



T.C

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İŞİTME ENGELLİ OLGULARDA MOLEKÜLER ETİYOLOJİK  
SEBEPLERİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Duygu KANKAYA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fatma Sılan

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2016

ÇOMÜ-BAP Proje No: TYL 2014/204





T.C

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İŞİTME ENGELLİ OLGULARDA MOLEKÜLER ETİYOLOJİK  
SEBEPLERİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Kim. Duygu KANKAYA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fatma SILAN

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2016

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2014/204

## TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri

Enstitüsü

Program Adı : Tıbbi Genetik

Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Duygu KANKAYA

Tez Başlığı : İşitme Engelli Olgularda Moleküler Etiyolojik Sebeplerin  
Araştırılması

Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Hastanesi

Sınav Tarihi : 22.01.2016

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Fatma SILAN	Tıp Fakültesi	
<b>Sınav Jüri Üyeleri(Unvan ve Adı)</b>		
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR	Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Coşkun SILAN	Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet ULUDAĞ	Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ULUDAĞ	Tıp Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../.....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Canakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Medical Genetics

Programme Level : Master of Science ( X) Doctor of Philosophy ( )

Department : Medical Genetics

Student Name and Surname: Duygu KANKAYA

Title of the Thesis : Investigation of Molecular Etiologies in Hearing Impaired Patients

Examination Place : Canakkale Onsekiz Mart University Research Hospital

Examination Date : 22.01.2016

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Fatma SILAN	Medical School	
<b>Members of Examination Jury (Titles and Names)</b>		
Prof. Dr. Oztürk OZDEMIR	Medical School	
Assoc. Dr Coskun SILAN	Medical School	
Asist. Prof. Dr. Ahmet ULUDAG	Medical School	
Asist. Prof. Dr. Aysegül ULUDAG	Medical School	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated ..... and numbered .....

## **BEYAN FORMU**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8'de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih: 11.01.2015**

**Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Duygu KANKAYA**

**İmza:**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süreci boyunca yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli fikirleriyle bana her konuda yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN' a,

Tez çalışması sürecinde desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ULUDAĞ'a,

Değerli çalışma arkadaşlarım Asistan Dr. Mine URFALI, Asistan Dr. Onur YILDIZ, Biyolog Diğdem UYSAL, Kimyager Hülya HAS ve Tekniker Şengül TÜRÜNZ e,

Çalışmalarında destek olan sevgili arkadaşlarım Biyolog Çisem AKURUT ve Biyolog Ümit KARADELİ'ye,

Yardımlarından dolayı Op. Dr. Volkan TÜRÜNZ'e,

Beni bugünlere getiren, çalışmalarım sırasında her zaman özveri gösterip, sabır, destek ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli annem Şerife GÜVEN, babam İbrahim GÜVEN ve kardeşim Semih GÜVEN'e,

Uzun süren bu çalışmamda her zaman gerekli yardımı, fedakarlığı, sabrı gösteren, desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sinan KANKAYA'ya ve yüksek lisans çalışmamın son döneminde ailemize katılan, ona ayırmam gereken zamanı paylaşan sevgili oğlum Kaan KANKAYA'ya,

Ve adını saymadığım, en küçük şekilde de olsa yardımı dokunan herkese, en içten duygularla teşekkür ederim.

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2014/204

## İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	I
TEZ ONAY FORMU.....	IV
THESIS APPROVAL FORM.....	V
BEYAN FORMU.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELERİN LİSTESİ.....	XI
TABLO DİZİNİ.....	XII
ŞEKİL DİZİNİ.....	XIII
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İşitme Mekanizması.....	3
2.2. İşitme Seviyesinin Belirlenmesi.....	5
2.3. İşitme Kayıplarının sınıflandırılması.....	6
2.3.1. Sendromik İşitme Kayıpları.....	8
2.3.2. Nonsendromik İşitme Kayıpları.....	13
2.3.2.1. Otozomal Resesif Kalıtılanlar.....	14
2.3.2.2. Otozomal Dominant Kalıtılanlar.....	14
2.3.2.3. X' e Bağlı Kalıtılanlar.....	14
2.3.2.4. Mitokondriyal Kalıtılanlar.....	15
2.4. Gap Junction.....	18
2.4.1. Konneksin proteinin genel yapısı.....	18
2.4.2. Konneksin 26 proteinin işitmedeki rolü.....	21
2.4.3. Konneksin <i>GJB2</i> geni.....	23
2.4.4. İşitme kaybına yol açan konneksin mutasyonları ve polimorfizmleri.....	25



2.4.4.1. Otozomal dominant kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları.....	25
2.4.4.2. Otozomal resesif kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları.....	26
2.4.4.3. Mitokondrial mutasyonlar ve işitme kaybı.....	31
3. YÖNTEM VE GEREÇ.....	33
3.1. Olguların Seçimi.....	33
3.2. Kan Örneklerinin Alınması.....	33
3.3. Moleküler Analiz .....	34
3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	34
3.3.1.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler.....	34
3.3.1.2. Manuel DNA İzolasyonu.....	34
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi.....	36
3.3.2.1. PCR ve DNA Dizi Analizi için Gerekli Malzemeler.....	36
3.3.2.2. Konneksin 26 ( <i>GJB2</i> ) geninin PCR ile Çoğaltılması.....	37
3.3.2.3. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....	38
3.3.2.4. Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması.....	39
3.3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	40
3.3.2.6. DNA Dizi analizi için Örneklerin Cihaza Yüklenmesi.....	41
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA.....	52
6. KAYNAKÇA.....	56
7. EKLER.....	65
Ek-1 Spiralli Tez Kontrol Formu.....	65
Ek-2 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi.....	66

EK-3 Etik Kurul Onay Formu.....	67
8.ÖZGEÇMİŞ.....	68

## **KISALTMALAR VE SİMGELERİN LİSTESİ**

**EDTA:** Etilen Diamin Tetraasetik Asit

**DFNB:** Otozomal Resesif Nonsendromik Duyu Kaybı

**GJB2:** Gap Junction Beta 2

**Cx26:** Konneksin 26

**ddNTP:** Dideoksinükleotitler

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**dNTP:** Deoksinükleozid trifosfat

**Kb:** Kilobaz

**MgCl<sub>2</sub>:** Magnezyum klorür

**mL:** Mililitre

**mM:** Mikromolar

**°C:** Santigrat derece

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**rpm:** Dakikada dönüş sayısı

**IHC:** İç tüy hücresi

**OHC:** Dış tüy hücresi

**dB:** Desibel

**WS:** Waardenburg Sendromu

**BOR:** Brankioto renal Sendromu

**KID:** Keratitis ichthyosis sağırılık sendromu

**HID:** Hystrix-like ichthyosis sağırılık sendromu

**BPS:** Bart-Pumphery sendromu

**PPK:** Palmoplantar kerotoderma

**MtDNA:** Mitokondriyal DNA

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> İşitme kaybının sınıflandırılması.....	7
<b>Tablo 2.</b> Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri.....	11
<b>Tablo 3.</b> Sendromik olgularda dominant kalıtım gösteren <i>GJB2</i> mutasyonları.....	13
<b>Tablo 4.</b> Nonsendromik işitme kaybı ile ilgili gen ürünlerinin işlevleri ve gen lokusları.....	15
<b>Tablo 5.</b> Otozomal Resesif Kalıtılan <i>GJB2</i> Mutasyonları.....	27
<b>Tablo 6.</b> Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	37
<b>Tablo 7.</b> Konneksin 26 geni Ekzon- 1, 2A ve 2B bölgeleri için 15 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	38
<b>Tablo 8.</b> Konneksin 26 geni Ekzon- 1, 2A ve 2B bölgeleri için PCR reaksiyonunun çalışma şartları.....	38
<b>Tablo 9.</b> PCR Ürünlerinin Temizlenmesi için PCR reaksiyonunun çalışma şartları.....	39
<b>Tablo 10.</b> Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması için 10 µl'lik PCR' da kullanılan bileşenler ve miktarları (Forward Primer).....	39
<b>Tablo 11.</b> Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması için 10 µl'lik PCR' da kullanılan bileşenler ve miktarları (Reverse Primer).....	40
<b>Tablo 12.</b> 10 µl' lik reaksiyon karışımı için, Thermal Cycler programı.....	40

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Kulağın anatomik yapısı.....	3
Şekil 2: İç kulağın yapısı.....	4
Şekil 3. Konneksinler ve gap junctionların organizasyonu.....	19
Şekil 4. Konneksin 26 proteinin hücre membranında yerleşimi.....	20
Şekil 5. Konneksin 26 protein alanları.....	21
Şekil 6. Kokleadaki potasyum döngüsü.....	23
Şekil 7. 13. kromozom üzerinde <i>GJB2</i> geninin yerleşimi.....	24
Şekil 8. <i>GJB2</i> geninin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgeleri.....	24
Şekil 9. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan <i>H100P</i> homozigot mutasyonunun lokalizasyonu.....	42
Şekil 10. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan <i>H100P</i> homozigot mutasyonu sekans görüntüsü.....	43
Şekil 11. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan <i>H100P</i> homozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	44
Şekil 12. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan, <i>35delG</i> heterozigot mutasyonunun ( <i>Gly12Valfs</i> ) lokalizasyonu.....	45
Şekil 13. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan, <i>35delG</i> heterozigot mutasyonunun ( <i>Gly12Valfs</i> ) sekans görüntüsü.....	46
Şekil 14. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan, <i>35delG</i> heterozigot mutasyonunu ( <i>Gly12Valfs</i> ) sekans görüntüsü.....	46
Şekil 15. <i>GJB2</i> geninin 2.ekzonunda saptanan, <i>35delG</i> heterozigot mutasyonunu ( <i>Gly12Valfs</i> ) sekans görüntüsü.....	47
Şekil 16. <i>GJB2</i> geninin 2. ekzonunda saptanan, <i>V27I</i> heterozigot mutasyonunun lokalizasyonu.....	48
Şekil 17. <i>GJB2</i> geninin 2. ekzonunda saptanan, <i>V27I</i> heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	49
Şekil 18. <i>GJB2</i> geninin 2. ekzonunda saptanan, <i>V27I</i> heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	49
Şekil 19. <i>GJB2</i> geninin 2. Ekzonunda saptanan, <i>V153I</i> heterozigot mutasyonunun lokalizasyonu.....	50

<b>Şekil 20.</b> GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V153I heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	51
<b>Şekil 21.</b> GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V153I heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü.....	67

## ÖZET

Konjenital Bilateral Sensorinöral işitme kayıplarının %60' ına genetik faktörler neden olmakta ve ileri derecede işitme kayıplarının yarısının tek bir gen mutasyonuna bağlı olduğu bildirilmektedir. GJB2 geninde ortaya çıkan mutasyonlardan biri olan 35delG mutasyonu anormal konneksin 26 (GJB2) proteinin sentezine neden olur ve bozulan konneksin 26 protein sentezi işitme kaybına sebep olur. Bu çalışmada; İşitme kaybı olan hastalarda GJB2 gen mutasyonlarının işitme kaybı üzerindeki etiyolojisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışmaya 90 desibel ve üzeri bilateral sensorinöral işitme kaybı olan 46 hasta dahil edildi. Hastaların periferik kan-EDTA örneklerinden total DNA izole edildi. GJB2 geninin 1. ve 2. ekzonları PCR ve Sanger Sequencing yöntemi ile analiz edildi. Bu çalışmada 3130 Genetic Analyzer cihazı ve Seqscape v 2.6 ve Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımları kullanıldı. İşitme kaybı olan 46 hasta (5 K, 41 E) incelendiğinde 6 hastada patolojik mutasyon saptandı (%13) ve 11 hastada mutasyon saptanmadı (%24). Bu mutasyonlar, 35delG heterozigot, H100P homozigot, V153I heterozigot, V27I heterozigot mutasyonlarıdır. GJB2 genin 1. ekzonunda mutasyon saptanmadı. GJB2 geni 2.ekzonunda; 2 hastada 35delG heterozigot (%4,3), 2 hastada V27I heterozigot (%4,3), 2 hastada V153I heterozigot (%4,3), 33 hastada H100P homozigot mutasyon (%71,7) saptandı. En sık saptanan mutasyon H100P homozigot mutasyonu olup, bu mutasyon polimorfizm olarak değerlendirildi (%71,7). Ancak işitme kaybı ile ilişkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla tam işiten sağlıklı kontrollerde H100P mutasyonunun analizi planlandı. İşitme engelli kardeşi olan 9 hastadan 7'sinde H100P homozigot, 1'inde 35delG heterozigot ve H100P homozigot mutasyonları birlikte saptandı. İşitme kaybına ek olarak spina bifidası olan bir hastada 35delG heterozigot ve H100P homozigot mutasyonu saptandı.

**Anahtar kelimeler:** İşitme Kaybı; GJB2; H100P; 35delG

## ABSTRACT

The genetic factors causes 60% of Congenital Bilateral Sensorineural hearing loss and it is reported to be dependent on a single gene mutation half of hearing loss. 35delG that is one of the mutations occurs in GJB2 gene causes the synthesis of an abnormal protein connexin 26 (GJB2) and deteriorating connexin 26 protein synthesis leads to hearing loss. In this study; It was aimed to investigate the etiology on hearing loss of GJB2 gene mutations in patients with hearing loss. 46 patients were 90 decibels or higher with bilateral sensorineural hearing loss included to study. Total genomic DNA was isolated from patient's periferal blood-EDTA samples. The exons 1 and 2 of GJB2 gene were analyzed by PCR and Sequencing Sanger method. In this study, 3130 Genetic Analyzer instrument and Seqscap v 2.6 and Sequencing Analysis 5.3.1 software was used. When examined 46 patients (5F,41M) with hearing loss, pathological mutation was detected in 6 patients (%13) and was not detected mutation in 11 patients (%24). These mutations are 35delG heterozygous, H100P homozygous, V153 heterozygous and V27I heterozygous mutations. The exon 1 of GJB2 genewas not detected mutation. 2.ekzon in the GJB2 gene; 35delG heterozygous mutation was detected in 2 patients (%4,3), V27I heterozygous mutation was detected in 2 patients(%4,3), V153I heterozygous mutation was detected in 2 patients (%4,3), H100P homozygous mutation was detected in 33 patients (%71,7). H100P homozygous mutation which was detected frequently was evaluated as polymorphism (%71,7). But; in order to determine whether the association with hearing loss, H100P mutation analysis was scheduled in full hearing healthy controls. In 7 of 9 patients who have brother with hearing impaired was detected H100P homozygotes, In 1 of 9 patients were detected H100P homozygotes, 35 delG heterozygous mutations. In addition to hearing loss, 35delG heterozygous and H100P homozygous mutations were detected in a patient with spina bifida.

**Keywords:** The hearing loss; GJB2; H100P; 35delG



## 1. GİRİŞ ve AMAC

İşitme kaybı kulağın dış, orta veya iç kısmına ait patolojilerden yada işitme siniri veya beynin işitme merkezindeki bir patolojiden kaynaklanan işitme duyusu kaybı olarak tanımlanır (Hedge 1995).

İşitme kaybı Dünyada ve Türkiye’de en yaygın görülen duyuusal bozukluktur (Hilgert ve ark., 2009). Dünyada her 1000 çocuktan 1 ya da 2’inde konjenital işitme kaybı görülürken yetmiş milyondan fazla insanın da işitme kaybından etkilendiği bilinmektedir (Morton ve Nance, 2006). Prelingual sensorinöral işitme kaybı 1/650’lik doğum sıklığıyla çocuklardaki en sık sensorial bozukluktur (Tamayo ve ark., 2008). İşitme kaybı yeni doğanda dil kazanımını ve eğitiminin ilerlemesini, çocukluk ve yetişkin dönemde ise kişilerin sosyal ve iş yaşamlarını ciddi şekilde etkilemektedir (Eyerci 2010).

Sesin tanınması ve iletiminin hayatımızdaki rolünü düşündüğümüzde insan genomunda 130’dan fazla lokus ve 54 otozomal dominant, 67 otozomal resesif, 8 X’e bağlı, bir Y kromozomuna bağlı ve iki mitokondrial genin belki de daha fazlasının işitme sistemi için gerekli olduğu bugün artık bilinmektedir (Lingala ve Penagaluru, 2009).

İşitme kaybı basit olarak iletim, sensorinöral veya ikisinin birleşimi; sendromik veya nonsendromik; prelingual ve postlingual olarak sınıflandırılabilir. Sendromik ve nonsendromik grupta, klasik Mendel kalıtım tiplerinden biri veya mitokondriyal kalıtım şekli görülmektedir. Nonsendromik işitme kaybı genetik işitme kaybının %70’ini oluşturur. İşitme kayıplarının % 40-60’ı genetik kökenli, % 70-80’i nonsendromiktir. Nonsendromik genetik prelingual sensorinöral işitme kayıpları otozomal resesif (%70-80), otozomal dominant (%8-20), X’e bağlı resesif (%1-5) ya da mitokondrial (%1) kalıtım gösterir (Morton 1991, Ozturk 2004).

İşitme kaybı ile ilgili gen tanımlanması ve mutasyon taraması konusunda en önemli adım 1997’de Kelsell’in *GJB2* genini bulması ile atılmıştır. “Gap Junction” kanallarının oluşumundan sorumlu olan “Konneksin 26 (*GJB2/Cx26*)” proteinini kodlayan bu gendeki mutasyonların, resesif kalıtılan prelingual nonsendromik işitme kayıplarının yaklaşık %50’sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Kelsell ve ark., 1997). *GJB2* mutasyonları, dünya çapında pek çok popülasyonda otozomal resesif kalıtımın en sık sebebidir (Lee 2009). En sık *GJB2* mutasyonu olan 35delG

mutasyonu GJB2 mutasyonlarının % 48-77'sini kapsar (Kalay ve ark. 2005, Hayashi ve ark. 2010).

Genel olarak işitme bozukluğu ile ilişkili olduğu bilinen genlerin bir toplumdaki sıklığının belirlenmesi oldukça önemlidir. Birçok sağır kişi ve aileleri sağırlıklarının sebebini bilmeyi ister, özellikle de genetik olup olmadığının belirlenmesini ister. Genetik tanı, doğru genetik danışmanlık ve aile planlamasına izin verir. Akrabalar için taşıyıcı testleri ve çevresel risk faktörleri hakkında gerekli bilgiyi sağlarlar. Bu çalışmalar işitme kaybı için genetik tarama programlarının yapılmasını sağlayarak hastalığın daha erken teşhisine yardımcı olmaya yöneliktir. İşitme taramalarının yapılmaması durumunda ise hastalar zamanında tanı alamamakta, uygun rehabilitasyon verilemeyen hastalarda konuşma gelişimi olmamaktadır. Bu da hastaların izole bir sosyal yaşam sürmelerine yol açmaktadır (Brookhouser 2000, Morton 1991). Türk toplumunda işitme kaybının genetik etiyolojisinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda LHFPL5, ESSRB, LRTOMT (DFNB63), FGF3 genleri Türk bilim adamları tarafından tanımlanmıştır.

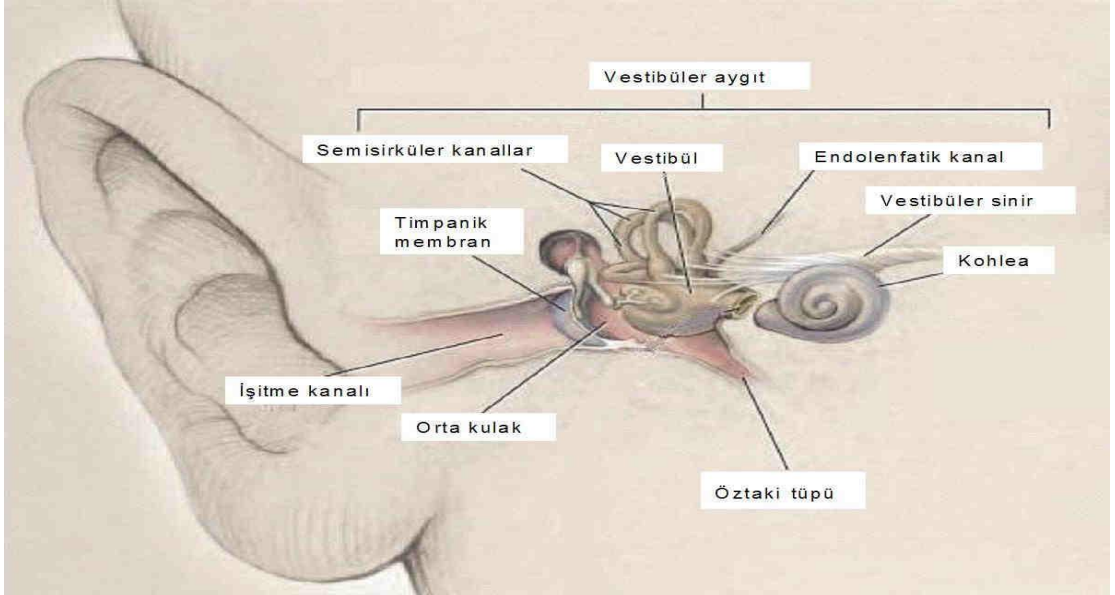
Bu tez çalışmasında; İşitme kaybı olan hastalarda GJB2 gen mutasyonlarının işitme kaybı üzerindeki etiyolojisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda; 90 desibel ve üzeri bilateral sensörinöral işitme kaybı olan hastaların periferik kan-EDTA örneklerinden total DNA izole edilmiştir. GJB2 geninin 1. ve 2. Ekzon bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edilerek, DNA dizi analizi yöntemi ile seçilen gen bölgelerdeki değişimler araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İşitme Mekanizması

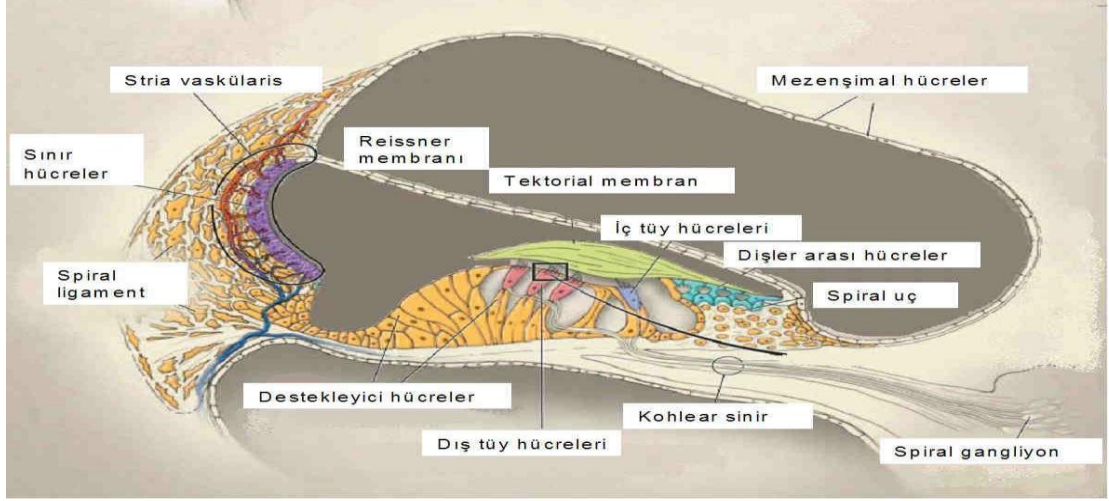
Kulak işitme ve denge işlevlerinden sorumludur. Dış kulak, orta kulak ve iç kulak olmak üzere 3 ana bölümden oluşur (Şekil 1) Dış kulak: kulak kepçesi ve dış kulak kanalından oluşur. Ses dalgaları kulak kepçesi tarafından toplanır, dış kulak yolundan (işitme kanalından) geçerek kulak zarına çarpar. Kulak zarı (timpanik zar) dış kulak yolu ile orta kulağı birbirinden ayırır ve orta kulaktaki kemik zincire ses dalgalarını iletir (Şekil 1)



**Şekil 1.** Kulağın anatomik yapısı (Morton ve Nance, 2006)'dan alınmıştır.

Orta kulak; Malleus, incus ve stapes isimli üç hareketli işitme kemikçığinden oluşur. Kulak zarından ses dalgalarının titreşimi malleus ile alınır ve inkus ve stapeşe iletir. İnkus'tan da oval pencere aracılığı ile iç kulağa iletilir. Böylece kulak zarı ve kemikleri havadaki titreşimleri iç kulağın sıvı ortamına taşıyan bir dönüştürme görevi yaparlar (Petit ve ark., 2001). İç kulak labirent adı verilen iç içe geçmiş kanallardan oluşur. Bu kanallardan kemiksi labirent kohlea ve vestibülü içerir. Kohlea kıvrımlı sarmal bir tüptür. İşitme reseptörü olan Corti organı kohleanın içinde bulunur. Skala media endolenf ile, skala vestibuli ve skala timpani ise perilenf ile doludur. Perilenf ve endolenfin iyonik kompozisyonları çok farklıdır. Endolenf

yüksek  $K^+$  düşük  $Na^+$  ve az miktarda  $Ca^{++}$  içerirken perilenf plazmaya benzer şekilde, düşük  $K^+$  , yüksek  $Na^+$  ve endolenfden çok daha yüksek miktarda  $Ca^{++}$  içerir (Petit ve ark., 2001). Endolenf ve perilenf arasındaki bu iyonik farklılık kohlear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskularis hücrelerince sağlanmaktadır (Şekil 2).



**Şekil 2.** İç kulağın yapısı (Morton ve Nance, 2006)'dan alınmıştır.

İşitme sisteminin en önemli elemanı iç kulaktaki Corti organı olup, reseptörlere sahip tüy hücreleri içerir. İç tüy hücreleri, Nervus akustikus ve Akustik kortekse sinyaller ileten reseptör hücreleridir. Dış tüy hücreleri ise hem sensöriyal elemanlardır, ayrıca alınan sesleri artırarak akustik hassasiyete ve frekans seçiciliğine katkıda bulunur. Ses dalgalarının kulak zarından iç kulağa yansıya mekanik etkisi perilenfin içindeki sıvıda dalgalanmaya yol açar. Perilenfteki dalga hareketi endolenfe yansiyarak tektorial membranda titreşimlere neden olur. Bu titreşimler stereosillerin bükülmesini sağlar. Stereosillerin üst yüzeyindeki harekete duyarlı (mekanosensitif) iyon kanalları açılır ve potasyumdan zengin endolenften hücre içine doğru potasyum akışı olur ve bunun sonucunda da bu hücreler depolarize olur. Depolarizasyon bazolateralde bulunan kalsiyum kanallarını aktive eder. Hücreye kalsiyum iyon akışı olur, bu akış ta akustik siniri uyarak nörotransmitterlerin salınımını stimüle eder. Böylece dış kulak yoluyla alınıp zar yoluyla orta kulağa, kemikler aracılığı ile iç kulağa iletilen mekanik ses dalgaları, iç kulaktaki stereosillia yapılarında akustik sinire aktarılan elektrik enerjisine dönüşmüş olur (Willems 2000). Normal işitmenin

devamı için bu olayların tekrarlanabilmesi gerekir, yani aksiyon potansiyelini oluşturan potasyum iyonlarının endolenfe geri pompalanması gerekmektedir. Hücrede kalsiyum iyonlarının artması, kalsiyuma duyarlı potasyum kanallarını açar ve potasyum iyonları hücre dışına atılır (Noyan 1999). Bu geri dönüş sırasında potasyum iyonları ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmındaki kanala geçerler. Burada iyonların hücreler arası geçişi “Gap Junction “ yapıları sayesinde olur. Stria vaskularise gelen potasyum iyonları voltaj kapılı potasyum kanallarından geçerek endolenfe geri pompalanmış olur (Tekin ve ark., 2001).

## 2.2. İşitme Seviyesinin Belirlenmesi

İşitme, sesin şiddetine verilen değer ile ölçülür. Sesin şiddeti bulunduğu ortamda oluşturduğu basınç değişikliğine göre belirlenir. Ses şiddetindeki değişimleri ölçmek için kullanılan birim desibel’dir (dBL). Ses şiddetindeki değişiklikleri ifade etmek için desibel sistemi kullanılmasının nedeni, iletişimde kullanılan olağan ses şiddeti sınırları içinde kulaklarımızın ses şiddetindeki yaklaşık bir desibellik bir değişikliği ancak ayırt edebilmesidir. Desibel, bir hastada işitme eşiğinin elde edilmesi için gereken uyarının akustik gücü ile normal bir bireydeki aynı akustik güç arasındaki oranın logaritmik olarak artan birimidir. Lineer olarak artmadığından 1dBL ile 5 dBL arasındaki fark 5 dBL ile 10 dBL arasındaki fark ile aynı değildir. Normal işiten insanların algılayabildiği en küçük ses 0 dBL’dir ve odyometri testinde bu değer referans olarak kabul edilir. Her frekansta ölçüme hastayı rahatsız etmeyecek mümkün olan en yüksek seviyeden başlanır. Uyarı şiddeti, 10 dBL’lik azaltmalar ile hastanın duymadığı seviyeye kadar indirilir. Daha sonra 5 dBL’lik arttırmalar yapılır. Hastanın tekrar duymaya başladığı seviyedeki ses şiddeti işitme eşiği olarak odiyogram adı verilen bir grafik üzerinde işaretlenir. Fısıltı şeklinde konuşma 0-40 dBL normal konuşma ise 40-80 dBL dir (Guyton ve Hall, 2001). İşitme kayıpları birçok şekilde sınıflandırılabilir. Genetik sağırlığın odyolojik kriterleri 1996 yılında “European Workshop on Genetic Hearing Loss” adlı çalıştayda belirlenmiştir (Liu ve ark. 2005, Hismi ve ark. 2006). Genel olarak odyolojik fenotipe ve etkene göre Tablo 1’de sınıflandırma yapılmıştır (Kochhar ve ark. 2007, Tümer 2007).

### 2.3. İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması

İşitme kaybı genetik, çevresel veya hem genetik hem çevresel sebeplerle gelişebilir. Pek çok yayında çevresel ve genetik etiyojoloji %50-60 bildirilse de ülkemizde akraba evliliği nedeniyle genetik etiyojoloji %60 civarında bildirilmektedir. İşitme kaybının etiyojolojisinde yer alan çevresel faktörler arasında prematürite, düşük doğum kilosu, ototoksik ilaçlar, prenatal ve post natal enfeksiyonlar ve kafa travmaları sayılabilir (Tekin 2002, Morton ve Nance, 2006, Silan 2011).

İşitme kaybı fenotipte ek bulguların olup olmamasına göre sendromik (%10-30) ve nonsendromik (%70-90) olarak da ikiye ayrılmaktadır (Morton ve Nance, 2006). Sendromik işitme kayıplarının bazılarında ek bulgular doğumda mevcut (konjenital anomaliler) olabileceği gibi bazı sendromlarda da Usher sendromunda olduğu gibi ergenlik dönemi yada erişkin dönemde ortaya çıkabilir. Yayınlar arasında sendromik etiyojolojinin oranında büyük farklılık bulunması hasta gurubunun yaşına ve incelemede kullanılan yöntemlere göre değişiklik göstermektedir. İşitme kayıpları klinik olarak sensörinöral, iletim, miks (hem sensörinöral hem iletim tipi bir arada) ve santral tip olmak üzere 4'e ayrılır.

Sensörinöral işitme kaybı, işitme sinirlerinin veya iç kulaktaki koklea hücrelerinin yaşlanma, yüksek ses, hastalık, yaralanma, enfeksiyon, baş travması, ilaçların toksik etkileri ile zarar görmesi nedeni ile ya da kalıtsal olarak ortaya çıkar. Genetik işitme kaybında etkilenmiş bireylerde zaman zaman işitme ile ilgisi olmayan ek klinik özellikler görülmektedir. Bu tip genetik işitme kaybına sendromik işitme kaybı denir. Sendromik işitme kaybından daha sık olarak görülen nonsendromik işitme kaybında ise olgular işitme kaybından başka herhangi bir ek klinik özellik taşımazlar. Nonsendromik işitme kaybı genellikle monogenik olarak görülse de yüksek derecede heterojenite göstermektedir. Kalıtsal işitme kaybının yaklaşık %70'i nonsendromiktir ve hasar çoğunlukla sensörinöral orijinlidir. Sensörinöral işitme kaybı toplam işitme kayıplarının %90'ından sorumludur (Abreu ve Quintanilha 2007, Schrijver 2004). Konduktif işitme kaybı, en sık rastlanan işitme kayıpları arasında ikinci sırayı almaktadır. Dış kulakta kulak kiri birikmesi, otitis media veya kulak zarının delinmesi gibi dış veya orta kulak hasarları sonucu ses dalgalarının yükseltgenmesinin ve iç kulağa geçişinin engellenmesi ile ortaya çıkar. Merkezi tip

işitme kaybı beyin sapı ya da beyinde meydana gelen bir hasar sonucu oluşan ve oldukça nadir olarak görülen bir sağırlıktır. Miks işitme kaybı ise konduktif ve sensörinöral işitme kaybının bir kombinasyonudur (Petit 2006, Friedman ve Griffith, 2003).

İşitme kayıpları başlangıç yaşına göre de konjenital (doğumda mevcut), prelingual (konuşma öncesi erken başlangıçlı) ve postlingual (konuşma başladıktan sonra gelişen) işitme kaybı olmak üzere üç tiptir. Prelingual (dil gelişimi öncesi - 2 yaşına kadar) dönemde ortaya çıkan işitme kayıpları otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı veya mitokondrial kalıtım gösterebilmekle birlikte sıklıkla otozomal resesiftir. Postlingual dönemde (dil gelişimi sonrası) özellikle de ileri yaşlarda ortaya çıkan işitme kayıpları sıklıkla otozomal dominant kalıtım göstermektedir (Finsterer ve Fellingner, 2005). Mendeliyen kalıtım sıklıkla otozomal resesif (%70-80), otozomal dominant (%20), X'e bağlı resesif (%1-2) ve mitokondrial (%0-20) olarak tanımlanmış olup mitokondrial kökenli işitme kayıplarının sıklığı toplumlara göre oldukça değişkendir (Nance 2003).

**Tablo 1.** İşitme kaybının sınıflandırılması

**A. Odyolojik fenotipe göre sınıflandırma**

<b>1. Tip</b>	<b>2. İlerleme</b>	<b>3. Frekans</b>	<b>4. Şiddet</b>	<b>5. Başlangıç</b>
Sensörinöral	İlerleyici	Düşük (<500 Hz)	Normal <20 dBL	<b>Doğumsal</b>
Konduktif	Durağan	Orta (501-2000Hz)	Hafif 21-40 dBL	<b>Çocukluk</b>
Miks	Değişken	Yüksek (>2000 Hz)	Orta 41-70 dBL	<b>Erişkin</b>
Merkezi			İleri 71-95 dBL	
			Çok ileri 95> dBL	

## B.Etkene göre sınıflandırma

### 1.Genetik nedenler (%50-60)

### 2.Genetik olmayan nedenler (%40-50)

1a. Fenotip	1b. Kalıtsal	İç.Multigenik	Teratojen etkiler (CMV, Rubella)
<b>Sendromik (%30-40)</b>	Otozomal resesif (%70-80)	Kromozomal Anomaliler	Prematüre
<b>Non-sendromik (%60-70)</b>	Otozomal dominant (%10-20)	Trizomi 13;18;21	Postnatal enfeksiyon (menenjit, cititis media)
	Cinsiyete bağlı (%1-2)	Mozaik Trizomi 8	Ototoksik ilaçlar
	Mitokondriyal (%0-20)	Turner sendromu	Akustik ve kranial Travma
		22q11 delesyonu	

### 2.3.1. Sendromik İşitme Kayıpları

İşitme kaybına ek olarak dismorfik, endokrinolojik, metabolik, major veya minör organ anomalilerinin bulunduğu durumlara SENDROMİK işitme kaybı adı verilir. İşitme kaybına yüz, cilt, böbrek, göz, pigment, sinir, kalp, iskelet anomalileri ve saç kaybı gibi bulguların eşlik ettiği 440' dan fazla sendrom tanımlanmıştır (Nance 2003). Toplam işitme kaybının %10- 30'unu oluşturur ve olguların çoğunda iletim ya da miks tip işitme kaybı görülmektedir. Bu tür olgularda işitme kaybı sendrom ile ilişkili olarak primer veya sekonder fenotip olarak ortaya çıkmaktadır. Birçok sendromik form Mendel kalıtımına uymasına rağmen bazıları kromozomal düzensizlik ve mitokondriyal mutasyonlar nedeni ile olabilir. Sebep her zaman genetik olmayabilir ya da bilinmeyebilir. Shprintzen ve ark.'a göre sendromlar iki gruba ayrılır. Bunların ilki sebebi bilenen sendromlardır. Bu sendromlar kromozomal, genetik, teratojenik ya da mekanik nedeni olabilir. Sebepi bilinmeyen sendromlar ise tekrarlayan bir paterne ya da tek bir paterne uyup uymadığına göre iki kategoriye



ayrılır. İşitme kaybı ve diğer anomalilerin birlikte seyrettiği 440' dan fazla sendromik durum bildirilmiştir. Örneğin Jervell ve Lange-Nielsen sendromu iç kulak homeostazisi, Vohwinkel gap junction, Alport ve Stickler de ekstrasellüler matriks elemanı kollajen, Norrie sendromunda norrin, Waardenburg sendromunda hücre iskeleti, Usher de miyozin benzeri proteinlerin, Pendred sendromunda sülfat taşıyıcılarında görülen mutasyonların sendromik işitme kaybına yol açtığı ortaya konulmuştur. En yaygın görülen sendromlar Waardenburg, Usher, Alport, Pendred, Brankiootorenal Sendrom (BOR), Treacher-Collins Sendromudur (Petit ve ark. 2001, Bitner-Glindzicz 2002, , Silan ve ark. 2004).

**Waardenburg Sendromu (WS):** Cilt anomalileri ve işitme kaybının birlikte seyrettiği en yaygın ve en önemli sendromlardan biridir. Otozomal dominant geçişli olup yüksek penetrans göstermesine rağmen aynı aile içinde bile klinik bulgular değişkenlik gösterebilmektedir. Klinik olarak dört tipi vardır. Tip 1: Sağırılık, iç kantuslar arasındaki mesafenin artması (distopia kantorum ), saçlar, iris heterokromisi ve ciltte hipo-apigmente alanlar vardır. Tip 2: Sağırılık, saçlar, gözler ve deride pigmentasyon değişiklikleri vardır. Distopia kantorum yoktur. Tip 3: Tip 1 e ek olarak ekstremitte anomalileri vardır. Tip 4: Tip 1 e ek olarak Hirschprung hastalığı vardır (Kochhar ve ark., 2007).

**Usher sendromu** hem lokus heterojenitesi hem de genetik heterojenite gösterir. Yapılan çalışmalarda değişik ailelerde 10 dan fazla farklı lokus saptanmış, sadece tip 1 için altı farklı gende mutasyonlar bildirilmiştir (Nance 2003).

**Alport Sendromu:** Sensörinöral işitme kaybı ile birlikte ilerleyen glomerülopati görülür. İlerleyen böbrek yetmezliği ve ölümle sonuçlanır. Bu hastalıktan etkilenen bireylerde progresif tipte bilateral işitme kaybı görülebilir (Gregory 2004).

**Pendred Sendromu:** Pendred Sendromu otozomal resesif geçiş gösterir. Pendred sendromunun en önemli klinik bulguları konjenital sensörinöral işitme kaybı ile guatrdır. Fakat guatr olguların tümünde bulunmayabilir, puberte veya sonrasında başlayabilir. Hastaların yaklaşık yarısında hipotiroidi saptanmaktadır. Pendred

sendromlu hastaların çoğunda ileri radyolojik görüntüleme yöntemleri ile saptanabilecek genişlemiş vestibüler kanallar gibi iç kulak anomalileri mevcuttur. İşitme kaybı doğuştan görülebildiği gibi erken çocukluk döneminde de ortaya çıkabilir. Pendred sendromuna neden olan “PDS” geni 7q31 kromozomda lokalizedir ve 21 ekzondan oluşur. Bu gen sülfat transportu yapan transmembran proteinlerine benzer 780 aminoasitten oluşan pendrin proteinini kodlamaktadır. Pendrin proteini iyon/klor taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır. Endolenfatik dengenin sağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. PDS mutasyonları ayrıca non-sendromik işitme kayıpları ile de ilişkili bulunmuştur (Nance 2003, Martini ve ark. 2009).

**Brankiotoorenal Sendrom (BOR):** Brankial sinüs ve fistüller, brankial ark anomalileri, dış kulaklar normal veya dismorfik olabilir, iç kulakta Mondini malformasyonu ve basit üriner sistem malformasyonlarından renal ageneziye kadar değişebilen üriner sistem anomalileri ile karakterize bir sendromdur (Kochhar ve ark., 2007).

**Treacher-Collins Sendromu:** Otozomal dominant kalıtılır. Anomaliler asimetrik ve bilateraldir. Özellikle dış ve orta kulak malformasyonu görülür. Yüzde simetrik olarak zigomatik kemiklerin hipoplazisi, antimongoloid palpebral fissürler, mikrognati ve dış kulak anomalileri mevcuttur (Nance 2003).

Bu sendromlara neden olan genler ve kodladıkları moleküller Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Bazı sendromik olgularda tutulum gösteren genler ve işlevleri.

<b>Sendrom</b>	<b>Kalıtım</b>	<b>Gen</b>	<b>Kodladığı Molekül</b>
Waardenburg tip1	O.D	PAX3	Transkripsiyon faktörü
Waardenburg tip2	O.D.	MITF	Transkripsiyon faktörü
Waardenburg tip3	O.D.	PAX3	Endotel ligand ve reseptör
Waardenburg tip4	O.D.	EDN3,EDNRB	Endothelin-3, ligand
Treacher Collins	O.D.	TCOF1	Nükleolar fosfoprotein
Branchio-oto-renal	O.D.	EYA1	Transkripsiyon faktörü
Jarvel ve Lange-Nielsen	O.R	KCNQ1,KCNE1	İyon kanalı
Pendred Sendromu	O.R.	SLC26A4	Anyon transporter
Alport Sendromu	X'e bağlı	COL4A5/6	Kollagen alfa 5
	O.R.	COL4A3/COL4A4	Kollagen alfa 3
Norrie	X'e bağlı	NDP	Ekstrasellüler matriks protein

Stickler	O.D.	COL2A1, COL11A1, COL11A2	Yapısal kollagen
Usher tip 1A	O.R.	Bilinmiyor	
Usher tip 1B	O.R.	MYO7A	Tip 7 miyozin
Usher tip 1C	O.R.	Harmonin	PDZ domain protein
Usher tip 1D	O.R.	CDH23	Cadherin 23
Usher tip 1F	O.R.	PCDH15	Protocadherin 15
Usher tip 1J	O.R.	CIB2	
Usher tip 1G	O.R.	SANS	
Usher tip 2A	O.R.	USH2A	Ekstrasellüler matriks protein
Usher tip 2B	O.R.	Bilinmiyor	
Usher tip 2C	O.R.	VLGR1\GPR98	
Usher tip 2D	O.R.	WHRN	
Usher tip 3A	O.R.	CLRN1	Tranmembran protein
Usher tip 3B	O.R.	HARS	

Aynı gende meydana gelen farklı mutasyonların hem nonsendromik otozomal resesif işitme kaybına hem de sendromik işitme kaybına neden olduğu (özellikle cilt bulgularıyla birlikte) gösterilmiştir. Örneğin DFNB1 lokusu hem Palmoplantar Keratoderma ve Keratitis Ichthyosis Deafness sendromunda hem de nonsendromik işitme kaybında rol oynar. Yine anyon transport proteinini kodlayan Pendrin geninde meydana gelen mutasyonlar hem sendromik (Pendred sendromu) hem de

nonsendromik (DFNB4) işitme kaybına yol açmaktadır (Everett ve ark. 1997, Lee ve White 2009). Non-sendromik olgularda yüksek oranda mutasyon belirlenen *GJB2* geninin, sendromik olgular ile dominant kalıtım gösteren mutasyonları Tablo 3'te gösterilmiştir (Eyerici 2010).

**Tablo 3.** Sendromik olgularda dominant kalıtım gösteren *GJB2* mutasyonları. KID: Keratitis ichthyosis sağırılık sendromu HID: Hystrix-like ichthyosis sağırılık sendromu BPS: Bart-Pumphery sendromu PPK: Palmoplantar kerotoderma VS: Vohwinkel sendromu.

Mutasyon Adı	Sendrom	Tanımı	Etkisi	Protein bölgesi
G12R	KID	G34C	12. kodon Gly→Arg	IC1
S17F	KID	C50T	17. kodon Ser→Phe	IC1
D50N	KID-HID	G148A	50. kodon Asp→Gln	EC1
N54K	BPS	Tanımlanmamış	54. kodon Asn→Lys	EC1
G59A	PPK	C176G	59. kodon Glu→Arg	EC1
D66H	VS	G196C	66. kodon Asp→His	EC1
R75W	PPK	C223T	75. kodon Arg→Trp	EC1
R75Q	PPK	G224A	75. kodon Arg→Gln EC1	EC1

### 2.3.2. Nonsendromik İşitme Kayıpları

Nonsendromik işitme kayıplarının %70-80'inin otozomal resesif, %10-15'inin otozomal dominant, kalanların X'e bağlı ve mitokondriyal nedenlere bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Bayazit ve Yılmaz, 2006). Genetik işitme kayıplarının

tanımlanmasında çeşitli rehberler kullanılmaktadır. Genetik nonsendromik işitme kayıpları için sembol olarak DeaFNess'tan üretilen DFN sembolü kullanılmaktadır. DFNA otozomal dominant 23 form, DFNB otozomal resesif form için kullanılmaktadır. Sadece DFN ise X' e bağlı ve mitokondrial kalıtımı simgelemektedir (Lalwani ve Castelein, 1999). Nonsendromik işitme kayıpları eşlik eden başka anomali olmadan sadece işitme kaybıyla karakterizedir. Konjenital genetik nonsendromik işitme kayıpları genellikle doğum sırasında fark edilmemekte, ilerleyen dönemlerde infant iletişim kurmadığında anlaşılmaktadır. Persistan konjenital veya erken başlangıçlı işitme kayıpları çocuğun konuşmasının gelişimini de etkilemektedir. Eğer fark edilmezse okul başarısı ve sosyal yaşamı da etkilenmektedir. Ülkemizde başarı ile sürdürülmekte olan yenidoğan taraması bu konuda büyük ilerleme sağlamıştır. Konjenital genetik işitme kaybı ön tanısı, detaylı aile hikayesi ve fizik muayeneye dayanarak konmakta yapılan genetik analizlerle tanı kesinleştirilmektedir (Josephson ve Grundfast, 2000).

#### **2.3.2.1. Otozomal Resesif Kalıtılanlar**

Konjenital nonsendromik işitme kayıplarının %70-80 i otozomal resesif kalıtlıdır. Günümüzde de 60'a yakın otozomal resesif gen lokusu saptanmıştır. Otozomal resesif gen lokusu DFNB olarak gösterilir ve kronolojik olarak bulunma sırasına göre 1'den başlayarak numaralandırılır (Lalwani ve Castelein, 1999, Bitner-Glindzicz 2002, Bayazit ve Yılmaz, 2006).

#### **2.3.2.2. Otozomal Dominant Kalıtılanlar**

Konjenital nonsendromik işitme kayıplarının %20 sini oluşturmaktadır. Konjenital nonsendromik işitme kaybına neden olan 40'tan fazla gen lokusu bulunmuştur. Bu kalıtım tipi daha sık olarak postlingual başlangıçlı işitme kayıplarında görülmektedir (Petersen 2002).

#### **2.3.2.3. X' e Bağlı Kalıtılanlar**

Tüm genetik nonsendromik işitme kayıplarının % 1-3'unu oluşturmaktadır (Denoyelle ve ark., 1999). İşitme kaybı, DFN6 dışındakiler için prelingualdır. Tek X

kromozomuna sahip olduklarından erkek çocuklar etkilenirler (Bayazit ve Yılmaz, 2006).

#### 2.3.2.4. Mitokondriyal Kalıtılanlar

Bazı mitokondriyal DNA mutasyonları nonsendromik işitme kaybına neden olmaktadır. Bu mitokondriyal nonsendromik işitme kayıplarında maternal kalıtım paterni görülür. Mitokondriyal mutasyonlar tarafından oluşan işitme kayıplarında penetrans eksikliği görülmektedir. Yine bu mutasyonlarda belirlenmemiş genetik veya çevresel faktörlerin de progresyonda rol oynadığı düşünülmektedir (Ensink ve ark., 2002).

Nonsendromik işitme kaybından sorumlu genlerin hücrede oynadıkları işlevlere bakılarak; tüy hücre demetlerinin oluşumu; hücre iskelet proteinleri, adezyon proteinleri, motor proteinler, iyon homeostasisin sağlanması, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin kompozisyonunun belirlenmesi ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere genel bir sınıflandırma yapılabilir (Bitner-Glindzic 2002, Hilgert ve ark., 2009). Tablo 4'te Non-sendromik işitme kaybı ile ilgili gen lokusları ve gen ürünlerinin işlevleri verilmiştir.

**Tablo 4.** Nonsendromik işitme kaybı ile ilgili gen ürünlerinin işlevleri ve gen lokusları.

<i>GEN</i>	<i>PROTEİN</i>	<i>LOKUS</i>
<b><i>TÜY HÜCRE DEMETLERİNİN OLUŞUMU</i></b>		
<b><i>Hücre İskelet Proteinleri</i></b>		
<i>ACTG1</i>	$\gamma$ -actin	DFNA20/26
<i>DIAPH1</i>	diaphenous 1	DFNA1
<i>ESPN</i>	Espin	DFNB36
<i>RDX</i>	Radixin	DFNB24
<i>TRIOBP</i> TRIO ve filamenöz	Actin bağlayıcı protein	DFNB28
<i>CCDC50</i>	Ymer	DFNA44

<i>Adhezyon proteinleri</i>		
<i>CDH23</i>	cadherin 23	DFNB12-USH1D
<i>PCDH15</i>	Protocadherin 15	DFNB23-USH1F
<i>TMHS (LHFPL5)</i>	lipoma HMGIC fusion partner-like 5	DFNB67
<i>VLGR1b (GPR98)</i>	G protein-coupled receptor 98	USH2C
<i>USH2A</i>	Usherin	USH2A
<i>Motor proteinleri</i>		
<i>MYO6</i>	myosin VI	DFNA22-DFNB37
<i>MYO7A</i>	myosin VIIA	DFNA11-DFNB2-USH1B
<i>MYH9</i>	myosin, heavy chain 9, nonmuscle	DFNA17
<i>MYO15A</i>	myosin XVA	DFNB3
<i>MYO3A</i>	myosin IIIA	DFNB30
<i>Scaffolding proteinler</i>		
<i>WHRN</i>	Whirlin	DFNB31-USH2D
<i>USH1C</i>	Harmonin	DFNB18-USH1C
<i>SANS (USH1G)</i>	SANS	USH1G
<i>Ekstraseluler matriks proteinleri</i>		
<i>TECTA</i>	$\alpha$ -tectorin	DFNA8/12-DFNB21
<i>COL11A2</i>	collagen, type XI, alpha 2	DFNA13-DFNB53-STL3
<i>STRC</i>	Stereocilin	DFNB16
<i>OTOA</i>	Otoancorin	DFNB22
<i>COCH</i>	Cochlin	DFNA9
<i>İyon Homeostasis proteinleri</i>		
<i>Konneksinler</i>		
<i>GJB2</i>	konneksin 26	DFNA3-DFNB1
<i>GJB3</i>	konneksin 31	DFNA2
<i>GJB6</i>	konneksin 30	DFNA3-DFNB1
<i>GJA1</i>	konneksin 43	



<b>İyon kanalları</b>		
<i>KCNQ4</i>	potasyum voltaj kapılı kanal, KQT-benzeri altailesi, üye 4	DFNA2
<i>SLC26A4</i>	solute carrier family 26, üye 4	DFNAB4-PDS
<i>SLC26A5</i>	solute carrier family 26, üye 5 (prestin)	
<b>Sıkı Bağlantılar</b>		
<i>CLDN14</i>	claudin 14	DFNB29
<i>TRIC (MARVELD2)</i>	tricellulin (MARVEL domain containing 2)	DFNB49
<b>Diğerleri</b>		
<i>CRYM</i>	μ-crystallin	
<i>WFS1</i>	Wolframin	DFNA6/14/38-WFS
<b>Transkripsiyon faktörler</b>		
<i>EYA4</i>	eyes absent homolog 4 (Drosophila)	DFNA1
<i>POU4F3</i>	POU class 4 homeobox 3	DFNA15
<i>POU3F4</i>	POU sınıf 3 homeobox 4	DFN3
<i>TFCP2L3 (GRHL2)</i>	grainyhead-like 2 (Drosophila)	DFNA28
<i>ESRRB</i>	estrogen-related receptor beta	DFNB35
<b>Fonksiyonu Tam Anlaşılmayan Proteinler</b>		
<i>TMPRSS3</i>	transmembran proteaz, serine 3	DFNB8/10
<i>TMC1</i>	transmembran channel-like 1	DFNA36-DFNB7/11
<i>MYO1A</i>	myosin Ia	DFNA48
<i>MYH14</i>	myosin, heavy chain 14	DFNA4
<i>DFNA5</i>	DFNA5	DFNA5
<i>PJVK</i>	Pejvakin	DFNB59
<i>TMIE</i>	transmembrane inner ear	DFNB6
<i>OTOF</i>	Otoferlin	DFNB9

## 2.4. Gap Junction

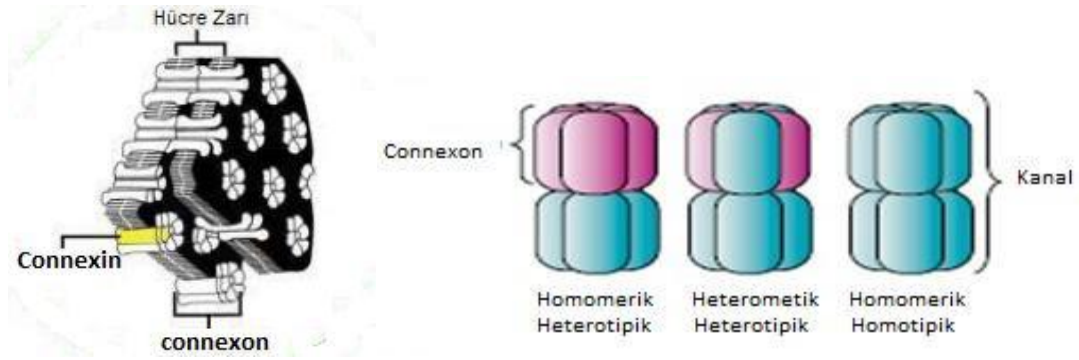
Çok hücreli organizmalarda doku-organ homeostazisinin sağlanması için hücreler arası iletişim önemlidir. Hücreler arasındaki etkileşim, iletişim kuracakları hücrelere sinyal yolları ya da hücreler arası kanallar yoluyla sağlanır. Gap junction, tight junction, adherens junction, desmozom, hemidesmozom, fokal adezyonlar, kimyasal sinapslar ve immunolojik sinapslar çok elemanlı kompleks membran yapılarıdır. Hücre sinyalizasyonu ve yapısal doku organizasyonu sağlarlar. Bütün bu yapılar farklı transmembran yapılardan oluşurlar. Genelde scaffold proteinler, anchor proteinler ve sinyalizasyon proteinleri transmembran proteinlere yapışıktır ve aktin, mikrotübül ve intermediate filament ağıyla bağlantılıdır. Gelişim, doku fonksiyonu ve hücre homeostazisinin hücreler arası koordinasyonuna aracılık etmede önemli bir fonksiyona sahiptirler. Gap junctionları oluşturan birimlerin, yani konneksinlerin bir araya gelip toplanması karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir (Bruzzone ve ark., 1996, Martinez ve ark., 2009).

### 2.4.1. Konneksin proteinin genel yapısı

Gap junction komşu hücrelerin karşılıklı membranların da köprü olarak iş gören hidrofilik kanal formunda hücreden hücreye sinyal moleküllerinin direkt geçişine izin veren tek hücreler arası yapıdır. İyonların (K, Ca), siRNA, ikincil habercilerin (cAMP, cGMP ve IP3), küçük metabolitlerin (glukoz) geçmesine izin vererek hücreler arasında elektriksel ve biyokimyasal dengenin sağlanmasına izin verir (Bruzzone ve ark. 1996, Valiunas ve ark., 2005). Bu proteinlerden biri de konneksin 26'dır. Farklı tiplerdeki konneksinler farklı doku ve hücrelerdeki gap junction kanallarının yapısına katılırlar. Günümüze kadar 15 tanesi tanımlanan bu proteinler arasında GJB2 (DFNB1 ve DFNA3), GJB3 (DFNA2) (DFNA3) ve GJB6 gibi proteinler sayılabilir (Van Camp ve ark. 2001, Wangeman 2002).

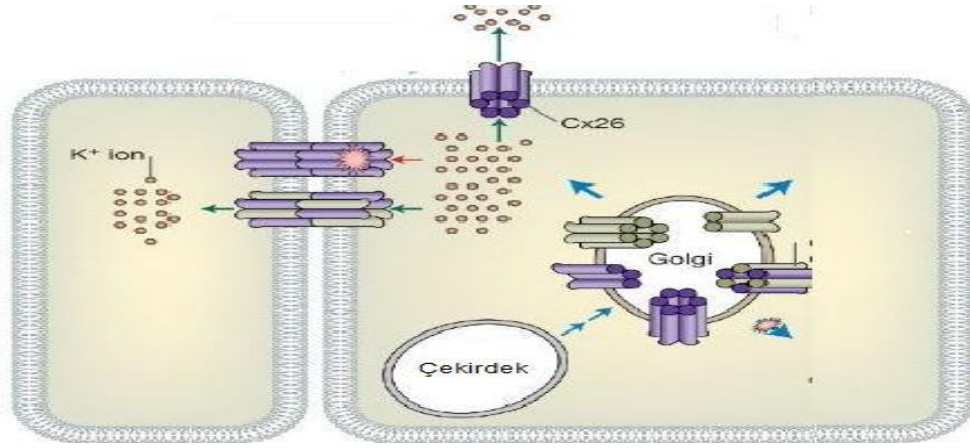
Konneksin grubu proteinler gap junctionları oluşturan birimler olup hem omurgalı (konneksin, pannexin) hem de omurgasız hayvanlarda (innexin) bulunur. Memelilerde, gap junction kanalları iki hemikanaldan oluşur, connexon olarak adlandırılan bu yapılar iki komşu hücrenin her biriyle oluşur. Bitişik hücre membranları arasında bir boşluk bırakmasına rağmen iki connexon ekstrasellüler

yüzeyde sıkı ilişki içindedirler. Yapısal analizler göstermiştir ki her bir konneksin 6 politopik transmembran altünitesinden oluşmuştur ve connexin denilmektedir. Konneksin kanalında bulunan konneksin proteinleri özdeş olursa “homomerik”, farklı olursa; “heteromerik” konneksin oluşmaktadır. Kanallarda bu oluşuma göre homotipik, heterotipik ve heteromerik kanal şeklinde farklı isimler almaktadır (Kumar ve Gilula, 1996).



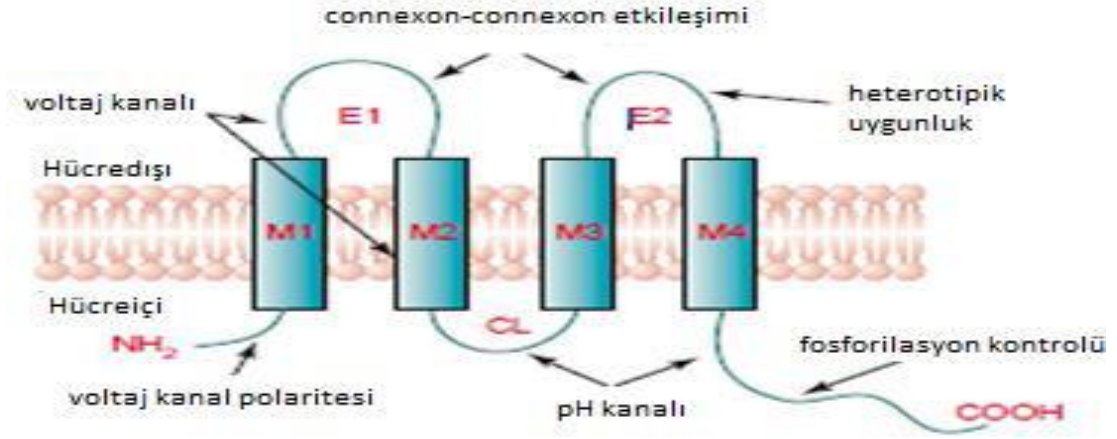
**Şekil 3.** Konneksinler ve gap junctionların organizasyonu (Kumar ve Gilula, 1996).

Konneksinler en az 22 izoformdan oluştuğu tahmin edilen büyük bir gen ailesi tarafından kodlanır (Thonnissen ve ark., 2002). 25-62 kDa büyüklüğünde, C terminal domainin uzunluğunda farklılık görülen, glikozillenmemiş yapısal olarak korunmuş özellik gösterirler. Konneksinler; gen yapıları, gen homolojileri, spesifik sekans motiflerine göre alfa, beta ve gama gruplarına ayrılır. Ayrıca konneksinler literatürde moleküler kütlelerine göre (26kDa=Cx26) ve evrimsel sınıflandırmaya göre (*GJB2*=Cx26) gruplandırılırlar. Birçok farklı gap junction kanal alt ünitesi eksprese edilir. Endoplazmik retikulum membranının da konneksin alt ünitelerinin biyosentezini içeren işlemler çok sıkı düzenlenir. Hekzamerik hemi kanallara uygun alt ünitelerin oligomerizasyonu, plazma membranına konneksinlerin yerleştirilmesi, ekstrasellüler alanda konneksinlerin uygun konneksinler ile başa baş bağlanmaları, dinamik, spatial, temporal organize olmuş plakların düzenlenmesi, degradasyon ile kanalların sitoplazmaya gönderilmesini içeren birçok işlem gerçekleşir (Evans ve ark., 2006).



**Şekil 4.** Konneksin 26 proteininin hücre membranında yerleşimi (Evans ve ark., 2006).

Konneksin 26 proteininde dört transmembran domain (M1-M4), iki ekstrasellüler domain (E1- E2), bir sitoplazmik domain (CL), bir N-terminal domain (NT) ve bir C-terminal domain (CT) bulunmaktadır. N terminal domain aminosit ile çevrili bir ortamda kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar yaparak voltaj değişiminde rol oynar. Transmembran domainler gap junction kanal porlarının oluşması ve kanal geçirgenliğinin belirlenmesini sağlamaktadır. M1 domaini voltaj sensörü olarak çalışır. M2 domaini konneksinlerin oligomerizasyonu için gereklidir. M3 domaini amfipatik özellik gösterir. Kanal ayırımında gereklidir. Ekstraselüler alan ise konneksinler ile bitişğinde bulunan hücrelerin uygun bir biçimde örtüşmesini sağlayacak 3 sistein rezidülü korunmuş bir bölge içerir (Krutovskikh ve Yamasaki, 2000).



**Şekil 5.** Konneksin 26 protein domainleri. Dört transmembran domain (M1-M4), iki ekstrasellüler domain (E1-E2), bir sitoplazmik domain (CL), bir N-terminal domain (NH<sub>2</sub>) ve bir C-terminal domain (COOH) (Krutovskikh ve Yamasaki, 2000).

Plazma membranındaki konneksin dinlenme durumunda kapalıdır. Düşük ekstrasellüler Ca<sup>+2</sup>, membran depolarizasyonu, membranda oluşabilecek mekanik stres ve metabolik inhibisyon etkisi ile açılabilir. Konneksinler; hücre içi ve dışı pH, fosforilasyon, redoks gibi çok sayıda faktörden etkilenirler (Evans ve ark., 2006).

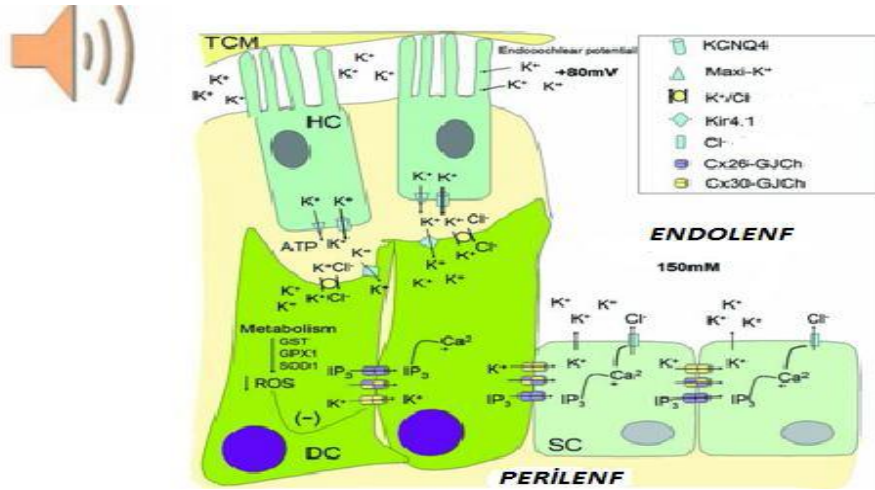
Olgun memeli kohleasında 5 konneksin izoformu vardır. Bunlar; Cx26, Cx29, Cx30, Cx31 ve Cx43' tür (Forge ve ark., 2003). Son bulgular göstermiştir ki konneksinler tek ve spesifik fonksiyonlara sahiptirler. Her bir konneksin izoformu farklı doku dağılımı sağlamasına rağmen birçok hücre tipi bir konneksin izoformundan daha fazlasını eksprese eder. Farklı konneksin izoformlarının oligomerizasyon davranışı araştırıldığında bütün konneksinlerin heterooligomerik konneksin formuna katılmadığı görülür. Bu gözlemler göstermiştir ki konneksin izoform interaksiyonu seçicidir. Birçok farklı kanal tipinin niçin olduğunu bilmemek de, muhtemelen ekprese edildikleri çeşitli hücrelerin birçok farklı spesifik ihtiyaçlarını sağlamada gerekli olabilecekleri bildirilmektedir (Bruzzone ve ark., 1996).

#### 2.4.2. Konneksin 26 proteinin işitmedeki rolü

Hayvan dokularındaki hücrelerin çoğunluğu komşu hücreler ile aralıklı kavşaklar yoluyla iletişime girerler. Her aralık kavşak, geleneksel elektron

mikrograflarında, iki komşu hücrenin zarlarının 2-4 nm civarında düzenli, dar bir aralık ile ayrıldığı bir yama olarak görünmektedir. Kavşak boyunca kanal oluşturan proteinler “konneksin”ler uzanmaktadır. Oluşturdukları kanallar yani konneksonlar bir hücrenin sitoplazmasından, diğer hücrenin sitoplazmasına, inorganik iyonların ve suda çözünen moleküllerin doğrudan geçişlerine izin vererek, hücreleri hem elektriksel hem de metabolik olarak birbirlerine kenetlerler. Boya enjeksiyon deneyleri, bağlayıcı kanalların azami gözenek büyüklüğünü 1.5-2 nm olarak göstermektedir, bu kenetlenmiş hücrelerin küçük molekülleri birbirleri ile paylaştıklarını (inorganik iyonlar, şekerler, aminoasitler, nükleotidler, vitaminler, halkasal amp ve inozitol trifosfat), büyük moleküller (proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler) için ise bunun söz konusu olmadığını düşündürmektedir. Bu hücre eşleşmesinin, ancak yeni yeni anlaşılmaya başlanan birçok işlevsel sonuçları vardır (Kikuchi ve ark., 2000, Zhao ve ark., 2006). Bu gap junction ağları kohlear iyonik homeostazisten sorumludur. Kohlea, sensör hücreleri iyonik çevreden ayıran bir yapıdır. İki ana sıvı dolu kompartıman içerir perilenf ve endolenf. Perilenf ekstrasellüler sıvılara benzer şekilde yüksek  $\text{Na}^+$  düşük  $\text{K}^+$ , buna karşın endolenf yüksek  $\text{K}^+$  düşük  $\text{Na}^+$  kompozisyonuna sahiptir. Gap junctionlar, özellikle *GJB2* ve *GJB6*, stria vaskularisin bazal ve intermediate hücrelerini bağlar. Endokoklear potansiyelin oluşumu için önemlidir ve işitme için gereklidir. Gap junctionlar hücreler arasında metabolitlerin paylaşılması için gereklidir. Korti organının lateral duvarlarında metabolik eşitlik önemlidir. Bağlı hücreler  $\text{HCO}_3^-$ , serbest radikal,  $\text{Ca}^{+2}$  ve metabolitler için tampon sistemi sağlarlar. Destek hücrelerindeki gap junction ağının koklear  $\text{K}^+$  iyonlarının resirkülasyonunda kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. İşitmede ses dalgaları skala timpani içindeki sıvıyı hareketlendirerek baziller membranını hareketini sağlar. Bu da tektoriyal membrandaki uzun sterosilyaları hareket ettirir. Böylece hücre içine  $\text{K}^+$  akışı başlar. Tüy hücrelerinin bazal membranındaki *KCNQ4* ve maxi-K iyon kanallarından  $\text{K}^+$  hücre dışına çıkar. Potasyum  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kanalı ve  $\text{K}^+$  kanalı gibi iş gören Kir 4.1 yardımı ile Deiter hücrelerinin içine alınır. Bu hücreleri bağlayan gap junctionlar yardımı ile destek hücreler arasında  $\text{K}^+$  dağıtılır. ATP gibi ek sinyaller bu hücrelerde  $\text{IP}_3$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  un salınımını sağlar. İkincil haberci niteliği taşıyan bu moleküller birçok hücre fonksiyona aracılık eder (Beltramello ve ark. 2005, Martinez ve ark., 2009). Örneğin

Betramello ve ark. wild tip Cx26 ve sağlıklıyla ilişkili Cx26 V84L mutasyonlu hastalarda IP<sub>3</sub> ilişkili kanalı karşılaştırmış başlangıçta hem wild hem de mutant kanal eşit bir biçimde K<sup>+</sup> iyonlarını geçirirken IP<sub>3</sub> geçişi mutant ve wild tipte farklılık göstermiştir. V84L mutant kanal K<sup>+</sup> iyonuna geçirgenken, IP<sub>3</sub> transferi mutant proteini eksprese eden hücreler arasında bozulmuştur. Yine Cx30' un IP<sub>3</sub> permeabilitesi araştırılmış ve Cx26'nın yaklaşık yarısı kadar olduğu görülmüştür. Bu da kohlea hücrelerinde her ne kadar Cx30 gereksiz görünmese de Cx26'nın telafisini sağlamadığını düşündürmektedir. Ayrıca kohleadaki bu yüksek metabolizma reaktif oksijen türlerinin de artışına neden olmaktadır. Bu moleküller gap junctionların negatif düzenleyicileridir. Yaşlanma sonucu ortaya çıkan işitme kaybında rol oynadıkları düşünülmektedir (Martinez ve ark., 2009).

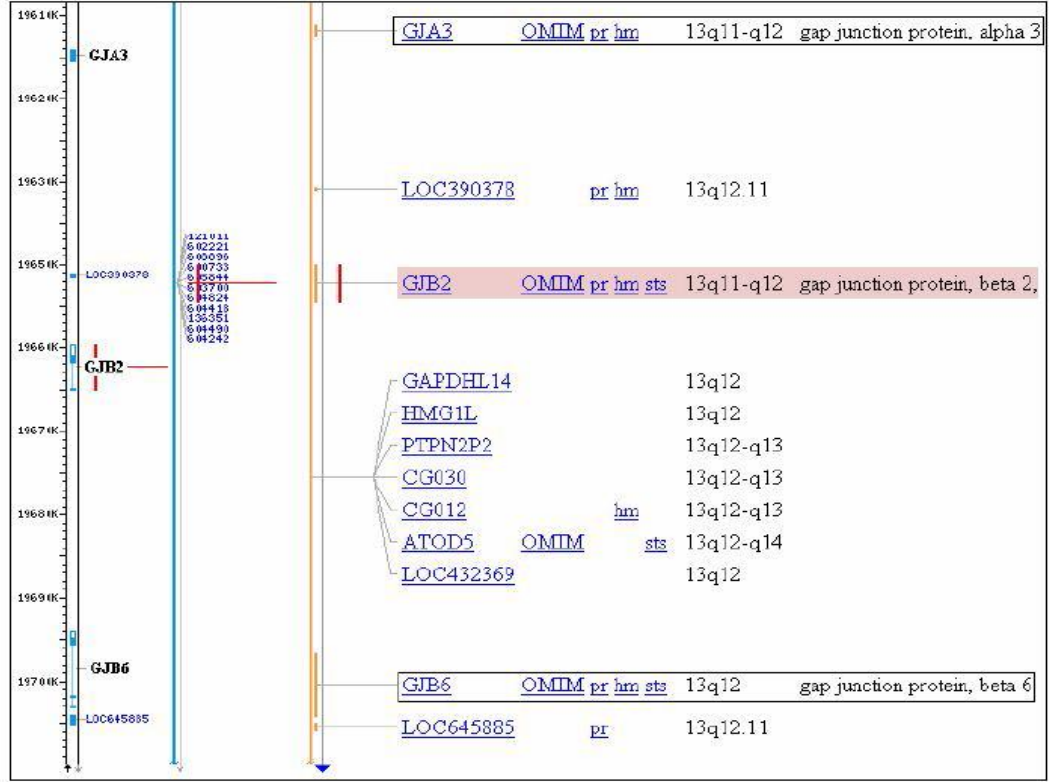


Şekil 6. Kokleadaki potasyum döngüsü (Martinez ve ark., 2009).

### 2.4.3. Konneksin *GJB2* geni

Konneksin geni ilk kez bağlantı analizleri yardımı ile prelingual, ağır işitme kaybı olan Tunus'lu 2 geniş ailede gösterildi (Guilford ve ark., 1994). *GJB2* geni, 1997 yılında ilk kez DFNB1A lokusunda tanımlandı. Kelsell ve ark. bu çalışmada *GJB2* geninde 3 ailenin üyelerini etkileyen homozigot mutasyon tanımlamıştır. İmmunohistokimyasal boyama yaparak insan koklea hücrelerinde Cx26'nın yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir. Sitogenetik bandı, 13. kromozomun 13q11-

q12 bölgesinde yerleşim gösteren Cx26 geni sentromerik yönde *GJA3* ve telomerik tarafta ise *GJB6* arasında yer alır.



Şekil 7. 13. kromozom üzerinde *GJB2* geninin yerleşimi (NCBI, Mapviewer).

Gen iki ekzon ve bir introndan oluşmaktadır. Gen 5509 nükleotid içermektedir. Ekzon 1; 158 bazdan oluşur ve transkript edilmez. İki ekzon arasında geniş bir intron bölgesi bulunmaktadır. Ekzon 2 ise 681 bazdan oluşur ve 226 aminoasitlik gen ürününü oluşturan kısım bu bölgededir.



Şekil 8. *GJB2* geninin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgeleri (Eyerici 2010).



İnsan *GJB2* geninin 5'UTR ve promotor bölgesi guanin ve sitozince zengindir. Cx26 proksimal promotor bölge 128bp den oluşmaktadır. Bu bölge içinde TATA motifi (TTAAAA) -24 bölgesinde yer almaktadır. İki GC kutusu ise -93 ve -81 bölgelerinde 6 nükleotid ile ayrılmıştır (GCGGCG). Bu bölge Sp1 transkripsiyon faktörleri tarafından tanınmaktadır (Tu ve Kiang, 1998). Promotor ve translasyona uğramayan bölgelerdeki mutasyonlar, *GJB2*'nin düzenlenmesini etkileyebilmektedir. Bu mutasyonlar, sadece tek allel de *GJB2* mutasyonu tanımlanan, işitme kaybı olgularında patogenezin oluşumuna katkı da bulunabilir (Eyerici 2010).

#### **2.4.4. İşitme Kaybına Yolaçan Konneksin 26 Mutasyonları ve Polimorfizmleri**

Cx26 da görülen mutasyonlar dört sınıfa ayrılabilir.

1. Hücre membranında yerleşim gösterme ve gap junctionların toplanması için gerekli hemikanal trafiğini değiştirme.
2. Fonksiyonel olmayan kanal formasyonu oluşturma.
3. Mutasyonun fonksiyonel kanal oluşturmaya ancak kanalın açılıp kapanması ve geçirgenlik özelliklerinin değişmesi, örneğin IP<sub>3</sub> geçirgenliğinin azalması.
4. Mutasyonların fonksiyonel kanallar oluşturabilmesi fakat hücre canlılığını azaltan yaşamsal metabolitlerin homeostasisini veya iyonik dengeyi etkilemesi. Mutasyonlar çoğunlukla voltaj sensörü, kanal açıp kapama ve hemikanal geçirgenliğini sağlayan bölgelerde bulunur.

*GJB2* geninde kodlanmayan bölgedeki mutasyonlar özellikle promotor bölgedeki mutasyonlar *GJB2* transkripsiyonun düzenlenmesini etkileyebilmektedir. Bugün farklı toplumlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *GJB2* geni üzerinde tanımlanan 100'den fazla mutasyon ve polimorfizmin etkili olduğu bilinmektedir (Ballana ve ark., 2010).

##### **2.4.4.1. Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren *GJB2* Mutasyonları**

*GJB2* geninde tanımlanmış mutasyonlardan çok azının otozomal dominant işitme kaybı ile beraber çeşitli tiplerde cilt hastalıklarına neden olduğu saptanmıştır. Palmoplantar keratoderma gibi cilt fenotipleriyle (misens mutasyonlar G59A, R75W, DE42), Vohwinkel sendromu (D66H) ve Keratitis ichthyosis-deafness (D50N, G12R ve S17F mutasyonu) hastalıklarında da görülür. Bu mutasyonlar daha çok hücre içi

trafiğin sağlanmasından sorumlu amino uç ve birinci ekstrasellüler bölgede toplanarak konneksionların birleşmesinde bozukluklara neden olmaktadır. RNA interferans kullanılarak *GJB2* dominant allellerin süpresyonu dominant işitme kaybının bazı formlarını tedavi etmek için uygun bir strateji olabilir (Nickel ve Forge, 2008).

#### **2.4.4.2. Otozomal Resesif Kalıtım Gösteren *GJB2* Mutasyonları**

Gap Junction Beta 2, nonsendromik sensörinöral işitme kaybına neden olan genler arasında ilk sıradadır (Glatke ve Kujawa, 1991, Gasparini ve ark., 2000). Gap junction Beta 2 gen mutasyonları, potasyum döngüsü ve endokoklear potansiyelin bozulmasına neden olur ve bu durum işitme kaybına yol açar. Bunun nedeni ise, afferent sinir liflerini aktive eden tüy hücrelerindeki reseptör potansiyelinin engellenmesidir. Gap Junction Beta 2 'yi etkileyen mutasyonlar kokleadaki potasyum döngüsünün bozulması sonucunda, korti organının potasyum tarafından lokal olarak entoksikasyonu oluşmakta ve buda hücre ölümü ve dolayısıyla işitme kaybına yol açmaktadır. Kokleadaki işitsel yol boyunca Cx 26 mutasyonu nedeniyle hangi bölgelerin hasar gördüğü tam olarak bilinmemektedir (Engel ve ark., 2003). Beyaz ırkta en çok görülen Cx mutasyonlarından bir tanesi 35delG'dir ve tüm patolojik Cx26 mutasyonlarının yarısından fazlasının nedenidir (Cohn ve Kelley, 1999).

#### **35delG mutasyon Oluşumu**

Çocuklukta görülen nonsendromik işitme kayıplarının %50 si *GJB2* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (Van Laer ve ark., 2001). Elliden fazla Cx26 mutasyonu bildirilmiştir. Bunların arasında en sık görülen mutasyon, genin 30. pozisyonunda başlayıp 35. nci pozisyonunda sonlanan 6 Guanin rezidüsünden oluşmuş zincirdeki tek bir nükleotidin delesyonu sonucunda ortaya çıkar. Bunun sonucunda 12. aminoasitteki zincirin erken sonlanmasına neden olur (Kelsell ve ark., 1997, Reardon 1998, Denoyelle ve ark., 1999, Park ve ark., 2000, Van Laer ve ark., 2001). Bu mutasyonun ortaya çıkışı yaklaşık olarak 500 kuşak önceye dayanmakta olup, 1000 yaşında olduğu saptanmıştır. Mutasyon büyük olasılıkla Orta Doğu'daki bazı bölgelerden kaynaklanmış, ve iki neolitik göç yolunu takip etmiş ve tüm

Avrupa' ya yayılmıştır. (Van Laer ve ark., 2001). 35delG Avrupa ve Orta doğuya yayılmış olan eski bir delesyon mutasyonu olmakla birlikte, tamamiyle bağımsız ve tekrarlanan özelliklerde taşımaktadır (Barış ve ark., 2001). Asya ve Avrupa arasında köprü görevi gören Türkiye, iki mutasyon göç rotasının üzerinde yer almaktadır. 35delG atasal bir mutasyon da olsa, populasyonlar arasında sık tekrarlanan bir mutasyon da olsa populasyonumuz gen havuzuna katıldığı bir bölge/bölgeler ve atasal bir haplotip/haplotipler olması gerekmektedir (Balcı 2002).

Türkiyede 35delG taşıyıcılığının görülme sıklığı ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda %0.8, %1.8 ve %2.7 oranlarında sonuçlar bulunmuştur (Gasparini ve ark. 2000, Barış ve ark. 2001, Tekin ve ark. 2001, Uyguner ve ark. 2001). Çeşitli araştırmalar, Akdeniz toplumları ve Türk toplumlarındaki nonsendromik resesif işitme kaybının %63-79'unun nedenini bu mutasyon bozukluğu olarak belirtmişlerdir (Estivill ve ark. 1998, Denoyelle ve ark., 1999). Nonsendromik işitme kaybı tanısı konan vakaların ise %2.1 'inin 35 delG mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir. Bu bulguların beyaz ırk toplumlarıyla yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumlu olduğu belirtilmiştir (Tekin ve ark., 2005).

**Tablo 5.** Otozomal Resesif Kalıtılan *GJB2* Mutasyonları

	<b>Mutasyon adı</b>	<b>Protein bölgesi</b>
IVS1+1 G >A	G -3172A	
G-3170A	G -3170A	
M1V (p.0)	A1G	IC1
T8M	C23T	IC1
31del38	31-69del38 nt	IC1
31del14	31-45del14 nt	IC1
G12V	G35T	IC1
30delG	30-35delG	IC1
35insG	30-35insG	IC1
35delG	30-35delG	IC1
K15T	A44T	IC1

51del12insA	51-63 12 nt del ve ins A	IC1
S19T	G56C	IC1
I20T	T59C	IC1
W24X	G71A	TM1
V27I+E114G	G79A +A341G	TM1+IC2
R32C	C94T	IC1
R32L	G95T	IC1
R32H	G95A	IC1
V37I	G109A	TM1
A40E	C119A	EC1
A40G	C119G	EC1
W44X	G132A	EC1
G45E	G134A	EC1
E47X	G139T	EC1
E47K	G139A	EC1
167delT	167delT	EC1
Q57X	C169T	EC1
176-191del16	176-192del 16nt	EC1
C64X	C192A	EC1
Y65X	C195A	EC1
Y65X	C195G	EC1
W77R	T229C	TM2
W77X	G231A	TM2
235delC	233-235delC	TM2
L79P	T236C	TM2
Q80X	C238T	TM2
Q80P	A239C	TM2
Q80R	A239G	TM2
I82M	C246G	TM2
V84L	G250C	TM2

S85P	T253C	TM2
A88S	G262T	TM2
L90V	C268G	TM2
L90P	T269C	TM2
269insT	269insT	TM2
M93I	G279A	TM2
V95M	G283A	IC2
Y97X	Tanımlanmamış	IC2
290-291insA	Frameshift	IC2
H100Y	C298A	IC2
H100L	A299T	IC2
299-300delAT	299delAT	IC2
302del3	302delAGA	IC2
E101G	A302G	IC2
310del14	314-328del 14nt	IC2
312del14	312-326del 14nt	IC2
314del14	310-324del 14nt	IC2
333-334delAA	333-335del AA	IC2
S113R	T339G	IC2
delE120	360delGAG	IC2
K122I	A365T	IC2
Q124X	C370T	IC2
R127H	G380A	IC2
W133X	G398A	IC2
Y136X	C408A	IC2
S139N	G416A	IC2
R143W	C427T	TM3
E147K	G439A	TM3
E147X	G439T	TM3
469delG	469delG	EC2

486insT	486insT	EC2
R165W	C493T	EC2
504insAAGG	504insAGG	EC2
509insA	509insA	EC2
509del14	509-523del 14nt	EC2
515del17	515-532del 17nt	EC2
W172X	G516A	EC2
C174R	T520C	EC2
P175T	C523T	EC2
V178A	T533C	EC2
R184W	C550G	EC2
R184P	G551C	EC2
572delT	572delT	EC2
S199F	C596T	TM4
605ins46	605-651ins 46 nt	TM4
I203K	TC608AA	TM4
N206S	A617G	IC3
631delGT	631-632delGT	IC3
L214P	T641C	IC3
645-648delTAGA	645delTAGA	IC3

### **Polimorfizmler (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*)**

İnsan genom DNA'sı statik değildir, aksine, değişik tiplerde kalıtsal değişikliklere maruz kalmaktadır. Yeni mutasyonlar bir bireyin germinal veya somatik hücrelerinde oluşur. Eğer germinal hücrelerde gerçekleşen bir mutasyon bireyin üremesine engel olmuyorsa gelecek nesillere aktarılabilir ve popülasyondaki frekansı artabilir. Allelik dizilerdeki varyasyon, (eğer bir varyantın frekansı 0,01'den büyükse) DNA polimorfizmi olarak tanımlanır (şansla açıklanamayacak kadar büyük bir oran). İnsan genomik DNA'sının ortalama heterozigotluk oranı 0,0037 olarak hesaplanmıştır (alleliz diziler yaklaşık her 250 – 300 bazda bir farklılık göstermektedir). Allelik

dizilerdeki varyasyon, mutasyon oranı relatif olarak düşük olduğundan nadiren yeni mutasyonların bir sonucu olarak meydana gelir. Bu nedenle, bir bireydeki farklı allelik diziler *de novo* mutasyonlarla ortaya çıkmaz, kalıtlıdır (Strachan ve Read, 1999). Genomik DNA üzerinde gözlenen polimorfizmler; populasyon genetiği, ilaç çalışmaları, adli tıp çalışmaları, organ nakli, kanser ve genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bakış açıları oluşturmaktadır.

Cx26 geni üzerinde birçok polimorfizm saptanmıştır. Genel olarak toplumlarda görülen polimorfizmler ve işitme kaybı ile birliktelik gösteren değişimler bildirilmiştir (Balbana ve ark., 2010).

#### **2.4.4.3. Mitokondrial mutasyonlar ve işitme kaybı**

Mitokondrial DNA (mtDNA)'nın sekans analizi ilk kez 1981 yılında yapılmıştır. Her mitokondride sayısı 2-10 arasında değişen mtDNA vardır. Ancak bu sayı aynı dokuyu oluşturan hücreler arasında bile farklılık göstermektedir. İnsan mtDNA'sı 16,569 bp uzunluğunda biri ağır diğeri hafif olmak üzere çift zincirli ve dairesel formda olup replikasyon ve transkripsiyonu mitokondri içinde olmaktadır. 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 mRNA olmak üzere toplam 37 gen bulunmaktadır. Genler içinde intron bölgeleri yer almaz (Anderson ve ark., 1981). MtDNA kalıtımı sitoplazmik bir kalıtım olup, bu kalıtım anne yoluyla yavrulara aktarılmaktadır. Böylece hasta annenin çocuklarının cinsiyet ayrımı olmaksızın tamamının hasta olması, hasta babanın ise tüm çocuklarının sağlıklı olması sitoplazmik kalıtımın karakteristik özelliğidir. Mitokondrial DNA, nükleer DNA'dan bağımsız olarak replikasyon yapar. Mitokondrinin bu otonom özelliği nedeniyle hücre bölünmesi sırasında mtDNA heteroplazmik bir segregasyon gösterebilir. mtDNA'da oluşabilecek mutasyonlar sonucu hücre içinde mutant ve normal mtDNA'lar yavru hücrelere rastgele dağılır. Bu durum mtDNA ile geçiş gösteren hastalıkların kliniğinde farklılıklar oluşturmaktadır.

Mitokondrial sağırılık sensorineural, bilateral ve genellikle progresif seyreder. Mitokondrial genler prelingual işitme kaybının nadir sebebi olarak görülür. Nonsendromik, sendromik olabilir ayrıca bir ailedeki bireyler arasında bile işitme farklılık arz eder (Prezant ve ark. 1993, Estivill ve ark. 1998). İşitme kaybının nedeni Korti, stria vaskularis ve destek hücrelerini içeren koklear dejenerasyondur. MtDNA

mutasyonlarının nasıl işitme kaybına neden olduğu hala çok açık olmasada, işitme kaybının dış tüy hücre fonksiyonunun kaybı nedeniyle kokleada olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve apoptotik sinyalizasyonun değişmesi ana patojenik faktörlerdir. Korti organı yoğun enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Azalan ATP üretimi, ATPaz ve nörotransmitterlerin salınımını baskılar (Sinnathuray ve ark., 2003).

### **Mitokondrial mutasyonlar**

Birkaç mitokondrial mutasyon tanımlanmıştır. Bunların en önemlisi 1992 yılında bir Arab-İsrail ailesinde tanımlanmış 12S rRNA *MTRNR1* geninde ki A1555G mutasyonudur (Prezant ve ark., 1993) Etkilenen kişilerin çoğunda çocukluk döneminde ağır ve derin işitme kaybı görülmüş, diğer aile üyelerinde ise yetişkinlikte işitme kaybı veya bazılarında normal işitme görülmüştür. Mutasyon, 12S rRNA'nın yüksek korunumlu bölgesinde, aynı zamanda bakterilerde de aminoglikozidlerin bağlandığı noktada olmaktadır (Guan ve ark., 1996). Gentamisin, streptomisin, kanamisin ve tobramisin gibi aminoglikozid antibiyotikler aerobik gram negatif bakterilerin yol açtığı infeksiyonların tedavisinde kullanılır (Lortholary ve ark., 1995). Aminoglikozidlerin kullanımı sık sık renal, vestibüler ve işitme sisteminde toksisiteye yol açar. Bu ilaçlar böbrek tübüllerindeki hücrelerde, iç kulaktaki perilenf ve endolenftde toplanabilir. Streptomisin ve gentamisin vestibuler hasara neden olurken, neomisin ve kanamisin koklear hasara neden olur. Tobramisin ise eşit oranda etkilemektedir. Aminoglikozidler antibakterial etkilerini bakteri ribozomlarının 16S rRNA'nın spesifik bir G nükleotidine bağlanarak yapmaktadırlar (Davies ve Davis 1968, Usami ve ark. 1998). 12S rRNA bölgesinde meydana gelen mutasyon ribozomun aminoglikozid duyarlılığını değiştirmektedir. Mitokondriyal DNA üzerinde, 12S rRNA kodlayan bölgede 1555. adenin yerine guanin nükleotidi gelmesiyle oluşmaktadır. 12S rRNA daki 1555. nükleotiddeki oluşan değişiklik *Escherichia coli* bakterisinin 16S rRNA dizine çok benzemektedir. Aminoglikozidler mutant 12S rRNA'ya bağlanarak iç kulakta ototoksik etkilere neden olmaktadır (Prezant ve ark. 1993, Tekin ve ark. 2003, Xing ve ark. 2007). İspanya, Japonya ve Çin de yapılan çalışmalar, sensörinoral duyma kaybından etkilenmiş ancak aminoglikozid kullanmamış kişilerde de bu mutasyona sıklıkla rastlanıldığını



göstermiştir. Bu durum karşısında *MTRNR1* genini modifiye eden başka bir genin varlığı düşünülmüş ve bağlantı (*linkage*) analizi yapılan A1555G mutasyonu taşıyan birçok aile ile yapılan çalışmalar sonucunda bu modifiye edici gen 8p23.1 bölgesinde haritalanmıştır (Frinnila ve ark., 2003). Özetle non-sendromik mitokondrial sağırılık çoklu jenerasyonlu ailelerde düşünülmesi gerekir. Aminoglikozid antibiyotikler kullanılmaması bir erkekte sağırılık geçişi bilgisi olmadıkça böyle düşünülmemelidir (Usami ve ark., 1998).

### 3. YÖNTEM VE GEREÇ

#### 3.1. Olguların Seçimi

Projemiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 25.09.2013 tarihinde alınan EK-2013-162 no' lu izin ile başlatılmıştır ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TYL-2014/204 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İşitme kaybı tanısı hikaye, fizik muayene, radyolojik değerlendirme, laboratuvar bulguları ve radyolojik görüntüleme ile faydalanılarak konuldu. Hikayede, hastaların yaşı, ailede kaç çocuk olduğu, kaçında işitme kaybı ve anomalili aile bireyi olduğu, yakın akrabalar da dahil olacak şekilde ailede başka işitme kayıplı bireylerin olup olmadığı, işitme kaybının şiddeti, ebeveyn akrabalığı, sorgulandı. Muayenede, sistemik dismorfolojik muayene yapıldı.

Çalışmaya Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniğine doğrudan başvuran veya ilimizdeki KBB uzmanlarınca referans edilen hastalar, 50 desibel ve üzeri sensörinöral işitme kaybı olan, işitme kaybı 2,5 yaş öncesi başlamış, unilateral veya bilateral işitme kaybı olan hastalar dahil edildi.

### **3.2. Kan Örneklerinin Alınması**

Her bir hastanın ön koldan 1-2 ml periferik kan örneği Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA) içeren tüplere alındıktan sonra laboratuvarımıza getirildi. Kan daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’ de saklandı.

### **3.3. MOLEKÜLER ANALİZ**

DNA ekstraksiyonu ve moleküler analizler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada Konneksin 26 (GJB2) geninin ekzon 1, ekzon 2A ve ekzon 2B bölgelerindeki mutasyonlara bakıldı.

#### **3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

##### **3.3.1.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler**

- Mikrosantrifüj
- Vorteks
- Isıtıcı blok
- Otomatik pipet seti
- Manuel DNA İzolasyon kiti (HighPure PCR TemplatePreparation Kit Roche)
- Ethanol (%96-100)
- İsopropil alkol
- 2 ml steril ependorf tüp
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Cryo tüp
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

##### **3.3.1.2. Manuel DNA İzolasyonu**

DNA izolasyon işlemi; proteinlerin parçalanmasını ve denatürasyonunu, proteinden DNA’ nın ayırımı ve DNA’nın çöktürülmesini içerir. Tam kan kullanıldığı için eritrosit lizisi gereklidir. PCR inhibisyonuna neden olan proteininin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır.

Bu çalışma, HighPure PCR Template Preparation Kit Roche ile üreticinin kandan DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında genomik DNA izolasyonu 46 bireyden EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 1-2 ml kan örneklerine aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulanarak yapıldı.

*Periferik kandan DNA eldesi amacıyla;*

- 40 µl Proteinaz-K 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu.
- Üzerine 200 µl örnek (periferik kan) eklendi.
- Üzerine 200 µl Binding buffer eklenilerek 15 sn vortekslendi.
- 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 100 µl isopropil alkol eklendi. Pipetaj yapıldı.
- Karışım spin kolona tüpün kenarlarını ıslatmadan aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolonun kapağı sarsmadan dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl İnhibitör removal buffer eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl Wash buffer eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- Aynı işlem tekrarlandı. Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl Wash buffer eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- 12000 rpm'de kısa santrifüj sonrası spin kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı.

- Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı. Üzerine 200 µl Elution buffer eklendi.  
Not: Elution buffer 70 °C’de ısıtıcıya koyularak çalışma sırasında ısıtıldı.

- Son olarak 8000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon atıldı.

### **3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi**

Bu çalışmada 46 bireyin kan örneklerinden izole edilen genomik DNA’lardan Konneksin 26 (GJB2) geninin ekzon 1, ekzon 2A ve ekzon 2B bölgeleri PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Her bir bölge için F ve R olmak üzere iki primer kullanıldı. PCR işlemi sonrası PCR ürünleri; ExoSAP, Dizileme hazırlık PCR’ı, saflaştırma aşamalarından geçirildikten sonra DNA dizi analizi için Kapiller Elektrofrez Cihazı (ABI Prism 3130) kullanılarak GJB2 geninin ekzon 1, ekzon 2A ve ekzon 2B bölgeleri dizilendi ve mutasyon taraması yapıldı.

#### **3.3.2.1. PCR ve DNA Dizi Analizi için Gerekli Malzemeler**

- Kapiller Elektrofrez Cihazı (ABI Prism 3130)
- ThermalCycler (AppliedBiosystemsGeneAmp PCR System 9700)
- Mikrosantrifüj (Mikro 120-Hettich)
- Isıtıcı blok (Eppendorf)
- Vorteks (IKA VortexGenius 3)
- Otomatik pipet seti (GLP F1 kit 0.2-2 µl,2-20µl, 20-200µl ve 100-1000µl)
- Seqfinder Sequencing System Connexin (GJB2) Kit
- BigDyeTerminator v 3.1cycle Sequencing kit
- BigDyeTerminator v 1.1 v 3.1 5X Sequencing Buffer
- ExoSAP (GML)
- Performans Optimize Edici Polimer (POP 7) (AppliedBiosystem)
- Sephadexs
- Kolonlu Tüp
- 2 ml steril ependorf tüpleri
- 0.2 ml steril ependorf tüpleri
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

### 3.3.2.2. Konneksin 26 (GJB2) geninin PCR ile çoğaltılması

Bu çalışmada 46 bireyin kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'lardan Konneksin 26 geninin ekzon 1, ekzon 2A ve ekzon 2B bölgelerinin çoğaltılması için (PCR çalışmasında) GML firmasının sağladığı *SeqFinder Sequencing System Connexin (GJB2) Kit Procedure* kullanılmıştır. Çalışılacak her bir geni amplifiye edebilmek için polimorfik bölgeyi de içine alacak şekilde uygun primer setleri kullanıldı. Bundan dolayı ilgili bölgelere özgü forward (ileri) ve revers (geri) primer setleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

**Tablo 6.** Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Primer
Ekzon 1-F	TATGTTCTGTGTTGTGTCAT
Ekzon 1-R	TTTGATCTCCTCGATGTCCTTA
Ekzon 2-F	GTGGCCTACCGGAGACAT
Ekzon 2-R	CCCTCTCATGCTGTCTATTTCTT

**PCR' nin hazırlanışı:** Toplam reaksiyon hacmi 15 µl olacak şekilde Tablo 8'deki bileşenler sırasıyla 0.2 µl steril tüplere eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan PCR karışımına Taq DNA polimeraz en son eklendi. Karışım iyice homojenize edildi. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (Applied Biosystem Thermal Cycler) yapıldı (Tablo 7).

**Tablo 7.** Konneksin 26 geni Ekzon-1, 2A ve 2B bölgeleri için 15 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktar (µl)
GML PCR Mix	7,5
GML Taq. Pol.	0,2
Connexin Primer Mix	1,0
GML Enhancing	2,0
Distile su	3,0
Genomic DNA	1,5
Total	15

**Tablo 8.** Konneksin 26 geni Ekzon-1, 2A ve 2B bölgeleri için PCR reaksiyonunun çalışma şartları.

Basamak	Tanım	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	95 °C	10 dakika
2	Amplifikasyon (40 döngü)	95 °C	40 saniye
		60 °C	1 dakika
		72 °C	50 saniye
3	Final Uzama	72 °C	7 dakika
4	Saklama	4 °C	∞

### 3.3.2.3. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

1. PCR platesi 100 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
2. 5 µl amplifiye edilen PCR ürününe GML ExoSAP'tan 2 µl eklendi ve karıştırıldı.
3. 1600 g' de 30 saniye santrifüj yapıldı.
4. 7 µl'lik reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda gösterilen Thermal Cycler programında çalıştırıldı.

**Tablo 9.** PCR Ürünlerinin Temizlenmesi için PCR reaksiyonunun çalışma şartları

Basamak	Tanım	Sıcaklık	Zaman
1	Enzim İnkübasyonu	37 °C	30 saniye
2	Enzim İnaktivasyonu	80 °C	15 dakika
3	Saklama	4 °C	∞

#### 3.3.2.4. Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması

Her bir PCR ürünü dizileme reaksiyonu için Forward ve Reverse olarak iki tüp olarak hazırlandı. Hazırlanan 8 µl' lik reaksiyon karışımı üzerine 2 µl PCR ürününden eklenerek karışım vortekslendi ve 1600 g de 30 saniye santrifüj yapıldı.

**Tablo 10.** Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması için 10 µl'lik PCR' da kullanılan bileşenler ve miktarları (Forward Primer)

Bileşen	Miktar (µl)
BigDye Terminator Mix	2,0
Sequencing Buffer	2,0
Sequencing Forward Primer	2,0
Distile su	2,0
PCR ürünü	2,0
Total	10,0

**Tablo 11.** Dizileme Reaksiyonlarının Hazırlanması için 10 µl'lik PCR' da kullanılan bileşenler ve miktarları (Reverse Primer)

Bileşen	Miktar (µl)
BigDye Terminator Mix	2,0
Sequencing Buffer	2,0
Sequencing Reverse Primer	2,0
Distile su	2,0
PCR ürünü	2,0
Total	10,0

**Tablo 12.** 10 µl' lik reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda gösterilen Thermal Cycler programında çalıştırıldı.

Basamak	Tanım	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	96 °C	1 dakika
2	Amplifikasyon (25 döngü)	96 °C	10 saniye
		50 °C	5 saniye
		60 °C	4 dakika
3	Saklama	4 °C	∞

### 3.3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Dizileme reaksiyonu için gerçekleştirilen PCR işleminden sonra PCR ürünlerinden tuz ve dNTP lerin uzaklaştırılması için bu aşama gereklidir.

- 2 ml' lik kolonlu tüp içine 700 µl Sephadex (1 g Sephadex + 14 ml distile su) eklendi.  
**Not:** Sephadex kullanmadan önce vortekslenir ve 30 saniye çalkalanır.
- 3 dakika 2000 g de santrifüj yapıldı.



- Santrifüj sonrası tüpte kolon oluşumu sağlandıktan sonra PCR ürünü kolondan geçirildi.
- 3 dakika 2000 g de santrifüj yapıldıktan sonra PCR ürünü cihaza yüklenmek için hazırdır.

### **3.3.2.6. DNA Dizi analizi için Örneklerin Cihaza Yüklenmesi**

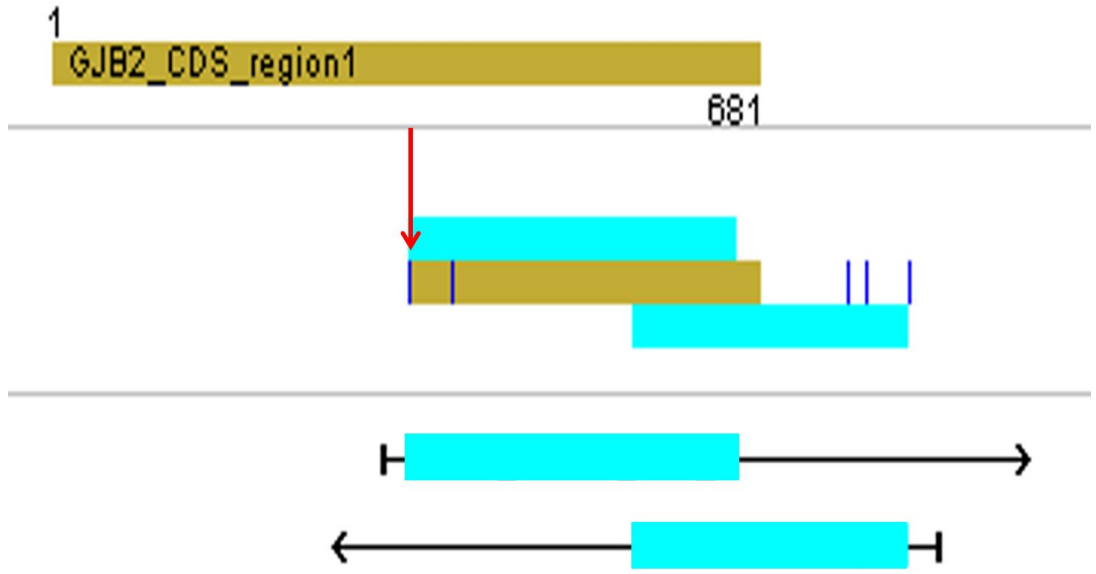
Konneksin 26 geninin ekzon 1, ekzon 2A ve ekzon 2B bölgelerinin dizisinin belirlenmesi için, saflaştırma işlemi sonrası elde edilen ürünler (10-12 µl) kapiller elektroforez sistemi olan otomatik dizi analiz cihazına (Genetic Analyzer cihazı/ ABI Prism 3130) yüklendi. Cihazın okunmasında Seqscape v 2.6 ve Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımları kullanıldı.

## **4. BULGULAR**

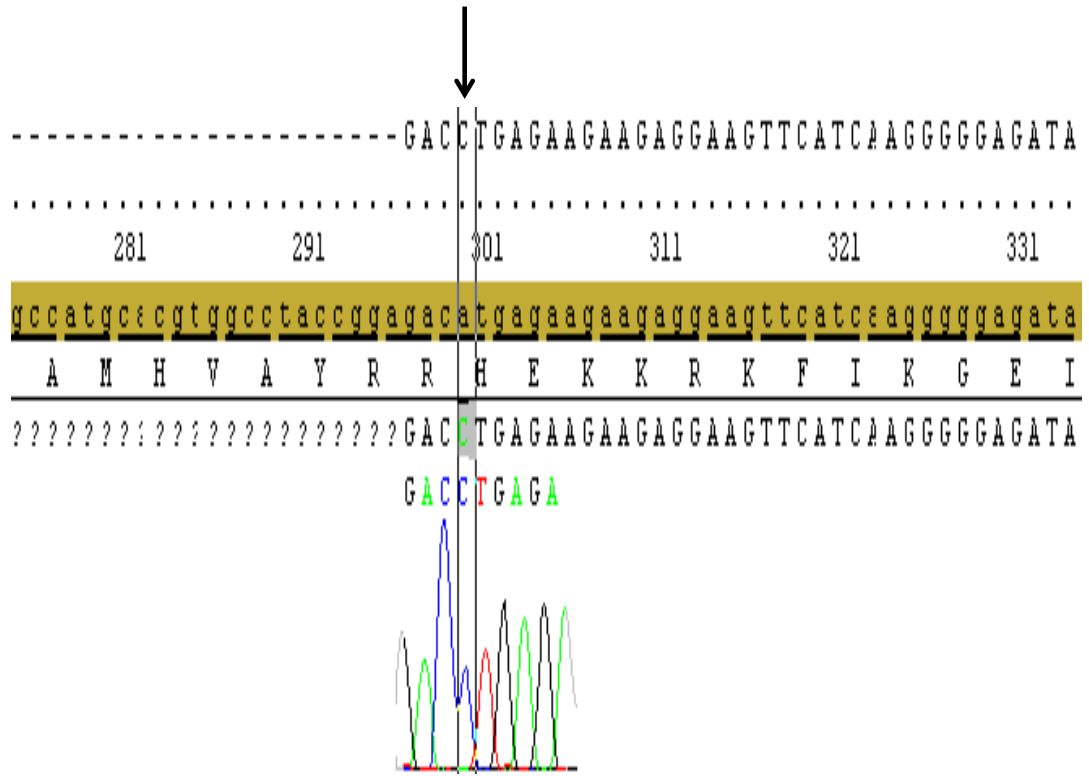
İşitme kaybı olan yaşları 13-24 arasında değişen 46 hasta (5 K, 41 E)'dan oluşan olgu grubuna ait DNA örneklerine PCR işlemi uygulandı ve GJB2 geninin 1. ve 2. ekzonları dizilendi. 6 hastada patolojik mutasyon saptandı (%13) ve 11 hastada hiç mutasyon saptanmadı (%24). Bu mutasyonlar, 35delG heterozigot, H100P homozigot, V153I heterozigot ve V27I heterozigot mutasyonlarıdır. GJB2 genin 1. ekzonunda hiç mutasyon saptanmazken, GJB2 geni 2. ekzonunda; 2 hastada 35delG heterozigot (%4,3), 2 hastada V27I heterozigot mutasyonu (%4,3), 2 hastada V153I heterozigot (%4,3) ve 33 hastada H100P homozigot mutasyonu (%71,7) saptandı.

### **GJB2 Geninin 1. ve 2. Ekzonlarının Dizi Analizi Sonuçları**

### **GJB2 Geninin DNA Dizi Analiz Verilerine Göre 2. Ekzonlarında Saptanan Mutasyonlar ve Görüntüleri**

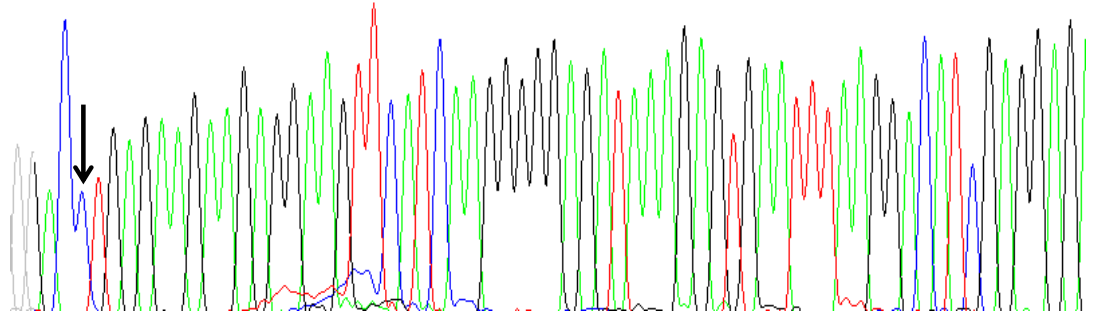


**Şekil 9.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *H100P* homozigot mutasyonunun lokalizasyonu ok ile yukarıda gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).

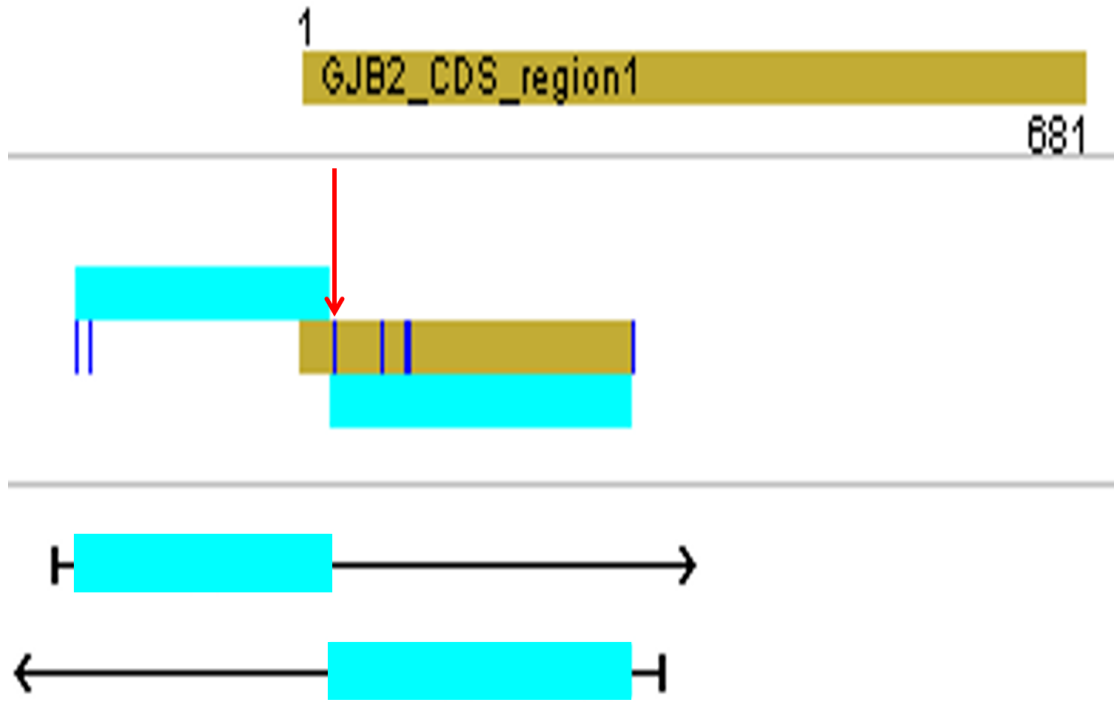


**Şekil 10.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *H100P* homozigot mutasyonu (*A/C* homozigot mutasyonu-Transversiyon) yukarıda ok ile gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).

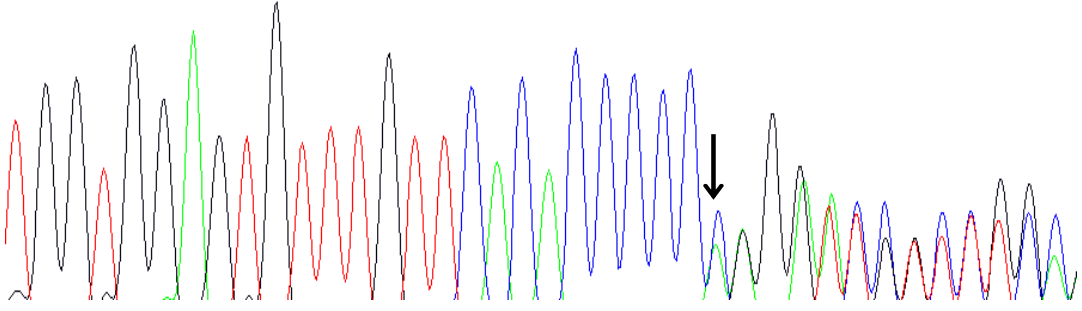
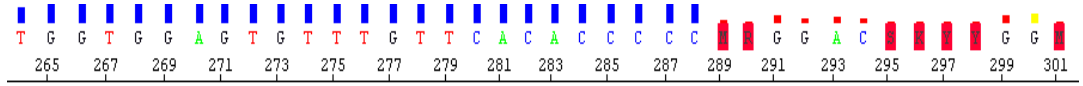
TTGACCTGAGAA GAA GAGG AAGTT CATCAA GGGGGAGATA AAGAGTGA ATTTAAGGACATCGAGGAG  
TTGACCTGAGAA GAA GAGG AAGTT CATCAA GGGGGAGATA AAGAGTGA ATTTAAGGACATCGAGGAG



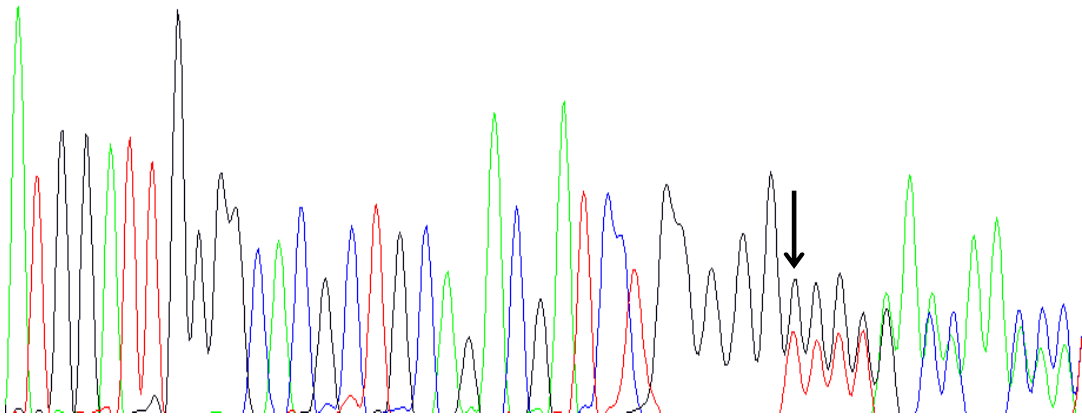
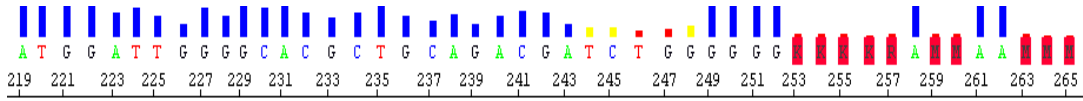
**Şekil 11.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *H100P* homozigot mutasyonu ok ile yukarıda gösterilmektedir (A/C homozigot mutasyonu-Transversiyon) (Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımına ait görüntü).



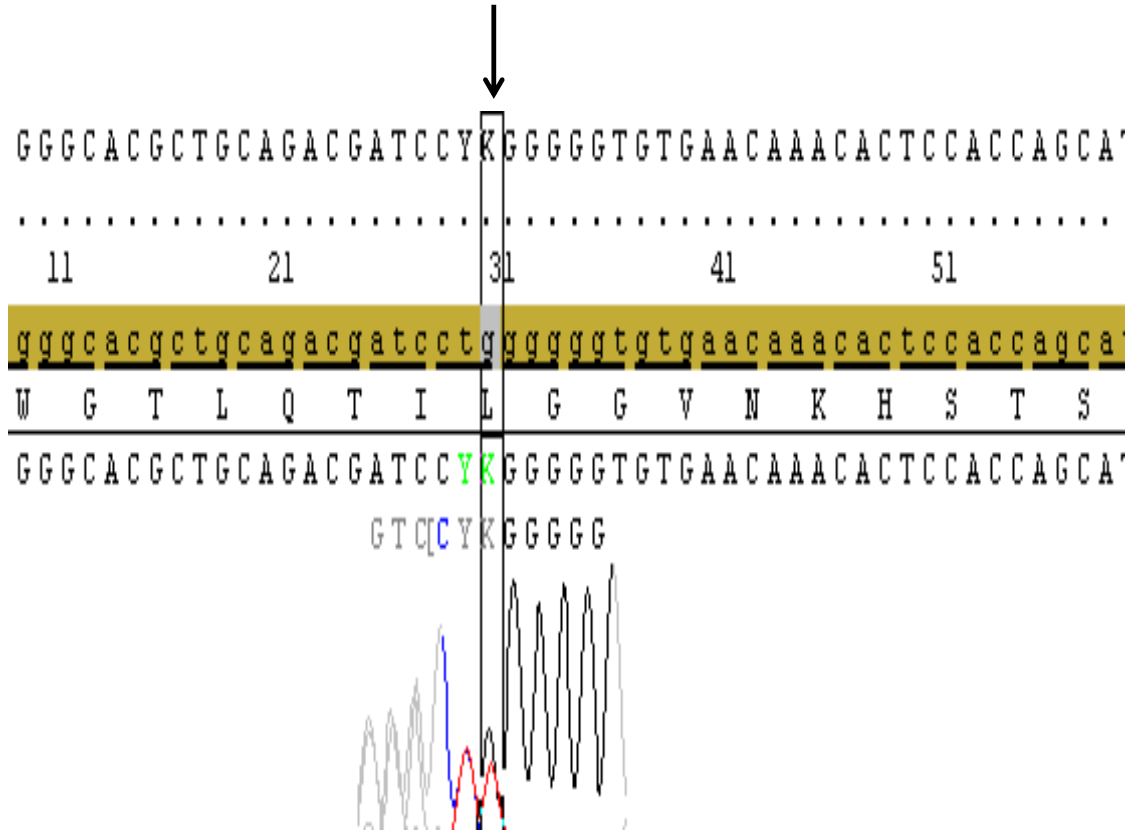
**Şekil 12.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *35delG heterozigot mutasyonunun* (Gly12Valfs) lokalizasyonu (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).



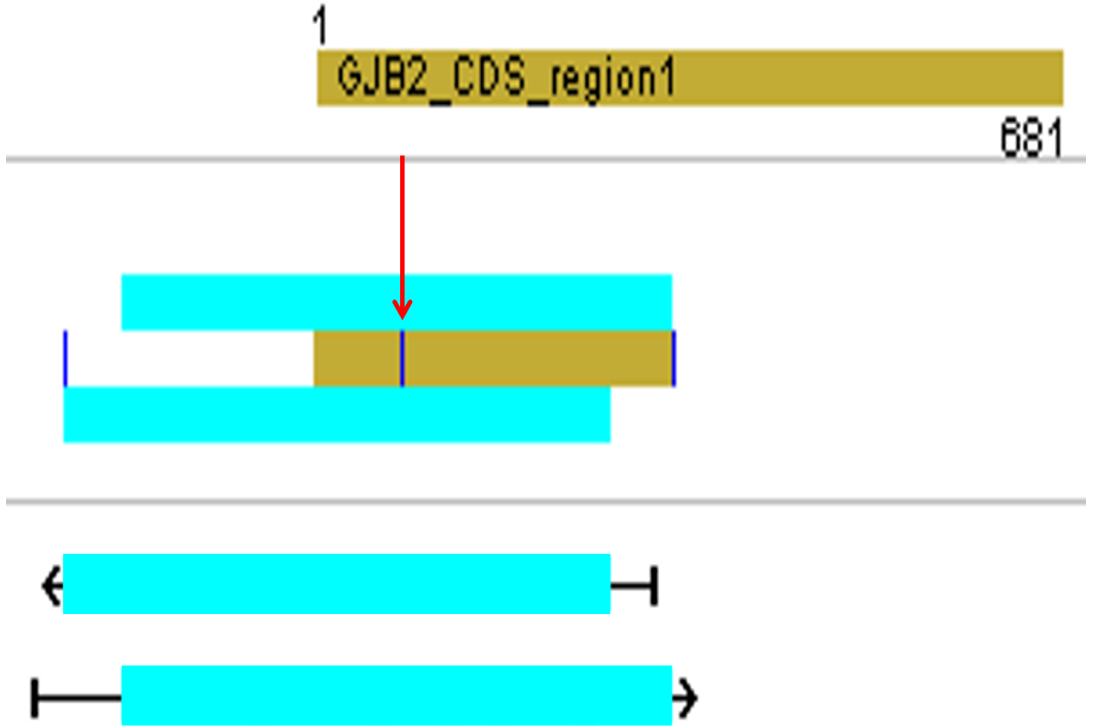
**Şekil 13.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *35delG* heterozigot mutasyonunun (Gly12Valfs) sekans görüntüsü ok ile yukarıda gösterilmektedir (Bu delesyon sonucu erken stop kodonu oluşmakta ve dizilimin sonrasındaki görüntü frameshift mutasyondan kaynaklanmaktadır). (Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımına ait görüntüsü).



**Şekil 14.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *35delG* heterozigot mutasyonunun (Gly12Valfs) sekans görüntüsü ok ile yukarıda gösterilmektedir ( Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımına ait görüntüsü).

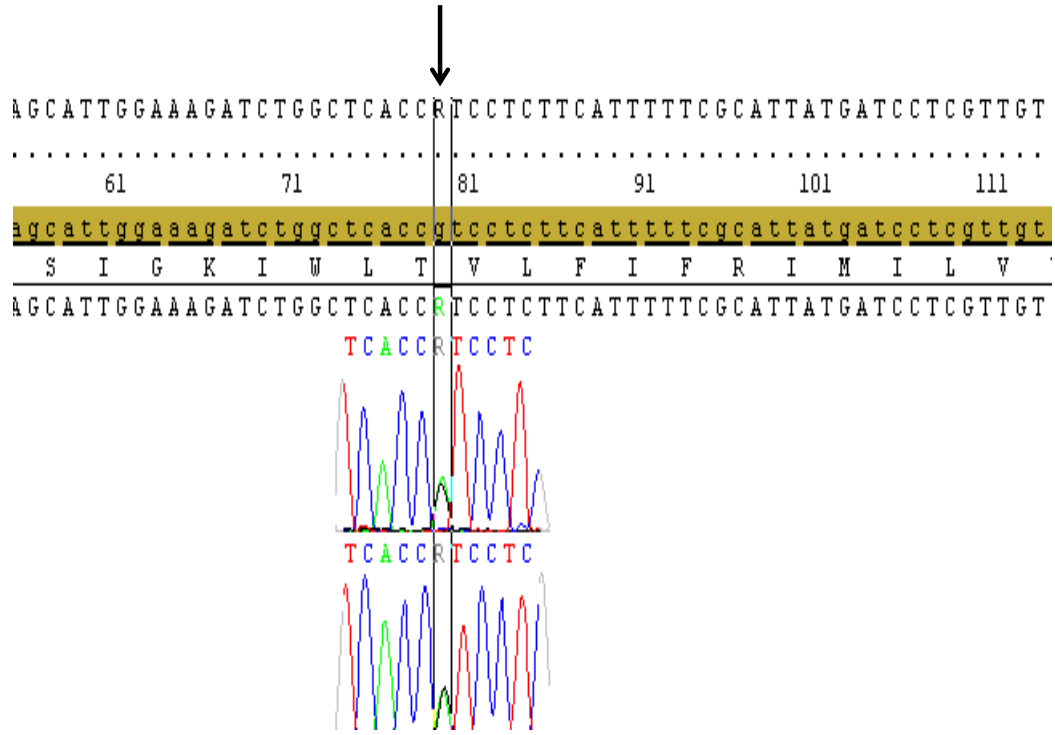


**Şekil 15.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, *35delG* heterozigot mutasyonunun (Gly12Valfs) sekans görüntüsü ok ile yukarıda gösterilmektedir (Bu delesyon sonucu erken stop kodonu oluşmakta ve dizilimin sonrasındaki görüntü frameshift mutasyondan kaynaklanmaktadır). (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).

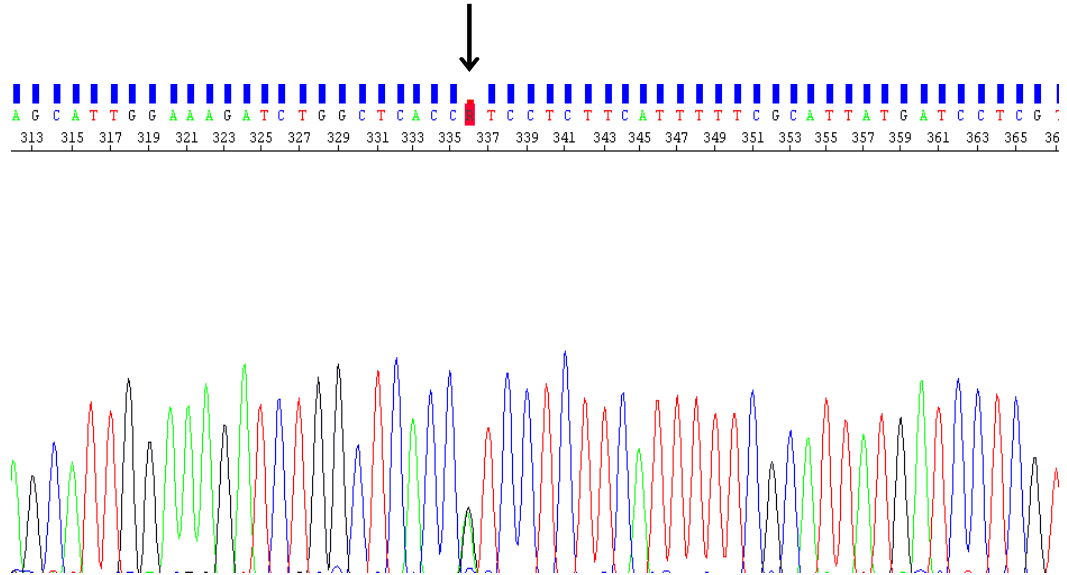


**Şekil 16.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V271 heterozigot mutasyonunun lokalizasyonu yukarıda ok ile gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).

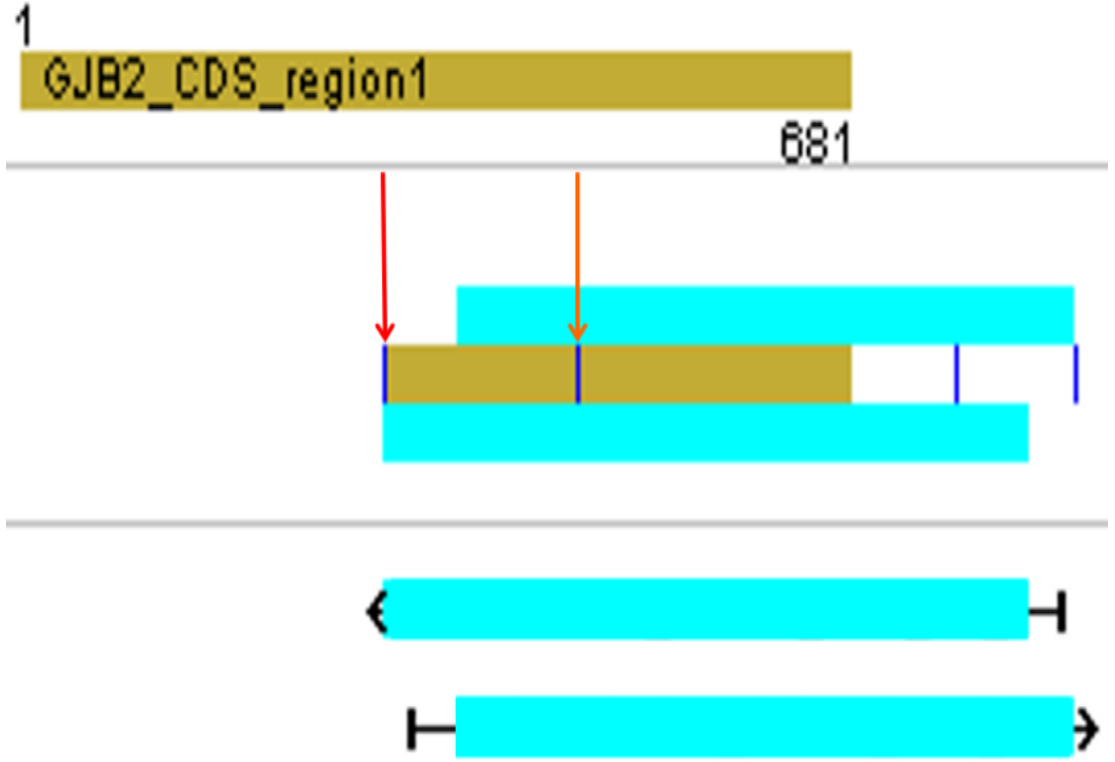




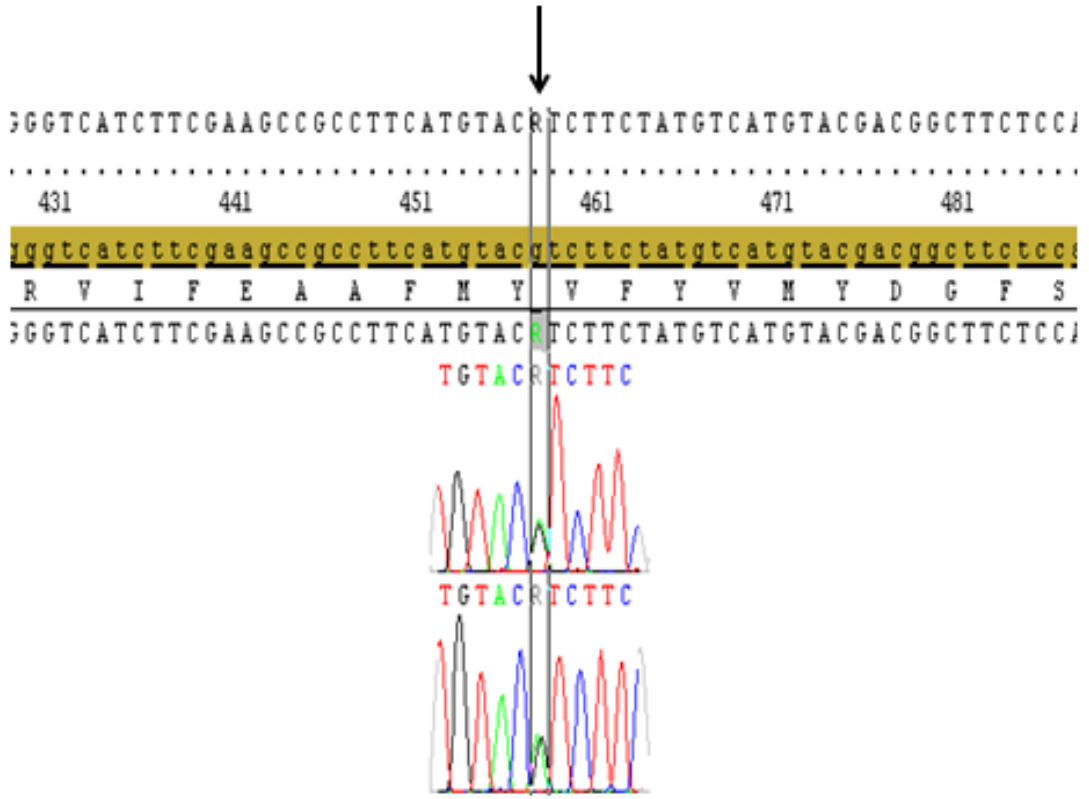
Şekil 17. GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V271 heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü yukarıda ok ile gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).



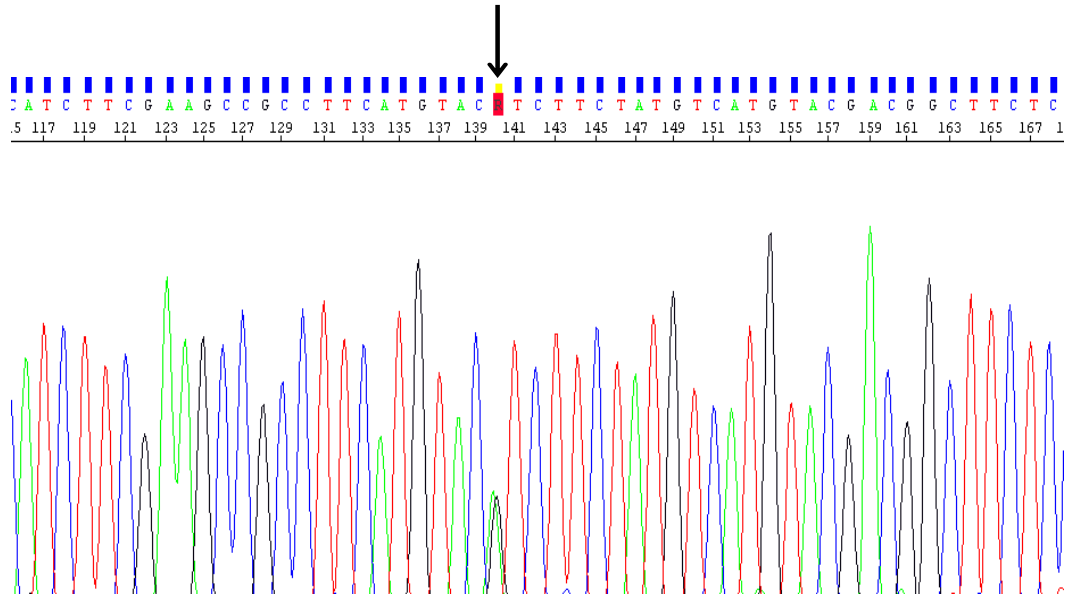
Şekil 18. GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V271 heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü yukarıda ok ile gösterilmektedir (Sequencing Analysis 5.3.1 yazılımının görüntüsü).



**Şekil 19.** GJB2 geninin 2. Ekzonunda saptanan, V153I heterozigot mutasyonunun lokalizasyonu ok ile yukarıda gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).



**Şekil 20.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V153I heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü ok ile yukarıda gösterilmektedir (Seqscape v 2.6 yazılımına ait görüntü).



**Şekil 21.** GJB2 geninin 2. ekzonunda saptanan, V153I heterozigot mutasyonunun sekans görüntüsü ok ile yukarıda gösterilmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Sağırılık, sosyal iletişim ve öğrenme kapasitesi açısından önemli bir sağlık problemidir. Özellikle pediatrik yaş grubunda, tam olarak gelişim için gerekli olduğundan üzerinde durulmalıdır. Yeni doğan tarama testleri ile bu olgulara ilk altı ay içerisinde ulaşma olanaklarımız artmıştır. Genetik açıdan riskli ailelerin saptanması olgulara daha da erken tanı konmasını sağlayabilecektir (Tekin 2001, Bolz 2004). İşitme kayıpları popülasyonda sık rastlanan, sendromik veya non-sendromik seyreden hastalıklardır. Dünyada 70 milyondan fazla işitme kaybından etkilenen birey olduğu düşünülmektedir. Pre-lingual veya konjenital işitme kaybı ise en sık rastlanan duyuşal yitim olup, her 1000 yeni doğanda 1 gözlenebilmektedir. Bebeklerin dil yeteneği, lisan becerilerini kazanabilmesi, çevreyle uyum ve iletişimi, zeka, sosyal ve duyuşal gelişimi açısından işitme duyularının doğuştan itibaren normal sınırlarda olması gereklidir. Bu nedenle sağlıklı yeni doğanlarda en yaygın doğuştan anomaliler arasında gözlenen doğuştan işitme kayıpları ve nedenlerinin erken dönemde saptanması çok önemlidir.

Türkiye de sağırılığın etiyojisi üzerine en geniş kapsamlı çalışmalardan biri 840 sağır öğrencinin pedigrisi ve klinik analizlerinin yapıldığı çalışmadır. Bu çalışmada sağırılığın %51 oranında genetik kökenli olduğu %15'inin sonradan kazanılmış, %34 probandda ise sağırılık nedeninin bilinmediği rapor edilmiştir (Öztürk 2005).

Sılan ve Arakadaşlarının 2010 yılında Gelibolu İşitme Engelliler okulundaki 64 öğrencide yaptıkları klinik değerlendirmeler, pedigrisi analizleri ve tüm olgulara 35delG ve Mit A1555G mutasyonu analizi yapılması sonucunda 40 olgu genetik (%62.5), 10 olgu hem genetik hem edinsel(%15.6) etiyojili olarak tanımlanmış, 13 olgu edinsel (%20.3 ) ve etiyojisi açıklanamayan sadece 1 olgu (%1.6) bildirilmiştir.

Çalışmamızda; Hastalığın genetik nedenlere dayandırılması için her aileden alınan ayrıntılı soy geçmişi, ailede birden fazla sağır birey olması kalıtsal işitme kaybını destekleyici sonuçların alınmasını sağladı.

*35delG mutasyonunun*, Orta Doğu'dan köken aldığı ve populasyon göçleriyle Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmüştür (Van Laer L 2001). Beyaz ırkta 35delG mutasyonunun, bir 'hot spot' bölge olabileceği düşünülmüştür. İkinci ekzonun 30-35. nükleotidleri arasında altı G tekrarı olması, DNA polimeraz alfa için bir hata noktası olabileceğini ve bununda mutasyonel hot spotlara neden olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak SNP belirteçleri kullanılarak yapılan diğer araştırmalar göstermiştir ki; 35delG bir 'hot spot' mutasyondan çok 'founder effect' ile populasyonda frekansı artmış bir mutasyondur. İşitme kayıplı bireylerin birbirleri ile seçimli olarak birleşmesi, gen havuzunda bu patolojik allellerin frekanslarında kaymaya sebep olmaktadır. Ayrıca kistik fibrozisde görüldüğü gibi heterozigot avantaj gösterdiği düşünülmektedir. Bu mutasyon kodon 12 de bulunan glisin aminoasidinin valine dönüşmesine neden olarak erken bir stop kodon oluşmasına neden olmaktadır. Bu mutasyon için homozigot olan kişilerin klinik fenotipleri orta derecede işitme kaybından çok ileri derece işitme kaybına kadar değişebilmektedir (Eyerici, 2010). Bizim çalışmamızda 35delG mutasyonunu heterozigot taşıyan bireyler ileri derecede işitme kaybı göstermektedir. Bu olgularda Konnksin 26 geninin intronik bölgesinde veya diğer konnksin genlerinde de mutasyonlar olabilir. İtronik mutasyonlar da splicing'i bozarak normal polipeptid sentezine engel olabilmektedirler. 17 avrupa ülkesinde yapılan diğer bir çalışmada 35delG'nin ortalama taşıyıcı frekansı 1.96(1/51) bulunmuştur. Kuzey Avrupa'ya doğru gidildikçe bu oranın %2.86 olduğu görülmüştür. 35delG'nin taşıyıcı frekansı Yunanistan (%3.5), Güney İtalya (%4.0), Fransa (%3.4) gibi Akdeniz populasyonlarında daha da yüksektir. Avrasya bölgesinde 2308 sağlıklı bireyi içeren 18 etnik populasyon ile yapılan çalışmada Türkçe konuşan Kazak (%0.8), Uygur (%0.9), Yakut (%0.4) toplumlarında 35delG frekansı düşük bulunmuştur. Özbek ve Altay toplumlarında ise bu mutasyona hiç rastlanmamıştır. Yine Başkır (%0.3) ve Tatar (%1) larda 35delG düşük oranda görülmüştür. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar, 35delG'nin popülasyondan rastgele seçilmiş bireylerdeki taşınma sıklığının % 1.3 ila %1.8 aralığında olduğunu ortaya koymuştur. 35delG mutasyonu açısından Türkiye'nin homojen bir yapı göstermediğini, Türkiye'nin batısı ile doğusu arasında önemli derecede fark olduğunu, akraba evlilik oranı yüksek olmasına rağmen 35delG homozigot

frekansının doğuda daha düşük olduğunu bildirmiştir (Eyerci, 2010). Bizim çalışmamızda 46 probandda 35delG' nin görülmesi %4.3 bulunmuştur ve birleşik heterozigot mutasyon taşıyan probandlarda yaklaşık %50 oranında akraba evliliği hikayesi olduğu görülmektedir.

*V271 polimorfizmi;* 79. nükleotidde guanin yerine adenin gelmesi ile birinci transmembran bölgede 27. kodondaki valinin izolösine dönüşmesi sonucu oluşur. Avrupa toplumlarında sıklığı %'1in altında bulunmuştur (Snoeckx ve ark., 2005). Bizim bulgularımızda 46 hastada görülmesi %'4.3 tür. Çinliler üzerinde yapılan bir çalışmada 100 kişiden oluşan kontrol grubunda 8 kişi de (%8) bu polimorfizme rastlanmıştır. Asya toplumlarındaki bu yüksek oranın "founder effect" nedeni ile olabileceği düşünülmektedir (Öztürk 2005).

*V153I polimorfizmi;* Bazı çalışmalarda mutasyon bazılarında ise polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Örneğin DHPLC tekniği ile yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi bir hastada heterozigot mutasyon tespit edilmiştir. Hastada kohlear sinirde apilazi, internal işitme kanalında daralma gibi radyolojik bulgular ile ilişki gösteren çok ileri işitme kaybı bildirilmiştir (Eyerci 2010). Bu değişimin hem dominat hem de resesif etki gösterdiği düşünülmektedir (Lin ve ark., 2000). Ülkemizde 14 ailede yapılan bir çalışmada sadece 2 hastada bulunmuş ve polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (Beyazıt vd 2003). Bizim çalışmamızda V153I probandın ikisinde heterozigot olarak bulunmuş, 46 hastada görülmesi %4.3 olarak bulunmuştur.

*H100P polimorfizmi;* Çalışmamızda en sık saptanan mutasyon olan H100P homozigot mutasyonu polimorfizm olarak değerlendirildi ve 33 işitme engelli hastada saptandı (%71,7). İşitme engelli kardeşi olan 9 hastadan 7'sinde H100P homozigot mutasyon saptanırken, 1 hastada 35delG heterozigot ve H100P homozigot mutasyonlarının birlikte saptanması mutasyonların kombine etki yaratabileceğini düşündürdü. İşitme kaybına ek olarak spina bifidası olan bir hastada

ise 35delG heterozigot ve H100P homozigot mutasyonları birlikte saptandı. Ancak H100P'nin işitme kaybı ile ilişkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla tam işiten sağlıklı kontrollerde H100P mutasyonunun analizi planlandı.

## 6. KAYNAKÇA

Abreu Alves FR, Quintanilha Ribeiro Fde A. Diagnosis routine and approach in genetic sensorineural hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73:412-7.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290:457-65.

Balcı B. İşitme kaybından sorumlu connexin (Cx26/GJB2) geni 35delG mutasyonunun populasyonumuz için atasal haplotipinin belirlenmesi. 2002, Hacettepe üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, 75 sayfa, Ankara, (Doç. Dr.Pervin Dinçer)

Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, et al. Connexins and deafness. [Electronic Journal]. <http://davinci.crg.es>, September 2010.

Barış I, Kılınç MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutations in the connexin26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet.* 2001; 60(6):452-5.

Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, et al. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003; 67:1331-5.

Bayazit YA, Yilmaz M. An overview of hereditary hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006; 68: 57-63

Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, et al. Impaired permeability to Ins (1, 4, 5) P-3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol.* 2005; 7- 63.

Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull.* 2002; 63:73-94.



Bolz H, Schade G, Ehmer S, Kothe C, Hess M, Gal A, 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 Feb;188 (1-2):42-6.

Brookhouser PE. Nongenetic sensorineural hearing loss in children. Canalis RE, Lambert PR (eds) in *The Ear* (ed 1) Massachusetts, Lippicott Williams and Wilkins. 2000; 489.

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins. The molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.* 1996; 238:1-27.

Davies J, Davis BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem.* 1968; 243:3312-6.

Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, Petit C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet.* 1999; 353:1298-303.

Egeli E, Çiçekci G, Silan F, Oztürk O, Harputluoğlu U, Onur A et. al., Etiology of deafness at the Yeditepe School for the deaf in Istanbul. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003 May; 67(5):467-71.

Ensink RJ, Huygen PL, Cremers CW. The clinical spectrum of maternally transmitted hearing loss. *Adv Otorhinolaryngol.* 2002; 61 :172-83.

Estivill X, Govea N, Barcelo A, et al. 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.

Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 2006; 397:1-14.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet.* 1997; 17: 411-22.

Eyerici N. Genetik işitme kayıplarına neden olan connexin 26 (GJB2) genindeki mutasyonların Nanochip-Mikrodizin yöntemi ile bölgesel araştırılması. 2010, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 122 sayfa, Erzurum (Prof. Dr. İbrahim Pirim).

Finnila S, Majamaa K. Lack of a modulative factor in locus 8p23 in a Finnish family with nonsyndromic sensorineural hearing loss associated with the 1555A>G mitochondrial DNA mutation. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11: 652-8.

Finsterer J and Fellingner. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005; 69(5): 621-47.

Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003; 4: 341-402.

Forge A, Becker D, Casalotti S, et al. Gap junctions in the inner ear: Comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J Comp Neurol.* 2003; 467:207-29.

Gasparani P, Rabionet R, Barbujani G ve ark. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8: 19-23.

Gregory MC. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy: unraveling the tangled strands of type IV collagen. *Kidney Int.* 2004; 65:1109-10.

Guan MX, FischelGhodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:963-71.

Guilford P, Benarab S, Blanchard S, et al. A Non-Syndromic Form of Neurosensory, Recessive Deafness Maps to the Pericentromeric Region of Chromosome-13q. *Nat Genet.* 1994; 6:24-8.

Guyton, AC, Hall, JE. *Tıbbi Fizyoloji*, (Çeviri Editörü: Çavuşoğlu H) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 602-611.

Hayashi C, Funayama M, Li. Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M. et. al., Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Feb; 75(2):211-4.

Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, et al. Phenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17:517-24.

Hismi BO, Yilmaz ST, Incesulu A, Tekin M. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: Variability is present for all genotypes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006; 70:1687-94.

Josephson GD, Grundfast KM. Genetic hearing impairment in children. Canalis RE, Lambert PR (eds) in *The Ear* 1. baskı Massachusetts, Lippicott Williams and Wilkins 2000; 511.

Kalay E, Caylan R, Kremer H, et al. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res.* 2005; 203:88-93.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997; 387:80-3.

Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, et al. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Rev*. 2000; 32:163-6.

Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med*. 2007; 9:393-408.

Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res*. 2000; 462:197-207.

Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996; 84: 381-8.

Lalwani AK, Castelein CM. Cracking the auditory genetic code: nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Am J Otol*. 1999; 20:115-132.

Lee JR, White TW. Connexin-26 mutations in deafness and skin disease. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11:35.

Lin D, Goldstein JA, Mhatre AN, et al. Assessment of denaturing highperformance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2). *Hum Mutat*. 2000; 18:42-51.

Lingala HB, Penagaluru PR. Role of connexin 26 (GJB2) & mitochondrial small ribosomal RNA (mt 12S rRNA) genes in sporadic & aminoglycoside-induced non syndromic hearing impairment. *Indian J Med Res*. 2009; 130:369-78.

Liu XZ, Pandya A, Angeli S, et al. Audiological features of GJB2 (connexin 26) deafness. *Ear and Hearing*. 2005; 26:361-9.

Lortholary O, Tod M, Cohen Y, et al. Aminoglycosides. *Med Clin North Am* 1995; 79:761-87.

Martinez AD, Acuna R, Figueroa V, et al. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 1:309-22.

Martini A, Calzolari F, Sensi A. Genetic syndromes involving hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 1:S2-12.

Morton CC and Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med*. 2006; 354(20): 2151-64.

Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 630:16-31

Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2003; 9: 109-19.

Noyan A. *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Ankara, 1999.

Nickel R, Forge A. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16: 452-7.

Ozturk O, Silan F, Oghan F, Egeli E, Belli S, Tokmak A. et. al., Evaluation of deaf children in a large series in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Mar; 69(3):367-73.

Ozturk O, Silan F, Oghan F, et al. Evaluation of deaf children in a large series in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005; 69:367-73

Petersen MB. Non-syndromic autosomal dominant deafness. *Clin Genet.* 2002; 62: 1-13

Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med* 2006; 12:57-64.

Petit C, Levilliers J and Hardelin JP. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet.* 2001; 35:589-646.

Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial Ribosomal-RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 1993; 4:289-94.

Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *J Mol Diagn.* 2004; 6:275-84.

Silan F, Demirci L, Egeli A, et al. Syndromic etiology in children at schools for the deaf in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2004; 68:1399-406.

Silan F, Güçlü O, Kadioglu LE, Silan C, Atik S, Uludağ A et al. GJB2 35delG and mitochondrial A1555G mutations and etiology of deafness at the Gelibolu school for the deaf in Turkey", *Journal of international advanced otology*, 2011; 7:361-371.

Sinnathuray AR, Raut V, Awa A, et al. A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol.* 2003; 24:418-26.

Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldman D et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:945-957.

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics.* Wiley-Liss, 1999.

Tamayo ML, Olarte M, Gelvez N, Gomez M, Frías JL, Bernal JE. et al., Molecular studies in the GJB2 gene (Cx26) among a deaf population from Bogotá, Colombia: results of a screening program. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008 Jan; 73(1):97-101.

Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH, Xia XJ, Liu XZ. et. al., Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet.* 2001 May; 108(5):385-9.

Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clinical Genetics.* 2005; 67:31-7.

Tekin, M., Cin, S. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2002; 55(3): 211-216.

Tekin M, Duman T, Bogoclu G, et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr.* 2003; 162:154-8.

Tekin M, Arnos KS and Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet.* 2001; 358(9287):1082-90.

Thonnissen E, Rabionet R, Arbones ML, et al. Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet.* 2002; 111:190-7.

Tu ZJ, Kiang DT. Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:169-81.

Tümer S. Kalıtsal ve non-sendromik işitme kaybı olgularının aday lokuslardaki mutasyonel analizi, 2007, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Usami SI, Abe S, Shinkawa H, et al. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: Special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord.* 1998; 31:423-35.

Uyguner O, Emiroğlu M, Hafiz G. Spectrum of Connexin 26 gene(GJB2) mutations in Turkish families with inherited non-syndromic deafness and determination of the GJB2 35delG mutation carrier frequency in Turkish population. *Eur. J. Hum Genet.* 2001; SUPPL 1, 283

Valiunas V, Polosina YY, Miller H, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol.* 2005; 568:459-68.

Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet.* 2001; 8:515-8.

Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med.* 2000; 342(15):1101-9.

Xing GQ, Chen ZB, Cao X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell Res.* 2007; 17:227-39

Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, et al. Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol.* 2006; 209:177-86.



## 7-EKLER

### EK-1

### SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.		
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.		
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.		
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.		
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.		
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)		
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.		
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.		
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.		
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.		
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlenin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.		
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.		

Tarih: 15/01 / 2016 Öğrenci Duygu KANKAYA İmza	Tarih: 15/01 / 2016 Danışman Prof. Dr. Fatma Sılan İmza
---	--

**EK-2 ÇANAĞKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİLTİ TEZ YAZIM**  
**KONTROL LİSTESİ**

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: 15/01 / 2016 Öğrenci Duygu KANKAYA İmza	Tarih: 14/01 / 2016 Danışman Prof. Dr. Fatma Silan İmza	

EK-3 Etik Kurul Onay Formu



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-277  
Konu : Başvuru İncelemesi

30./09/2013

Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz “İşitme Engelli Olgularda Moleküler Etiyolojik Sebeplerin Araştırılması” başlıklı EK-2013-162 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 25/09/2013 tarih ve 18-06 nolu kararı aşağıdadır. Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Emine COŞAR  
Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkan

**Karar Tarihi** : 25.09.2013 15:00

**Karar No** : 2013-18

**Karar-06)** EK-2013-162 no’lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsünün göndermiş olduğu düzeltmeler kontrol edildikten sonra yapılan oylamada “**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**” kararı verilmiştir. (Yrd. Doç. Dr. Naci TOPALOĞLU projede yer almasından ve Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN’ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamışlardır.)

.../09/2013 Bilgisayar İşletmeni : F.OTURAN

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	DUYGU	<b>Soyadı</b>	KANKAYA
<b>Doğum Yeri</b>	ÇANAKKALE/MERKEZ	<b>Doğum Tarihi</b>	03/04/1987
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kimlik No</b>	36448137220
<b>E-mail</b>	dyg_gwn@hotmail.com	<b>Tel</b>	(541) 7892489

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Öğrenim devam ediyor.
<b>Lisans</b>	Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2010

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri .

1. Uludağ A., Sılan F., Uludağ A., Kankaya D. G., Sılan C., Yalçıntepe S., Sahin E. M., Ozdemir O. MTHFR polimorfizmlerinin kanser riski ile ilişkisi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 207, 19-23 Aralık 2012, Bursa.
2. Ozdemir O., Uludağ A., Güngör A. N. C., Coşar E., Yalçıntepe S. A., Uysal D., Kankaya D. G., Demir Y., Sılan F. Fetal anöploidilerin analizinde QF

PCR: Çanakkale deneyimi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 61, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

3. Sılan F., Uludağ A., Kankaya D. G., Güneş F., Uysal A., Yalçın-tepe S., Karadeli U., Ozdemir O. Çanakkale populas-yonunda Beta-Talesemi mutasyon profilleri ve sıklığı. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 252, 19-23 Aralık 2012, Bursa
4. Kankaya D., Sılan F., Ozdemir O. İşitme Engelli Olgularda Moleküler Etiyolojik Sebeplerin Araştırılması. Gevher Nesibe Tıp Günleri 2016 ve Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları Kongresi, 11-13 Şubat 2016, Kayseri

### **İlgi Alanları-Laboratuvar Deneyimi**

- Moleküler Genetik
- DNA İzolasyonu
- PCR
- Real-Time PCR
- Sanger Sekans
- Pyro Sekans
- MLPA