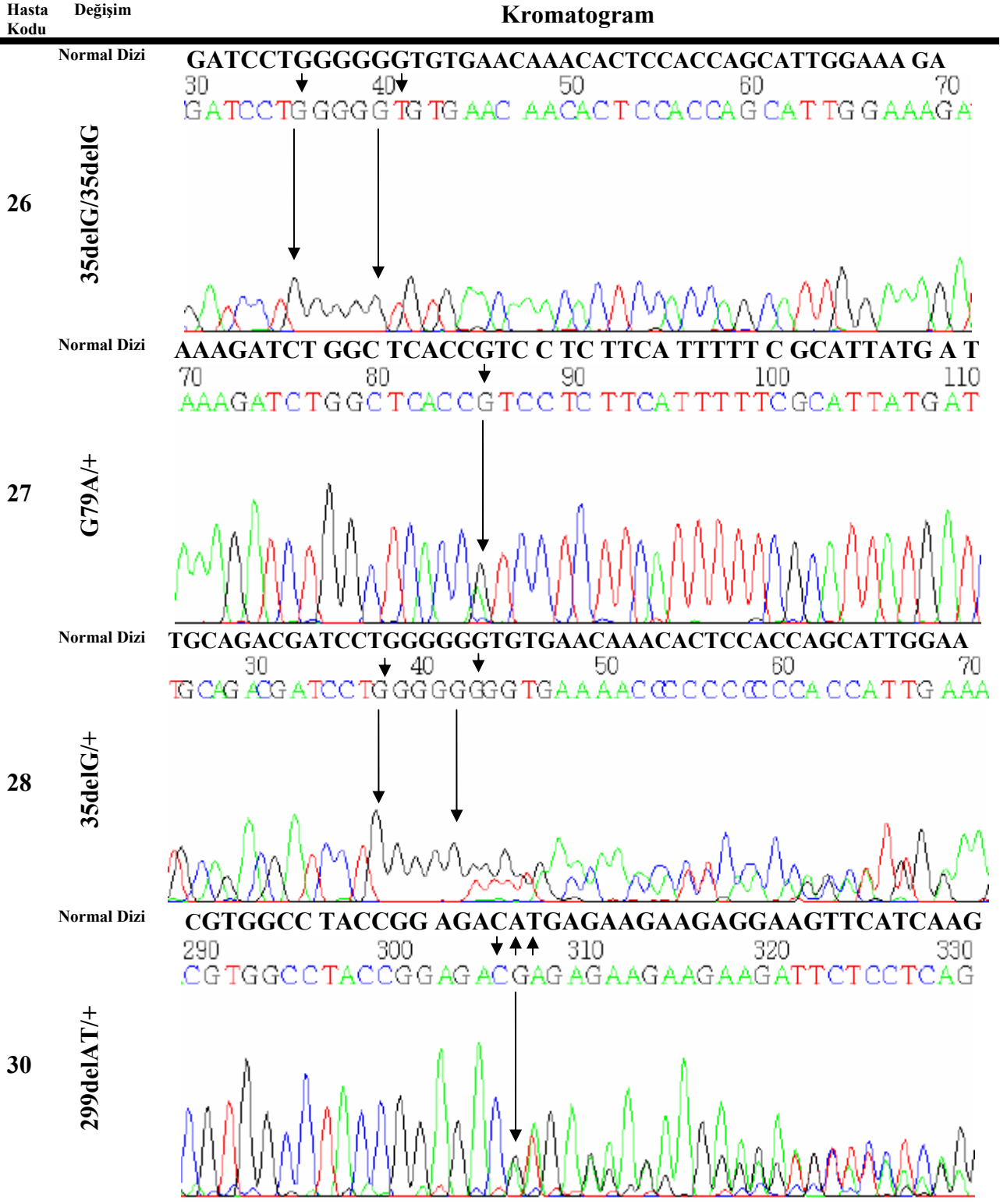
EK-3 Probandlara ait saptanan değişimlerin kromatogramlardaki görünümü.



Hasta Değişim
Kodu

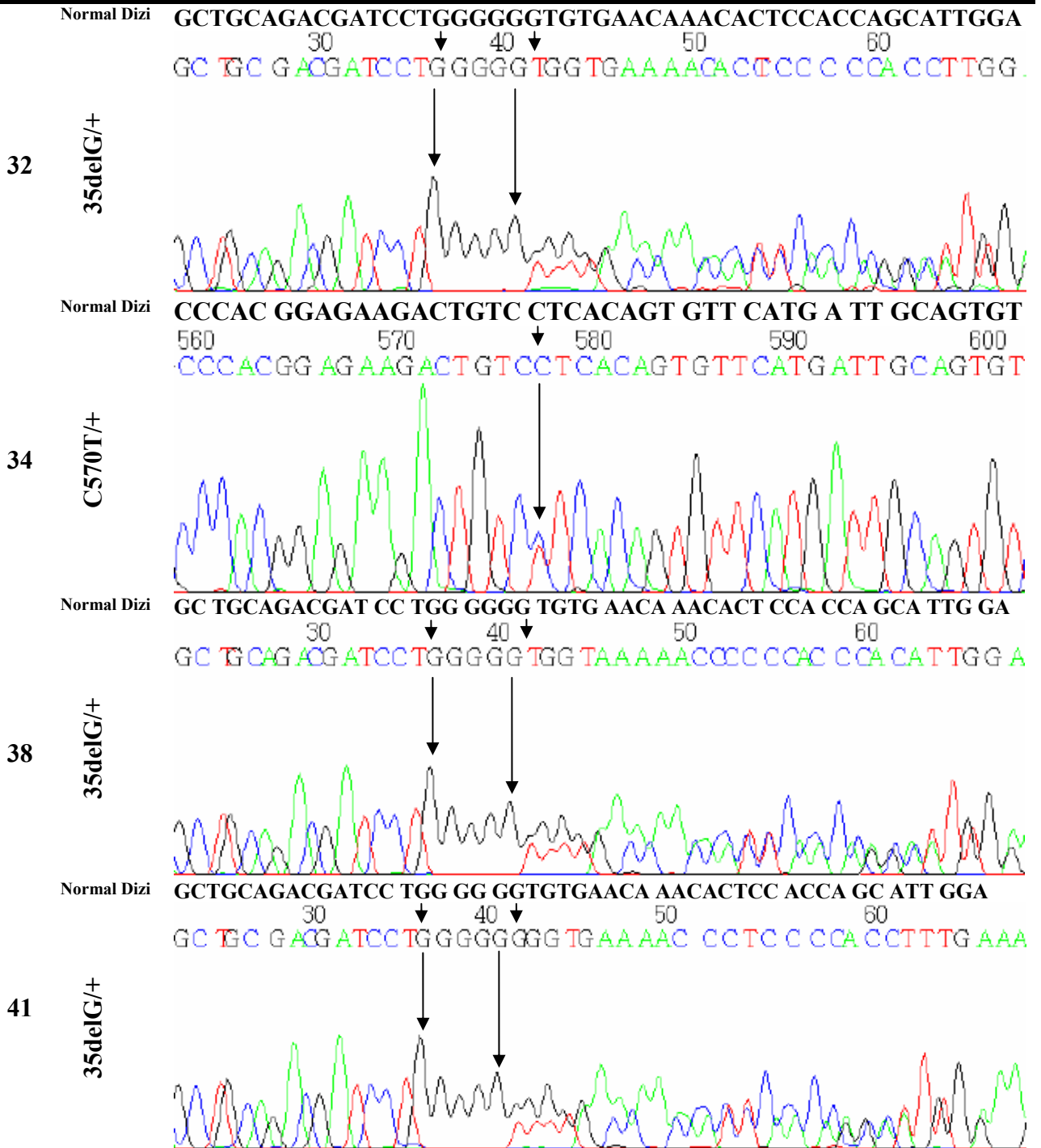
Kromatogram





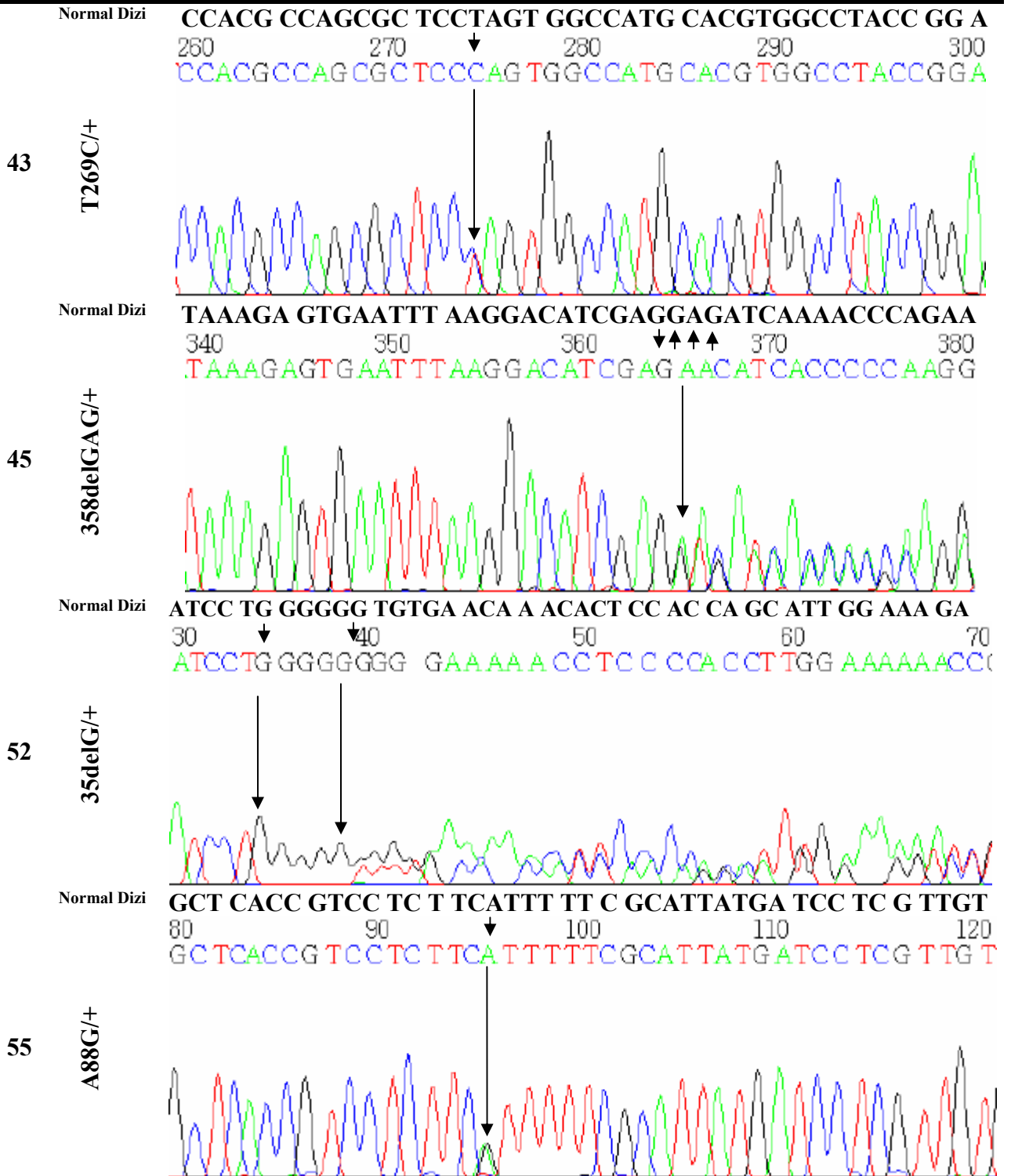
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



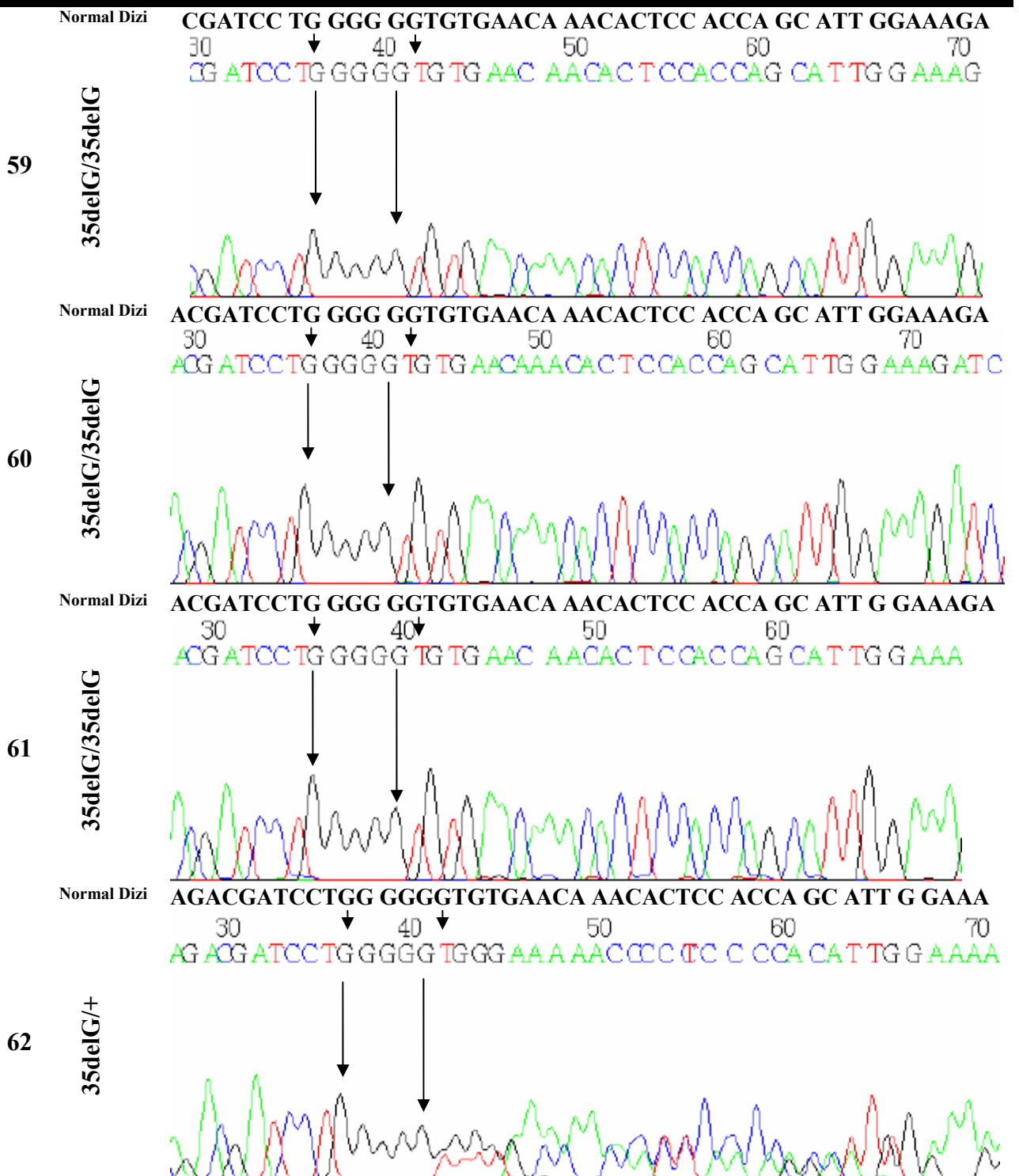
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



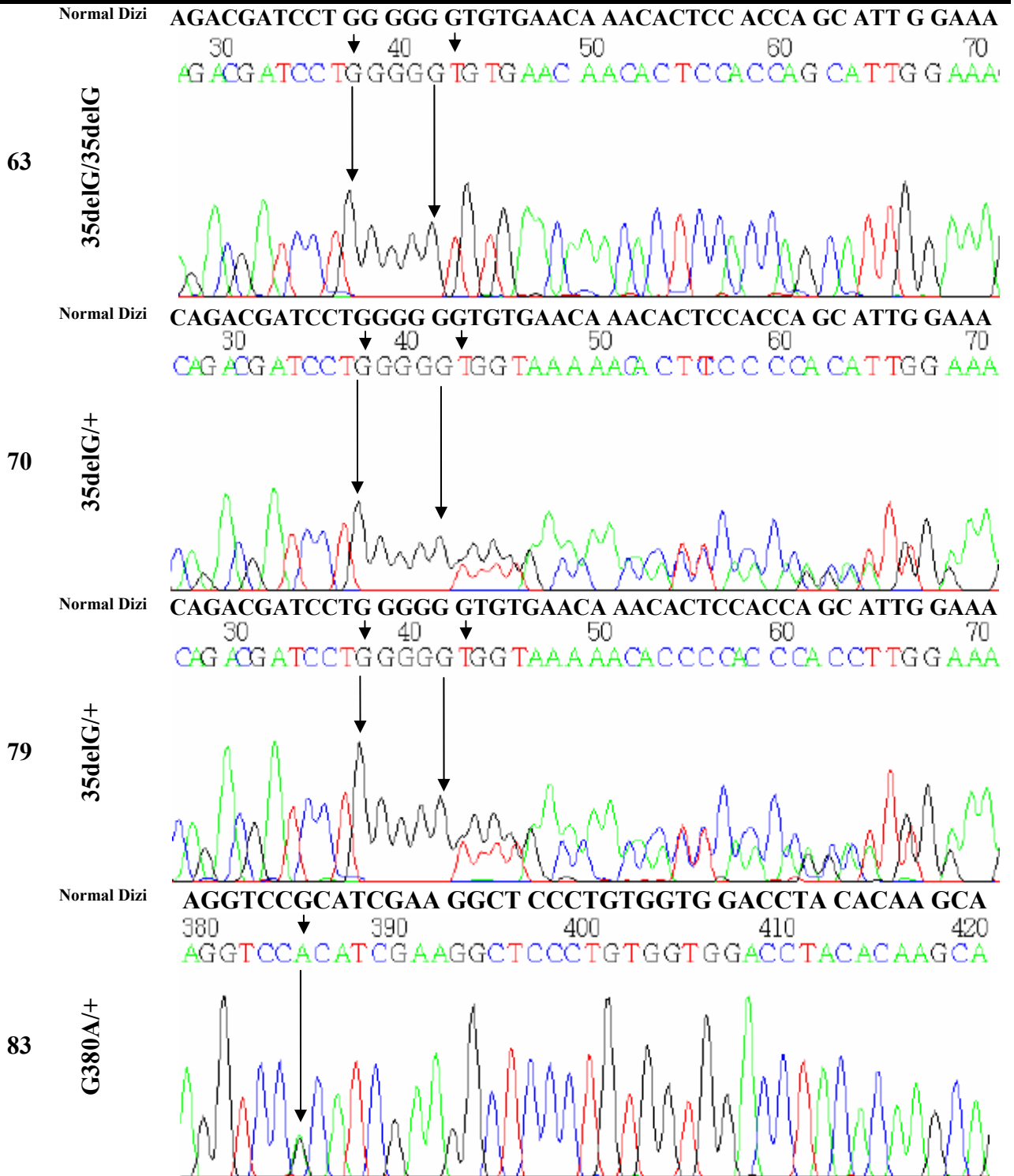
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



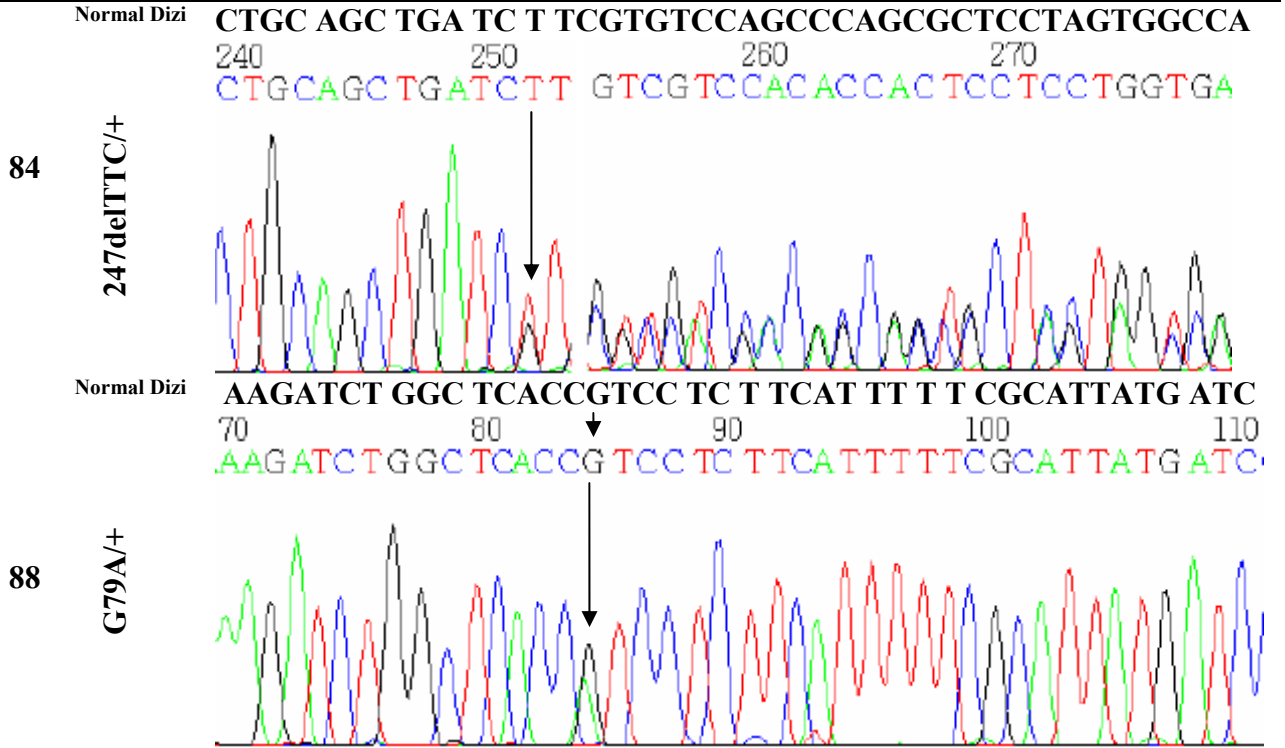
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram

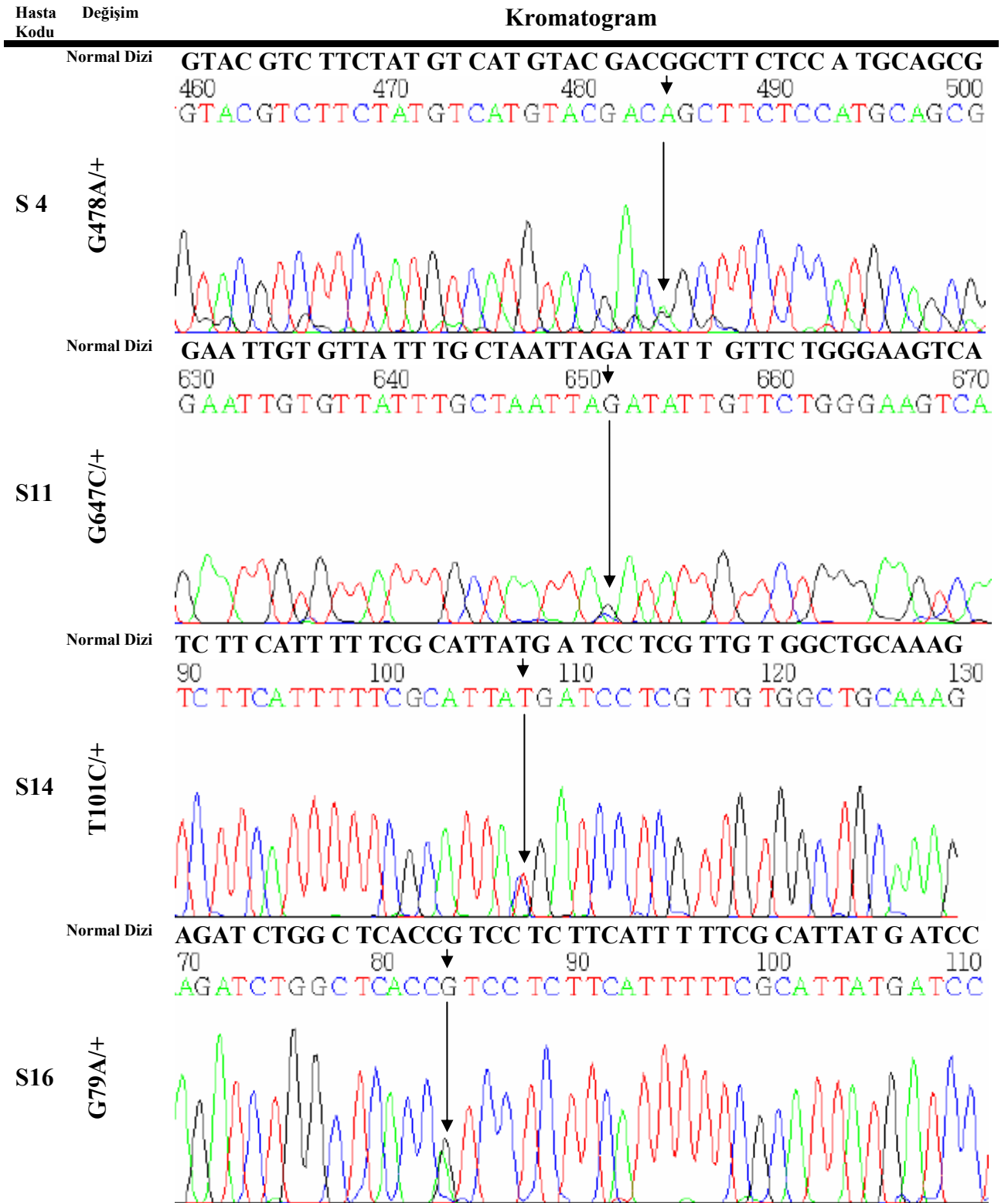


Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram

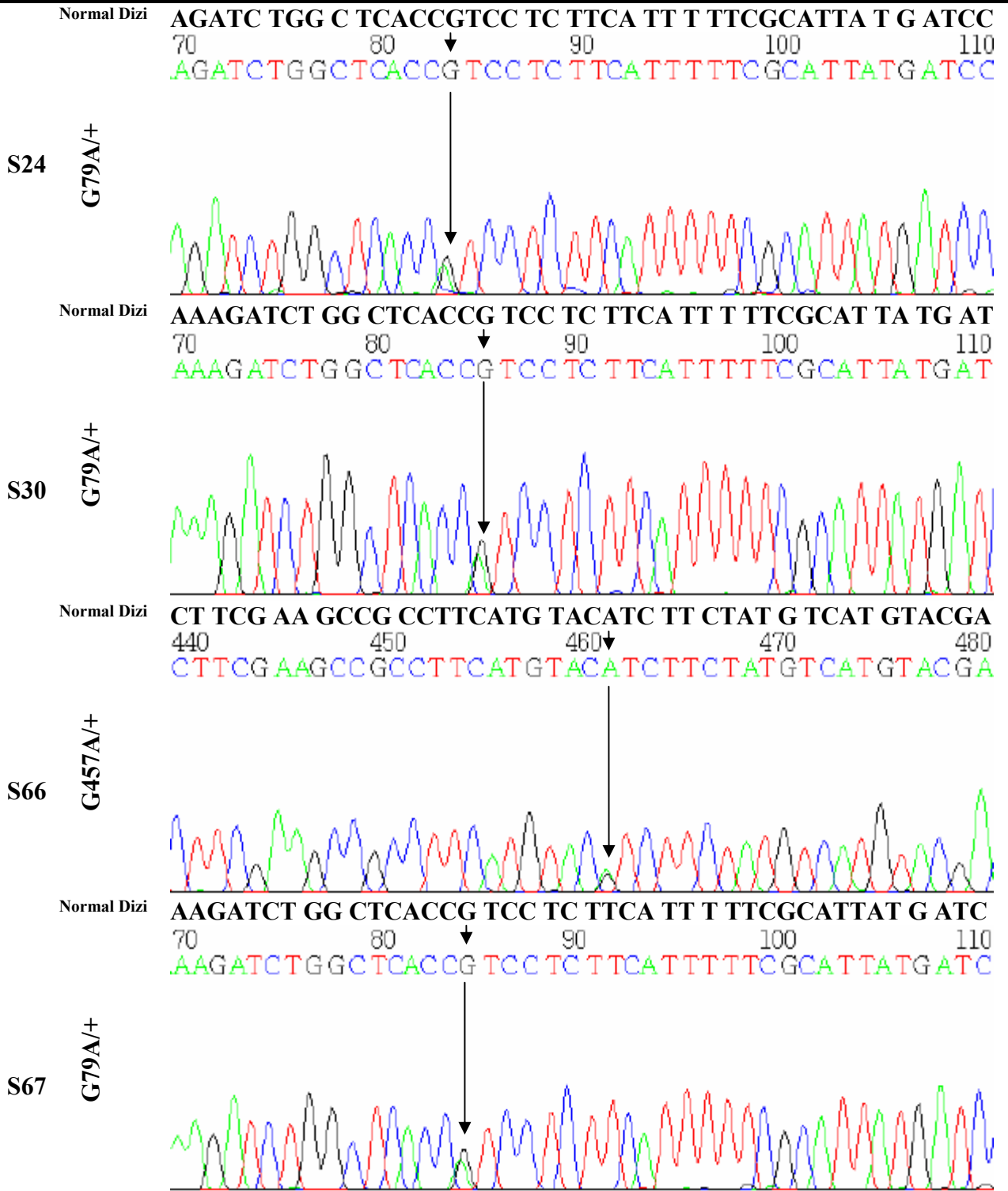


EK 4 Kontrol grubunda saptanan değişimlerin kromatogramlardaki görünümü



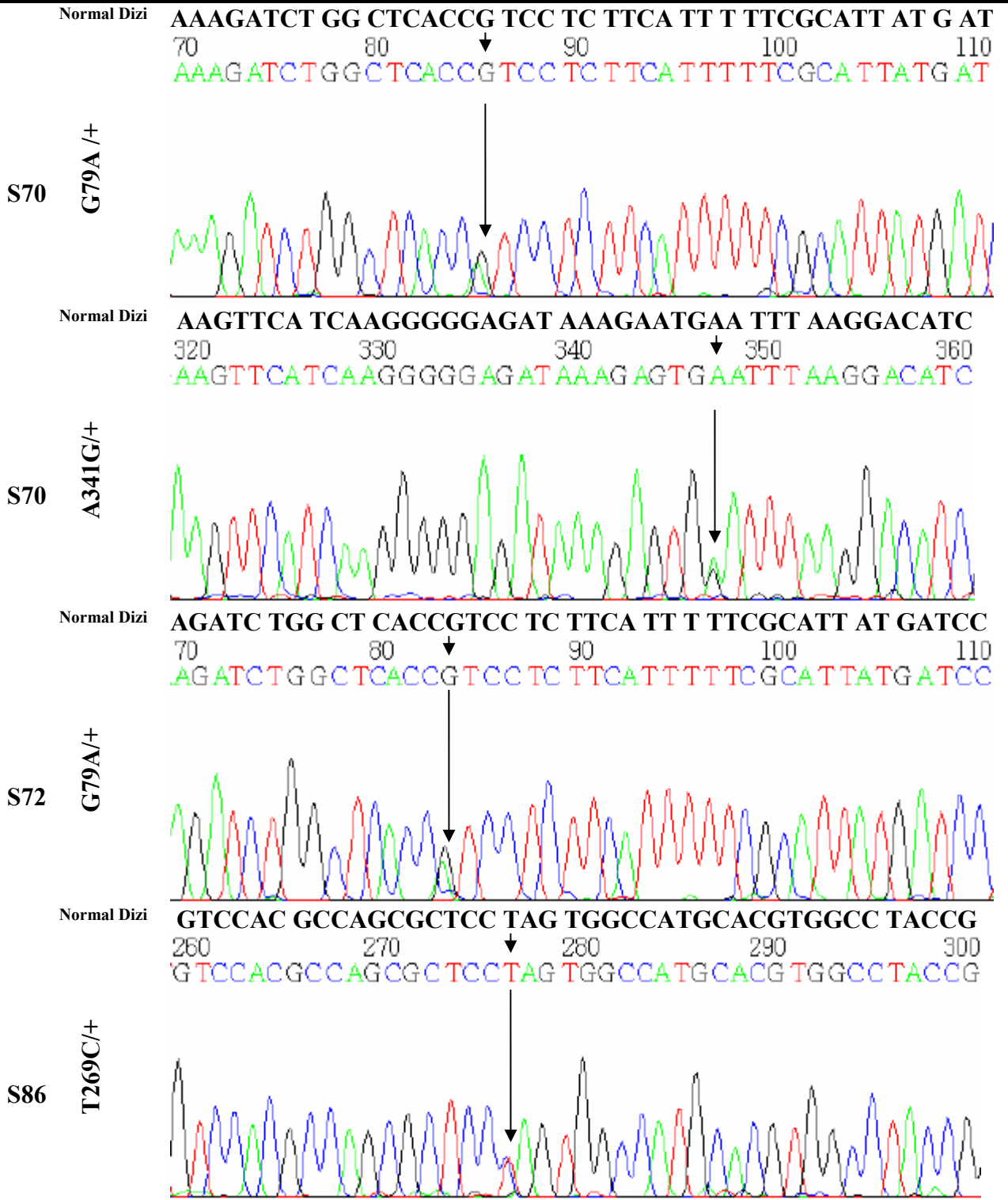
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



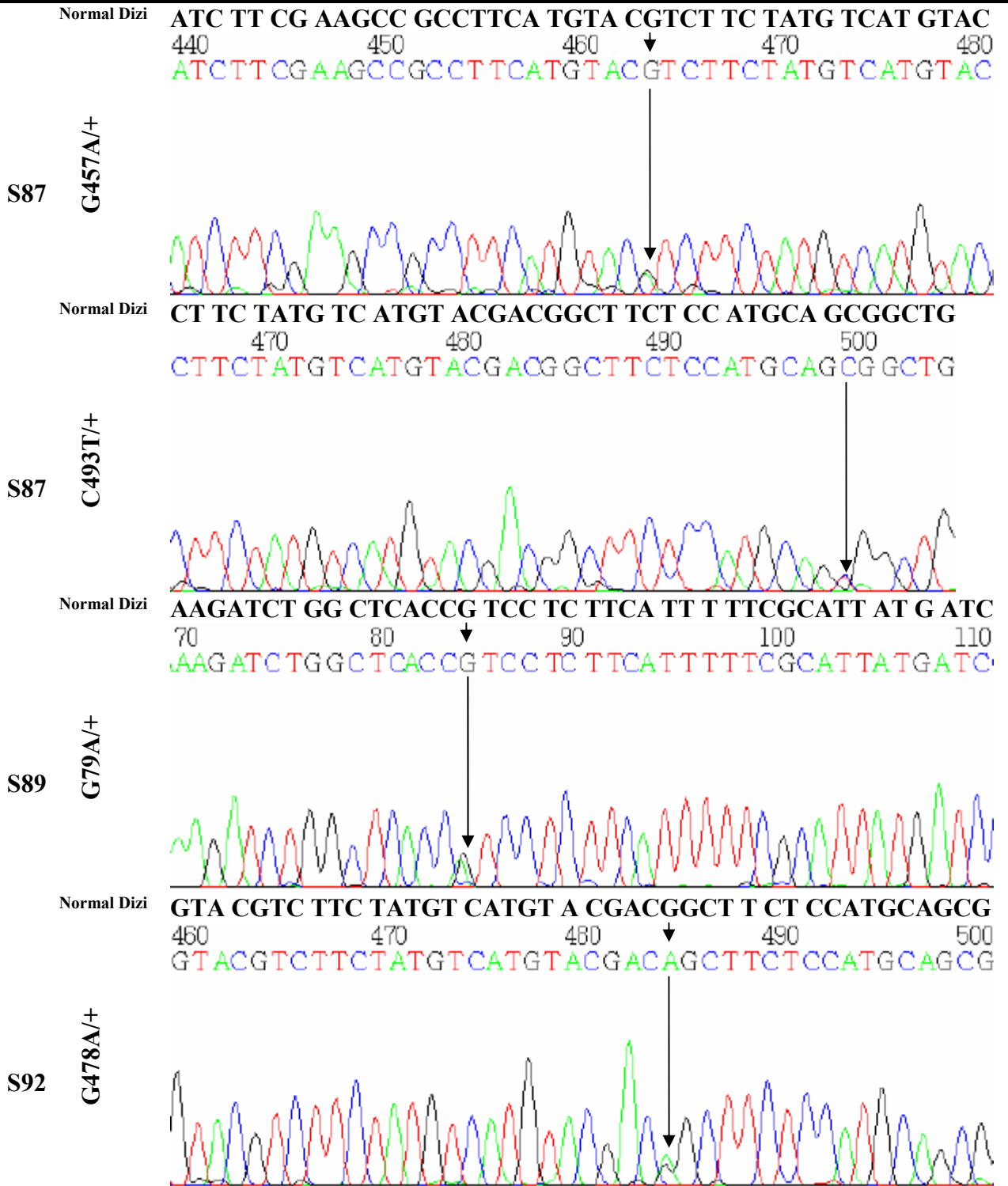
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



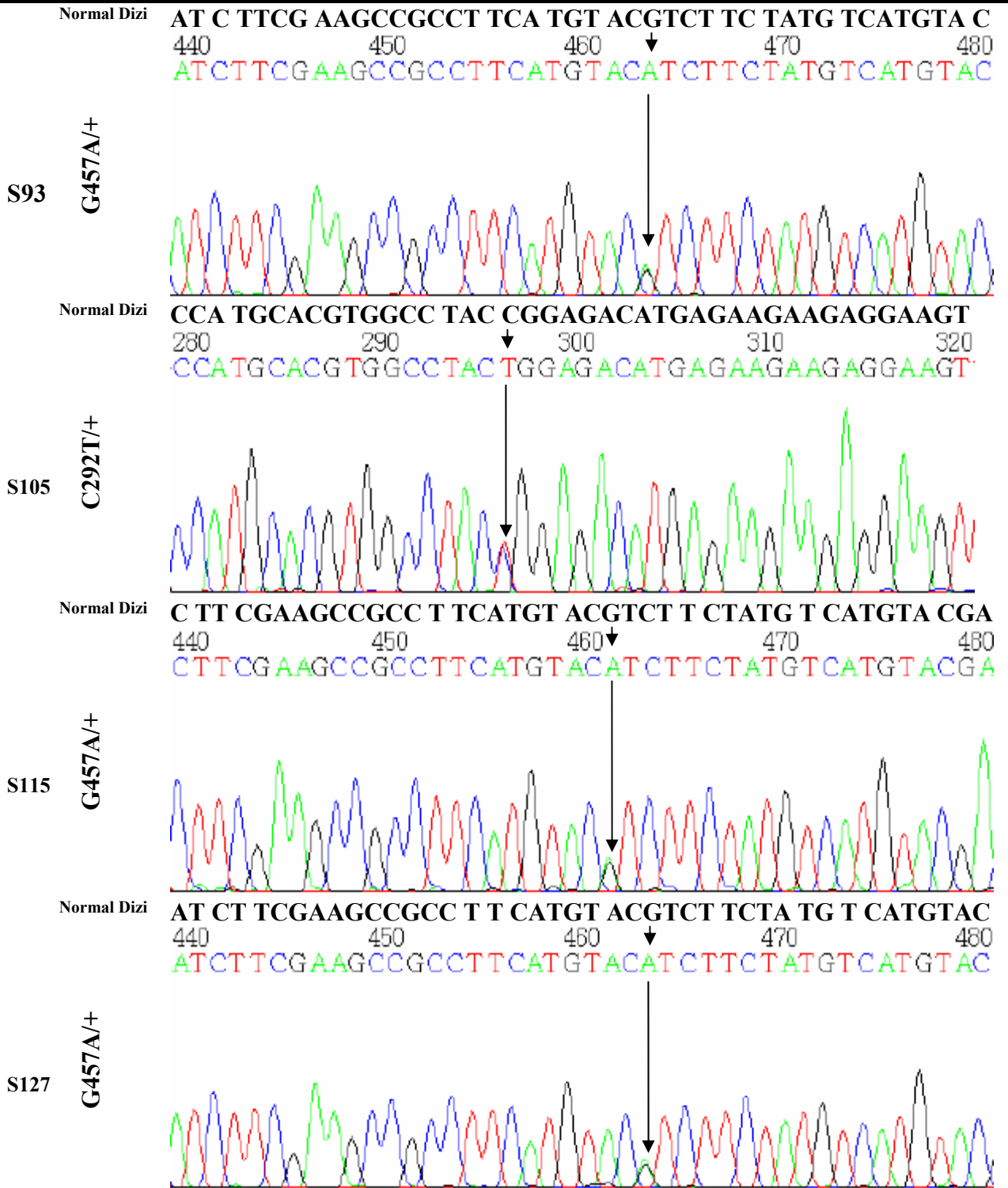
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



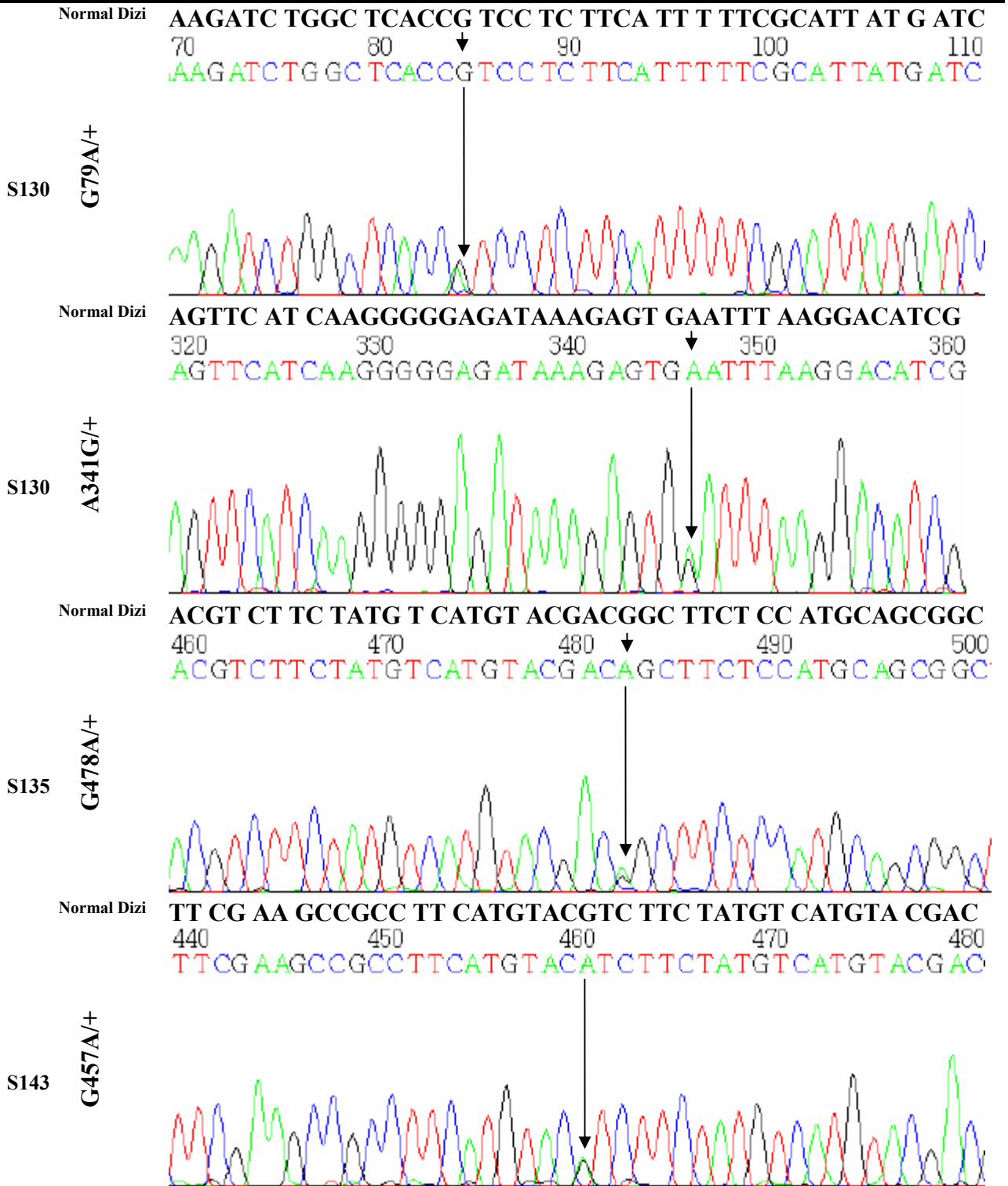
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



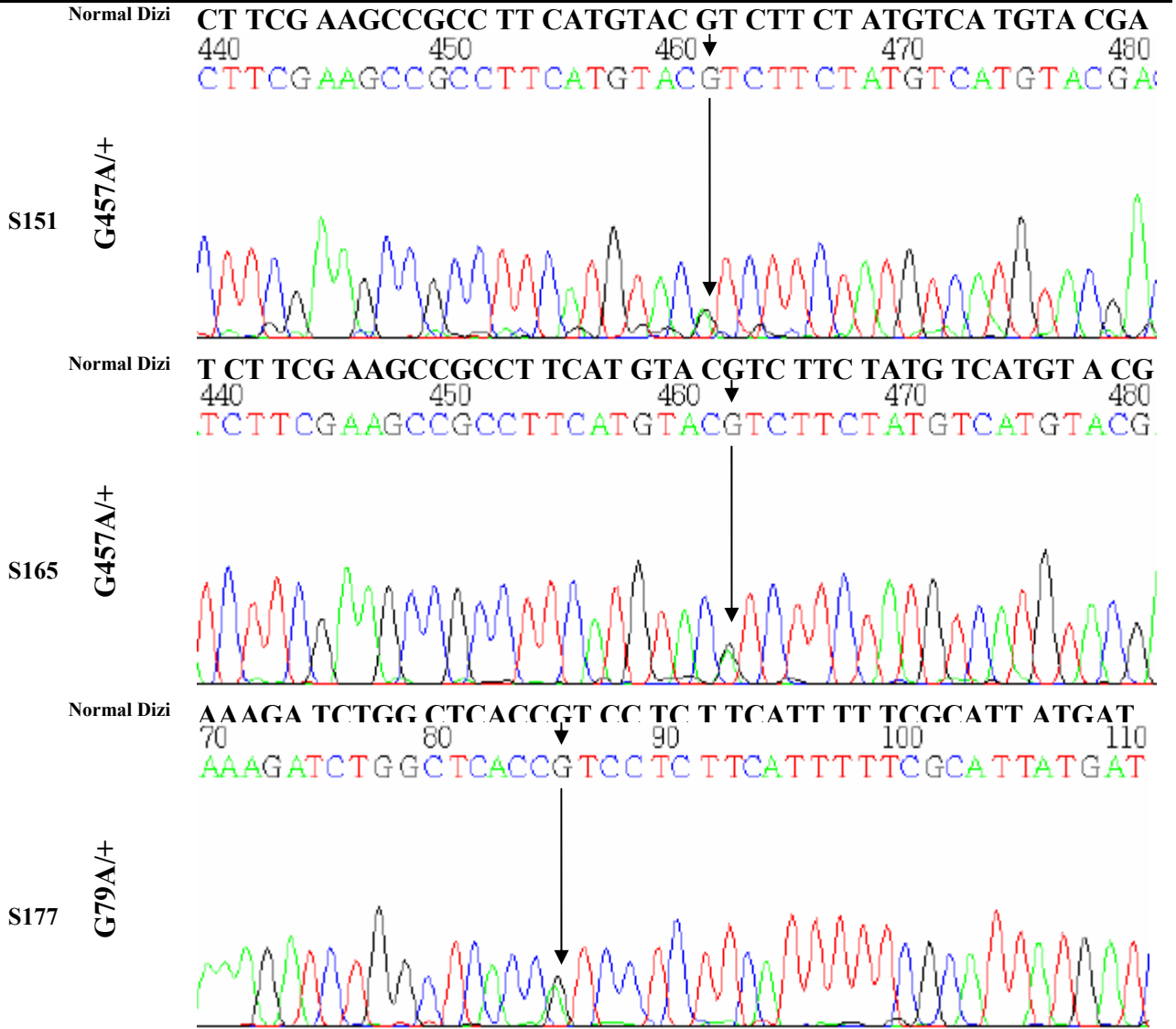
Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



Hasta Değişim
Kodu

Kromatogram



Kaynak Listesi

1. Seeman P, Malikova M, Raskova D, Bendova O ve ark. Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet*, 2004; 66: 152-157.
2. Lefebvre PP, Van de Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Rev*, 2000;32:159-162.
3. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2003; 9:109-119.
4. Nance WE, Kearsley MJ. Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution: *Am J Hum Genet* , 2004; 74: 1081–1087.
5. Kelsel DP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 1997; 387:80-83.
6. Kenneson A, Braun KV, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. *Genet Med*, 2002; 4:258-274.
7. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 2002; 63:73-94.
8. Estivill X, Govea N, Barcelo A, Perello E ve ark. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet*, 1998; 62:27-35.
9. Usami SI, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: Special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord*, 1998; 31: 423-435.
10. Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, Batsuuri J ve ark. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. *J of Med Genet*, 1997; 34: 169-172.
11. Tekin M, Arnos KS, Pandya A, Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 2001a; 358: 1082-1090.
12. Liu XZ, Pandya A, Angeli S, Telischi FF ve ark. Audiological Features of GJB2 (Connexin 26) Deafness. *Ear Hear*, 2005; 26: 361–369.
13. Hone SW, Smith RJH. Genetic screening for hearing loss. *Clin Otolaryngol*, 2003; 28: 85-290.
14. Erbe CB, Harris KC, Runge-Samuelson CL, Flanary VA ve ark. Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 2004; 114:607-611.

15. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M ve ark. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet*, 2000; 106: 50-57.
16. Ben Yosef T, Friedman TB. The genetic bases for syndromic and nonsyndromic deafness among Jews. *Trends Mol Med*, 2003; 9: 496-502.
17. Friedman TB, Schultz JM, Ben-Yosef T, Pryor PS ve ark. Recent advances in the understanding of syndromic forms of hearing loss. *Ear Hear*, 2003; 24:289-302.
18. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin 26 gene. *Gene*, 1997; 199:165-171.
19. Richard G. Connexins: a connection with the skin. *Exp Der*, 2000; 9: 77-96.
20. Frei K, Ramsebner R, Hamader G, Lucas T ve ark. Lack of association between Connexin 31 (GJB3) alterations and sensorineural deafness in Austria. *Hear Res*, 2004; 194:81-86.
21. Gerido DA, White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Acta Biol Med Biomemb*, 2004; 1662:159-170.
22. Gasmelseed NM, Schmidt M, Magzoub MM, Macharia M ve ark. Low frequency of deafness-associated GJB2 variants in Kenya and Sudan and novel GJB2 variants. *Hum Mutat*, 2004; 23:206-207.
23. Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet*, 2002; 62: 1-13.
24. Tekin M, Arnos KS, Xia XJ, Oelrich MK ve ark. W44C mutation in the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic deafness. *Clin Genet*, 2001b; 59: 269-273.
25. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *Am J Hum Genet*, 1998; 62:792-799.
26. Richard G. Connexin gene pathology. *Clin and Exp Der*, 2003; 28: 397-409.
27. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S ve ark. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J of Hum Genet*, 2000; 8:19-23.
28. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S ve ark. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 2001;104(1): 165-172.
29. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, KendrickJones J ve ark. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 1997; 16: 188-190.

30. Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G ve ark. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 1997; 16: 191-193.
31. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK ve ark. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 1998; 19: 60-62.
32. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S ve ark. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 409-412.
33. Finbow ME, Pitts JD. Commentary: Is the gap junction channel -the connexon- made of connexin or ductin?. *J of Cell Sci*, 1993; 106: 463-472.
34. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular Genetics of Hearing impairment due mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat*, 2000; 16:190.
35. Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH ve ark. Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem*, 2003; 84: 735–742.
36. Kathrin AS. The gap junction proteins beta1-connexin (cx32) and beta2-connexin (cx26) can form heteromeric hemichannels. *J Biol Chem*, 1995; 270(12); 6768-6772.
37. Tekin M, Akar N, Cin Ş, Blanton SH ve ark. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet*, 2001; 108: 385–389.
38. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*, 2003; 24: 275-288.
39. Chang EH, Van Camp G, Smith RJH. The role of connexins in human disease. *Ear Hear*, 2003; 24:314-323.
40. Bolz H, Schade G, Ehmer S, Kothe C ve ark. Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of GJB2 and the 342-kb deletion involving GJB6. *Hear Res*, 2004; 188:42-46.
41. Feldmann D, Denoyelle F, Chauvin P, Garabedian EN ve ark. Large deletion of the GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: Genotypic and phenotypic analysis. *Am J Med Genet A*, 2004, 127A:263-267.
42. Söhl G., Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes*, 2003; 10: 173–180.
43. Kelley PM, Cohn E, Kimberling WJ. Connexin 26: required for normal auditory function. *Brain Res Rev*, 2000; 32: 184-188.

44. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*, 1999; 234:177–186.
45. Griffith AJ, Chowdhry AA, Kurima K, Hood LJ ve ark. Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet*, 2000; 67:745-749.
46. Fischel-Godsian N. Mitochondrial deafness. *Ear Hear*, 2003; 24:303-313.
47. Taylor RW ve Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 2005; 6: 389-402.
48. Sinnathuray AR, Raut V, Awa A, Magee A, Toner JG. A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss, *Otol Neurotol*, 2003; 24: 418–426.
49. Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *CMLS*, 2000; 57:1927-1937.
50. Casano RAMS, Bykhovskaya Y, Johnson DF, Hamon M ve ark. Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families. *Am J Med Genet*, 1998; 79:388-391.
51. Li RH, Xing GQ, Yan M, Cao X ve ark. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large chinese family with maternally inherited hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2004; 124A: 113-117.
52. Torroni A, Cruciani F, Rengo C, Sellitto D ve ark. The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: Recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am J Hum Genet*, 1999; 65: 1349-1358.
53. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H ve ark. Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes MTO1 and GTPBP3. *Mol Genet Metab*, 2004; 83:199–206.
54. Giordano C, Pallotti F, Walker W F, Checcarelli N ve ark., Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 293: 521-529.
55. Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet*, 1996; 5(7):963–971.
56. Malik SG, Pieter N, Sudoyo H, Kadir A ve ark. Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia. *J Hum Genet*, 2003; 48: 480-483.

57. Tekin M, Duman T, Bogoçlu G, Incesulu A ve ark. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both caucasian and oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat Mut*, 2003; Online.
58. Zhao L, Wang Q, Qian Y, Li R ve ark. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in two Chinese families with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 33: 967–973.
59. Bykhovskaya Y, Yang H, Taylor K, Hang T ve ark. Modifier locus for mitochondrial DNA disease: Linkage and linkage disequilibrium mapping of a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Genet Med*, 2001; 3(3):177-180.
60. Finnila S ve Majamaa K. Lack of a modulative factor in locus 8p23 in a Finnish family with nonsyndromic sensorineural hearing loss associated with the 1555A4G mitochondrial DNA mutation. *Eur J Hum Genet*, 2003; 11:652–658.
61. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang HY ve ark. Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *Mol Genet Metab*, 2004; 82:27-32.
62. Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M ve ark. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res*, 2006; 39:219-226.
63. Hutchin TP, Thompson KR, Parker M, Newton V ve ark. Prevalence of mitochondrial DNA mutations in childhood/congenital onset non-syndromal sensorineural hearing impairment. *J of Med Genet*, 2001; 38: 229-231.
64. Gallo-Teran J, Morales-Angulo C, Castillo ID, Villamar M ve ark. Incidence of the mutations A1555G in the mitochondrial DNA and 35delG in the GJB2 gene (connexin-26) in families with late-onset non-syndromic sensorineural hearing loss from Cantabria. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2002; 53: 563-571.
65. Jacobs TH, Hutchin PT, Kappil T, Gillies G ve ark. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet*, 2004; 1-8.
66. Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Louhichi N ve ark. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNASer(UCN) genes in Tunisian patients with nonsyndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 340: 1251–1258.
67. Li X, Zhang LS, Fischel-Ghodsian N, Guan MX. Biochemical characterization of the deafness-associated mitochondrial tRNASer(UCN) A7445G mutation in osteosarcoma cell cybrids. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 328: 491–498.
68. Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.nd edition, New York, Cold Spring Harbor Lab. Pres, 2001.

69. Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (Connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat*, 1999; 14: 263-266.
70. Karin MD et al. Methodology of a Multistate Study of Congenital Hearing Loss: Preliminary Data from Utah Newborn Screening. *Am J of Med Genet Part C(Semin Med Genet.)* 2004, 125C:28–34.
71. Rehm HL, Williamson RE, Kenna MA, Corey DP ve ark. Understanding the genetics of deafness a guide for patients and families. Second Edition. Cambridge, Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness, 2003 ([http:// hearing. harvard .edu](http://hearing.harvard.edu)).
72. Frangulov A, Rehm HL, Kenna MA. Common Causes Of Hearing Loss, For Parents & Families. Cambridge, Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness, First Edition. 2004 (<http://hearing.harvard.edu>).
73. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A ve ark. 2003a, Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr*; 162: 154-158.
74. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer APM ve ark. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res*, 2005; 203(1-2):88-93.
75. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G ve ark. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet*, 2003; 64: 65-69.
76. Baris I, Kilinc MO, Tolun A, Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet*, 2001; 60:452-455.
77. Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH ve ark. Frequency of connexin 26 (GJB2) mutation carriers in the Turkish population. *Am J Hum Genet*, 2000; 67: 240.
78. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C ve ark. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2003; 67:1331-1335.
79. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V ve ark. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet*, 2004; 5: 5-15.
80. Tóth T, Kupka S, Haack B, Riemann K ve ark. GJB2 Mutations in patients with non-syndromic hearing loss from northeastern Hungary. *Hum Mutat*, Mutation in Brief #721 Online, 2004.
81. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S ve ark. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*, 2005; 77: 945–957.

82. Abe S, Kelley PM, Kimberling WJ, Usami S. Connexin 26 Gene (Gjb2) Mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555A→G mitochondrial mutation. *Am J Med Genet*, 2001; 103:334-338.
83. Gürtler N, Kim Y, Mhatre A, Müller R ve ark. GJB2 Mutations in the Swiss Hearing Impaired. *Ear Hear*, 2003; 24:440–447.
84. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH ve ark. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. *Genet Med*, 2003; 5(3):161-165.
85. Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL ve ark. GJB2: The spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Hum.Mut*, 2004; 24:305-311.
86. Thonissen E, Rabionet R, Arbones ML, Estivill X ve ark. Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet*, 2002; 111:190-197.
87. Wattanasirichaigoona D, Limwongseb C Jariengprasertd C, Yenchitsomanusc PT ve ark. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. *Clin Genet*, 2004; 66: 452–460.
88. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM ve ark. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000;37:41–43.
89. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G ve ark. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet*, 2001; 38: 515-518.
90. Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E ve ark. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet*, 2003; 113:18–23.
91. Yan D, Park HJ, Ouyang XM, Pandya A ve ark. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet*, 2003, 114: 44–50.
92. Rickard S, Kelsell DP, Sirimana T, Rajput K ve ark. Recurrent mutations in the deafness gene GJB2 (connexin 26) in British Asian families. *J Med Genet*, 2001; 38: 530–533.