

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

OTOZOMAL RESESİF NON-SENDROMİK İŞİTME KAYIPLI
BİREYLERDE *GJB2* GEN MUTASYONLARININ SSCP VE DNA DİZİ
ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

118838

118838

DOKTORA TEZİ

ERSAN KALAY

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

MAYIS-2002
TRABZON

T. C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

OTOZOMAL RESESİF NON-SENDROMİK İŞİTME KAYIPLI BİREYLERDE GJB2
GEN MUTASYONLARININ SSCP VE DNA DİZİ ANALİZİ İLE
BELİRLENMESİ

ERSAN KALAY

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 24.04.2002

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 21.05.2002

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Doç. Dr. A. Nurten AKARSU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ö. Refik ÇAYLAN

Jüri Üyesi : Yard. Doç. Dr. Fahri UÇAR

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Abdülkadir REİS

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince çalışmalarımı başlangıcından sonuna kadar sürekli takip edip, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca karşılaştığım her türlü teknik sorunu aşmamda desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, önerileri ve iltifatlarıyla bana cesaret veren, yoğun iş temposuna rağmen bana zaman ayırabileceğini bildiğim ve kendisi ile tanışmış olmaktan dolayı kendimi çok şanslı saydığım sayın Hocam Doç. Dr. A. Nurten AKARSU'ya en derin saygı ve şükranları sunmaktan sonsuz keyif alırım.

Kendisi ile çalışmamı kabul ederek beni onurlandıran, çalışmanın klinik değerlendirmelerini büyük titizlikle yapan, her konuda beni destekleyen ve kendisi ile çalışmaktan büyük keyif aldığım sayın Hocam Doç. Dr. Refik ÇAYLAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na, Dr. Osman B. ÖZGÜMÜŞ'e, Yük. Hemşire Yeliz CİNEL'e, Odyometrist Evrim KANDEMİR'e ve bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime müteşekkir olduğunu belirtmek isterim.

Birlikte sevinip birlikte üzüldüğüm, çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve beni sabırla destekleyen, kendisine ayırmam gereken vakti çalışmalarına ayırmama müsaade eden sevgili eşim Aysel KALAY'a sabrından, hoşgörüsünden ve desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Ersan KALAY

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	<i>i</i>
İÇİNDEKİLER	<i>ii</i>
TABLO LİSTESİ	<i>v</i>
ŞEKİL LİSTESİ	<i>vii</i>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Genetik Hastalıklar	4
2.1.1. Kromozomal Hastalıklar	5
2.1.2. Multifaktöriyel Hastalıklar	5
2.1.3. Tek Gen Hastalıkları	5
2.2. Tek Gen Hastalıklarının Kalıtımı	6
2.2.1. Otozomal Dominant Kalıtım	6
2.2.2. Otozomal Resesif Kalıtım	7
2.2.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım	7
2.2.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım	7
2.2.5. Mitekondrial Kalıtım	8
2. 3. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar	8
2.3.1. Nokta Mutasyonları (Nükleotid Substitution)	8
2.3.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar	10
2.3.3. Büyük Delesyonlar ve İnsersiyonlar	10
2.3.4. Trinükleotid Tekrar Artışları	10

2.4. Mutasyon Tarama Metotları	11
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
2.4.2. SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism)	12
2.4.3. ARMS (Amplifikasyon Refractory Mutation System)	12
2.4.4. DNA Dizi Analizi	13
2.4.4.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi	13
2.5. İşitme Mekanizması	15
2.6. İşitme Bozuklukları	19
2.6.1. İşitme Bozukluklarının Genetiği	20
2.6.1.1. <i>GJB2</i> (Gap Junction Beta-2) Geni	22
2.6.1.2. Connexinler ve Connexin 26'nın İşitme Kaybındaki Rolü	22
2.6.1.3. <i>GJB2</i> (Gap Junction Beta-2) Mutasyonları	24
3. MATERYAL METOD	28
3.1. MATERYAL	28
3.1.1. Çalışma grubu	28
3.1.2. Kimyasallar	29
3.1.3. Gereçler	30
3.1.4. Solüsyonlar	32
3.1.4.1. DNA İzolasyon Tamponları	32
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları	34
3.1.4.3. Poliakrlamid Jel Elektroforez Solüsyonları	34
3.1.4.4. Yükleme Tamponları	36
3.1.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonları	37
3.2. METOD	38
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu	38
3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçülmesi	39
3.2.3. Yarışmalı ARMS İle 35delG'nin Taranması	39
3.2.3.1. Yarışmalı ARMS İçin PCR	39

3.2.3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile 35delG'nin Gösterilmesi	40
3.2.4. SSCP Analizi	42
3.2.4.1. SSCP Analizi İçin PCR	42
3.2.4.2. <i>GJB2</i> Mutasyonlarının SSCP Analizi İle Taranması	43
3.2.5. Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi	45
3.2.5.1. Dizi Analizi İçin DNA Örneklerinin PCR İle Çoğaltılması	45
3.2.5.2. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi	45
3.2.5.3. DNA Dizi Analizi İçin PCR	46
3.2.5.4. DNA Dizi Analizini İçin Jel Elektroforezi	47
3.2.5. Yeni Mutasyonların Kontrol Grubunda Taranması	48
3.2.5.1. 517C→T Mutasyonunun Kontrol Grubunda Taranması	49
3.2.5.2. 238C→A Mutasyonunun Kontrol Grubunda Taranması	49
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. ÖZET	92
8. SUMMARY	93
9. KAYNAKLAR	94

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İşitme kayıplarının sınıflandırılması	19
Tablo 2. İşitme kaybından sorumlu otozomal resesif genler	21
Tablo 3. İşitme kaybından sorumlu otozomal dominant genler	21
Tablo 4. İşitme kaybından sorumlu X'e bağlı genler	21
Tablo 5. İşitme kaybına neden olan resesif <i>GJB2</i> mutasyonları.	25
Tablo 6. İşitme kaybına neden olan dominant <i>GJB2</i> mutasyonları.	26
Tablo 7. 35delG mutasyonu belirlemek için kullanılan allel spesifik primerlerin dizileri	39
Tablo 8. <i>GJB2</i> genini amplifikasyonunda kullanılan primerlerin dizileri, pozisyonları ve ürünleri.	42
Tablo 9. DNA dizi analizi reaksiyonu	46
Tablo 10. 517C→T ve 238C →A mutasyonları için dizayn edilen allel spesifik primerler.	49
Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen bireylerin ailelerindeki ve tek bir kuşaktaki işitme engelli birey sayısı, anne-babaları arasındaki akrabalık, alındıkları okullar ve yaşadıkları iller.	51
Tablo 12. Örneklerin SSCP jeline yükleniliş sırası.	57
Tablo 13. Farklı bant paterni veren örneklerin <i>GJB2</i> geni üzerinde oluşturulan bölgelere göre dağılımı.	61

Tablo 14. <i>GJB2</i> geninde belirlenen mutasyonlar .	74
Tablo 15. <i>GJB2</i> geninde belirlenen mutasyon frekansı ve sıklığı	75
Tablo 16. <i>GJB2</i> mutasyonlarının rölatif sıklığı	75



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Dış, orta ve iç kulağın görünümü.	15
Şekil 2. Kokleanın kesiti ve Corti organının yapısı.	16
Şekil 3. Tüylü hücrelerin elektron mikroskop görüntüsü.	17
Şekil 4. Dış tüylü hücre ve iyon kanalları.	18
Şekil 5. Connexin 26 proteininin konfüğürasyonu.	23
Şekil 6. Gap junction proteinlerinin hücre membranındaki yerleşimi	24
Şekil 7. 35delG mutasyonunun yarışmalı ARMS ile gösterilmesi.	55
Şekil 8. SSCP analizinde kullanılacak <i>GJB2</i> geni PCR ürünleri.	56
Şekil 9. <i>GJB2</i> geni I. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.	57
Şekil 10. <i>GJB2</i> geni II. Bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.	58
Şekil 11. <i>GJB2</i> geni III. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.	59
Şekil 12. <i>GJB2</i> geni IV. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.	60
Şekil 13. 71G→A (W24X/ Trp→stop) mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	62
Şekil 14. Heterozigot ve homozigot delE120'nin (delGAG 358-360) DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	63

Şekil 15.	Heterozigot 238C→A / Q80K (gln→lys) değişiminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	64
Şekil 16.	Homozigot 310del14 mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	65
Şekil 17.	Heterozigot 517C→T / P173S (prolin→serin) değişiminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	66
Şekil 18.	Heterozigot 478G→A/G160S polimorfizminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	67
Şekil 19.	Heterozigot 457G→A/V153I (val→ile) polimorfizminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	68
Şekil 20.	46 numaralı bireyin ailesinde 35delG'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi.	69
Şekil 21.	46 numaralı bireyin ailesinde 238C→A/Q80K'nın yarışmalı ARMS ile gösterilmesi.	69
Şekil 22.	Q80K değişimi görülen 46 numaralı bireyin aile ağacı ve aile bireylerinin genotipi.	70
Şekil 23.	Q80K mutasyonunu 35delG ile kompaund heterozigot olarak taşıyan 46 numaralı bireyin odyoloji sonucu.	70
Şekil 24.	17 numaralı bireyin ailesinde 35delG'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi.	71
Şekil 25.	17 numaralı bireyin ailesinde 517C→T/P173S'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi.	71
Şekil 26.	517C→T/P173S değişimi görülen 17 numaralı bireyin aile ağacı ve aile bireylerinin genotipi.	72
Şekil 27.	P173S mutasyonunu 35delG ile kompaund heterozigot olarak taşıyan 17 numaralı bireyin (II-1) ve aynı genotipi taşıyan kız kardeşinin (II-2) odyoloji sonuçları.	72

GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde yaklaşık 4000 civarında tek gen hastalığı bilinmektedir ve bu hastalıkların sıklıkları coğrafik bölgelere ve etnik orijinlere göre değişkenlik göstermektedir (1). İşitme kaybı en sık karşılaşılan algılama bozuklularından biri olup her 1000 çocuktan birinde görülmektedir (2). İşitme bozuklukları etiolojilerine göre; genetik veya non-genetik, başlama yaşına göre; prelingual veya postlingual, fenotipik bulgularına göre ise sendromik veya non-sendromik olarak sınıflandırılmaktadır. Non-genetik işitme kayıplarına perinatal enfeksiyonlar, kokleayı etkileyen akustik veya serebral travmalar, ototoksik ilaçları içeren çevresel faktörler neden olmaktadır. Genetik işitme kayıpları ise tek bir genin mutasyonu (monogenik) veya farklı genlerin mutasyonları (multifaktöriyel) ile çevresel faktörlerin kombine etkileri sonucunda gelişmektedir (3). Prelingual işitme bozukluklarının yaklaşık olarak %50'sinin sebebini çevresel faktörler teşkil ederken, geri kalan diğer yarısının %30'unu sendromik ve %70'ini non-sendromik olmak üzere tek gene bağlı bozukluklar oluşturmaktadır. Non-sendromik işitme bozukluklarının %75'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %5'i X'e bağlı ve %1'den azı mitokondrial kalıtım göstermektedir (4).

2001 yılı itibariyle, non-sendromik otozomal dominant sağırılığa neden olan 40 adet DFNA lokusu, non-sendromik otozomal resesif sağırılığa neden olan 29 adet DFNB lokusu ve non-sendromik X'e bağlı sağırılığa neden olan 8 adet DFN lokusu olmak üzere toplam 78 lokus tanımlanmıştır. Bu lokuslardan 16 DFNA, 11 DFNB ve 2 DFN geni klonlanmıştır. Belirlenen genlerin ve lokusların dışında işitme kaybına neden olan başka lokusların da olabileceği önerilmektedir (5, 6).

Otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan genlerin araştırılması sürecinde ilk olarak 1994 yılında *DFNB1* lokusu tanımlanmıştır. Takip

eden yıllarda, *DFNB1* lokusundan non-sendromik otozomal resesif işitme kaybından sorumlu *GJB2* (Gap Junction Beta-2) geni klonlanmıştır. Çeşitli toplumlarda yapılan mutasyon taramaları sonucunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı vakaların yaklaşık %50'sinden *GJB2* gen mutasyonlarının olduğu gösterilmiştir (7, 8, 9, 10, 11, 12).

GJB2 geni, 13. kromozomun uzun kolunun proksimalinde 13q11-q12 bölgesinde yer almaktadır. *GJB2* geni 226 amino asitten oluşan, 26 kD ağırlığında connexin 26 (Cx26) olarak adlandırılan bir protein kodlamaktadır. *GJB2* mutasyonları, potasyum iyonlarının tüylü hücrelerden supporting hücrelere ve oradan da tekrar endolenfe dönmelerini sağlayan gap junctionları bozarak potasyum iyon döngüsünü engellemektedir. 2001 yılı itibariyle otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan yaklaşık 67 adet *GJB2* mutasyonu rapor edilmiştir (13).

Klinik muayene ile, non-sendromik olan genetik işitme bozuklukları ile çevresel faktörlere bağlı gelişen işitme bozukluklarını birbirinden ayırmak mümkün değildir. Ancak, ailede işitme bozukluğu olan ikinci bir bireyin bulunması sorunun genetik olduğu yönünde bilgi vermektedir (9). Bu nedenle ailelere yeterli genetik danışmanlık vermek mümkün olmamakta ve kesin teşhis ancak genetik bozukluğun gösterilmesi ile mümkün olmaktadır. Diğer taraftan bilindiği gibi kalıtsal hastalıklardan korunmanın belli bir yöntemi yoktur. Bu hastalıkların birçoğunun ise tedavi edilmeleri mümkün değildir. Hastalıkların önlenmesi, toplumda taşıyıcıların belirlenmesi, genetik danışma ve doğum öncesi tanı metotları ile hastalığın bir sonraki kuşaklara aktarılmasının engellenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenlerle toplumlarda kalıtsal hastalıklara neden olan spesifik mutasyon profillerinin bilinmesinin önemi büyüktür.

Bu çalışmada, Türk toplumunda işitme bozukluklarının genetik yönden araştırılması için bir DNA bankası oluşturmak ve bu DNA'lar kullanılarak Türk toplumunda, non-sendromik otozomal resesif işitme kaybına neden olan *GJB2* gen mutasyonlarının belirlenmesi ve mutasyon profilinin çıkartılması amaçlanmıştır. Bunun yanında, işitme kayıplarından sorumlu olduğu bilinen diğer genlerdeki

mutasyonların taranması, bilinen lokuslardaki genlerin bulunması ve İnsan Genom Projesi kapsamında bilinen hiçbir gene ve lokusa bağlantı göstermeyen ailelerde yeni genlerin aranması yönündeki çalışmalara temel oluşturacak bir çalışmanın başlatılması planlanmıştır. Ayrıca, moleküler genetik çalışmalarının artan önemi karşısında moleküler genetik laboratuvarımızın ve bilgi birikimimizin geliştirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Genler kararlı bir yapı gösterseler de, zaman zaman doğal veya çevre şartlarına bağlı olarak değişikliklere uğrarlar. Genetik materyalde meydana gelen, fenotipe yansıyan, yeni oluşan hücrelere kalıcı bir şekilde aktarılan değişikliklere mutasyon denilmektedir (1). Yalnızca DNA'nın primer dizisindeki değişiklikler değil, epigenetik olarak adlandırılan metilasyon bozuklukları da bu grup içine girer. Mutasyonlar hem somatik hücrelerde hem de üreme (germ-line) hücrelerinde olabilir. Üreme hücrelerinde olan mutasyonlar kuşaktan kuşağa aktarılabilir ve kalıtsal hastalıklara neden olurlar. Bu mutasyonların bazıları bireylerin yaşama şansını ortadan kaldırdıkları için gelecek kuşaklara taşınmazlar. Daha az zarar verici ve uygun koşullarda tolere edilebilen mutasyonlar gelecek kuşaklara aktarılırlar. Vücut (soma) hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar daha çok kanserle ilgili olup fenotipe yansıyabilirler ancak kalıtsal değildirler. Mutasyonlar; yapısal ve enzimatik proteinleri kodlayan genlerin bir şekilde ekspresyonunu değiştirerek genetik hastalıkların oluşmasına neden olurlar (14).

2.1. Genetik Hastalıklar

Genetik hastalıklar, mutasyonların genetik materyali tutuşuna ve çevresel faktörlerden etkilenme durumlarına göre kromozomal, multifaktöriyel ve tek gen hastalıkları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (1, 14).

2.1.1. Kromozomal Hastalıklar

Bu hastalıklar; kromozomlardaki sayısal ve yapısal değişiklikler sonucu oluşurlar. Majör kromozom bozukluklarının çoğu büyüme ve mental gerilik, çeşitli konjenital anormalliklerle ve dismorfik özelliklerle karakterizedir. Kromozomal bozukluklar oldukça yaygındır. Canlı doğan çocukların yaklaşık % 0.7'sinde ve ilk üç aydaki spontan düşüklerin yaklaşık %50'sinde kromozomal anomaliler görülmektedir (15).

2.1.2. Multifaktöriyel Hastalıklar

Multifaktöriyel (poligenik veya kompleks) hastalıkların temelini bir araya gelmiş birden fazla küçük genetik varyasyonlar oluştururken çevresel faktörler de önemli rol oynamaktadır. Yetişkin dönemde görülen diabetes mellitus, koroner arter hastalıkları, hipertansiyon, şizofreni ve doğumda görülen nöral tüp defektleri, konjenital kalp hastalıkları, yarı damak-yarı dudak gibi defektler multifaktöriyel hastalıklara örnek olarak verilmektedir. Multifaktöriyel hastalıklar aile içinde tekrarlama eğilimi göstermelerine rağmen bilinen tek-gen kalıtım kalıplarından hiçbirine uymazlar (15).

2.1.3. Tek Gen Hastalıkları

Tek gen hastalıkları (Mendelian hastalıklar) homolog kromozomlar üzerinde bulunan ve birbirlerinin alternatifi olan allellerden birinin veya her ikisinin mutasyona uğraması sonucu oluşmaktadır. Günümüzde yaklaşık 4.000 civarında farklı tek gen hastalığı bilinmektedir. Her 1000 canlı doğumdan 10'unda tek gen hastalıklarından biri görülmekte ve çocukluk dönemi ölümlerinin %5-10'una tek gen hastalıkları neden olmaktadır. Tek gen hastalıklarının majör etkisi yeni doğum ve çocukluk döneminde kendini göstermesine rağmen yetişkin dönemdeki önemi de gittikçe artmaktadır. Tek gen hastalıklarının büyük bir kısmının yetişkin dönemde nadiren görülmesine rağmen bir kısmı da ciddi sağlık problemleri oluşturmaktadır.

Koroner arter hastalıklarının gelişmesinde büyük önemi olan ailesel hiperkolesterolemi her 500 kişiden birinde, ailesel meme kanseri ve kalıtsal kolon kanseri her 300 kişiden birinde görülmektedir (14).

Mutasyonlar kromozomlardaki genlerde olduğu gibi mitokondrial genlerde de meydana gelmekte ve bunun sonucunda mitokondrial hastalıklar gelişmektedir. Mitokondrial hastalıklar genelde kas ve sinirlerdeki enerji üretimini etkilemekte ve hücre yaşlanmasında rol oynamaktadırlar. Bu bozukluklar, maternal kalıtım göstermektedirler (15).

2.2. Tek Gen Hastalıklarının Kalıtımı

Bir bireyin birbirinin aynısı bir çift allele sahip olması durumu *homozigotluk*, bir normal bir mutant allele sahip olması durumu *heterozigotluk*, iki farklı mutant allele taşıması durumu da *kompaund* veya *kompaund heterozigotluk* olarak adlandırılır. Bu terimler hem bireyler için hem de genotip için kullanılır.

Tek gen hastalıkları ailedeki kalıtım şekilleri ile karakterizedir. Tek gen hastalıklarının kalıtım kalıbı iki önemli faktöre bağlıdır: (i) Gen lokusunun otozomal veya cinsiyet kromozomlarında (X-linked) lokalize olması ve (ii) özelliğin *dominant* veya *resesif* olması. Böylelikle tek gen kalıtımının otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı dominant ve X'e bağlı resesif olmak üzere dört farklı şekli vardır (16).

2.2.1. Otozomal Dominant Kalıtım

Kişinin, mutasyonu heterozigot olarak taşıması hastalığın ortaya çıkması için yeterlidir. Hastalık her kuşakta görülür. Hasta bireylerin çocuklarında hastalık %50 oranında görülür. Kız ve erkekler eşit olarak hastalanırlar. Bazı bireyler geni taşıdıkları halde hastalığı ortaya çıkarmazlar, fakat sonraki kuşaklara bu özelliği aktarırlar. Bu duruma penetrans yokluğu denilirken hasta bireyler arasında klinik açıdan ifade farklılıkları da görülür. Bu duruma da ekspresyon farklılığı denilir (16, 17).

2.2.2. Otozomal Resesif Kalıtım

Hastalığın ortaya çıkması için bireyin mutant geni homozigot olarak taşıması gerekmektedir. Heterozigotluk durumunda hastalık ortaya çıkmaz, ancak bu bireyler taşıyıcı olurlar. Akraba evlilikleri taşıyıcı bireylerin karşı karşıya gelmesi ihtimalini arttırdığı için hastalığın ortaya çıkması ihtimalini de artırır. Hastalık, kızlarda ve erkeklerde eşit olarak görülür. Taşıyıcı bir ana ve taşıyıcı bir babanın çocuklarında hastalık görülmesi olasılığı %25'dir. Aile ağacında, akrabalık hikayesi ve tek bir kuşakta birden fazla hasta bireylerin görülmesi otozomal resesif kalıtımı destekler (16, 17).

2.2.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım

Hastalığın ortaya çıkması açısından kız ve erkekler arasında fark vardır. Kızlar iki adet X kromozomu taşıdığı için tek bir X kromozomunda hastalık genini taşımaları hasta olmaları için yeterli değildir, ancak taşıyıcı olurlar. Erkekler ise bir X bir de Y kromozomu taşımaktadırlar. X kromozomunda hastalık geni bulunduğu zaman bunu dengeleyecek ikinci bir X kromozomu olmadığı için hastalık ortaya çıkar. Böylelikle bu kalıtım kalıbında genellikle erkekler hasta, kızlar ise normal fakat taşıyıcıdır. Taşıyıcı bir annenin erkek çocuklarının %50'si hastadır. Annenin erkek kardeşlerinde hastalık görülebilir. Hasta bir erkeğin, hastalığı oğullarına geçirme olasılığı yoktur. Kızlarının ise hepsi normal fakat zorunlu taşıyıcıdır (16, 17).

2.2.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım

Bu kalıtım kalıbında kızlar ve erkekler eşit olarak etkilenir. Tek bir X kromozomunda mutant geninin bulunması, hastalığın ortaya çıkması için yeterli olduğundan X'e bağlı resesif kalıttan farklı olarak kızlar da hastalığı göstermeye başlar. Özelliğin ailesel geçişi tamamen otozomal dominant kalıta benzer, tek

fark babadan erkek çocuğa kalıtımın olmayışıdır. Hasta erkekler, niteliği oğullarına geçiremezler (16, 17).

2.2.5. Mitokondrial Kalıtım

Organizmada, yukarıda tanımlanan nükleer kalıtım modellerinin yanı sıra bir de mitokondrial genom ile aktarılan hastalıklar vardır. Sadece annenin mitokondrial genomu bir sonraki kuşağa aktarıldığı için bu tip kalıtımın sadece anne yoluyla taşındığı dikkat çekicidir. Hasta annelerin genellikle tüm çocukları hasta olur. Bazı çocuklarda hastalık hafif düzeyde olabilir ve normal gibi algılanabilir. Bu hasta çocukların bir sonraki kuşağına bakıldığında, hasta kadınların çocuklarında yine hastalık ortaya çıkarken hasta erkeklerin tüm çocukları sağlıklı olur (16).

2. 3. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar

Tek gen hastalıklarına neden olan mutasyonlar etki mekanizmalarına bağlı olarak oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Tek bir bazın değişmesi sonucu oluşan mutasyonlara “nokta mutasyonu” denilir. Bir veya daha fazla bazın kaybolması “delesyon”, artması ise “insersiyon” olarak adlandırılır. Delesyon ve insersiyonlar oldukça geniş bir bölgeyi kapsayacak şekilde de gerçekleşmektedir. Ayrıca, son yıllarda keşfedilen trinükleotit tekrarlarındaki artışlar da tek gen hastalıklarına neden olmaktadır (14, 18).

2.3.1. Nokta Mutasyonları (Nükleotid Substitution)

DNA sekansı üzerindeki tek bir bazın başka bir baz ile yer değiştirmesine nokta mutasyonu (nükleotid sustitüsyonu) denilmektedir. Yer değiştirmeye katılan bazlar dikkate alındığında *transisyon* ve *transversiyon* olmak üzere iki tip yer değiştirme vardır. Transisyon, baz değişikliğinin pürinden pürine ($A \leftrightarrow G$) veya pirimidinden pirimidine ($T \leftrightarrow C$) olması durumudur. Transversiyon ise baz değişikliğinin pürinden primidine ($A \rightarrow T$ / $A \rightarrow C$ / $G \rightarrow T$ / $G \rightarrow C$) veya pirimidinden pürine ($T \rightarrow A$ / $T \rightarrow G$ / $C \rightarrow A$ / $C \rightarrow G$) olması durumudur. Nokta mutasyonları,

genlerin ekspresyonlarını engelleme veya ürünün fonksiyonunu bozma mekanizmalarına göre farklı tiplere ayrılır (14, 18).

1. Sessiz (silent) mutasyon: Gen üzerindeki her nükleotid değişimi protein üzerinde bir amino asit değişimine neden olmaz. Yalnızca aynı amino aside karşılık gelen farklı kodonların yer değiştirmesine neden olur. Sessiz mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların % 23'ünü teşkil eder.

2. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon: Tek bir baz değişikliği bir kodonun farklı bir amino aside karşılık gelen başka bir kodonla yer değiştirmesine neden olur. Böylelikle peptit zincirinde bir amino asit değişir. Yanlış anlamlı mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların % 73'ünü teşkil eder.

3. Anlamsız (nonsense) mutasyon: Baz değişikliği, bir amino aside karşılık gelen kodonu sonlanma kodonlarından birine dönüştürür. Peptit zinciri sentezinin erken aşamada sonlanmasına ve olması gerekenden daha kısa ve fonksiyonel olmayan bir peptit zinciri sentezlenmesine neden olur. Anlamsız mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların yaklaşık %4'ünü teşkil eder.

4. RNA İşlenmesi (Splicing) Mutasyonu: Transkripsiyonun sonucu sentezlenen işlenmemiş RNA'ya "heterojen nükleer RNA" (hnRNA) denilir. hnRNA'da protein kodlayan ekzon ve protein kodlamayan intron bölgeleri bulunur. Primer transkript olan hnRNA'dan protein kodlamayan intron bölgeleri çıkartılarak (splicing) olgun mRNA oluşturulur. İntronların kesilerek çıkartılması ve ekzonların birleştirilmesi, ekzon-intron (AG/verici bölge) ve intron-ekzon (GT/alıcı bölge) birleşme bölgelerindeki özel nükleotid dizileri sayesinde gerçekleşir. Splicing olayını bozan üç tip mutasyon tanımlanmıştır. Birinci tip mutasyon, intron-ekzon birleşme bölgelerinde yer alan, alıcı ve verici bölgelerindeki korunmuş nükleotid dizilerinin değişmesi sonucunda oluşur. İkinci tip mutasyon ise gen içerisinde alternatif splicing bölgelerinin oluşmasıdır. Alternatif splicing bölgeleri normal splicing bölgeleri ile yarışır. Üçüncü mekanizma ise, intron içinde yer alan, splicing işlemi için önemli rolü olan ve dallanma noktası (branch point) olarak bilinen korunmuş sekansın değişmesidir (14, 19).

2.3.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar

DNA zinciri üzerinden nükleotidlerin eksilmesine delesyon, artmasına insersiyon denilmektedir. Kodlayan bölgede üç ve üçün katları şeklinde olmayan delesyonlar ve insersiyonlar çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonu olarak adlandırılır ve mutasyon noktasından itibaren genetik kodu oluşturan kodonları kaydırarak okuma çerçevesini değiştirirler. Çerçeve kayması mutasyonları peptit zincirinin amino asit dizisini büyük ölçüde değiştirmekle birlikte sıklıkla peptit zincirinin erken aşamada sonlanmasına neden olur. Üç ve üçün katları şeklinde olan delesyon ve insersiyonlar ise yalnızca mutasyonun olduğu bölgeden amino asit kaybına veya ilavesine neden olarak peptit zincirinin bir kısmını etkiler (14, 18, 19).

2.3.3. Büyük Delesyonlar ve İnsersiyonlar

Bir genin tamamını veya ardışık olan bir grup geni etkileyen delesyon ve insersiyonlara büyük delesyonlar ve insersiyonlar denilir. Bu mutasyonlar genin kodlayan bölgesini keser veya ortadan kaldırır. Alternatif olarak iki genin birleşmesine ve füzyon proteinler oluşmasına neden olur. Bu tip mutasyonlar özellikle ardışık olarak tekrarlayan homolog genlerin dengesiz cross-overları sonucu oluşmaktadır. Globin geni buna bir örnektir (14, 18).

2.3.4. Trinükleotid Tekrar Artışları

Trinükleotit tekrar dizilerindeki tekrar sayılarının artışının fenotipik etkilerinin belirlenmesi son yıllardaki önemli gelişmelerden biridir. Tekrar sekanslarındaki tekrar sayılarının artması yeni bir mutasyon mekanizmasıdır. Bu mutasyon şekli, ilk olarak mental geriliğin en sık sebeplerinden biri olan fragile X sendromunda rapor edilmiştir. Zaman içerisinde Miyotonik distrofi, X-linked spinal and bulbar muscular distrofi (Kennedy's hastalığı), Huntigton hastalığı gibi çeşitli kalıtsal hastalıkların oluşmasında da tekrar artışlarının etkin rol oynadığı görülmüştür. Bu tür mutasyonların hastalığa neden olma mekanizmaları tam olarak

bilinmemekle birlikte transkripsiyonu engellediği veya fonksiyonunu kaybetmiş proteinlerin sentezlenmesine neden olduğu rapor edilmiştir (18, 19).

2.4. Mutasyon Tarama Metotları

Tek gen hastalıklarına neden olan ve daha önceden tanımlanmamış mutasyonları belirlemek amacıyla çok çeşitli mutasyon tarama metotları geliştirilmiştir. Bu metotlardan DNA dizi analizi hariç hemen hemen tamamı, ilgilenilen DNA fragmanı üzerinde yalnızca mutasyon olduğunu gösterir. Mutasyonun ne olduğu ve tam olarak nerede olduğu hakkında bilgi vermez. Bu nedenle mutasyon tarama metotları arasında DNA dizi analizinin üstünlüğü tartışılmaz. Bununla birlikte hızlı mutasyon taraması için geliştirilen tüm metotlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ürünü başlangıç materyali olarak kullanılır (20).

2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, Saiki ve ark. (21) tarafından 1985 yılında geliştirilmiştir. DNA üzerinde incelenmek istenen bölgenin in-vitro çoğaltılması olayıdır. DNA'nın çoğaltılmak istenen bölgesi, karşılıklı her iki zincirin 3' ucuna komplementer olan yapay oligonükleotid primerler ile sınırlandırılır. Sınırlandırılan bölgenin amplifikasyonu, çift zincirli kalıp DNA'nın ısı ile tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), ısının düşürülmesiyle yapay oligonükleotidlerin kalıp DNA'ya bağlanması (annealing) ve DNA sentezi için gerekli dNTP ve DNA polimeraz'ın varlığında primerlerin 3'OH uçlarından uzaması (extention) olmak üzere üç basamakta gerçekleştirilir. Bu üç basamak bir döngü olarak kabul edilir ve her başarılı döngüde istenilen bölgedeki DNA miktarı iki katına çıkar. PCR reaksiyonu ortalama 30 döngüde tamamlanır. Ortamdaki DNA miktarı 2^n (n =döngü sayısı) şeklinde hesaplanır. PCR reaksiyonu tek başına bir mutasyon tarama metodu değildir (21, 22, 23).

2.4.2. SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism)

SSCP Analizi Orita ve ark. (24) tarafından geliştirilmiş, tek baz değişimini tespit edebilme yeteneğine sahip bir mutasyon tarama yöntemidir. SSCP tekniği, tek zincirli nükleik asitlerin hidrofilik ortamlarda kendi üzerlerine yaptıkları katlanmaların tesadüfı olmadığı prensibi üzerine kurulmuştur. Tek zincirli nükleik asitler belirli koşullar altında çözelti içerisinde baz kompozisyonlarına bağılı olarak intramoleküler etkileşim sonucu sekonder bir yapı kazanırlar. Tek bir nükleotid değişikliği dahi bu yapıyı değiştirebilir. Nükleik asitlerin üç boyutlu konformasyonunda oluşan bu değişiklikler molekülün non-denaturant poiakrilamid jel elektroforezindeki mobilitesini değiştirir. SSCP analizi ile değişimin varlığı gösterilebilirken bu değişimin DNA zinciri üzerinde hangi nükleotitte ne şekilde olduğunu söylemek mümkün değildir. Nükleotid değişiminin tam yerini ve şeklini göstermek için DNA fragmanının dizi analizinin yapılması gerekmektedir. Görüntülemelerde, başlangıçta radyoaktivite kullanılmasına karşın son zamanlarda non-radyoaktif (floresan) ve gümüş boyama yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (20, 25, 26).

2.4.3. ARMS (Amplifikasyon Refractory Mutation System)

DNA sekansındaki bilinen bir nokta mutasyonunun, küçük bir delesyonun veya insersiyonun var olup olmadığını göstermede kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir. Metod ilk kez Newton ve ark. (27) tarafından uygulanmıştır. Yöntem, PCR amplifikasyonunda kullanılacak primerlerin 3'-OH uçlarındaki nükleotidlerin komplementer DNA ile hibridize olup olmamaları prensibine dayanır. PCR iki paralel reaksiyon şeklinde gerçekleştirilir. Birinci primerin 3'-OH ucu normal tip DNA'nın komplementeri, ikinci primerin 3'-OH ucu mutant tip DNA'nın komplementeri olacak şekilde tasarlanır. Dizayn edilen oligonükleotid primerler spesifik hedef DNA ile hibridize olabildiklerinde PCR' da primer olarak fonksiyon gösterebilmektedir. Ancak 3'-OH ucundaki yanlış eşleşmeler her zaman amplifikasyon ürününün sentezini tamamen engellememektedir. Bu nedenle primer

sekansının 3'-OH ucundan ikinci, üçüncü veya dördüncü nükleotid değiştirilerek kasıtlı yanlış eşleşmeler oluşturulur. Böylelikle primerin spesifikliğı artırılır. Normal ve mutant sekansın PCR ürünlerini birbirinden ayırt etmek için de primerlerden birinin 5' ucuna fazladan iki veya üç baz ilave edilerek elektroforezdeki mobilite farkından yararlanılır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve etidium bromür boyama veya poliakrilamid jel ve gümüş boyama ile kolay ve hızlı bir şekilde görünür hale getirilir (20, 27, 28)

2.4.4. DNA Dizi Analizi

Ön tarama teknikleri ile DNA fragmentlerindeki mutasyonların lokalizasyonu saptandıktan sonra, mutasyonun tipi DNA dizi analiz tekniklerinden biri ile gösterilir. Mutasyonların belirlenmesi amacıyla uygulanan DNA dizi analizleri *Alan Maxam-Walter Gilbert* tarafından geliştirilen “kimyasal” ve *Frederick Sanger ve arkadaşları* tarafından geliştirilen “enzimatik” metotlar olarak ikiye ayrılır. Kullanma kolaylığı ve hassasiyeti açısından günümüzde tercih edilen metot F. Sanger'in enzimatik yöntemi olup “Sanger” veya “dideoksinükleotid” metodu olarak da adlandırılmaktadır (29, 30)

2.4.4.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi

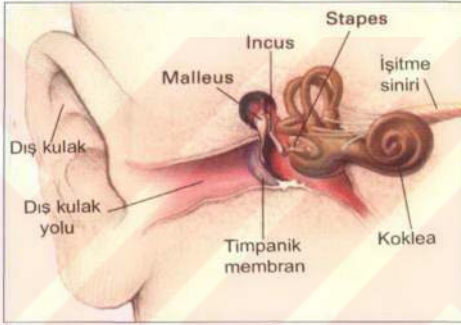
Dideoksinükleotidler, şeker alt biriminin 2 ve 3 numaralı karbonlarında hidroksil (-OH) grubu taşımayan, suni nükleotid molekülleridirler. Buna karşılık, doğal bir deoksiribonükleotid şeker alt birimi 3 nolu karbonunda hidroksil grubu taşımaktadır. DNA replikasyonu sırasında, replikasyona katılacak olan nükleotid kalıp DNA tarafından belirlenir. Kalıp DNA zinciri ile baz eşleşmesi yapabilen nükleosid trifosfat, 5'α- fosfat grubu ile büyüyen zincirin son nükleotidinin 3'-OH grubuna fosfodiester bağı ile bağlanır. Büyüyen zincirin sonuna dideoksinükleotid eklenecek olursa, daha sonra gelecek olan nükleotid, büyüyen zincir ile fosfodiester bağı kuramayacak ve DNA sentezi duracaktır. Sonuç olarak, Sanger yöntemi; dideoksinükleotidin DNA sentezini durdurması prensibi üzerine kurulmuştur (29).

Sekans reaksiyonları yeni teknolojiler sayesinde otomatize edilmiştir ve flourosans boyalar ile görüntülenmektedirler. Bununla birlikte manuel yöntemler halen daha kullanılmaktadır. Başlangıçta radyoizotoplar ile görüntüleme sağlanırken artık gümüş boyama ile de kaliteli sonuçlar alınmaktadır (31).



2.5. İşitme Mekanizması

İşitme beş farklı algılama şeklinden biri olup kulak aracılığı ile gerçekleşir. Kulak; dış kulak, orta kulak ve iç kulak olmak üzere üç anatomik kısımdan oluşur (Şekil 1). Dış kulak, kulağın görünen kısmı auricle ve dış kulak kanalından oluşur. Orta kulak; timpanik membran, hareketli kemikler olan malleus, incus, stapes ve östaki kanalından oluşur. İç kulak ise işitme organı olan koklea ve denge organı olan vestibül ve semisirküler kanallardan oluşur (32, 33, 34).



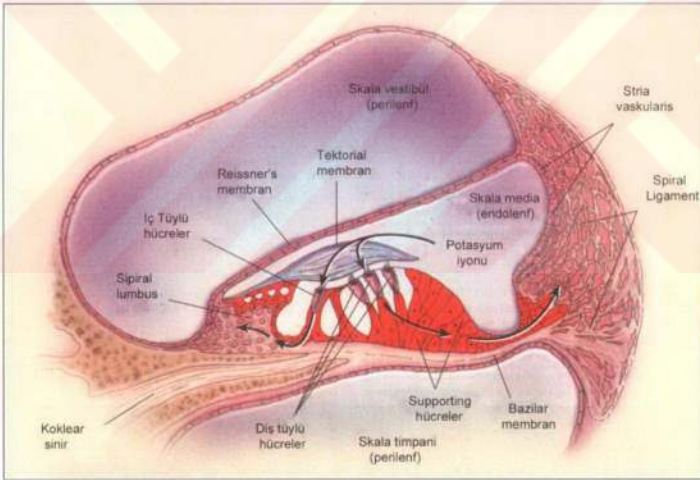
Şekil 1. Dış, orta ve iç kulağın görünümü (32).

Beyinde etkili olan ses dalgaları dış kulak (auricle) tarafından yakalanır ve dış işitme kanalından timpanik zara (kulak zarı) taşınır. Ses dalgalarının timpanik zarda oluşturduğu titreşim orta kulaktaki üç hareketli kemiğin titreşimine neden olur. Bu kemiklerden sonuncusu olan stapes'in oval pencere üzerine oturmakta olan tabanı piston şeklinde ileri geri hareket ederek mekanik hareketi iç kulağın merkezi boşluğu olan vestibulaya iletir (32).

İç kulağın işitmeden sorumlu olan kısmı kokleadır. Koklea 2.5 devir yapan spiral bir yapıya sahiptir. İçinde üç farklı kanal bulunur. Kanallardan skala vestibül ve skala timpani yüksek sodyum ve düşük potasyum iyonu konsantrasyonuna sahip perilef ile dolu olup, birbirinden kokleanın üçüncü kanalı olan skala media (koklear kanal) ile ayrılır. Skala vestibul oval pencereye açılırken skala timpani

yüvarlak pencereye açılmaktadır. Skala media ise yüksek potasyum ve düşük sodyum konsantrasyonuna sahip endolenf ile doludur. Ortada yerleşmiş olan skala media skala vestibuladan Reissner's membran ile ve skala timpaniden bazillar membran ile ayrılır. Skala media, kokleanın membran yapıdaki kanalı olup içinde işitme merkezi olan Corti organı bulunur (35).

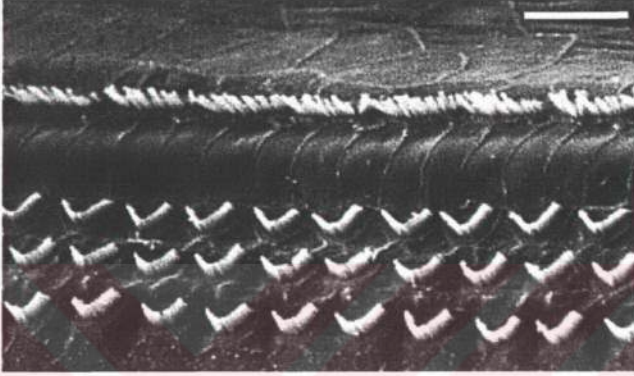
Corti organı, ses dalgalarının kulakta oluşturduğu mekanik hareketi tüy hücreleri ile elektriksel sinyallere dönüştüren bölümdür. Yapısında tektorial membran ve bu membranla karşılıklı olan bazillar membran bulunur. Bazillar membranın tektorial membrana bakan yüzeyinde iki tip algılayıcı tüylü hücre bulunmaktadır. İç kısımda yer alan tüylü hücreler tek ve dış kısımda yer alan tüylü hücreler üç sıra halinde dizilmiştir (Şekil 2) (32).



Şekil 2. Kokleanın kesiti ve Corti organının yapısı (32).

Dış ve iç tüylü hücrelerin her birinde içerden dışarıya doğru olmak üzere büyükten küçüğe doğru sıralanan üç sıra stereosilya (tüy) bulunmaktadır (Şekil 3). “V” şeklinde sıralanan stereosilyalar aktin ve konvansiyonel olmayan miyozin moleküllerinden oluşan bir omurgaya sahip olup birbirlerine uç kısımlarından

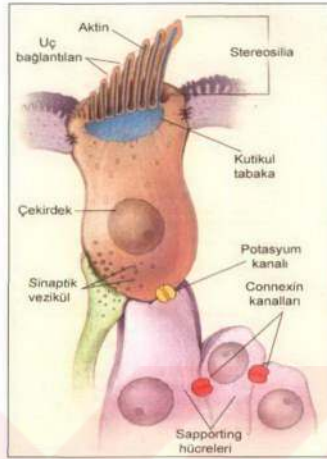
bağlıdır. Dış tüylü hücrelerdeki stereosilyaların uç kısımları viskoz ve elastik örtü şeklinde olan ve tektorial membran olarak adlandırılan yapıya gömülüdür (36).



Şekil 3. Tek sıra iç ve üç sıra dış tüylü hücrelerin elektron mikroskop görüntüsü (bar 15µm) (<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/english/index.htm>)

Tektorial membran ile baziler membranın birbirine göre hareketi iç ve dış silyalı hücrelerinin stereosilyalarının hareket etmesine neden olur. Myosin 7A ve miyosin 15, stereosilyaların organizasyonunda ve hareketinde görev almaktadır. Bu hareket sonucunda endolenf içindeki yüksek konsantrasyondaki potasyum iyonları stereosilyaların uç bağlantılarındaki tanımlanamamış kanallardan tüylü hücrelerinin içine girerek aksiyon potansiyelini başlatırlar α -tektörin gen bozukluklarının, tektorial membranın uyarıcı etkisini ortadan kaldırdığı düşünülmektedir (37).

Potasyum iyonlarının silya hücrelerinin içine girmesi hücreyi depolarize ederek bazolateral bölgedeki kalsiyum kanallarının açılmasına ve kalsiyumun hücre içine girmesine neden olmaktadır. Hücre içine girerek hücreyi depolarize eden kalsiyum, silya hücrelerinin bazal bölgesinde bulunan sinaptik veziküllerde bulunan ve işleme sinirini aktive edecek olan nörotransmitterlerin salgılanmasını harekete geçirir (Şekil 4) (32, 36).



Şekil 4. Dış tüylü hücre ve iyon kanalları (32).

Sinaptik veziküllerin plazma membranına taşınmasında otoferlin rol almaktadır. Böylece mekanoelektriksel ileticiler olan tüy hücreleri mekanik hareketi elektriksel sinyallere dönüştürürler. Elektriksel sinyaller, sinir lifleri ve spiral ganglionlar üzerinden koklear sinirler yolu ile beyinin işitsel korteksine iletilirler. Normal işitmenin devam edebilmesi için hücre içine giren potasyum iyonlarının tekrar endolenfe dönmesi gerekmektedir. Bunun için potasyum iyonları öncelikle KCNQ4 geni tarafından kodlanan potasyum kanalları aracılığı ile tüylü hücreleri bazolateral taraftan terk ederek supporting hücrelere geçerler (38). Tüy hücreleri tekrar polarize olur. Daha sonra bu potasyum iyonları gap junctionlar üzerinden basit difüzyonla supporting hücrelerden ve koklear fibrositlerden stria vascularise geçerler. Buradan da KVLQT1 ve KCNE1 genleri tarafından kodlanan potasyum kanalları ile aktif olarak tekrar endolenfe pompalanırlar (39, 40, 41, 42, 43).

2.6. İşitme Bozuklukları

İşitme bozuklukları etiolojilerine, başlama yaşlarına, fenotipik özelliklerine, şiddetlerine ve işitme yolu üzerindeki yerine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. İşitme kayıplarının sınıflandırılması (3)

Kriterler	Alt kategoriler
Sebeup	Genetik (monogenik veya multifaktöriyel) Non-genetik
Fenotip	Sendromik Non-sendromik
Başlama	Prelingual Postlingual
Tip	Sensorinöral İletim tipi Mikst tip
Şiddeti	Normal işitme 0-20 dB Hafif işitme kaybı 21-40 dB Orta derecede işitme kaybı 41-60 dB Orta-Şiddetli işitme kaybı 61-80 dB Şiddetli işitme kaybı 81-100 bB Derin işitme kaybı >100 dB
Frekans	Düşük < 500 Hz Orta 501-2000 Hz Yüksek > 2000 Hz

Non-genetik işitme kayıplarına perinatal enfeksiyonlar, kokleayı etkileyen akustik veya serebral travmalar, ototoksik ilaçları içeren çevresel faktörler neden olmaktadır. Genetik işitme kayıpları ise tek bir genin mutasyonu (monogenik) veya farklı genlerin mutasyonları ile çevresel faktörlerin kombine etkileri (multifaktöriyel) sonucunda gelişmektedir (32, 44).

Sendromik işitme kaybı, işitme kaybının bir veya daha fazla doku veya organdaki spesifik patolojilerle birlikte görülmesidir. Bunların arasında Waardenburg's, Usher's, Pendred's, ve Alport' sendromları en sık gözlenen örneklerdir (45). Non-sendromik işitme kaybında ise sadece sağırılık görülür. Bununla birlikte tek bir gendeki farklı mutasyonlardan biri sendromik diğeri non-sendromik işitme bozukluğuna neden olabilmektedir (32, 46, 47).

2.6.1. İşitme Bozukluklarının Genetiği

Yeni doğan her 1000 çocuktan 1'inde prelingual işitme kaybı vardır (2, 48). Yaklaşık olarak vakaların %50'sinin sebebini çevresel faktörler teşkil ederken, geri kalan diğer yarısının %30'unu sendromik ve %70'ini non-sendromik olmak üzere tek gene bağlı bozukluklar oluşturmaktadır (2, 49). Non-sendromik olan işitme kayıplarının %75'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %5'i X'e bağlı ve %1'den azı mitokondrial kalıtım göstermektedir (4, 45, 50, 51). Postlingual işitme kaybı, prelingual işitme kaybından daha sık görülmekte olup toplumda 60 yaş üzerindeki insanların %10'unu ve 80 yaş üzerindeki insanların %50'sini etkilemektedir (52, 53). Postlingual işitme kayıplı vakaların çoğunluğu multifaktöriyel kalıtım gösterirken tek gene bağlı gelişenler genelde otozomal dominant kalıtım göstermektedir (32).

Non-sendromik işitme kaybına neden olan gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak isimlendirilmekte ve keşfedilişlerinin kronolojik sırasına göre her lokusa numara verilmektedir. Bu isimlendirmeye göre otozomal dominant lokuslar DFNA, otozomal resesif lokuslar DFNB ve X'e bağlı lokuslar DFN olarak gösterilmektedir (32). 2002 yılı itibariyle, non-sendromik otozomal dominant sağırılığa neden olan 41 adet DFNA lokusu, non-sendromik otozomal resesif sağırılığa neden olan 29 adet DFNB lokusu ve non-sendromik X'e bağlı sağırılığa neden olan 8 adet DFN lokusu olmak üzere toplam 78 lokus tanımlanmıştır. Bu lokuslardan 11 DFNB (Tablo 2), 16 DFNA (Tablo 3) ve 2 DFN (Tablo 4) geni klonlanmıştır (13, 54). Bu genlerden yalnızca bir kısmının kulaktaki fonksiyonu bilinmektedir.

Tablo 2. İşitme kaybından sorumlu otozomal resesif genler (6)

Lokus ismi	Kro. lokus.	Gen	Fonksiyon
DFNB1	13q12	<i>GJB2</i> (Connexin 26)	Gap Junction, Potassium döngüsü
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7</i> (Miyosin 7A)	Steriosilialarda yapısal ve fonksiyonel unkonsiyonel miyozin
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15</i> (Miyosin 15)	Steriosilialarda yapısal ve fonksiyonel unkonsiyonel miyozin
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i> (Pendrin)	Anyon transportu
DFNB7	9q13-q21	<i>TMC1</i>	Bilinmiyor
DFNB8/10	21q22	<i>TMPRSS3</i>	Transmembran protein
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i> (Otoferlin)	Vesicle-membran birleşmesi
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>	Transmembran protein
DFNB16	15q21-q22	<i>STRC</i>	Steriosilialarda yapısal protein
DFNB21	11q	<i>TECTA</i> (á-tectorin)	Tektorial membranda yapısal proteini
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i> (Claudin-14)	Tight junction proteini

Tablo 3. İşitme kaybından sorumlu otozomal dominant genler (6).

Lokus ismi	Kro. lokus	Gen	Fonksiyon
DFNA1	5q31	<i>HDIA1</i>	Sitokinez ve hücre polartesi
DFNA2	1p34	<i>GJB3 / KCNQ4</i>	Gap Junction, Potasyum döngüsü
DFNA3	13q12	<i>GJB2 / GJB6</i>	Gap Junction, Potasyum döngüsü
DFNA5	7p15	<i>DFNA5 (ICERE-1)</i>	Bilinmiyor
DFNA6/14	4p16.3	<i>WFS1</i> (Wolframin)	Endoplazmi retikulumda lokalize transmembran protein
DFNA8/12	11q22-24	<i>TECTA</i>	Tektorial membranda yapısal proteini
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i>	Kokleada ekstrasellular protein
DFNA10	6q22-q23	<i>EYA4</i>	Transkripsiyon faktörü
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i>	Steriosilialarda yapısal ve fonksiyonel Unkonsiyonel miyozin
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i>	Yapısal protein
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i>	Transkripsiyon faktörü
DFNA17	22q	<i>MYH9</i>	Unkonvansiyonel miyozin ağır zinciri
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	Unkonvansiyonel miyozin
DFNA36	9q13-q21	<i>TMC1</i>	Bilinmiyor
DFNA39	4q21.3	<i>DSPP</i>	Bilinmiyor

Tablo 4. İşitme kaybından sorumlu X'e bağlı genler (6)

Lokus ismi	Kro. lokus	Gen	Fonksiyon
DFN1	Xq22	<i>DDP</i>	Nörolojik gelişme
DFN3	Xq21.1	<i>POU3F4</i>	Transkripsiyon faktörü

Tek gene bağılı non-sendromik işitme kaybı ile ilgili olan genlerin 100'ün üzerinde olabileceği düşünülmektedir (55).

Otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan genlerin araştırılması sürecinde ilk olarak tanımlanan lokus *DFNBI*'dir. Bu lokus ilk olarak 1994 yılında Tunus'lu bir ailede gösterilmiştir (13). Takip eden yıllarda, İsrail'de yaşayan şiddetli işitme kayıplı geniş bir Bedevi ailesinde ve akraba evliliği yapmış orta ve ileri derecede işitme kayıplı geniş bir Pakistan ailesinde *DFNBI* lokusunda, non-sendromik otozomal resesif işitme kaybindan sorumlu bir genin olduğu doğrulanmıştır (56, 57). Üç yıl sonra, 1997'de, *DFNBI* lokusundan Gap Junction Beta-2 (*GJB2*) geni klonlanmıştır (58). Çeşitli toplumlarda yapılan mutasyon taramaları sonucunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı vakaların yaklaşık %50'sinden *GJB2* gen mutasyonlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir (7, 8, 9, 10, 11, 12).

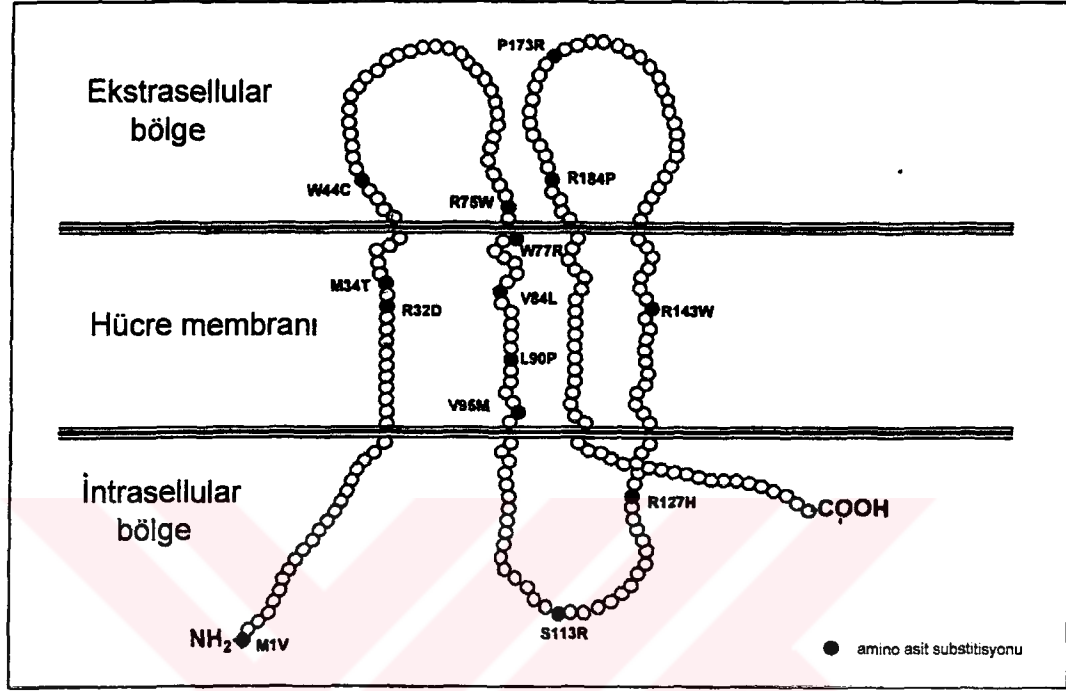
2.6.1.1. *GJB2* (Gap Junction Beta-2) Geni

Gap junction beta-2 (*GJB2*) geni aynı zamanda Connexin 26 (Cx26) geni olarak da isimlendirilmektedir. *GJB2* geni 13. kromozomun uzun kolunun peroksimalinde 13q11-q12 bölgesinde yer almaktadır (13, 56, 57). İki ekzona sahip olan *GJB2* geninin 5'-P ucunda bulunan birinci ekzonu protein kodlamamaktadır. İkinci ekzon ise 681 nükleotide karşılık 226 amino asitten oluşan ve connexin 26 (Cx26) olarak adlandırılan bir proteini kodlamaktadır (59, 60).

2.6.1.2. Connexinler ve Connexin 26'nın İşitme Kaybındaki Rolü

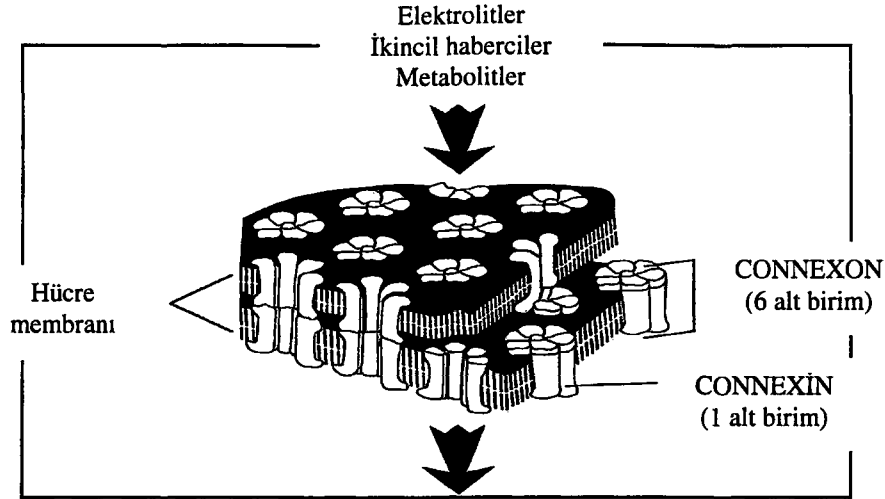
Connexinler farklı dokularda yaygın olarak sentezlenen geniş bir protein ailesidir. Oldukça korunmuş bir amino asit dizisine sahip olup dört transmembran domein, iki ekstrasellular lop, bir intrasellular lop ve bir sitoplazmik kuyruktan oluşurlar (Şekil 5). Lop oluşturan bölgelerdeki amino asit dizisi ve sitoplazma

içindeki kuyrukların uzunlukları farklı connexinleri birbirinden ayırmaktadır. Connexinler gap junctionların alt birimleridirler (61).



Şekil 5. Connexin 26 proteininin konfigürasyonu,

Altı connexin proteini sitoplazmada bir araya gelerek connexon olarak adlandırılan hekzamerik kanalları oluştururlar. Bu kanallar plazma membranına taşınırlar. Komşu iki hücredeki connexonların disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmaları gap junctionları oluşturur. Connexonlar homomerik olabildikleri gibi heteromerik de olabilirler. Gap junctionlar, iyonların, ikincil habercilerin ve metabolitlerin bir hücrenin sitoplazmasından komşu hücrenin sitoplazmasına pasif geçişlerini kolaylaştıran intersellüler haberleşme kanalları olarak fonksiyon gösterirler (Şekil 6). Bu yapıları ve fonksiyonları ile gap junctionlar, hücrelerin çeşitli hücre içi sinyallere eş zamanlı olarak cevap vermelerine imkan sağlarlar (61, 62, 63).



Şekil 6. Gap junction proteinlerinin hücre membranındaki yerleşimi.

Deride ve iç kulakta çok sayıda Gap junction vardır. Gap junctionlar, deride keratinocytelerin (epidermis tabakasında keratin üreten hücre) büyüme ve gelişmelerinin koordinasyonunda rol alır (64). Diğer taraftan iç kulağın sensori epitel hücrelerinde, işitme iletimi sırasında potasyum iyonlarının döngüsünü Gap Junctionların düzenlediği düşünülmektedir (66). İç kulakta yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla, koklea içindeki stria vasculariste, basement membranda, limpu ve spiral çıkıntıda *GJB2* geninin eksprese edildiği gösterilmiştir (58). İç kulaktaki gap junctionlar, işitme uyarılarının mekanik uyarıdan elektriksel uyarıya dönüşümünden sonra, potasyum iyonlarının silyali hücrelerden supporting hücrelere ve oradan da tekrar endolenfe dönmelerini sağlayan kanallardır. *GJB2* geninde meydana gelen mutasyonların Cx26 proteininin fonksiyonunu bozarak potasyum iyon döngüsünü engellediği düşünülmektedir (59).

2.6.1.3. *GJB2* (Gap Junction Beta-2) Mutasyonları

GJB2 gen mutasyonlarının otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olduğunun gösterilmesinden sonra çeşitli toplumlarda mutasyon taramaları yapılmıştır. 2002 yılı itibariyle otozomal resesif non-sendromik sağırlığa neden olan yaklaşık 67 adet *GJB2* gen mutasyonu tanımlanmıştır (6). Bu mutasyonlardan; 35 adedi yanlış anlamlı (missens), 9 adedi anlamsız (nonsens), 2 adedi splicing

mutasyonu, 1 adedi başlama kodonu mutasyonu, 14 adedi çerçeve kaymasına (frameshift) neden olan çeşitli büyüklüklerde 16 delesyon ve 4 adet birer nükleotitik insersiyonlardır (Tablo 5).

Tablo 5. İşitme kaybına neden olan resesif *GJB2* mutasyonları.

	Mutasyon ismi	Mutasyonun tanımı	Etkisi	Protein domain	Ref,
1	3170G to A	-3170 G → A	Splising bölgesi	none	(60)
2	IVS+1 G to A	-3170 G → A	Splising bölgesi	none	(8)
3	M1V	1 A → G	Başlama kodonu	İS 1	(12)
4	R32C	94 C → T	Arg 32 Cis	İS 1	(66)
5	T8M	23 C → T	Tre 8 Met	İS 1	(6)
6	31del14		Çerçeve kayması	İS 1	(67)
7	31del38		Çerçeve kayması	İS 1	(9)
8	G12V	35 G → T	Gly 12 Val	İS 1	(68)
9	35delG	del of G at 35	Çerçeve kayması	İS 1	(11)
10	35insG		Çerçeve kayması	İS 1	(12)
11	51del12insA		Çerçeve kayması	İS 1	(69)
12	S19T	56 G → C	Ser 19 Thr	İS 1	(68)
13	I20T	59T→C	Ile 20 Thr	İS 1	(70)
14	W24X	71G → A	Trp 24 Stop	TM1	(58)
15	M34T	101 T → C	Met 34 Thr	TM1	(58)
16	V37I	109 G → A	Val 37 Ile	TM1	(71)
17	A40E	119 C → A	Ala 40 Glu	ES 1	(6)
18	W44X	132 G → A	Trp 44 Stop	ES 1	(8)
19	G45E	134 G → A	Gly 45 Glu	ES 1	(72)
20	E47X	139 G → T	Glu 47 Stop	ES 1	(9)
21	E47K	139 G → A	Glu 47 Lys	ES 1	(66)
22	167delT		Çerçeve kayması	ES 1	(11)
23	Q57X	169 C → T	Gln 57 Stop	ES 1	(73)
24	176-191del16		Çerçeve kayması	ES 1	(74)
25	Y65X	195 C → G	Tyr 65 Stop	ES 1	(12)
26	W77R	229 T → C	Trp 77 Arg	TM2	(50)
27	W77X	231 G → A	Trp 77 Stop	TM2	(58)
28	235delC		Çerçeve kayması	TM2	(75)
29	L79P		missens	TM2	(76)
30	Q80P	239 A → C	Gln 80 Pro	TM2	(6)
31	I82M	246 C → G	Ile 82 Met	TM2	(6)
32	V84L	250 G → C	Val 84 Leu	TM2	(71)
33	S85P	253 T → C	Ser 85 Pro	TM2	(77)
34	L90P	269 T → C	Leu 90 Pro	TM2	(60)
35	269insT		Çerçeve kayması	TM2	(60)
36	V95M	283 G → A	Val 95 Met	İS 2	(71)
37	Y97X	Tanımlanmadı	Tyr 97 Stop	İS 2	(6)
38	H100Y	298 C → T	His 100 Tyr	İS 2	(8)
39	299-300delAT		Çerçeve kayması	İS 2	(72)
40	302del3			İS 2	(78)
41	310del14		Çerçeve kayması	İS 2	(9)
42	333-334delAA		Çerçeve kayması	İS 2	(71)
43	S113R	339 T → G	Ser 113 Arg	İS 2	(71)
44	delE120	del of GAG at	del of Glu 119-120	İS 2	(60)

Tablo 5'in devamı

No	Mutasyon ismi	Mutasyonun tanımı	Etkisi	Protein domain	Ref.
45	K122I	365 A → T	Lys 122 Ile	İS 2	(8)
46	Q124X	370 C → T	Gln 124 Stop	İS 2	(7)
47	Y136X	408 C → A	Tyr 136 Stop	İS 2	(75)
48	R143W	427 C → T	Arg 143 Trp	İS 2	(79)
49	E147K	439 G → A	Glu 147 Lys	TM3	(6)
50	A149T	445 G → A		TM3	(68)
51	469delG		Çerçeve kayması	ES 2	(78)
52	486insT		Çerçeve kayması	ES 2	(6)
53	509del14		Çerçeve kayması	ES 2	(6)
54	509insA		Çerçeve kayması	ES 2	(60)
55	515del17		Çerçeve kayması	ES 2	(6)
56	P173R	518 C → G		ES 2	(68)
57	P175T	523 C → T	Pro 175 Thr	ES 2	(60)
58	V178A			ES 2	(76)
59	R184W	550 C → G	Arg 184 Trp	ES 2	(80)
60	R184Q			ES 2	(76)
61	R184P	551 G → C	Arg 184 Pro	ES 2	(9)
62	A197S			ES	(76)
63	S199F	596 C → T	Ser 199 Phe	ES	(8)
64	I203K			İS 3	(76)
65	N206S	617 A → G	Gln 206 Ser	İS 3	(6)
66	631delGT		Çerçeve kayması	İS 3	(71)
67	L214P	Tanımlanmadı		İS 3	(76)
68	645-648delTAGA		Çerçeve kayması	İS 3	(66)

ES1: Birinci ekstrasellular lob, ES2: İkinci ekstrasellular lob, İS: Birinci intrasellular lob, İS2: İkinci intrasellular lob, TM1: Birinci transmembran lob, TM2: İkinci transmembran lob, TM3: Üçüncü transmembran lob

Bunun yanında, biri delesyon ve 6'sı missense mutasyon olmak üzere otozomal dominant kalıtım gösteren 7 adet *GJB2* mutasyonu bilinmektedir (Tablo 6) (6).

Tablo 6. İşitme kaybına neden olan dominant *GJB2* mutasyonları.

No	Mutasyon ismi	Mutasyonun tanımı	Etkisi	Protein domain	Referans
1.	delE42			TM1	(81)
2.	W44S	131 G → C	Trp 44 Ser	ES 1	(6)
3.	W44C	132 G → C	Trp 44 Cis	ES 1	(82)
4.	R75Q	224 G → A	Arg 75 Gln	ES 1	(6)
5.	C202F	605 G → T	Tanımlanmadı	TM4	(83)
6.	E129K	385 G → A	Glu 129 Lys	İS 2	(6)
7.	R143Q	428G → A	Arg 143 Gln	TM3	(70)

ES1: Birinci ekstrasellular lob, ES2: İkinci ekstrasellular lob, İS: Birinci intrasellular lob, İS2: İkinci intrasellular lob, TM1: Birinci transmembran lob, TM2: İkinci transmembran lob, TM3: Üçüncü transmembran lob

GJB2 mutasyonları toplumun etnik orijinine bağılı olarak, belirgin bir şekilde değişmektedir. Bu mutasyonlardan en önemlileri Akdeniz ülkelerinde görülen 35delG, Ashkenazi Yahudilerinde görülen 167delT ve özellikle Japon toplumunda görülen 235delC'dir (9, 12, 60, 69, 70, 72, 74, 75, 84).

GJB2 mutasyonları sonucu gelişen işitme kayıplarının odiyolojik fenotipleri değişkenlik göstermektedir. Homozigot veya compaund heterozigot olarak ve aynı mutasyonu taşıyan bireyler farklı odiyolojik fenotipe sahip olabilmektedir. *GJB2* mutasyonlarının her iki kulağı eşit seviyede etkilemesine rağmen asimetrik non-sendromik işitme kayıpları da rapor edilmiştir. Homozigot 35delG mutasyonlu iki kardeşin işitme kaybı dereceleri hafif işitme kaybı ve derin işitme kaybı arasında değişebilmesine rağmen bireylerin çoğunluğu ilerlemeyen, şiddetli veya derin işitme kaybı göstermektedir. Bunun yanında ilerleyen işitme bozuklukları da rapor edilmiştir (85).

GJB2 gen mutasyonlarının hemen hemen tamamı non-sendromik olarak sağırılığa neden olmakla birlikte D66H, G59A ve R75W mutasyonlarının iç kulak fonksiyonları ile birlikte epidermal farklılaşmayı bozarak hiperkeratosise ve palmoplantar keratodermaya da neden olmaktadır (86, 87, 88).

3. MATERYAL METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Haziran 1999 - Mayıs 2002 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Kulak Burun Boğaz Anabilim Dallarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, okul çağına gelmeden yaklaşık 5-6 yaşlarında hastanelerin odyoloji laboratuvarlarından hafif-derin işitme kaybı tanısı almış ve 1999-2000 eğitim öğretim döneminde Trabzon, Rize ve Ordu illerindeki İşitme Engelliler Okullarına devam eden yatılı ve gündüzlü öğrenciler değerlendirmeye alındı. Ailesinde birden fazla işitme engelli olan ve birbirleri ile akrabalığı olmayan öğrencilerin aileleri ile görüşülerek aile ağaçları çıkartıldı. Vakaların ailelerinden alınan bilgiler doğrultusunda işitme kaybının otozomal resesif geçiş gösterdiği bireyler belirlendi. Bu bireylerin klinik muayeneleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ö. R. Çaylan tarafından yapıldı. Klinik muayene sonuçlarına göre sendromik işitme kayıplı bireyler çalışma grubundan çıkartıldı.ve non-sendromik otozomal resesif işitme kayıplı 96 birey çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan bireylerin okulları, ailesindeki işitme engelli birey sayısı, tek bir kuşaktaki işitme engelli birey sayısı, anne-babasının akraba olup olmadığı, cinsiyeti ve hangi ilden geldikleri belirlendi.Çalışmaya dahil edilen her bir öğrenciden EDTA'lı tüpe 10 ml kan alındı. *GJB2* mutasyonu belirlenen bireylerin işitme seviyeleri pure-ton odyometre ile belirlendi.

Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılmak üzere işitme engelli olmayan 117 birey tesadüfi olarak belirlendi. Her bir bireyden EDTA'lı tüpe 10 ml kan alındı.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılacak kimyasal maddeler, kitler ve sarf malzemeleri değişik firmalardan temin edildi.

Acrylamide (C_3H_5NO)	Sigma, A-9099
NN-Metilenebisacrylamide ($C_7H_{10}N_2O_2$)	Sigma, M-2022
Agaroz	Sigma, A-0169
Amonyum persulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Sigma, A9164
Sodyum klorür (NaCl)	Merk, 1.01540.0500
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk, 1.06462
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Merk,
Glacial asetik asitd ($C_2H_4O_2$)	Merk, 1.00056.2500
Hidroklorik asit (HCl)	Merk, 1.00314.2500
Gliserol (%99)	Sigma, G-7757
Bromfenol mavisi ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	Merk, 1.08122.0005
Xylene cyanol ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)	Merk, 1.12007.2500
Trizma hydrochloride ($C_4H_{12}ClNO_3$)	Merk, 1.01547.0100
Trizma baz (Tris-base) ($C_4H_{11}NO_3$)	Applichem, A2264.1000
İzopropanol (% 100)	Sigma I-9516
Ethil alkol (C_2H_5OH)	Tekel, Türkiye
Etidium bromide ($C_{12}H_{20}N_3Br$)	Sigma, E-7637
Etilene-diaminetetra-acetic acide (EDTA)	Sigma, E-5134
Deoxynucleotide Thriphosphates (dNTP)	Promega, U1240
Taq DNA Polimeraz	Promega, M1661
Oligonucleotide primer	İontek, Türkiye

Proteinaz K	Promega, V3021
ϕ X174 DNA/ <i>Hinf</i> I Markır	Promega, E3511
Ammonyum asetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)	Sigma, A-1542
Sodyum tiyosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma, S-1648
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merk, 1.06398.1000
Gümüş nitrat (AgNO_3)	Sigma, S-6506
Silver Sequence TM DNA sequencing System	Promega, Q4100
Borik asit (H_3BO_3)	Merk, 1.00160.
PCR Preps DNA Pürifikasyon Sistemi	Promega, A2180
Fomaldehyde (CH_2O)	Sigma, F-8775
Mineral oil	Sigma, M-5905
Rain away (yağmur kaydırıcı)	USA
γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane	Promega, Q421A
Automatic Processor Compatible (APC) film	Promega, Q4411
N,N,N,N-tetramethylethyleneamide (TEMED)	Merk

3.1.3. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler değişik firmalardan sağlandı. Bazı cihazlar yerli firmalara imal ettirilmiştir.

Yatay elektroforez düzeneği	El yapımı
Dikey elektroforezi düzeneği	Owel, ABD
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	CONSORT E833, Belçika
Doğru akım güç kaynağı (500 volt)	El yapımı
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 6820, Almanya
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
Ultraviole transillüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Polaroid kamera	Gel Cam, İngiltere
Termocycler	Techne Genius, İngiltere

Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
Orbital Karıştırıcı	El yapımı
Eppendorf tüpler	Axygene, ABD
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
Hassas terazi	Kern, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Spektrofotometre	Shumatsu, Japonya
Manyetik karıştırıcı	IKA, USA
Deiyonize su sağlayıcı	Barnstead, ABD
Buz makinesi	Scotman, İngiltere
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
Distile su cihazı	Şimşek labor teknik, Türkiye
Pastör fırını	Nüve, Türkiye
Otoklav	Medexport, Rusya
Derin dondurucu (-35)	Bosh, Türkiye
Buz dolabı	Arçelik, Türkiye
Sequencing jel elektroforez	Owel, ABD
Laminar flow	Heraeus, Almanya
Nagatoskop	Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
APC film	Promega, ABD

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA izolasyon solüsyonları

1. Nuclei Lizis Tamponu (pH 8.2)

10 mM	Tris base,
400 mM	NaCl,
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 g Tris base

23.4 g NaCl

0.74 g Na₂EDTA 800 ml deiyonize suda çözüldü. pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

2. Proteinaz K seyreltme tamponu (pH 8.0)

0.05 M	Tris HCl
1 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 g Tris HCl

0.011 g CaCl₂ 80 ml deiyonize suda çözüldü. pH 8.0'a ayarlandı.

Son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

3. Proteinaz K çözeltisi (10 mg/ml)

Proteinaz K çözeltisi, 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda 100 mg Proteinaz K çözülerek hazırlandı. İşlem buz üzerinde yapıldı. Proteinaz K çözeltisi 600 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik eppendorf tüplere bölündü ve -20 °C'de saklandı.

4. %10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu

10gr SDS deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68 °C'de ısıtılarak çözüldü. Solüsyon oda ısısında saklandı.

5. Amonyum Asetat (9 M)

74 g amonyum asetat 20 ml steril deiyonize su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'de saklandı.

6. 0.1M Na₂EDTA (pH 8.0)

37,22 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10M'lik NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

7. 1M Tris-HCl

157. 6 g Tris-HCl 800 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

8. TE Tamponu

10 mM	Tris HCl
1mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1 M Tris HCl (pH 7.4)

0.1 M Na₂EDTA (pH 8.0) ayrı ayrı hazırlanır. Her ikisinden 5'er ml alınır. Üzerine 490 ml steril deiyonize su ilave edilerek 500 ml'ye tamamlanır. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk. otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları

1. TAE elektroforez tamponu (pH~ 8.5):

50X stok solüsyon hazırlanışı:

242 g Tris base

37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

57.1 ml Glasial asetik asit Deiyonize su kullanılarak 800 ml'de çözüldü. NaOH peleti kullanıldı pH ayarı yapıldı. Deiyonize su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu olarak deiyonize su ile 1X olarak sulandırıldı

1X çalışma solüsyonu:

40 mM Tris asetat

2 mM EDTA

2. Etidium bromide solüsyonu:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan muhafazalı olarak saklandı.

3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforez Solüsyonları

1. 0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)

186.1 g Na_2EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10M'lık NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı (yaklaşık 50 ml). Son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4 °C'de saklandı.

2. TBE elektroforez tamponu (pH ~8.0)

10X stok solüsyon

108 g Tris base

55 g Boric aside

40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) Deiyonize su kullanılarak 800ml'de çözüldü. pH ayarı yapıldıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu olarak deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

1X çalışma solüsyonu

89 mM Tris base

89 mM Borik asit

2 mM EDTA

3. % 40'lık Akrilamid–bis akrilamid solüsyonu (29:1)

193.3 g Akrilamid

6.7 g NN' Bis akrilamid

dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanır. Işık almayacak şekilde alüminyum folye ile sarılarak 4°C'de saklanır.

4. % 40'lık Akrilamid–bis akrilamid solüsyonu (19:1)

190 g Akrilamid

10 g NN' Bis akrilamid

dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. Işık almayacak şekilde alüminyum folye ile sarılarak 4°C'de saklandı.

5. % 10'luk (w/v) APS (Amonyum persulfat)

0.1 gr Amonyum persulfat üzerine 1ml dH₂O eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Her çalışmada taze olarak hazırlandı.

6. Yapıştırıcı Solüsyon

- 9.9 ml Etanol (%96)
- 50 µl Glacial asetik asit
- 50 µl γ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane
- Falkon tüp içerisinde karıştırılarak 4 °C’de saklandı.

3.1.4.4. Yükleme Tamponları

1. Non-denatüre yükleme tamponu

- % 50 (w/v) Sükroz
- % 0.1 (w/v) Bromfenol mavisi
- % 0.1 (w/v) Xylene cyanole
- 50 mM Na₂EDTA (pH: 8)
- Deiyonize su ile hazırlandı ve 4 °C’de saklandı.

2. Denatüran yükleme tamponu (SSCP için)

- % 95 (w/v) NaOH
- %0.005 (w/v) Bromfenol mavisi
- %0.005 (w/v) Xylene cyanole
- Deiyonize su ile hazırlandı ve 4 °C’de saklandı.

3.1.4.5. Gümüş Boyama solüsyonları

1. %10'luk Asetik asit:

1350 ml	Distile su
150 ml	Glacial asetik asit

2. %0.1'lik gümüş nitrat solüsyonunun hazırlanması:

Gümüş nitrat	%0.1 (v/w)
Formaldehite	% 0.078 (v/v)

Hazırlanışı:

1 litre	Distile su
1 g	Gümüş nitrat
2 ml	Formaldehit (% 39'luk)
Formaldehit kullanılmadan hemen önce ilave edildi	

3. Sodyum karbonatın (developer) hazırlanması:

Sodyum karbonat	%3.4 (v/w)
Formaldehite	% 0.078 (v/v)
Sodyum tiyosülfat	% 0.0005 (v/w)

Hazırlanışı:

1 litre	Distile su
34 g	Sodyum karbonat
2 ml	Formaldehit (%39'luk)
0.005 g	Sodyun tiyosulfat

Formaldehit ve sodyum tiyosülfat kullanılmadan hemen önce ilave edilir. Solüsyon buz üzerinde soğutulduktan sonra kullanılır. Kullanma sıcaklığı yaklaşık 10 °C'dir.

3.2. METOD

Çalışmada öncelikle *GJB2* geni üzerinde en sık karşılaşılan 35delG mutasyonunu taraması yapıldı. Tarama, yarışmalı ARMS' (Competitive-ARMS) kullanılarak yapıldı. 35delG mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan ve bu mutasyonu taşımayan bireylerin *GJB2* genlerinin kodlayan bölgesinde SSCP analizi ile mutasyon taraması yapıldı. SSCP analizinde farklı bant paterni veren bölgelerin DNA dizi analizleri yapılarak mutasyonlar tanımlandı. Daha önce tanımlanmamış nükleotid değişimlerinin mutasyon olup olmadığını göstermek için bu değişimlere allel spesifik primerler dizayn edildi ve bu değişimlerin toplumdaki görülme sıklığı belirlendi. Son olarak, *GJB2* mutasyonu görülen bireylerin saf ses odyometri ile işitme seviyeleri belirlendi.

3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

DNA, 9 ml'lik EDTA'lı kandan izole edildi. EDTA'lı kan 50 ml'lik falkon tüplere boşaltıldı ve üzerine 40 ml 121 °C'de 30 dakika otoklavlanmış soğuk (4-8) distile su eklenerek eritrositlerin parçalanması için 10 dakika bekletildi. 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra, pellet üzerine 3 ml nüklei lizis tamponu, 200 µl %10'luk SDS, 150 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek 37°C'lik etüvde bir gece (O/N) bekletildi. Etüvden çıkartılan tüplere yaklaşık 1-1.5 ml 9M NH₄HCO₃ eklenerek 10 saniye hızlıca çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilen tüpler 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatant üzerine, 3 katı kadar %96'lık soğuk (-20 °C) etil alkol döküldü. Etil alkol dökülen tüp hafifçe alt-üst edildi ve bu şekilde DNA'nın presipite olması sağlandı. Presipite olan DNA pipet ucuyla 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak üzerine 500 µL %70'lik soğuk (-20 °C) etil alkol eklendi ve alt-üst edilerek santrifüjde 10.000 rpm'de 30 saniye çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Hızlı santrifüj işlemi tekrarlandı ve tüpte kalan etil alkol pipet ucu ile alındı. 65°C'lik etüvde DNA 20 dakika kurutulduktan sonra üzerine 500 µL TE eklenerek çözüldü (89).

3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/μl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su ile 50 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı (90).

3.2.3. Yarışmalı ARMS İle 35delG'nin Taranması

3.2.3.1. Yarışmalı ARMS İçin PCR

GJB2 geni 35delG mutasyonu taraması için geliştirilen yarışmalı ARMS'in optimizasyonunda öncelikle homozigot 35delG, heterozigot 35delG ve normal allelelere sahip olduğu bilinen bireylerin DNA'sı kullanılarak PCR. Yapıldı. 35delG mutant alleli belirlemek için mutasyona spesifik 35delGMR primeri ve normal alleli belirlemek için normal allele spesifik 35delGMR primeri dizayn edildi. Bu primerlerle birlikte çalışmak üzere forward primer olarak CxF1 (11) kullanıldı (Tablo 7).

Tablo 7. 35delG mutasyonu belirlemek için kullanılan allel spesifik primerlerin dizileri

Primer	Primer baz dizisi
35delGMR	5'-gga gtg ttt gtt cac acc ccc c-3'
35delGMR	5'- a gtg ttt gtt cac acc ccc a- 3'
CxF1	5'- cat tcg tct ttt cca gag ca- 3'

PCR, 25 µl toplam hacimde 200 µl'lik tüplerde yapıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde yapıldı. PCR reaksiyonu 1X reaksiyon tamponundan 2.5µl (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 Triton-X), 1.2 mM MgCl₂, 160 µM her bir deoksiniükleotid trifosfat (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), her bir primerden (35delGMR, 35delGNR, CxF1) 5 pmol, 200 ng genomik DNA ve 0.5 U *Taq* DNA polimeraz kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon için ilk siklüs 94 °C'de 7 dk denaturasyon, 35 döngü olan ikinci siklüs 94 °C 35 saniye denaturasyon, 64 °C'de 3 dk primer bağlanması (annealing), 72 °C 35 saniye sentez (extension), son sentez siklüsü 72 °C'de 5 dk ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı.

3.2.3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile 35delG'nin Gösterilmesi

1. Poliakrilamid jel elektroforez için camlarının hazırlanması:

PCR ürünlerinin analizi 20X20 dikey elektroforez düzeneğinde yapıldı. Kulaklı ve düz camlar % 70'lik etil alkolle üçer kere silindi. Kulaksız cama 0.5 ml yapıştırıcı solüsyon döküldü ve cama homojen bir şekilde dağılması için gazlı bez ile iyice ovuldu. Kulaklı cama Rain X dökülerek homojen bir şekilde yayılması için gazlı bez ile iyice ovuldu. Her iki cam da gazlı bez veya kağıt havlu kullanılarak % 70'lik etil alkol ile üçer kere tekrar silinerek yapışkan solüsyonun ve Rain X'in fazlası alındı. Camların iki yanına ve alt kısmına 0.4 mm kalınlığında spacerlar konularak klempleslerlen tutturuldu.

2. % 10'luk doğal poliakrilamid jelin hazırlanması ve dökülmesi:

5 ml	% 40'lık Akrilamid-bis akrilamid solüsyonu (19:1)
2 ml	10X TBE tamponu
13 ml	dH ₂ O
100 µl	APS (%10'luk) (taze hazırlandı)
10 µl	TEMED

Toplam 20 ml olarak hazırlanan jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde 50 ml'lik enjektörle daha önce hazırlanan camların arasına döküldü. Tarak yerleştirilerek klemplesle tutturuldu ve donması için 1 saat beklendi.

3. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve yürütülmesi:

İki cam arasına dökülen jel polimerleştikten sonra tarak ve alt spacer çıkartıldı. Alt spacerın oluşturduğu boşluk ve elektroforez cihazının alt haznesi 1XTBE tamponla dolduruldu. Jel elektroforez cihazına yerleştirildi cihazının üst haznesi 1XTBE tomponla dolduruldu. Jel 30 dk ön elektroforez işlemine tabi tutuldu. Üzerine 5 µl yükleme tamponu ilave edilen PCR ürünlerinin 15 µl'si jelin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 350 Volt, 38 mA'de 5 saat yürütüldü.

4. Gümüş nitrat ile boyama

- i. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel camlarla birlikte düzenden alını. Jelin yapışmış olduğu kulaksız cam tutularak kulaklı cam kenarından hafifçe zorlanarak kaldırıldı.
- ii. Jelin yapışmış olduğu cam % 10'luk asetik asit içinde 30 dk orbital karıştırıcıda çalkalanarak fikse edildi.
- iii. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra jel iki kez 3 dk süre ile distile su ile yıkandı.
- vi. Jel %0.1'lik gümüş nitrat solüsyonunda 30 dk çalkalandı.
- v. Jel, gümüş nitrattan sonra yaklaşık 5 saniye distile su ile yıkandı.
- vi. Jelin üzerine % 3.4 (w/v) sodyum karbonatın yarısı döküldü. Bandlar görünür hale gelince sodyum karbonat boşaltılıp geride kalan taze sodyum karbonat jelin üzerine döküldü. Bantlar koyulaşınca fiksasyon için jel %10'luk asetik aside alındı.
- vii. Bandlar görünür hale gelince jel %10'luk asetik asit kaldırılarak boyama işlemi durduruldu (yaklaşık 2-3 dakika).
- viii Jel çeşme suyunda yaklaşık 4-5 dakika yıkandı (91).

3.2.4. SSCP Analizi

35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bireyler hariç tutularak heterozigot 35delG'lere ve bu mutasyonu taşımayan örneklerle SSCP analizi yapıldı. SSCP analizi için *GJB2* geninin amplifikasyonu örtüşen 4 çift primer ile yapıldı (11). Amplifikasyonda kullanılan primerlerin isimleri, gen üzerindeki yerleri, nükleotid dizileri ve PCR ürünlerinin büyüklükleri Tablo 8'de verildi.

Tablo 8. *GJB2* genini amplifikasyonunda kullanılan primerler

İsim	Primer baz dizisi	Pozisyonu	PCR ürünü
CxF1	5'- cat tcg tct ttt cca gag ca - 3'	(-38'den -19'a)	
CxR1	5'- cac gtg cat ggc cac tag - 3'	(+258'den +268'e)	323 bp
CxF2	5'- cgt gtg cta cga tca cta c - 3'	(+186'den +204'a)	
CxR2	5'- agc ctt cga tgc gga cct t - 3'	(+391'den +373'e)	206 bp
CxF3	5'- acc gga gac atg aga aga ag - 3'	(+290'den +309'a)	
CxR3	5'- ttc cag aca ctg caa tca tg - 3'	(+602'den +583'e)	312bp
CxF4	5'- tat gtc atg tac gac ggc t - 3'	(+463'den +481'e)	
CxR9	5'- tct aac aac tgg gca atg c - 3'	(+702'den +684'e)	239 bp

3.2.4.2. SSCP Analizi İçin PCR

Amplifikasyon 25 µl'lik hacimde yapıldı. PCR karışımı, 1 X reaksiyon tamponundan 2.5µl (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 Triton-X), 1.5 mM MgCl₂, her bir deoksiniükleotid trifosfattan 200 µM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), her bir primerden (forward-reverse) 7 pmol, 200 ng genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon için ilk siklus 94 °C'de 7 dakika denatürasyon, 35 döngü olan ikinci siklus 94 °C 50 saniye denatürasyon, CxF1/CxR1 için 55 °C'de, CxF2/CxR2 ve CxF3/CxR3 için 57 °C'de, CxF4/CxR4 için 56 °C'de olmak üzere 50 saniye primer bağlanması (annealing) ve 72 °C 50 saniye sentez (extension). Son sentez siklusü 72 °C'de 10 dakika ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı (11).

Altı µl PCR ürünü üzerine 5µl yükleme tamponu ilave edilerek TAE tamponu ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde 80 voltta 30 dakika yürütülerek kontrol edildi (Şekil 9).

3.2.4.3. *GJB2* Mutasyonlarının SSCP Analizi İle Taranması

1. Poliakrilamid Jel Elektroforez İçin Camlarının Hazırlanması:

SSCP analizi için 35X45 cm ölçülerinde sekans elektroforez düzeneği kullanıldı. Camların temizlenmesi ve hazırlanması bölüm 3.2.3.2'deki gibi yapıldı. 0.4 mm kalınlığında spacer ve köpek dişli tarak kullanıldı.

2. % 6'lık (29:1) doğal poliakrilamid jelin hazırlanması ve dökülmesi:

SSCP analizinde PCR ürünleri %5 gliserol içeren ve içermeyen iki farklı jelde yürütüldü.

i. %5 gliserol içeren % 6'lık (29:1) doğal poliakrilamid jel

10.5 ml	% 40'lık Akrilamid–bis akrilamid solüsyonu (29:1)
7 ml	10X TBE tamponu
3.5 ml	Gliserol
49 ml	dH ₂ O
350 µl	APS (%10'luk) (taze hazırlandı)
35 µl	TEMED

ii. Gliserol içermeyen % 6'lık (29:1) doğal poliakrilamid jel:

10.5 ml	% 40'lık Akrilamid – bis akrilamid solüsyonu (29:1)
7 ml	10X TBE tamponu
52.5 ml	dH ₂ O
350 µl	APS (%10'luk) (taze hazırlandı)
35 µl	TEMED

Toplam 70 ml'de hazırlanan jel 50 ml'lik enjektöre çekilerek daha önce hazırlanan camların arasına jelde hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü. Köpek dişli tarak ters olarak yerleştirilip klemplesle tutturuldu ve donması için 1 saat bekletildi.

3. PCR ürünlerinin SSCP jeline yüklenmesi ve yürütülmesi

İki cam arasına dökülen jel polimerleştikten sonra tarak ve alt spacer çıkartıldı. Alt spacerın oluşturduğu boşluk ve elektroforez cihazının alt haznesi 1XTBE tamponla dolduruldu. Jel elektroforz cihazına yerleştirildi cihazının üst haznesi 1X TBE tomponla dolduruldu. Jel 30 dk ön elektroforez işlemine tabi tutuldu. Köpek dişli tarak jele yerleştirilerek kuyucuklar oluşturuldu. Üzerine 5 µl denaturan yükleme tamponu ilave edilen PCR ürünleri 95 °C'de 4 dakika denatüre edilerek buz üzerine alındı. Örneklerin 7 µl'si jelin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 300 Voltta 20 saat yürütüldü. Jelin ısınmamasına dikkat edildi. Klima çalıştırılarak jelin ısısı 16-20 °C arasında tutuldu.

4. Gümüş nitrat ile boyama ve görüntüleme

Jelin gümüş nitrat ile boyanması ve fotoğrafının çekilmesi bölüm 3.2.3.4'de anlatıldığı gibi yapıldı.

Kontrollerden farklı band paterni veren PCR örneklerinin hangi bireye ve *GJB2* geninin hangi primer çifti ile amplifiye olan bölgesine karşılık geldiği belirlendi.

3.2.5. Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi

3.2.5.1. Dizi Analizi İçin DNA Örneklerinin PCR İle Çoğaltılması

SSCP analizinde normal sekansa sahip PCR ürünlerinden farklı band paterni veren PCR ürünleri DNA dizi analizinde kalıp DNA olarak kullanıldı. Bölüm III.2.4.2.'de olduğu gibi amplifiye edildiler. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılmak üzere saflaştırıldılar.

3.2.5.2. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

PCR ürünlerinin temizlenmesi purifikasyon kiti kullanılarak yapıldı.

- i. 30 µl – 300 µl PCR ürünü 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 100µl Purifikasyon tamponu ilave edilerek 5-10 saniye vortekslendi.
- ii. Karışımın üzerine 1ml Resin ilave edilerek 1'er dakika ara ile üç kere kısa süre vortekslendi. Resin–DNA karışımı şırıngaya çekildi ve mikro-kolondan geçirildi.
- iii. Ardından kolonu yıkamak için kolondan 2 ml %80'lik izopropanol geçirildi. Kolonu tamamen temizlemek için kolondan 1 ml daha %80'lik izopropanol geçirildi.
- iv. Mikro-kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve izopropanol kalıntısı tamamen uzaklaştırılır.
- v. Mikro-kolon 1.5 ml'lik temiz bir eppendorf tüpe geçirilerek üzerine 50-100 µl 65-70 °C'de dH₂O eklendi. Kolonlar 1 dakika bekletilerek 10.000g'de 25 saniye santrifüj edildi.
- vi. Eppendorfa geçen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80 voltta 20 dakika yürütülerek kontrol edildi (92).

3.2.5.3. DNA Dizi Analizi İçin PCR

DNA dizi analizi kit kullanılarak yapıldı. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması tamamen buz üzerinde gerçekleştirildi. DNA dizi analizi reaksiyonunda baz dizisi belirlenecek her bir PCR ürünü için 4 adet 200 µl'lik tüp buz üzerine yerleştirildi.

Sırasıyla:

1. tüp 2 µl d/ddATP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP ve ddATP)
2. tüp 2 µl d/ddTTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP ve ddTTP)
3. tüp 2 µl d/ddGTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP ve ddGTP)
4. tüp 2 µl d/ddCTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP ve ddCTP) konuldu.

Her bir tüpün üzerine 20 µl mineral oil ilave edilerek mineral oil'in çökmesi için kısa süre santrifüj edildi. Tablo 9'da verilen DNA dizi analizi reaksiyonu karışımı, d/ddNTP bulunan her bir tüpe 4 µl olacak şekilde dağıtıldı (31).

Tablo 9. DNA dizi analizi reaksiyonu

Enzim tamponu	2X	5 µl
Primer	10 pmol/µl	1 µl
Kalıp DNA	0.2 ng/µl	3 µl
dH ₂ O	Enjeksiyonluk su	7 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1 µl
Toplam		17 µl

Tüpler tekrar kısa bir süre santrifüj edilerek çöktürüldü ve Termalcycler'a yerleştirildi. DNA sekans reaksiyonu 95 °C'de 4 dakika bir siklus (ilk denatürasyon), 95 °C'de 45 saniye, 55 °C'de 45 saniye ve 70 °C'de 45 saniye olmak üzere 55 siklusa tamamlandı ve 4 °C'de bekletildi. Örnekler 4 °C bekletilmeden buz üzerine alınarak her bir tüpü üzerine 3 µl stop solüsyonu ilave edilerek santrifüjde çöktürüldü ve jele yüklemeye hazır hale getirildi.

3.2.5.4. DNA Dizi Analizini İçin Jel Elektrofrez

1. DNA dizi analizi için camların hazırlanması:

Sekans analizi için 34X45 cm ölçülerinde sekans elektrofrez cihazı kullanıldı. Elektrofrez cihazının camların temizlenmesi ve hazırlanması bölüm 3.2.3.2'deki gibi yapıldı. 0.4 mm kalınlığında spacer ve köpek dişli tarak kullanıldı.

2. DNA dizi analizi için denatürant poliakrilamid jelinin hazırlanması:

Sekans analizinde, akrilamid-bis akrilamid oranı 19:1 olan % 7 lik jel kullanıldı. Jele denatüran olarak 7 M üre kullanıldı. Her seferinde akrilamid ve bis-akrilamid karışımı taze olarak hazırlandı

%7'lik denatüran jel

Akrilamid	4.642 g
Bis akrilamid	0.258 g
TBE (10X)	7 ml
Üre	29.4 g
dH ₂ O	-----
Toplam	70 ml

Hazırlanan jelin tamamen homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda yeterince karıştırıldı. Hazırlanan jel dökülmeden hemen önce üzerine;

350 µl	APS (%10'luk)
35 µl	TEMED ilave edildi.

Enjektöre çekilen jel hazırlanan camların arasına hava kabarcığı bırakılmadan döküldü. Köpek dişli tarak ters olarak jelin üst kısmına yerleştirildi ve klemplesle tutturuldu. Jel bir saat süre ile polimerizasyona bırakıldı.

3. Örneklerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi:

Jel polimerize olduktan sonra ters olarak yerleştirilen köpek dişli tarak çıkartıldı. Tarağın yeri 1X TBE ile iyice yıkandı, jel kalıntıları temizlendi. Jelden alt spacer de çıkartıldı ve yeri 1X TBE ile dolduruldu. Elektroforez cihazının alt haznesi 1X TBE ile doldurulduktan sonra jel elektroforez üzerine yerleştirildi ve üst tank 1XTBE ile doldurulduktan sonra 1400 voltta 45 dakika ön yürümeye bırakıldı. Ön yürümeden sonra jelin üst kısmı jele zarar vermeden temizlendi. Köpek dişli tarak kuyucuklar oluşacak şekilde jele yerleştirildi. Örnekler 95 °C'de 4 dakika denatüre edildikten sonra, seri bir şekilde %7'lik denatüran poliakrilamid jele yüklenip 1400 volt'ta 3-4 saat yürütüldü. Elektroforez sırasında jelin sıcaklığı kontrol edilerek 55 °C'nin üzerine çıkmamasına dikkat edildi.

4. Gümüş nitrat ile boyama ve görüntüleme:

Jelin gümüş nitrat ile boyanması bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen baz dizilişi okunarak Gen Bankasından alınan *GJB2* geninin sekansı ile karşılaştırıldı ve mutasyonlar tespit edilerek görüntülendi.

3.2.5. Yeni Mutasyonların Kontrol Grubunda Taranması

SSCP analizi ve DNA dizi analizi sonucunda belirlenen ve daha önce *GJB2* geninde gösterilmemiş 517C→T ve 238C→A mutasyonlarının işitme kaybına neden olabilecek bir mutasyon olup olmadığını belirlemek için normal alleli ve varyant alleli amplifiye edebilecek allel spesifik primerler dizayn edildi (Tablo 10). Dizayn edilen primerler kullanılarak, mutasyonu taşıyan bireye mutasyonun hangi ebeveynden geldiği ve diğer kardeşlerindeki etkisi gösterildi. Mutasyonların polimorfizm olup olmadığı ailesinde işitme bozukluğu hikayesi olmayan ve kontrol grubu olarak seçilen 117 sağlıklı birey tarandı.

Tablo 10. 517C→T ve 238C →A mutasyonları için dizayn edilen allel spesifik primerlerin dizileri.

İsim	Primer sekansı
M238 R2	5'- gtg gac acg aag atc ag c c t -3
N238 R2	5'- g gac acg aag atc ag c c g -3'
Cx F2	5'- cgt gtg cta cga tca cta c - 3
N517 R2	5'- cac agt gtt ggg aca atg- 3'
M517 R2	5'- tc cac agt gtt ggg aca aca- 3'
Cx F4	5'- tat gtc atg tac gac ggc t - 3'

3.2.5.1. 517C→T Mutasyonunun Kontrol Grubunda Taranması

517C→T değişimini taşıyan alleli göstermek için CxF4 primeri ile 74 bp'lik PCR ürünü verebilecek M517R2 primeri ve normal alleli göstermek için CxF4 primeri ile 72 bp'lik PCR ürünü verebilecek N517R primerleri dizayn edildi (Tablo 10). PCR reaksiyonu bölüm 3.2.3.1'deki gibi hazırlandı. Amplifikasyon için ilk döngü 94 °C'de 7 dk denaturasyon, 30 döngü olan ikinci siklüs 94 °C 35 saniye denaturasyon, 58 °C'de 45 saniye primer bağlanması (annealing), 72 °C 35 saniye sentez (extension) ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı. PCR ürünleri üzerine 5 µl yükleme tamponu ilave edilerek %10'luk doğal poliakrilamid jelde, 350 Voltta, 38 mA'de 5 saat elektroforez edildi. Gümüş nitrat ile bölüm 3.2.3.2'deki gibi boyandı.

3.2.5.2. 238C→A Mutasyonunun Kontrol Grubunda Taranması

238C→A değişimini taşıyan alleli göstermek için CxF2 primeri ile 72 bp'lik PCR ürünü verebilecek allel spesifik M238R2 primeri ve normal alleli göstermek için CxF2 primeri ile 70 bp'lik PCR ürünü verebilecek allel spesifik N238R primerleri dizayn edildi. PCR reaksiyonu bölüm 3.2.3.1'deki gibi hazırlandı. Amplifikasyon için ilk siklüs 94 °C'de 7 dk denatürasyon, 30 döngü olan ikinci siklüs 94 °C 35 saniye denatürasyon, 55 °C'de 35 saniye primer bağlanması

(annealing), 72 °C 35 saniye sentez (extension) ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı. PCR ürünleri üzerine 5 µl yükleme tamponu ilave edilerek %10'luk doğal poliakrilamid jelde, 350 Voltta, 38 mA'de 5 saat elektroforez edilerek gümüş nitrat ile 3.2.3.2'deki gibi boyandı.



4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı 96 çocuğun *GJB2* geni mutasyonları tarandı. Çalışma grubu Karadeniz Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesini kapsamaktadır. Çalışmaya dahil edilen ailelerden alınan bilgilere göre seçilen aileler arasında akrabalık yoktu. Örneklerin her birinin ailesinde birden fazla işitme engelli birey vardır. Ayrıca çalışma grubuna dahil edilen bireylerin %64.5'inin anne-babası arasında akrabalık vardı (Tablo 11).

Yapılan mutasyon taraması sonucunda 25 bireyde homozigot ve 3 bireyde kompaund heterozigot olmak üzere 28 bireyin her iki allelinde *GJB2* mutasyonu belirlendi. İki bireyde ise *GJB2* mutasyonu heterozigot olarak görüldü. Ayrıca 4 bireyde de heterozigot olarak polimorfizm görüldü. *GJB2* mutasyonu sonucu işitme engelli olan bireylerin işitme seviyeleri şiddetli işitme kaybı ve derin işitme kaybı arasında değişmekteydi.

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen bireylerin ailelerindeki ve tek bir kuşaktaki işitme engelli birey, anne-babaları arasındaki akrabalık, alındıkları okullar ve yaşadıkları iller.

Örnek No	İşitme Engelli Sayısı		Anne-Baba Akrabalığı	Okulu	Yaşadığı İl
	Ailedeki	Tek Bir Kuşaktaki			
1	5	3	+	RİE	Artvin
2	2	1	+	RİE	Rize
3	3	3	+	RİE	Rize
4	2	2	+	RİE	Rize
5	2	1	-	RİE	Artvin
6	5	3	+	RİE	Rize
7	2	2	+	RİE	Trabzon
8	2	1	+	RİE	Artvin
9	3	2	-	RİE	Trabzon
10	5	3	+	RİE	Trabzon
11	3	2	+	RİE	Trabzon
12	2	1	-	RİE	Trabzon

Tablo 11'in devamı

Örnek No	İşitme Engelli Sayısı		Anne-Baba Akrabalığı	Okulu	Yaşadığı İl
	Ailedeki Tek Bir Kuşaktaki				
13	2	2	-	RİE	Giresun
14	4	4	+	RİE	Trabzon
15	2	2	-	RİE	Rize
16	5	4	+	RİE	Trabzon
17	3	2	-	RİE	Rize
18	7	3	+	RİE *	Rize
19	2	2	-	RİE	Rize
20	2	2	+	RİE	Ardahan
21	4	2	+	RİE	Ordu
22	2	2	-	RİE	Rize
23	4	2	+	RİE	Trabzon
24	3	2	-	RİE	Ordu
25	2	2	+	RİE	Trabzon
26	5	2	-	RİE	Trabzon
27	3	3	+	RİE	Rize
28	3	2	+	RİE	Rize
29	11	4	+	RİE	Rize
30	2	2	+	RİE	Trabzon
31	5	4	-	RİE	Ordu
32	3	1	-	RİE	Artvin
33	2	2	-	TİE *	Trabzon
34	4	4	+	TİE	Giresun
35	2	2	-	TİE	Tokat
36	2	2	+	TİE	Giresun
37	2	2	+	TİE	Samsun
38	2	2	-	TİE	Samsun
39	3	1	-	TİE	Trabzon
40	2	2	+	TİE	Trabzon
41	5	3	-	TİE	Trabzon
42	2	1	+	TİE	Trabzon
43	4	2	-	TİE	Trabzon
44	2	2	+	TİE	Trabzon
45	5	2	-	TİE	Samsun
46	2	1	+	TİE	Samsun
47	4	2	+	TİE	Kars
48	2	2	+	TİE	Samsun
49	8	2	-	TİE	Erzurum
50	3	2	+	TİE	Amasya
51	2	2	+	TİE	Amasya
52	3	3	+	TİE	Sivas
53	5	2	-	TİE	Amasya
54	2	2	+	TİE	Amasya
55	4	4	+	TİE	Bitlis
56	7	3	+	TİE	Van
57	6	3	+	TİE	Van
58	2	2	+	TİE	Ordu
59	3	3	+	TİE	Van

Tablo 11'in devamı

Örnek No	İşitme Engelli Sayısı		Anne-Baba Akrabalığı	Okulu	Yaşadığı İl
	Ailedeki	Tek Bir Kuşaktaki			
60	3	3	+	TİE	Kars
61	2	2	+	TİE	Van
62	5	2	+	TİE	Trabzon
63	6	2	+	TİE	Rize
64	3	2	+	TİE	Trabzon
65	3	1	+	TİE	Trabzon
66	2	2	+	TİE	Trabzon
67	2	2	+	TİE	Trabzon
68	5	3	+	TİE	Trabzon
69	2	2	-	TİE	Trabzon
70	2	2	+	TİE	Trabzon
71	4	3	-	TİE	Trabzon
72	3	3	-	TİE	Trabzon
73	2	2	+	TİE	Trabzon
74	5	4	-	OİE	Kastamonu
75	3	2	+	OİE	Giresun
76	3	3	+	OİE	Kırıkkale
77	4	2	+	OİE	Ordu
78	4	3	-	OİE	Ordu
79	2	2	+	OİE	Amasya
80	5	2	-	OİE	Kütahya
81	2	2	+	OİE	Tokat
82	3	3	-	OİE	Gümüşhane
83	5	5	+	OİE	Kastamonu
84	4	3	+	OİE	Isparta
85	2	2	-	OİE	Samsun
86	2	2	-	OİE	İstanbul
87	5	2	+	OİE	Çorum
88	3	2	+	OİE	Amasya
89	2	2	+	OİE	Amasya
90	4	4	+	OİE	Sivas
91	2	2	-	OİE	Sinop
92	3	3	-	OİE	Bartın
93	2	2	-	OİE	Samsun
94	2	2	+	OİE	Samsun
95	2	1	-	OİE	Ereğli
96	11	2	+	TİE	Trabzon

TİE : Trabzon - Çamlık İşitme engelli İlköğretim ve Çok Programlı Lisesi

RİE : Rize - Çaykent İşitme Engelliler İlköğretim Okulu

OİE : Ordu - Nuriye-Halit Çebi İşitme Engelliler Çok Programlı Lisesi

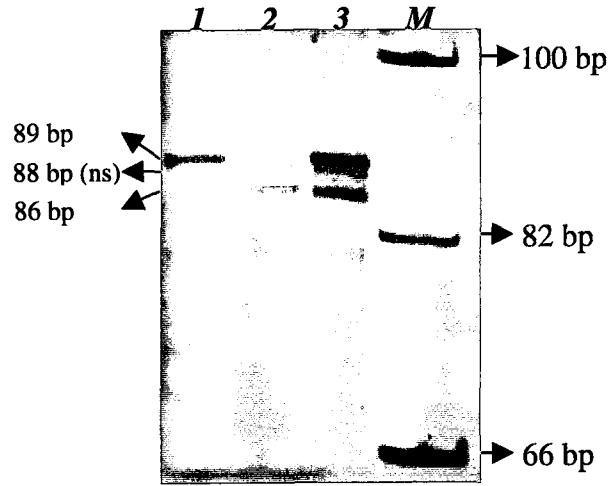
4.1. 35delG Mutasyonunun Yarışmalı ARMS İle Gösterilmesi.

4.1.1. 35delG'nin Belirlenmesi için Yarışmalı ARMS'ın Optimizasyonu

Yarışmalı ARMS örneklere uygulanmadan önce normal, heterozigot ve homozigot 35delG olduğu sekans analizi ile gösterilen örnekler kullanılarak reaksiyon optimize edildi.

Homozigot normal kişiye ait DNA kalıp olarak kullanıldığında yalnızca normal allelin, normale spesifik 35delGNR primeri ile amplifikasyonu sonucunda 89 bp'lik normal alleli gösteren PCR ürünü alındı. Homozigot mutant kişiye ait DNA kalıp olarak kullanıldığında, mutant allelin mutantan allelele spesifik 35delGMR primeri ile amplifikasyonu sonucunda 86 bp'lik mutant alleli gösteren PCR ürünü alındı. Aynı zamanda normal allelele spesifik 35delGNR primerinin mutant allelele ile de non-spesifik amplifikasyonu sonucunda 88 bp'lik soluk bir PCR ürünü elde edildi.

Heterozigot bireylerin DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonlarda ise normal alleli gösteren 89 bp'lik PCR ürünü, mutant alleli gösteren 86 bp'lik PCR ürünü ve non-spesifik amplifikasyon ürünü olan 88 bp'lik bir PCR ürünü elde edildi (Şekil 7). Tek bir reaksiyonda normal bireyi, heterozigot ve homozigot 35delG'li bireyleri birbirinden ayırmak mümkün hale geldi.



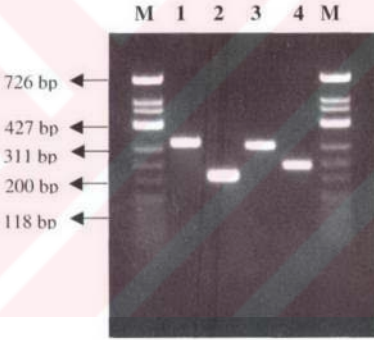
Şekil 7. 35delG mutasyonunun yarışmalı ARMS gösterilmesi. 1, normal allel; 2, homozigot 35delG; 3, heterozigot 35delG; M, DNA markır (ϕ X174 DNA/*Hinf* I); ns, nonspesifik bant

4.1.2. Örneklerde 35delG Mutasyonunun Yarışmalı ARMS İle Taranması.

Yarışmalı ARMS kullanılarak otozomal resesif nonsendromik işitme kayıplı bireyde 35delG mutasyonları belirlendi. 96 bireyin 20'sinde (% 20.8) homozigot ve 4'ünde (% 4.2) heterozigot olarak 35delG belirlendi. 35delG'yi homozigot olarak taşıyan bireylerin 14'ünün (%70) anne-babası arasında akrabalık vardı. Bu bireylerin işitme seviyeleri belirlendiğinde 35delG'nin hem şiddetli hem de derin işitme kaybına neden olabildiği görüldü. Ayrıca bu fark bireylerin her iki kulağı arasında da görülmüştür (Tablo 14).

4.2. *GJB2* Geninin SSCP Analizi

Doksan altı birey arasından homozigot 35delG tespit edilen 20 birey SSCP analiz çalışmasından hariç tutuldu. 35delG mutasyonu görülmeyen 72 örnek ve heterozigot 35delG görülen 4 örnek olmak üzere toplam 76 örneğe SSCP analizi yapıldı. 681 nükleotidi ve tek bir ekzonu olan *GJB2* geni, SSCP analizi için daha kısa DNA zincirlerine ayrılacak şekilde dört bölgede amplifiye edildi. Birinci bölge CxF1-CxR1 primerleri, II. bölge CxF2-CxR2 primerleri, III. bölge CxF3-CxR3 primerleri ve IV. bölge CxF4-CxR4 primerleri ile amplifiye edildi. Dört bölgenin PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde elektroforez edilerek görüntülendi (Şekil 8).



Şekil 8. SSCP analizinde kullanılacak *GJB2* geni PCR ürünleri. **M;** ϕ X174DNAHinf I, **1;** I. bölge PCR ürünü (323 bp), **2;** II. bölge PCR ürünü (206 bp), **3;** III. bölge PCR ürünü (312), **4;** IV bölge PCR ürünü (239),

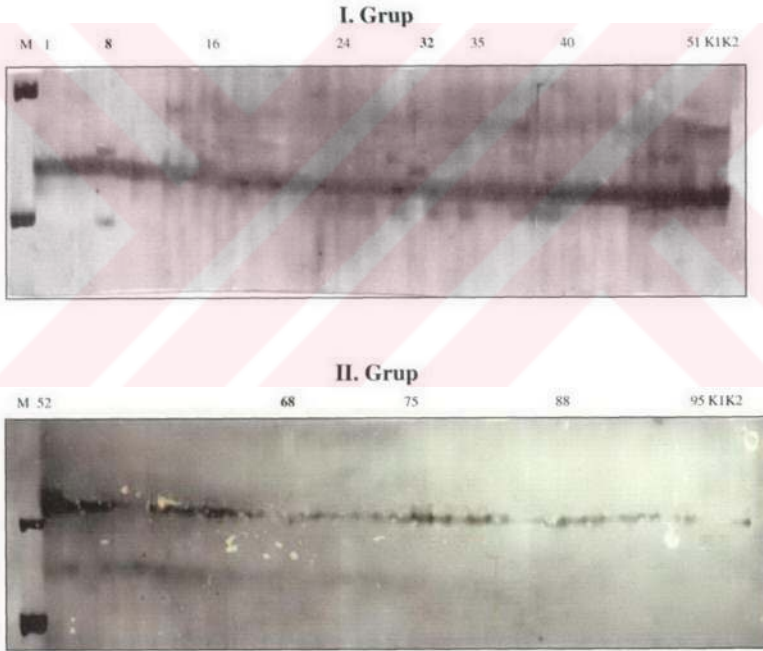
SSCP analizi ile mutasyon taraması yapılacak olan toplam 76 bireyin PCR ürünleri 40 ve 36 örnek olmak üzere iki gruba ayrılarak elektroforez edildi. Tablo 12'de her iki gruptaki örneklerin jele yükleniliş sırası gösterildi. Her bölge iki grup halinde jele yüklendi ve elektroforez sonucunda örneklerle ait bantlar kontrollerle karşılaştırılarak farklı bant veren örnekler belirlendi.

Tablo 12. Örneklerin SSCP jeline yükleniliş sırası.

Grup	Jele yükleniliş sırası
1. Grup	1, 2, 5, 7, 8, 10-13, 15-22, 24, 25, 27, 28, 30, 32-40, 42-47, 49-51
2. Grup	52-59, 61-63, 65, 66, 68-75, 77, 78, 83-95

I. bölgenin SSCP analizi

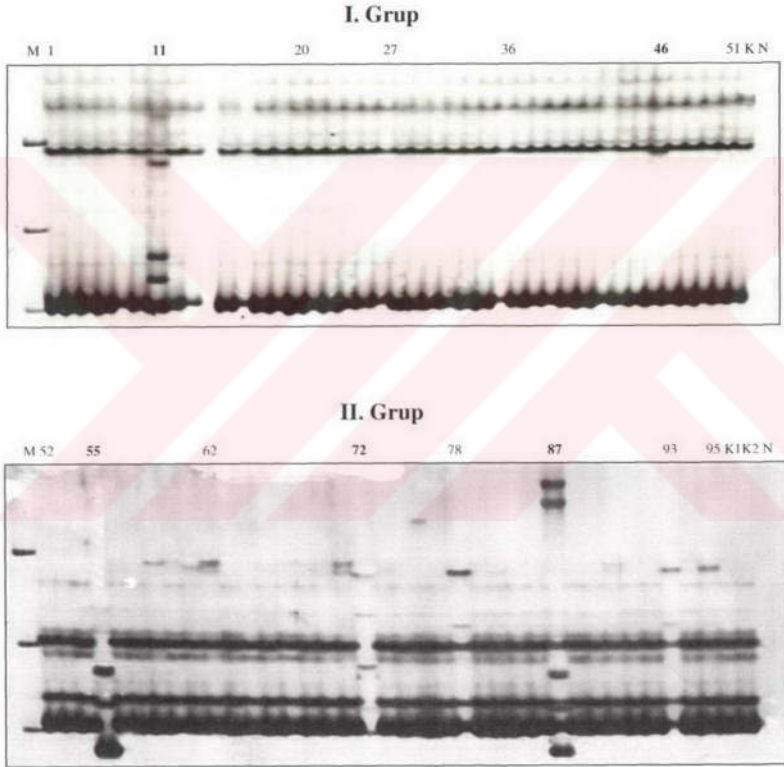
GJB2 geninin CxF1 ve CxR1 primerleri ile amplifiye edilen birinci bölgesinden elde edilen 323 bp'lik PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucunda, 3 örnekte kontrole kıyasla farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 9).



Şekil 9. *GJB2* geni I. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları. **I. Grup:** M; ϕ X174DNAHinf I, 1, 2, 5, 7, 10-13, 15-22, 24, 25, 27, 28, 30, 33-40, 42-47, 49-51; Normal, 8, 32; Mutant. K1 ve K2; Kontrol. **II. Grup.** M; ϕ X174DNAHinf I, 52-59, 61-63, 65, 66, 69-75, 77, 78, 83-95; Normal, 68; Mutant, K1 ve K2; Kontrol.

II. bölgenin SSCP analizi.

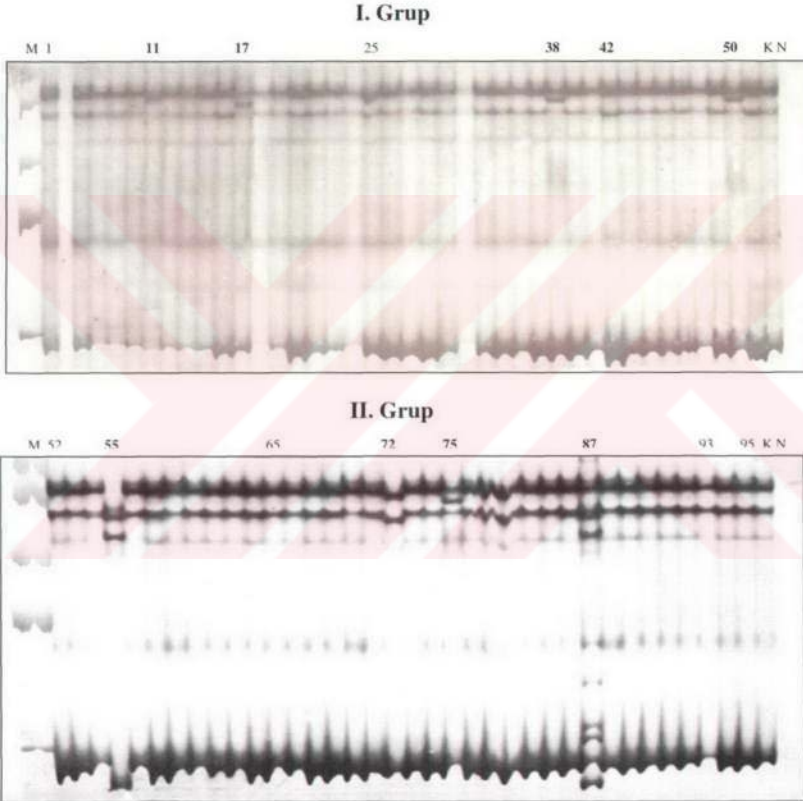
GJB2 geninin Cx2F ve Cx2R primerleri ile amplifiye edilen ikinci bölgesinden elde edilen 206 bp'lık PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucunda, 5 örnekte kontrole kıyasla farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. *GJB2* geni II. Bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları. **I. Grup.** M; ϕ X174DNAHinf I, 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15-22, 24, 25, 27, 28, 30, 33-40, 42-45, 47, 49-51; Normal, 11, 46; Mutant. K; Kontrol, N; Negatif kontrol. **II. Grup.** M; ϕ X174DNAHinf I, 52-54, 56-59, 61-63, 65, 66, 69-71, 73-75, 77, 78, 83-86, 88-95; Normal, 55, 72, 87; Mutant, K1 ve K2; Kontrol, N; Negatif kontrol.

III. bölgenin SSCP analizi

GJB2 geninin Cx33 ve Cx36 primerleri ile amplifiye edilen üçüncü bölgeden elde edilen 312 bp'lik PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucunda, 9 örnekte kontrole kıyasla farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *GJB2* geni III. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.

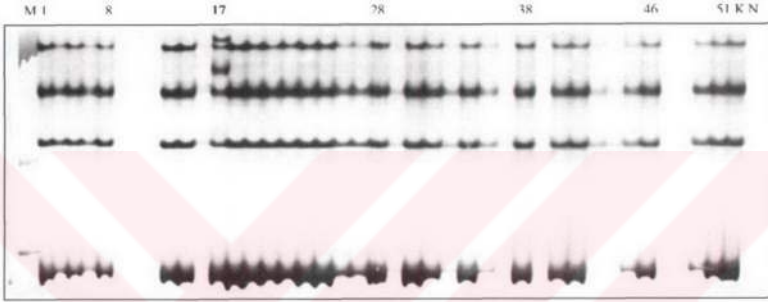
I. Grup. M; ϕ X174DNAHinf I, 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18-22, 24, 25, 27, 28, 30, 33-37, 39, 40, 43-47, 49,51; Normal, 11, 17, 38, 42, 50 ; Mutant, K; Kontrol, N; Negatif kontrol.

II. Grup. M; ϕ X174DNAHinf I, 52-54, 56-59, 61-63, 65, 66, 69-71, 73, 74, 77, 78, 83-86, 88-95; Normal, 55, 72, 75, 87; Mutant, K ; Kontrol, N; Negatif kontrol.

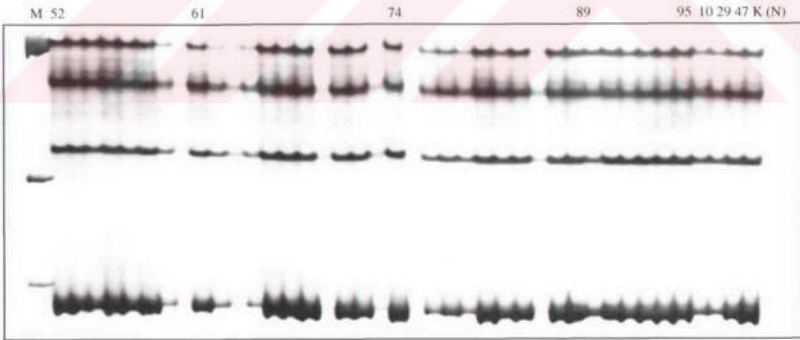
IV. bölgenin SSCP analizi.

GJB2 geninin CxR4 ve CxR4 primerleri ile amplifiye edilen dördüncü bölgeden elde edilen 239 bp'lik PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucunda 1 örnekte kontrole kıyasla farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 12).

I. Grup



II. Grup



Şekil 12. *GJB2* geni IV. bölgesinin %5 gliserol içeren % 6'lık non-denature poliakrilamid jelde SSCP analizi sonuçları.

I. Grup. M; ϕ X174DNAHinf I, 1, 2, 5, 7, 8, 10-13, 15, 16, 18-22, 24, 25, 27, 28, 30, 32-40, 42-47, 49-51; Normal, 17; Mutant, K; Kontrol, N; Negatif kontrol.

II. Grup. M; ϕ X174DNAHinf I, 52-59, 61-63, 65, 66, 68-75, 77, 78, 83-95, 10, 29, 47; Normal, K ; Kontrol, N; Negatif kontrol.

SSCP analizi sonucuna göre 8 örnekte yalnızca tek bir bölgede ve 5 örnekte iki bölgede olmak üzere 13 örnekte toplam 18 farklı bant görüldü. Farklı bantlar alınan bireyler ve bölgeler Tablo 13'de gösterildi.

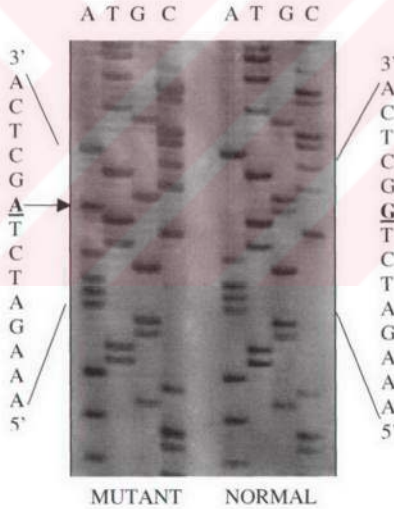
Tablo 13. Farklı bant paterni veren örneklerin *GJB2* geni üzerinde oluşturulan bölgelere göre dağılımı.

	Örnek no	Kontrollere kıyasla farklı bantlar görülen bölgeler			
		I. bölge CxF1-CxR1	II. Bölge CxF2-CxR2	II. Bölge CxF3-CxR3	IV. Bölge CxF4-CxR4
1.	8				
2.	11				
3.	17				
4.	32				
5.	38				
6.	42				
7.	46				
8.	50				
9.	55				
10.	68				
11.	72				
12.	75				
13.	87				

4.3. Dizi Analizi Sonuçları

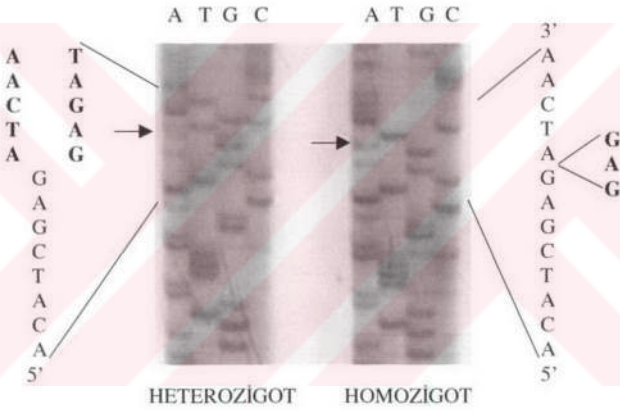
SSCP analizi sonucunda farklı bant paterni gözlenen 13 bireye ait 18 bölgenin DNA dizi analizi yapıldı.

I. bölgesinde farklı bant paterni alınan 8, 32, ve 68 numaralı bireylerin CxF1 ve CxR2 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizi analizi CxF1 primeri ile yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda her üç bireyde homozigot 71G→A (W24X/ Trp→stop) mutasyonu görüldü. Mutasyon proteinin TM1 domeinini tutmaktadır (Şekil 13).



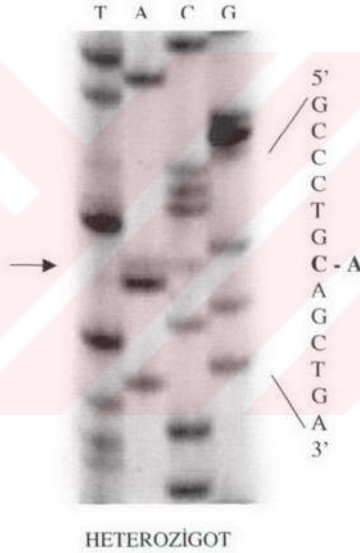
Şekil 13. 71G→A (W24X/ Trp→stop) mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

II. bölgelerinden farklı bant paterni alın 11 ve 72 numaralı bireylerin Cx2 ve CxR2 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizi analizi Cx2 primeri ile yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda 11 numaralı bireyde heterozigot ve 72 numaralı bireyde homozigot delE120 mutasyonu gözlemlendi. delE120, 358-359-360'ıncı nükleotidlere karşılık gelen ve glutamik asit kodlayan GAG kodonunun kaybı sonucu oluşmaktadır. delE120 proteinin IS2 domeinini tutmaktadır (Şekil 14).



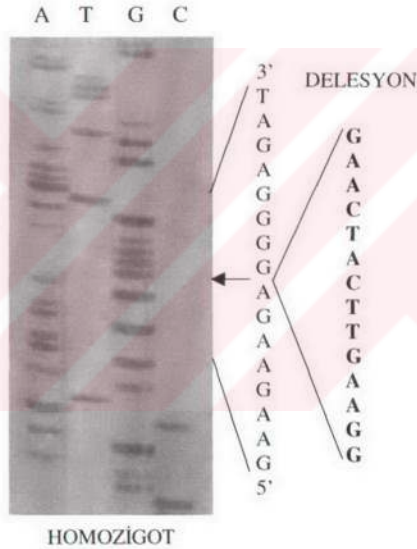
Şekil 14. Heterozigot ve homozigot delE120'nin (delGAG 358-360) DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

Yarışmalı ARMS ile heterozigot 35delG olduğu gösterilen 46 numaralı bireyin, SSCP analizi sonucunda II.bölgesine farklı bant paterni tespit edildi. CxF2 ve CxR2 primeri ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi CxR2 primeri kullanılarak yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda daha önce literatürde rapor edilmemiş ve proteinin TM2 domeinini tutan 238C→A/Q80K mutasyonu heterozigot olarak gözlemlendi (Şekil 15).



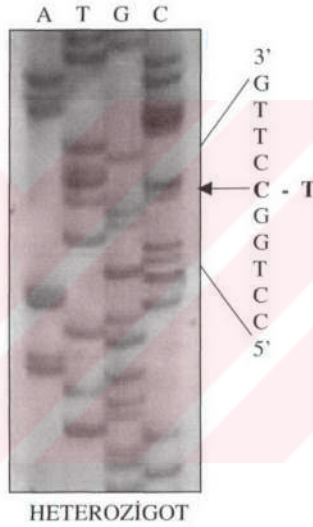
Şekil 15. Heterozigot 238C→A (Q80K) (gln→lys) değişiminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

SSCP analizi sonucunda II. bölgesinde farklı bant paterni alının 55 ve 87 numaralı bireylerin CxF2 ve CxR2 primer çifti kullanılarak elde edilen PCR ürününün CxF2 primeri ile DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda 55 numaralı bireyde homozigot ve 87 numaralı bireyde heterozigot 310del14 mutasyonu gözlemlendi. 310del14 mutasyonu 310 ile 323. nükleotidleri içine alan ve proteinin IS2 domeinini tutan 14 bazlık bir delesyon sonucu oluşmaktadır (Şekil 16).



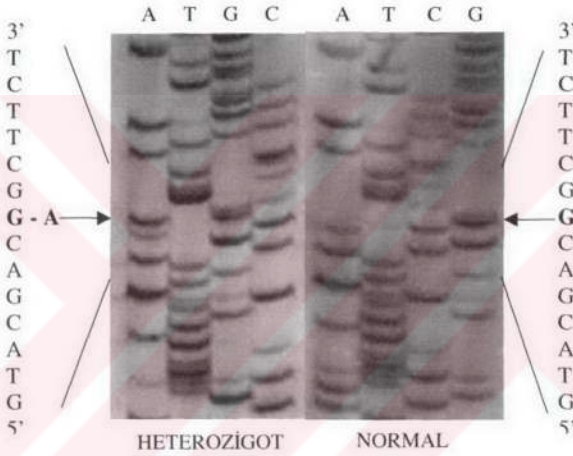
Şekil 16. Homozigot 310del14 mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

Yarışmalı ARMS ile bir allelinde 35delG gösterilen ve SSCP analizi sonucunda III. bölgesine farklı bant paterni gözlenen 17 numaralı bireyin CxF3 ve CxR3 primer çifti ile kullanılarak elde edilen PCR ürününün CxF3 ile DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda daha önce literatürde rapor edilmemiş olan ve proteininin ES2 domeinini tutan 517C→T (P173S) mutasyonu görüldü (Şekil 17).



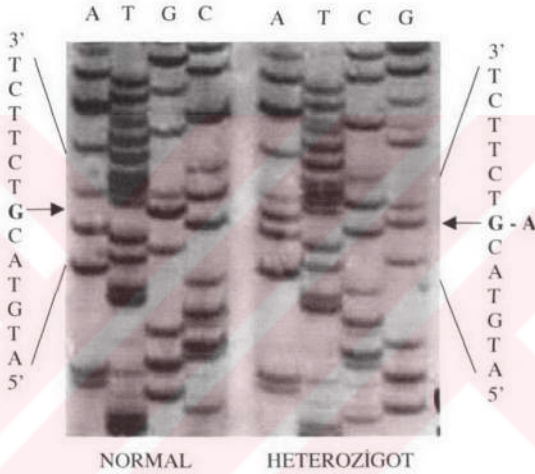
Şekil 17. Heterozigot 517C→T / P173S (prolin→serin) değişiminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

SSCP analizi ile III. bölgesinde farklı bant paterni gözlenen 38, 50 ve 75 numaralı örneklerin CxF3 CxR3 primerleri ile elde edilen PCP ürününün dizi analizi CxF3 primeri ile yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda her üç bireyde de heterozigot olarak proteinin ES2 domeinini tutan 478G→A/G160S polimorfizmi görüldü (Şekil 18).



Şekil 18. Heterozigot 478G→A/G160S (gly→ser) polimorfizminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

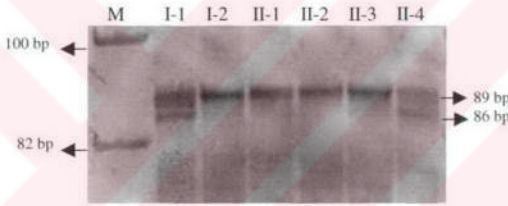
SSCP analizi ile III. bölgesinde farklı bant paterni alınan 42 numaralı örneğin CxF3 CxR3 primeri ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi CxF3 primeri ile yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda proteinin TM3 domeinini heterozigot olarak tutan 457G→A/V153I polimorfizmini görüldü (Şekil 19).



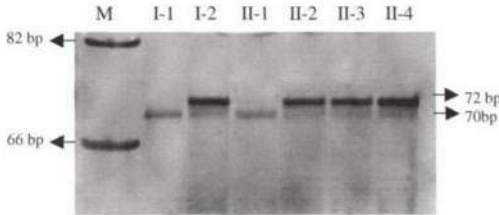
Şekil 19. Heterozigot 457G→A/V153I (val→ile) polimorfizminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

4.3.1. 238C→A/Q80K'nın Mutasyon Olup Olmadığının Gösterilmesi

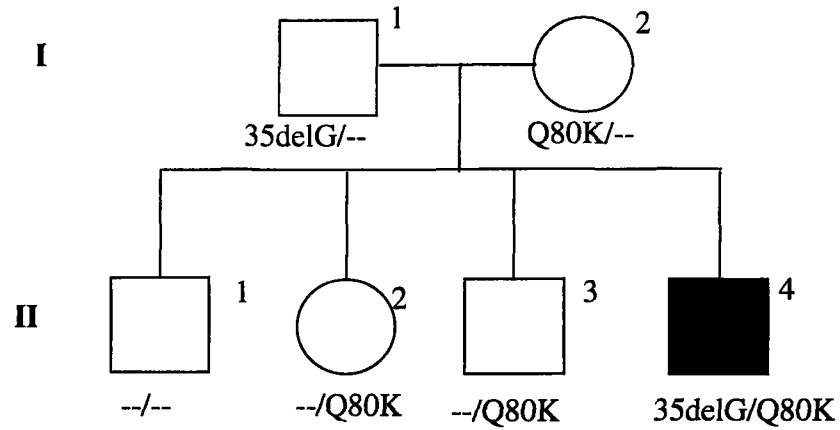
238C→A/Q80K mutasyonunun görüldüğü 46 numaralı bireyin diğer allelinde 35delG gözlenmişti. Öncelikle bu bireyin ailesindeki diğer bireylerde 35delG'nin dağılımı belirlendi (Şekil 20). Ardından hem 238C→A/Q80K alleleline hem de normal allele spesifik olarak dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan yarışmalı ARMS ile ailedeki 238C→A/Q80K'nın geçişi belirlendi (Şekil 21). Ailedeki bireylerin genotipleri aile ağacı üzerinde gösterildi (Şekil 22). Q80K ile 35delG'yi kompaund heterozigot olarak taşıyan bireyin saf ses işitme seviyesi odyometre ile belirlendi (Şekil. 23).



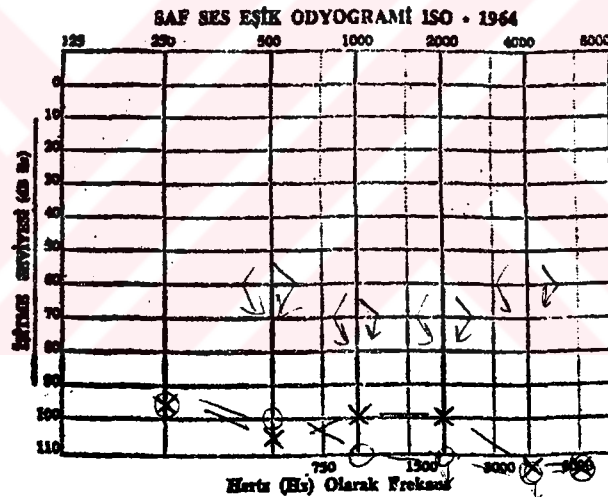
Şekil 20. 46 numaralı bireyin ailesinde 35delG'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi. M, ϕ X174 *HinfI* DNA markır; **89 bp**, mutant allel; **86 bp**, normal allel **I-1**, heterozigot 35delG; **I-2**, homozgot normal; **II-1**, homozgot normal; **II-2**, homozgot normal; **II-3**, homozgot normal; **II-4**, heterozigot 35delG;.



Şekil 21. 46 numaralı bireyin ailesinde 238C→A/Q80K'nın yarışmalı ARMS ile gösterilmesi. M, ϕ X174 *HinfI* DNA markır; **72 bp**, mutant allel; **70 bp**, normal allel **I-1**, homozgot normal; **I-2**, heterozigot 238C→A/Q80K; **II-1**, homozgot normal; **II-2**, heterozigot 238C→A/Q80K; **II-3**, heterozigot 238C→A/Q80K; **II-4**, heterozigot 238C→A/Q80K;



Şekil 22. Q80K değişimi görülen 46 numaralı bireyin aile ağacı ve aile bireylerinin genotipi.

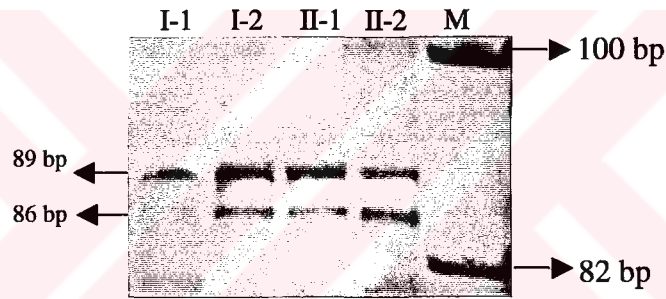


Şekil 23. Q80K mutasyonunu 35delG ile kompaund heterozigot olarak taşıyan 46 numaralı bireyin saf ses eşik odyogramı.

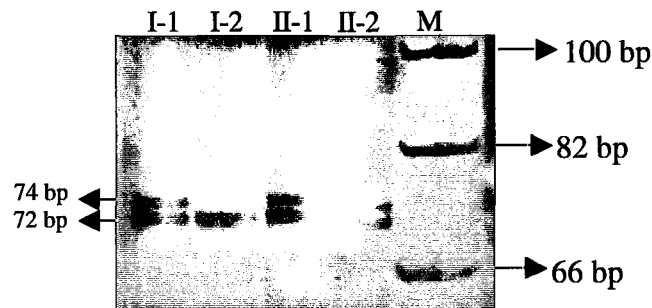
Ayrıca, kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı 117 bireyde 238C→A/Q80K için dizayn edilen allel spesifik primerler kullanılarak 234 allelde tarama yapıldı. Tarama sonucunda kontrol gurubu içinde Q80K alleli görülmedi.

4.3.2. 517C→T/P173S Değişimlerinin Mutasyon Olduğunun Gösterilmesi

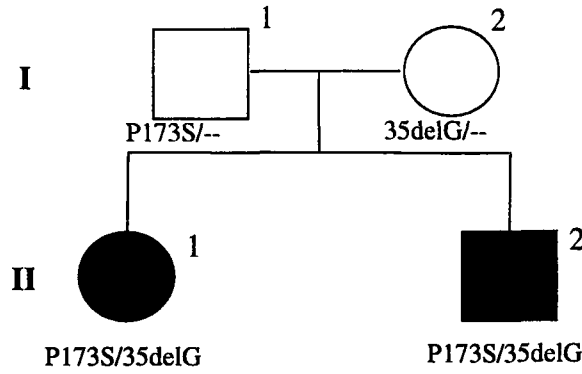
517C→T/P173S mutasyonunun görüldüğü 17 numaralı bireyin diğer allelinde 35delG gözlenmişti. Öncelikle bu bireyin ailesindeki diğer bireylerde 35delG'nin dağılımı belirlendi (Şekil 24). Ardından hem 517C→T/P173S alleleline hem de normal allele spesifik olarak dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan yarışmalı ARMS ile ailedeki 517C→T/P173S'nin geçişi ve dağılımı belirlendi (Şekil 25). Ailedeki bireylerin genotipleri aile ağacı üzerinde gösterildi (Şekil 26). İşitme engelli olan her iki kardeşin de 35delG ile 517C→T/P173S değişimini birlikte taşıdığı gözlemlendi. Her iki bireyinde işitme seviyeleri saf ses odyometre ile belirlendi. İndeks vakada derin işitme kaybı görülürken, indeks vaka ile aynı genotipi taşıyan kız kardeşinde şiddetli işitme kaybı görüldü (Şekil. 27).



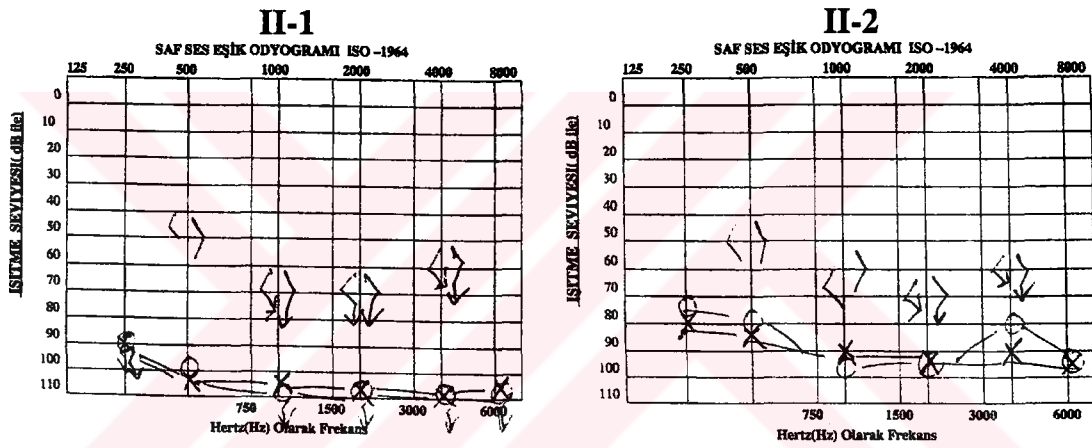
Şekil 24. 17 numaralı bireyin ailesinde 35delG'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi. **89 bp**, mutant allele; **86 bp**, normal allele; **I-1**, homozigot normal baba; **I-2**, heterozigot 35delG anne; **II-1**, heterozigot 35delG kardeş; **II-2**, heterozigot 35delG indeks vaka; **M**, ϕ X174 *HinfI* DNA markırı;



Şekil 25. 17 numaralı bireyin ailesinde 517C→T/P173S'nin yarışmalı ARMS ile gösterilmesi. **74 bp**, mutant allele; **72 bp**, normal allele; **I-1**, heterozigot 517C→T baba; **I-2**, 517C→T homozigot normal anne; **II-1**, heterozigot 517C→T kız kardeş; **II-2**, heterozigot 517C→T indeks vaka; **M**, ϕ X174 *HinfI* DNA markırı;



Şekil 26. 517C→T/P173S mutasyonu görülen 17 numaralı bireyin aile ağacı ve aile bireylerinin genotipi.



Şekil 27. P173S mutasyonunu 35delG'ile kompaund heterozigot olarak taşıyan 17 numaralı bireyin (II-1) ve aynı genotipi taşıyan kız kardeşinin (II-2) saf ses işitme odyogramı.

Kontrol olarak seçilen sağlıklı 117 bireyde, C→T/P173S için dizayn edilen allel spesifik primerler kullanılarak 234 allelde tarama yapıldı. Tarama sonucunda kontrol gurubu içinde P173S alleli görülmedi.

Sonuç olarak otozomal resesif non-sendromik sensorinöral işitme kayıplı ve akraba olmayan 96 bireyin dahil edildiği çalışmada *GJB2* geninin kodlayan bölgesinde mutasyon taraması yapıldı. Mutasyon taraması sonucunda 20 bireyde (3, 4, 6, 9, 14, 23, 26, 29, 31, 41, 48, 60, 64, 67, 76, 79, 80, 81, 82, 96) homozigot 35delG mutasyonu, Üç bireyde (8, 32 68) homozigot W24X, bir bireyde (55) homozigot 310del14, bir bireyde (72) homozigot delE120 ve bir bireyde (87) 310del14, bir bireyde (17) P173S ve bir bireyde (46) Q80K ile kompaund heterozigot olarak 35delG olmak üzere toplam 28 bireyin her iki allelinde mutasyon belirlendi. Ayrıca bir bireyde (53) heterozot 35delG ve bir bireyde (11) heterozigot delE120 olmak üzere iki bireyde tek bir allelinde mutasyon belirlendi. Çalışmada, Türk toplumunda ikisi çerçeve kaymasına (35delG, 310del14) ve biri tek bir amino asitlik kayba (delE120) neden olan üçü farklı delesyon ile birlikte iki yanlış anlamlı (P173S, Q80K) ve bir anlamsız (W24X) olmak üzere toplam altı farklı *GJB2* mutasyonu gösterildi. Altı farklı mutasyondan dördü (35delG, 310del14, delE120, W24X) Türk toplumundaki *GJB2* mutasyonlarının %96'sını teşkil etmektedir. Heterozigot olan iki bireyde ise *GJB2* geninin kodlayan bölgesi DNA dizi analizi ile tamamen tarandı. Ancak ikinci mutasyon belirlenemedi. Ayrıca 3 (38, 75, 50) bireyde G160S ve bir bireyde (42) V153I olmak üzere 4 bireyde heterozigot olarak iki farklı polimorfizm tespit edildi (Tablo 14).

Tablo 14. *GJB2* geninde belirlenen mutasyonlar.

No	Örnek No	Akrabalık	Mutasyonlar		İşitme Kaybı	
1.	3	+	35delG	35delG	-	-
2.	4	+	35delG	35delG	-	-
3.	6	+	35delG	35delG	Şiddetli	Şiddetli
4.	8	+	W24X	W24X	-	-
5.	9	-	35delG	35delG	Şiddetli	Şiddetli
6.	11	+	delE120	--		
7.	14	+	35delG	35delG	Derin	Şiddetli
8.	17 A	-	35delG	P173S	Derin	Derin
	17 B**		35delG	P173S	Şiddetli	Şiddetli
9.	23	+	35delG	35delG	Derin	Derin
10.	26	-	35delG	35delG	Derin	Şiddetli
11.	29	+	35delG	35delG	Derin	Derin
12.	31	-	35delG	35delG	Derin	Şiddetli
13.	32	-	W24X	W24X	Derin	Derin
14.	41	-	35delG	35delG	Derin	Derin
15.	46	+	35delG	Q80K	Derin	Derin
16.	48	+	35delG	35delG	-	-
17.	53	-	35delG	--	-	-
18.	55	+	310del14	310del14	Derin	Derin
19.	60	+	35delG	35delG	-	-
20.	64	+	35delG	35delG	Derin	Derin
21.	67	+	35delG	35delG	Derin	Derin
22.	68 A	+	W24X	W24X	Derin	Derin
	68 B**		W24X	W24X	Derin	Derin
23.	72	-	DelE120	delE120	Derin	Derin
24.	76	+	35delG	35delG	-	-
25.	79	+	35delG	35delG	Şiddetli	Şiddetli
26.	80	-	35delG	35delG	-	-
27.	81	+	35delG	35delG	-	-
28.	82	-	35delG	35delG	-	-
29.	87	+	35delG	310del14	Derin	Derin
30.	96	+	35delG	35delG	Şiddetli	Şiddetli
31.	38	-	G160S*	--		
32.	75	+	G160S *	--		
33.	42	+	V153I*	--		
34.	50	+	G160S*	--		

* Polimorfizm, ** Kardeş

Otozomal resesif non-sendromik işitme engelli 96 bireyin 28'inde belirlenen mutant *GJB2* allellerinin bu grup içerisindeki frekansları ve görülme sıklıkları hesaplandı. Bu gruptaki 192 allelin 43'ünde görülen 35delG % 22.9'luk allel frekansı ile en sık görülen mutasyondur (Tablo 15).

Tablo 15. *GJB2* geninde belirlenen mutasyon frekansı ve sıklığı

Mutasyon	Allel frekansı	Allel sıklığı (%)
35delG	43/192	22.4
W24X	6/192	3.1
310del14	3/192	1.6
delE120	2/192	1.04
P173S	1/192	0.5
Q80K	1/192	0.5
Toplam	56/192	29.17

GJB2 mutasyonlarının rölatif sıklıkları hesaplandığında ise 35delG'nin bütün *GJB2* mutasyonlarının %75.86'sını 35delG, %10.7'sini W24X, %5.4'ünü 310del14, %3.6'sını delE120, oluşturduğu görüldü (Tablo 16).

Tablo 16. *GJB2* mutasyonlarının rölatif sıklığı

Mutasyon	Rölatif Allel Frekansı	Rölatif Allel Sıklığı (%)
35delG	43/56	76.8
W24X	6/56	10.7
310del14	3/56	5.4
delE120	2/56	3.6
P173S	1/56	1.8
Q80K	1/56	1.8

4.4. Odyoloji Sonuçları

GJB2 mutasyonu belirlenen 28 bireyden 19'unun saf ses işitme eşikleri odyometre ile belirlendi (Tablo 14). Dokuz bireye ulaşılamadığı için odyolojik ölçümleri yapılamadı. 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan 6, 9, 14, 17, 23, 26, 29, 31, 41, 64, 67, 79 ve 96 numaralı 12 bireyin 4'ünde (6, 9, 79, 96) bilateral şiddetli, 5'inde (23, 29, 41, 64, 67) bilateral derin işitme kaybı ve 3'ünde (14, 26, 31) ise bir kulakta şiddetli, diğer kulakta derini işitme kaybı gözlemlendi. W24X mutasyonunu homozigot olarak taşıyan ikisi kardeş üç vakada (32, 68A, 68B), 310del14 ve delE120 mutasyonlarını homozigot olarak taşıyan sırasıyla 53 ve 72 numaralı bireylerde bilateral derin işitme kaybı görüldü. 35delG ile P173S mutasyonunu kompaund heterozigot olarak taşıyan iki kardeşten 17A numaralı bireyde bilateral derin ve 17B numaralı bireyde bilateral şiddetli işitme kaybı görüldü. Yine 35delG'nin Q80K ve 310del14 ile kompaund heterozigot olarak görüldüğü sırasıyla 46 ve 87 numaralı bireylerin her ikisinde bilateral derin işitme kaybı olduğu odyolojik ölçüm sonucunda gösterildi.

5. TARTIŞMA

Yeni doğan her 1000 çocuktan biri prelingual işitme kayıplı olarak doğmaktadır. Yaklaşık olarak vakaların %50'sini bebeklik dönemi enfeksiyonları, ototoksik ilaçlar veya travmalar teşkil ederken geri kalan diğer yarısını, %30'unu sendromik ve %70'ini non-sendromik olmak üzere tek gene bağlı prelingual işitme kayıpları oluşturmaktadır. Tek gene bağlı non-sendromik prelingual işitme kayıplarının yaklaşık olarak %75'i otozomal resesif kalıtım göstermektedir. Non-sendromik otozomal resesif sağırlığa neden olan 29 adet DFNB lokusu gösterilmişken bu lokuslardan 11'inin geni klonlanmıştır. Çeşitli toplumlarda yapılan mutasyon taramaları sonucunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı vakaların %20-%60'ından *GJB2* mutasyonlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. *GJB2* geninde rapor edilen yaklaşık 70 farklı mutasyon arasında 35delG'nin (30delG) nispi sıklığı %70 civarındadır (2, 4, 45, 48, 50, 51, 93).

Bu çalışmaya, çoğunluğu Karadeniz Bölgesinden olmakla birlikte, Doğu Anadolu Bölgesinden ve İç Anadolu Bölgesinden gelen öğrenciler dahil edildi. Klinik muayene ile Usher, Pendred ve Waardenburg gibi sendromik işitme kayıplı bireyler çalışma grubundan çıkartıldı. Enfeksiyon, ototoksik ilaç ve travma gibi çevresel faktörlere bağlı gelişen işitme engelli bireyleri çalışmadan hariç tutulabilmek için ailesinde en az iki işitme engelli olan bireyler değerlendirmeye alındı. Otozomal dominant, ve X'e bağlı kalıtım gösteren ailelere rastlanmadı. Çalışmaya otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı toplam 334 işitme engelli bireyin bulunduğu 96 farklı aileden birer birey alındı. Çalışma grubunu oluşturan otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı bireylerin saf-ses işitme seviyeleri orta-derin arasında değiştirmektedir. Türk toplumunda genel olarak %20 oranında olan akraba evliliği (94), ailelerden alınan bilgiler doğrultusunda bu çalışma

grubunda % 66.7 olarak tespit edildi (Tablo 11).

Öncelikle *GJB2* gen mutasyonları arasında önemli bir yer tutan 35delG mutasyonu yarışmalı ARMS ile tarandı. Homozigot 35delG görülmeyen bireylerde mutant alleller SSCP analizi ile belirlendi. SSCP'de farklı bant paterni veren allellere DNA dizi analizi yapıldı. Değerlendirmeye alınan 96 bireyin (192 allel) 28'inin her iki allelli ve 2'sinin birer allelinde olmak üzere toplam 58 (%29.29) allelde mutasyon belirlendi (Tablo 14). Sonuç olarak, 192 allelin %22.9'unda 35delG, %3.1'inde W24X, %1.6'sında 310del14, %1.04'ünde delE120, %0.5'inde P173S ve %0.5'inde Q80K olmak üzere %30.2 sinde *GJB2* mutasyonu belirlendi. Ayrıca 192 allelin %1.6'sında G160S ve % 0.5'inde V153I polimorfizmleri görüldü (Tablo 15).

GJB2 mutasyonları arasında önemli bir yer tutan 35delG mutasyonu, her iki ucunda timin bulunan ardışık altı guaninden birinin delesyonu sonucu oluştuğu için gösterilmesinde zorluklarla karşılaşılmaktadır. İşitme kaybının teşhisinde ve taşıyıcılığın belirlenmesinde 35delG mutasyonunu belirlemek için çeşitli çalışma grupları tarafından farklı prensiplere dayanan yöntemler sunulmuştur. 35delG bir enzim kesim bölgesi oluşturmadığı gibi var olan bir enzim kesim bölgesini de değiştirmemektedir. Kupka ve ark. (95) dizayn ettikleri mutagenik primerler ile PCR ürünü üzerinde enzim kesim bölgesi oluşturarak 35delG'nin homozigotluğunu ve heterozigotluğunu PCR'ı takip eden enzim kesimi ve PAGE ile göstermişlerdir. Diğer taraftan hem radyoaktif işaretleme hem de non-radyoaktif işaretleme ile hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır (66, 96, 97). Allel spesifik PCR'a dayalı olarak geliştirilen diğer bir yöntemde ise, normal allele ve mutant allele spesifik primerler ve bu primerlere eş olacak olan genel bir primer kullanılmıştır. Normal ve mutant allelin varlığı, her bir örnek için ayrı ayrı PCR ve agoroz jel elektroforezi yapılarak gösterilmiştir (7). Bu yöntemle bir bireyin genotipini belirlemek için daima iki PCR ve iki elektroforez yapma zorunluluğu vardır. Mutasyonu belirlemede kullanılan diğer bir yöntem ise DNA dizi analizidir (9). DNA dizi analizinin rutin uygulamalardaki yüksek maliyeti ve çok zaman alışı yöntemi primer olarak tercih edilebilir bir seçenek olmaktan çıkartmaktadır (96).

Yukarıda sözü edilen yöntemlerde PCR ve elektroforeze ek olarak ya enzim kesimi ya da ikinci bir PCR veya hibridizasyon işlemi yapma zorunluluğu vardır. Bu işlemler de çalışmanın maliyetini ve süresini artırmaktadır. Bu zorlukların aşılması ve 35delG mutasyonunu daha hızlı bir şekilde belirlemek için, bu çalışmada yarışmalı ARMS (amplification refractory mutation system) geliştirildi. Bu yöntemle bir bireyin genotipini tek bir PCR ve tek bir doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlemek mümkün hale geldi (Şekil 7). Mutant allele spesifik primer mutant alleli amplifiye ederken, normale allele spesifik primer normal alleli amplifiye etmektedir. Aynı zamanda, normal allele spesifik primer mutant alleli de non-spesifik olarak az miktarda amplifiye ederek jelde soluk bir bant olarak görülmektedir. Fakat mutant alleledeki bir bazlık delesyon sayesinde non-spesifik PCR ürünü normal allelin PCR ürününden bir baz kısa, mutant allelin PCR ürününden iki baz uzun olmaktadır. Bu sayede non-spesifik amplifikasyon da mutasyonun varlığını göstermekteydi. Böylece yarışmalı ARMS kısa bir süre içinde çok sayıda örneğin etkin bir şekilde taranmasına imkanı vererek çalışmanın hem süresini hem de maliyetini azaltmıştır.

SSCP analizi Orita ve ark. (24) tarafından geliştirilmiş, tek baz değişimini tespit edebilme yeteneğine sahip bir mutasyon tarama yöntemidir. SSCP tekniğinin diğer metodlara göre daha ucuz ve kolay olması yöntemin bilinmeyen mutasyonların belirlenmesinde ön tarama metodu olarak tercih edilmesine neden olmaktadır. (11, 26). Optimizasyona bağlı olarak SSCP'nin hassasiyeti %80-90 arasında değişebilmektedir (20). SSCP'nin hassasiyetini etkileyen faktörler arasında PCR ürününün temizliği, DNA fragmanının uzunluğu ve elektroforez koşulları gelmektedir. SSCP'de incelenen PCR ürünlerinin temiz olması ve fragmanların 200-250 nükleotid uzunlukları arasında olması yöntemin performansını artırmaktadır. Elektroforez sırasında sabit jel sıcaklığı iyi sonuçların elde edilmesi için önemlidir. Bu nedenle ince jellerin ve güçlü soğutmalı sistemlerin kullanılması önerilmektedir. Jelin sıcaklığının yükselmesini engellemek için düşük voltaj, uzun süreli elektroforezler yapılarak hem jelin ısınması önlenir hem de bantların daha güzel ayrılması sağlanır. 4-10 °C sabit sıcaklıkta yapılan elektroforezlerde genellikle güzel ayrılma sağlanmaktadır. Eğer düşük sıcaklıkta elektroforez

yapılmıyorsa jele % 5-10 oranında gliserol ilave edilmesiyle 20-25 °C’de yapılan elektroforezler de iyi sonuçlar vermektedir. Çapraz bağlayıcı olan bis-akrilamidin düşük derişimde olması (1:49 ya da 1:99) genellikle akrilamidin ayırım gücünü arttırmaktadır. Ayrıca düşük derişimde kullanılan gliserol de yararlıdır. Gliserol tek zincirli DNA molekülünün katlanmış yapısını stabilize etmektedir. Jel uzunluğu da bantların iyi ayrılmasını etkileyen bir faktördür. Farklı mutasyonların optimal koşullarda ayrılması hedef DNA’nın baz içeriği ile de ilişkilidir. Görüntülemeye, başlangıçta radyoaktivite kullanılmasına karşın son zamanlarda nonradyoaktif ve gümüş boyama yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (20, 25, 98).

Bu çalışmada, SSCP’nin optimizasyonu için farklı koşullar denendi. Akrilamid:bis-aksrilamid oranı 19:1, 29:1, 39:1 ve 1:49 olan %6’lık ve %7’lik jeller hem %5 gliserollü hem de gliserolsüz olarak denendi. Jelin sıcaklığı 16 °C ile 20 °C arasında tutuldu. Denemeler sonunda en iyi ayırım, akrilamid:bis-akrilamik oranı 39:1 olan ve %5 gliserol içeren %6’lık jelde elde edildi. Elektroforez üresince jelin ısınmaması için 300 voltun üzerine çıkılmadı ve ayırımın iyi olabilmesi için elektroforez süresi 20-22 saat arasında tutuldu. 323 bp’lik PCR ürünü veren birinci bölgenin ayırımında güçlük yaşanırken 206 bp, 312 bp ve 239 bp uzunluğundaki ikinci, üçüncü ve dördüncü bölgelerde daha kaliteli ayırım elde edildi. Genin amplifikasyonunda oluşturulan bölgeler birbirleri ile örtüştükleri için SSCP analizi sonucunda bir örneğin birden fazla bölgesinde farklı bantlar görüldü.

DNA dizi analizi, mutasyonun yerini ve tipini tam olarak belirleyebildiği için mutasyon tarama metotları arasında üstünlüğü tartışılmazdır. Kullanım kolaylığı ve hassasiyeti açısından günümüzde tercih edilen metod F. Sanger’in enzimatik yöntemi olup “dideoksinükleotid” metodu olarak da adlandırılmaktadır (29). Gelişmiş laboratuarlarda dizi analizi reaksiyonları yeni teknolojiler sayesinde otomatize edilmiş ve flourosans boyalar ile görüntülenmektedir. Bununla birlikte manuel yöntemler de kullanılmaktadır. Manuel dizi analizi reaksiyonlarında, başlangıçta radyoizotoplar ile görüntüleme sağlanırken artık gümüş boyama ile de kaliteli sonuçlar alınmaktadır. Bizim çalışmamızda manuel dizi analiz yöntemi ve gümüş boyama kullanıldı.

Bu çalışmada yapılan mutasyon taraması sonucunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı bireylerde yarışmalı ARMS ile 96 bireyin 20'sinde (%20.8) homozigot (birey no: 3, 4, 6, 9, 14, 23, 26, 29, 31, 41, 48, 60, 64, 67, 76, 79, 80, 81, 82, 96,), 3'ünde (%3,1) kompaund heterozigot (birey no:17, 46, 87) ve 1'inde (%1) heterozigot (birey no: 53) olarak 35delG görüldü (Tablo 14). Bizim çalışma grubumuzda 35delG mutasyonu otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarına neden olan mutattnt allellerin %22.4'ünü oluştururken (Tablo 15) bu oran Tekin ve ark. (99) tarafından 11 ailede yapılan bir çalışmada %64 olarak belirlendi. Tekin ve ark.'nın (99) yaptığı çalışmada çalışma grubunun küçük olması Türk toplumu hakkında genelleme yapmayı zorlaştırmaktadır. Diğer taraftan Otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı 83 biryde Barış ve ark.'nın (100) yaptığı diğer bir çalışmada ise bu oran % 32.5 olarak belirlendi. Barış ve ark.'nın (100) sonuçları Tekin ve ark.'nın (99) sonuçlarına göre bizim sonuçlarımıza daha yakındı. Fakat yinede belirgin olarak 35delG sıklığı yüksek olarak rapor edilmişti. Barış ve ark.'ın (100) sonuçları ile bizim sonuçlarımız arasındaki farkın, Anadolu popülasyonunun oldukça heterojen bir yapıya sahip olamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Anadolu'da tarıma dayalı ekonominin olması ve toprağa bağlı yaşam şekli bölgelerde izole toplumların oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle farklı bölgelerde farklı mutasyonların hakimiyetini görmek mümkün olmaktadır.

Bizim çalışmamızda otozomal resesif işitme engellilerde %20.4 olarak gözlenen 35delG sıklığı diğer toplumlarla karşılaştırıldığında da ilginç sonuçlar görülmektedir. 35delG'nin görülme sıklığı İspanya ve italya'da %34.48 (11, 12, 68), Fransa'da %38.24 (9, 60), Amerika'da %28.5 (71) ve İngiltere'de %14.79 (12) olduğu rapor edilmiştir. Ancak Tayland ve Japonya'da (72, 74, 75, 101) 35delG mutasyonu rapor edilmemiştir. Kore'de ise çok düşük oranlarda rapor edilmiştir (77). Bazı araştırmacılar tarafından yapılan haplotip analizi çalışmaları, 35delG mutasyonunun tek bir orijinden gelmediğini, mutasyona uğrayan bölgenin hot-spot bir bölge olduğunu ve 35delG'nin farklı toplumlarda spontan olarak oluştuğunu önermektedir (9, 50). Bu durumda 35delG'nin özellikle Avrupada yığılma gösterirken Uzak Doğu ülkelerinde görülmemesi açıklama beklemektedir. Haplotip

analizlerinin farklılıklar göstermesi bu mutasyonun oldukça eski bir mutasyon olup zaman içerisindeki cross-overlar ile haplotiplerin değişmiş olabileceğini de düşündürmektedir. Bu sonuçlar 35delG'nin tek bir atadan gelip, kökeninin Avrupa olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda *GJB2* mutasyonları arasındaki 35delG'nin relatif sıklığı %76.8 olarak görüldü (Tablo 16). Ancak Barış ve ark. (100) otozomal resesif işitme engellilerde elde ettikleri 35delG sıklığından yola çıkarak Hardy–Weinberg prensiplerine göre *GJB2* mutasyonlarının %93'ünü 35delG'nin teşkil edebileceğini hesaplamışlardır. Bu sonuç bizim elde ettiğimiz sonuçlardan oldukça yüksektir. İtalya'da otozomal resesif non-sindromik işitme kayıplı bireylerde 35delG'nin nispi sıklığı %88 (68), Fransa'da %75-86 (9). İspanya ve Avustralya'da %55 iken (68, 80), bu oran Askenazi Yahudilerinde %20'lere inmektedir (71). Bunun yanında non-sindromik işitme kayıplı Askenazi Yahudileri'nin %56.67'sinde, yine bir bazlık delesyon sonucu oluşan, 167delT mutasyonu görülmektedir (84, 102). Japonlarda ise non-sindromik işitme kayıplı bireylerde yapılan mutasyon taramalarında 35delG ve 167delT hiç görülmezken başka bir delesyon mutasyonu olan 235delC %7.8 oranında görülmektedir. (75, 72, 74, 85). Türk toplumunda ise 167delT ve 235delC mutasyonlarına rastlanmamıştır. 35delG, 167delT ve 235delC gibi mutasyonların nispi sıklıklarının toplumlarda yüksek olması ve kolaylıkla belirlenebilmeleri teşhis amaçlı çalışmalarda kolaylık sağlayacak olması açısından önemlidir.

35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bireylerin işitme kayıpları karşılaştırıldığında saf ses işitme seviyelerinin bireyden bireye değişebildiği görüldü. Yaklaşık olarak bireylerin yarısında şiddetli işitme kaybı görülürken diğer yarısında derin işitme kaybı görüldü. Ayrıca bireylerin bir kısmının iki kulağı arasında asimetri gözlemlendi. Bir kulakta şiddetli işitme kaybı görülürken diğerinde derin işitme kaybı görüldü. Wilcox ve ark.'nın (80) rapor ettiği gibi 35delG mutasyonunun neden olduğu işitme kayıplarında, saf ses işitme eşiği klinik açıdan ayırıcı bir tanı olma özelliği taşımamaktadır. Bu durum kesin teşhis için moleküler yöntemlerin önemini birkere daha ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, üç bireyde homozigot olmak üzere (birey no 8, 32, 68) en sık görülen ikinci mutasyon ise 71G→A sonucu oluşan W24X'dir (Tablo 14). Gen üzerindeki 71'inci guaninin adenine dönüşmesi sonucunda 24'üncü pozisyonda bulunan triptofan kodonu (UGG) stop kodonuna (UAG) dönüşmektedir. Mutasyon proteinin birinci transmembran domeininde (TM1) yer almaktadır. W24X, ilk olarak otozomal resesif işitme engelli üç farklı Pakistan ailesinde gösterilmiştir (58). İspanya ve İtalya'da çalışılan 193'ü otozomal resesif, 383'ü sporatik olan toplam 576 işitme engelli bireyden yalnızca birinde W24X heterozigot olarak gösterilmişken (68), on iki Tayland ailesinden birinde 235delC ile kompaund heterozigot olarak gösterilmiştir (101). Bu çalışmada ise üç bireyde homozigot olarak görülen W24X, çalışma grubumuzu oluşturan otozomal resesif non-sendromik işitme engelli 96 bireyin %3.1'ini oluşturmaktadır. *GJB2* mutasyonları arasındaki relatif sıklığı ise %10.7'dir. W24X'i homozigot olarak taşıyan üç aileden ikisinin aynı ilden (birey no: 8, 32) olması, ailelerden yine ikisinde (birey no: 8, 68) akrabalık olması bu mutasyonun tek bir atadan gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan mutasyonun homozigot olarak taşındığı bir ailede akrabalık olmaması (birey no: 32) mutasyonun toplum içerisinde taşıyıcılığının yüksek olabileceğini düşündürmektedir (Tablo 11). Özellikle Asya toplumlarında rastlanan bu mutasyonun, Türk toplumunda dikkate alınması gerektiği kanaatindeyiz. W24X mutasyonu her üç bireyde de bilateral derin işitme kaybına neden olmuştur (Tablo 14).

Birden fazla bireyde karşılaştığımız diğer bir mutasyon ise 310'uncu nükleotidden itibaren 14 nükleotidin delesyonu sonucu oluşan 310del14'dür. Bu mutasyon aynı zamanda 312del14 veya 314del14 olarak da adlandırılmakta ve çerçeve kaymasına neden olmaktadır (6). Bu çalışmada bir bireyde homozigot (birey no: 55) ve bir bireyde 35delG ile kompaund heterozigot olarak görülen 310del14'ün *GJB2* mutasyonları arasındaki relatif sıklığı %5.4'dür (Tablo 16). 310del14 ilk olarak Denoyelle ve ark. (9) tarafından İngiltere'de ve daha sonra Rabinet ve ark. (68) tarafından İtalya'da gösterilmiştir. 310del14'ü hem homozigot olarak taşıyan 55 no'lu bireyde hem de kompaund heterozigot olarak taşıyan 87 no'lu bireyde bilateral derin işitme kaybı görüldü (Tablo 14).

Bu çalışmada karşılaşılan başka bir delesyon mutasyonu ise 355'inci nükleotid ile 360'ıncı nükleotidler arasında kalan ve kısa bir tekrar bölgesi olan CAGCAG dizisinden bir CAG'nin delesyonu sonucu oluşan delE120'dir. Connecxin 26 proteini üzerinde 120'ci pozisyonundaki glutamik asitin kaybolmasına neden olmaktadır ve delE119 olarak da adlandırılmaktadır (6). İspanya ve İtalya'da çalışılan 193'ü otozomal resesif, 383'ü sporadik olan toplam 576 işitme engelliden yalnızca birinde kompaund heterozigot olarak rapor edilmiştir (68). Bu çalışmada ise bir bireyde homozigot (birey no: 72) ve bir bireyde de heterozigot (birey no: 11) olarak görülen bu mutasyonun *GJB2* mutasyonları arasındaki rolatif sıklığı %3.6'dır (Tabo 16). delE120'yi homozigot olarak taşıyan bireyde de bilateral derin işitme kaybı görülmüştür (Tablo 14).

Literatürde tanımlanmış mutasyonlardan farklı olarak bu çalışmada otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan iki yeni *GJB2* mutasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi 517. pozisyonundaki sitozinin timine dönüşmesi (517C→T) ile proteinin ikinci ekstrasellular bölgesinde (EC2), 173'üncü pozisyonunda bulunan prolin amino asitinin serin amino asidine (P173S) dönüşmesine neden olan yanlış anlamlı (missens) bir mutasyondur. P173S bir bireyde 35delG ile kompaund heterozigot olarak görülmüştür (birey no 17). Yapılan odiyolojik ölçümler sonucunda bireyin işitme kaybının ileri derecede olduğu belirlenmiştir. İşitme kaybının P173S mutasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için öncelikle bireyin ailesi incelemeye alındı. Anne, baba ve bir kız kardeşten oluşan ailede bütün bireyler incelendi. İşitme engelli olan ikinci kardeşin de indeks vaka gibi 35delG ve P173S'i kompaund heterozigot olarak taşıdığı ve derin işitme kayıplı olduğu görüldü (Tablo 14). 35delG'nin anne, P173S'in ise baba orijinli olduğu görüldü. Ayrıca, işitme engelli olmayan ve kontrol grubu olarak seçilen 117 bireye ait 234 allelde P173S için dizayn edilen allel spesifik primerler ile yapılan tarama sonucunda sağlıklı bireylerde P173S gözlenmedi. Kontrol grubunda P173S'in görülmemesi, bu mutasyonun bir polimorfizm olmadığını göstermekteydi. Diğer taraftan, Rabionet ve ark (68) tarafından aynı kodonda 518P→G sonucu oluşan ve işitme kaybına neden olan P173R mutasyonunun gösterilmiş olması

P173S'in de işitme kaybından sorumlu bir mutasyon olduğu kanaatini desteklemektedir.

İlk kez tanımlanan ikinci mutasyon ise 238. pozisyondaki sitozinin adenine dönüşmesi (238C→A) ile proteinin ikinci transmembran bölgesinde (TM2), 80'inci pozisyonda bulunan glutamine amino asitinin lizin amino asidine (Q80K) dönüşmesine neden olan yanlış anlamlı (missens) bir mutasyondur. Q80K, bir vakada (birey no: 46) 35delG ile kompaund heterozigot olarak görüldü (Tablo 14). Odiyolojik ölçümler sonucunda bireyin işitme kaybının ileri derecede olduğu belirlendi (Tablo 14, Şekil 24)). İşitme kaybının Q80K mutasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için öncelikle bireyin ailesi incelemeye alındı. Anne, baba, sağlıklı iki erkek ve bir kız kardeşten oluşan ailede bütün bireyler incelendi. 35delG'nin baba ve Q80K'nın anne orijinli olduğu görüldü. Erkek kardeşlerden biri hem 35delG hem de Q80K allelini taşımazken diğer iki kardeşin heterozigot olarak Q80K allelini taşıdığı görüldü (Şekil 21, şekil 22, Şekil 23). Ayrıca, işitme engelli olmayan ve kontrol grubu olarak seçilen 117 bireyde yapılan tarama sonucunda 234 allelde Q80K gözlenmedi. Kontrol grubunda Q80K'in görülmemesi, bu Q80K'nın bir polimorfizm olmayıp işitme kaybından sorumlu bir mutasyon olabileceği düşüncesini desteklerken aynı kodonda, 239A→C sonucu oluşan Q80P mutasyonunun da işitme kaybına neden oluşu (6) Q80K'nın da mutasyon olabileceğini doğrular nitelikteydi.

Bu çalışmada, işitme kaybına neden olan mutasyonların dışında işitme kaybına neden olmayan iki farklı polimorfizm görüldü. Polimorfizmlerden birincisi 478G→A sonucu oluşan ve proteinin 160'ıncı pozisyonundaki glisinin serine dönüşmesine neden olan G160S'dir. G160S, bu çalışmada hastaların üçünde heterozigot olarak görüldü (birey no: 38, 75, 50). Scott ve ark. (7) G160S'in taşıyıcılık sıklığını 2/200 (%1) olarak belirlemişlerdir. Karşılaşılan ikinci polimorfizm ise 457G→A sonucu oluşan ve proteinin 153'üncü pozisyonundaki valin amino asitinin izolösin amino asidine dönüşmesi ile oluşan V153I'dır. Çalışma grubunda bir bireyde (birey no: 42) heterozigot olarak gözlediğimiz V153I'nın

normal popülasyondaki görülme sıklığı Hilter ve ark (6) tarafından 4/367 (%1) olarak belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler, Türk popülasyonundaki non-sendromik işitme kayıplarının genetiği ile diğer ülkeler arasında bir karşılaştırma yapma olanağını bize vermektedir. Otozomal resesif işitme kayıplı bireylerin, Amerika'da %40'ında (71), Avrupa'da %46'sında (68), Japonya'da %12'sinde (74) ve Kore'de %8'inde (77) *GJB2* mutasyonları görülürken bu değer Türk toplumunda %29 olarak belirlendi. *GJB2* mutasyonlarının Türkiye'deki görülme sıklığı Avrupa ülkelerinden daha az iken Uzak Doğu ülkelerinden yüksekti. *GJB2* mutasyonlarının otozomal resesif işitme kayıplarındaki etkisi aynen 35delG mutasyonunda olduğu gibi toplumların etnik orijinlerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. *GJB2* mutasyonlarının Avrupa merkezli olması dikkat çekicidir. Bunun yanında doğuya gidildikçe *GJB2* mutasyonlarının otozomal resesif işitme kayıplarında daha az oranda sorumlu olması bu bölgelerde farklı genlerdeki mutasyonların önemli bir yer teşkil ettiğini göstermektedir. Bu nedenle *GJB2* mutasyonlarının düşük oranda görüldüğü toplumlarda farklı veya yeni genlerin tanımlanması muhtemeldir. Türk toplumu ile ilgili olarak iki farklı grup tarafından 35delG mutasyon taraması yapılmakla birlikte bütün genin mutasyonları taranmamıştır (99, 100).

Türk toplumunda genel olarak akraba evliliği %20 oranında görülürken (93) otozomal resesif işitme engelli ailelerde bu oran %64.5 olarak görüldü (Tablo 11). Bu da mutasyonların sıklıkla homozigot olarak görülmesine neden olmaktaydı. Bu sonuç non-sendromik işitme kayıpları gibi diğer otozomal resesif hastalıkların görülmesinde akraba evliliklerinin önemini birkere daha ortaya koymaktadır.

GJB2 mutasyonları ile etkilenen bireylerin saf ses işitme seviyeleri ile karşılaştırıldığında. *GJB2* mutasyonlarının şiddetli ve derin işitme kayıplarına neden olduğu gözlemlendi. Aynı genotipi taşıyan bireylerden birinde şiddetli işitme kaybı görülürken diğerinde derin işitme kaybı görüldü. Wilcox ve ark.'nın (80) sonuçlarıyla uyumlu olarak *GJB2* mutasyonlarının neden olduğu işitme kayıplarının teşhisinde saf ses işitme seviyelerinin ayırıcı bir tanı kriteri olamayacağı görüldü.

Bu çalışma, geniş bir coğrafik bölgeden seçilen otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı 96 bireyin % 29'una altı farklı *GJB2* mutasyonunun neden

olduğunu, bu mutasyonların %76.8'ini oluşturan 35delG'nin kısa zamanda belirlenmesine imkan veren kolay ve ucuz bir yöntem sunmaktadır. Sonuç olarak bu araştırmanın Türk toplumunda non-sendromik otozomal resesif işitme kayıpları genetiğinde etkili olan *GJB2* mutasyonlarının profilini büyük oranda ortaya koyduğunu düşünmekteyiz. Bu sonuçların, işitme kayıplarının teşhisinde ve ailelere genetik danışmanlık verilmesinde büyük kolaylıklar sağlayacağı, etkilenen bireylerde erken dönemde tedavinin başlatılmasına imkan vereceği kanısındayız.



SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ordu, Trabzon ve Rize işitme engelliler okullarına devam eden yatılı ve gündüzlü öğrenciler arasından, klinik muayene ve aile ağacı analizi sonucunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı 96 birey belirlendi. Çalışma grubunu oluşturan bireyler Doğu Anadolu, Doğu Karadeniz, Orta Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerinden köken almaktaydı.
2. Otozomal resesif non-sendromik işitme engelli 96 bireyin *GJB2* geninde mutasyon taraması yapıldı. Sonuç olarak, 25 bireyde homozigot ve 3 bireyde kompaund heterozigot olmak üzere toplam 28 (%29.2) bireyin her iki allelinde *GJB2* mutasyonu belirlendi. Ayrıca iki bireyde heterozigot mutasyon gözlemlendi.
3. Türk toplumunda, otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan ikisi çerçeve kaymasına (35delG, 310del14) ve biri bir amino asitlik delesyona (delE120) neden olan 3 adet delesyon, bir adet anlamsız (nonsens) (W24X) ve ilk kez tanımlanan iki adet yanlış anlamlı (missens) (P173S, Q80K) olmak üzere toplam 6 farklı *GJB2* mutasyonu belirlendi.
4. Türk toplumunda en sık görülen *GJB2* mutasyonu bir bazlık delesyon sonucu oluşan 35delG'dir. Otozomal resesif non-sendromik işitme engelli 96 bireye ait 192 allelin 43'ünde (%21.9) 35delG görülürken bu mutasyonun *GJB2* mutasyonları arasındaki rölatif sıklığı %76.8 olarak hesaplandı..

5. Otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplı bireylerde en sık karşılaşılan ikinci mutasyon; 71G→A sonucu oluşup W24X olarak adlandırılan anlamsız bir mutasyondur. Üç bireyde homozigot olarak görülen W24X toplam hastaların %3.1'ini oluştururken *GJB2* mutasyonları arasındaki rölatif sıklığı % 10.34 olarak hesaplandı.
6. Bu çalışmada görülen diğer bir *GJB2* mutasyonu 14 bazlık bir delesyon sonucu çerçeve kaymasına neden olan 310del14'dür. 310del14 toplam 192 allelin 3'ünde (%1.6) görülürken, *GJB2* mutasyonları arasındaki rölatif sıklığı %5.4 olarak hesaplandı.
7. Bu çalışmada görülen diğer bir delesyon mutasyonu ise 358-359'uncu nükleotidleri oluşturan ve glutamik asit kodlayan GAG dizisinin delesyonu sonucunda oluşan delE120'dir. delE120 96 bireyin birinde homozigot birinde heterozigot olarak görülmüştür. *GJB2* mutasyonları arasındaki rölatif sıklığı %3.6 olarak hesaplandı.
8. P173S ve Q80K mutasyonları ilk kez bu çalışmada gösterilen ve otozomal resesif non-sendromik işitme kaybına neden olan *GJB2* mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların her ikisi de 35delG ile kompaund heterozigot olarak birer ailede görülmüştür. Türk toplumunda *GJB2* mutasyonları arasındaki rölatif sıklıkları % 1.8 olarak hesaplandı.
9. Türk toplumunda otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarının %29.2'sini (28/96) *GJB2* mutasyonları oluştururken, bu mutasyonların %96'sını (54/56) dört farklı mutasyon (35delG, W24X, 310del14, delE120) teşkil etmektedir.

10. Otozomal resesif non-sendromik işitme engelli bireylerin %65'inin ve *GJB2* mutasyonu görülen bireylerin %67'sinin anne-babası arasında akrabalık görüldü.
11. Bu çalışmada *GJB2* mutasyonlarının işitme kayıpları üzerindeki önemi araştırıldığından özellikle ailesel geçiş gösteren bireyler çalışma grubuna dahil edildi. Ancak sporadik olarak görülen işitme engelli bireylerin de değerlendirmeye alınıp bu grup içinde *GJB2* mutasyonlarının belirlenmesi bu genin önemini daha net bir şekilde ortaya koyacaktır.
12. Sensorinöral işitme bozuklukları tedavi edilemediği gibi doğum öncesi tanıya da yasal olarak izin verilmemektedir. Ancak işitme kaybının ilk 6 ay gibi erken dönemde belirlenen bireyin özel eğitime tabi tutulması iletişim kurma yeteneğini önemli derecede arttırabildiği gibi bir çoğunun konuşabilmesine de imkan vermektedir. Bu nedenle bu çalışmanın da sonuçları dikkate alınarak işitme kaybindan sorumlu olduğu bilinen diğer genlerde de mutasyon taramaları yapılmalıdır.
13. İşitme kaybı ile bağlantılı olduğu gösterilen lokuslardaki genlerin belirlenmesi için işitme engelli geniş aileler belirlenmeli bu aileler üzerinden genler tanımlanmalı ve bu genlerdeki mutasyonlarda belirlenmelidir.
14. İşitme engelliler okulları ile hastanelerin KBB ve Moleküler Genetik Laboratuvarları arasında sürekli bir iletişim kurulmalı ve işitme engelliler okuluna gelen her öğrenci muhakkak bu tür bir çalışmaya dahil edilmelidir.
15. Çalışma sonuçları işitme engelli bireylerle, bu bireylerin aileleriyle, işitme engelli okullarının idareci ve öğretmenleri, ve hatta toplumla paylaşılmalıdır. Konu ile ilgili aydınlatıcı seminerler ve açıklamalar yapılarak toplum uzman kişiler tarafından bilgilendirilmeli ve yönlendirilmelidir.

16. Bu yöndeki temel amaç, verimli genetik danışmanlık vererek toplumdaki işitme engelli birey sayısını en aza indirmek ve var olan işitme engelli bireylerin de en iyi şekilde yetiştirilerek mümkün olduğunca yüksek kalitede bir hayat yaşamasını sağlamak olmalıdır.



ÖZET

Non-sendromik otozomal resesif konjenital işitme kaybının büyük bir kısmına *GJB2* (*Connexin 26*) mutasyonlarının neden olduğu bugüne kadar yapılan çeşitli toplum çalışmalarında gösterilmiştir. 35delG mutasyonu beyaz ırkta görülen en yaygın *GJB2* mutasyondur.

GJB2 mutasyonlarının Türk toplumundaki sağırılık üzerinde olan etkisini belirlemek için non-sendromik otozomal resesif konjenital işitme kayıplı ve akraba olmayan 96 hasta tarandı. 35delG mutasyonu, geliştirdiğimiz yarışmalı amplification ferfactory mutation system (C-ARMS) ile gösterildi. Diğer *GJB2* mutasyonları single strand conformation polymorphism (SSCP) ve silver sequencing analizi ile belirlendi.

Şiddetli ve derin işitme kayıplı 28 hastada altı farklı mutasyon görüldü. 35delG mutasyonu en yaygını olup mutant *GJB2* allellerinin %76.8'ini oluşturmaktaydı. Birden fazla allelde görülen W24X, 310del14 ve delE120 mutasyonlarının rölatif sıklıkları sırasıyla %10.7, % 5.4 ve %3.6 idi. Ayrıca iki bireyde 35delG ile kompaund heterozigot olarak iki yeni missense mutasyon (P173S ve Q80K) tanımlandı.

Bizim sonuçlarımız, otozomal resesif non-sendromik konjenital işitme kayıplı Türk hastalarının %29'una *GJB2* mutasyonlarının neden olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Non-sendromik işitme kaybı, *GJB2*, DFNB1, Connexin 26, 35delG

SUMMARY

DETERMINATION OF *GJB2* GENE MUTATIONS IN THE AUTOSOMAL RECESSIVE NON-SYNDROMIC HEARING LOST INDIVIDUALS WITH SSCP AND DNA SEQUENCING ANALYSIS

Mutations in *connexin 26* gene (*GJB2*) lead to significant proportion of non-syndromic autosomal recessive congenital hearing loss in all populations studied so far. The 35delG mutation is the most common *GJB2* mutation in white populations.

To determine the percentage of hearing loss attributed to *connexin 26* gene and the types of mutations in Turkish population, unrelated 96 patients with autosomal recessive non-syndromic congenital deafness were screened. The 35delG mutations were detected with competitive amplification refractory mutation system (C-ARMS) that we developed. The other *GJB2* mutations were screened with single strand conformation polymorphism (SSCP) and silver sequencing analysis.

Six different types of mutations were found in 28 of the patients with severe to profound hearing loss. Mutation 35delG was the most common, accounting for 76.8% of all *GJB2* deafness alleles. Three non-35delG mutations (W24X, 310del14 and delE120) were identified more than once with relative frequencies of 10.7%, 5.4%, and 3.6%, respectively. Two novel missense mutations (P173S and Q80K) compound heterozygous with 35delG mutation also were observed.

Our results indicate that *connexin 26* mutations are the cause in 29% of Turkish patients with autosomal recessive non-syndromic congenital hearing loss.

Key Words: Non syndromic hearing loss, *GJB2*, DFNB1, Connexin 26, 35delG

KAYNAKLAR

1. Thompson, M.W., Mcinnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Genetics in Medicine. Fifth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991, pp. 1-12.
2. Morton, N.E.: Genetic epidemiologist of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 630: 16-31, 1991
3. Parving, A., Vewton, V.: Guidelines for description of inherited hearing loss. *J. Audiol. Med.*, 4: 2-5, 1995.
4. Marazita, M.L., Ploughman, L.M., Rawlings, B., Remington, E., Arnos, K.S., Nance, W.E.: Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am. J. Med. Genet.*, 46: 486-91, 1993.
5. Van Camp, G., Smith, R.: Hereditary hearing loss homepage <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh>, last update: November 20, 2001
6. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.iro.es/deafness/> Last update 23/4/2001
7. Scott, D.A., Kraft, M.L., Carmi, R., Ramesh, A., Elbedour, K., Yairi, Y., Srisailapathy, C. R., Rosengren, S.S., Markham, A.F., Mueller, R.F., Lench, N.J., Van Camp, G., Smith, R.J., Sheffield, V.C.: Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Human Mutation*, 11 (5): 387-394, 1998.
8. Green, G.E., Scott, D.A., McDonald, J.M., Woodworth, G.G., Sheffield, V.C., & Smith, R.J.: Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Journal of the American Medical Association*, 281(23): 2211-2216, 1999.
9. Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M.A., Wilcox, S.A., Lench, N.J., Allen-Powell, D.R., Osborn, A.H., Dahl, H.H., Middleton, A., Houseman, M.J., Dode, C., Marlin, S., et al.: Prelingual deafness: High prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, 6 (12): 2173-2177, 1997.

10. Cohn, E.S., Kelley, P.M., Fowler, T.W., Gorga, M.P., Lefkowitz, D.M., Kuehn, H.J., Schaefer, G.B., Gobar, L.S., Hahn, F.J., Harris, D.J., & Kimberling, W.J.: Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics*, 103 (3): 546-550, 1999.
11. Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Mila, M., Monica, M.D., Lutfi, J., et al.: Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.*, 6 (9):1605-1609, 1997.
12. Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S. et al.: Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*, 351: 394-398, 1998.
13. Guilford, P., Ben Arab, S., Blanchard, S., Levilliers, J., Weissenbach, J., Belkahia, A., & Petit, C.: A non-syndromic form of neurosensory recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics*, 6 (1): 24-28, 1994.
14. Thompson, M.W., Mcinnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Genetics in Medicine. Fifth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991, pp. 115-141.
15. Gelehrter, T.D., Collins, F.S., Ginsburg, D.: Principles of Medical Genetics. Second edition, Williams&Wilkins Awaverly Company, Baltimore, 1998, pp. 1-8.
16. Thompson, M.W., Mcinnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Genetics in Medicine. Fifth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991, pp. 53-59.
17. Connor, J.M. Ferguson-smith, M.A.: Essential Medical Genetics. Fourth Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993, pp.75-81.
18. Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D.: Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Sevent edition. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle.: New York, Mc Graw-Hill Co., 1995, pp. 53-118.
19. Cooper, D.N., Krawczak, M., Antonarakis, S.E.: The Nature and Mechanisms of Human Gene Mutation In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Sevent edition. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. New York, Mc Graw-Hill Co., 1995, pp. 259-292.

20. Nollau, P., Wagener, C.: Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical chemistry*, 43 (7): 1114-1128, 1997
21. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., and Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
22. Erlich, H.A.: PCR technology, Principles and applications for DNA amplification: New York, W. H. Freeman and Company, 1992, pp. 17-23.
23. Kolmodin, L.A., Williams, J.F.: Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practices In The Nucleic Acid Protocols Handbook. Rapley, R. (Eds.) Totowa, New Jersey, Human Press Inc., 2000, pp.569-580.
24. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-9, 1989.
25. Saker, P.J.: Mutation Screening Using PCR-SSCP: Silver Staining and Isotopic Protocols. In The Nucleic Acid Protocols Handbook. Rapley R (Ed.), Totowa, New Jersey, Human Press Inc., 2000, pp. 695-703.
26. Humphries, S.E., Gudnason, V., Whittall, R., Ian, A.M.: Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry*, 43 (3): 427-453, 1997.
27. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E. et al. Analysis of any point mutation in DNA. Amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17:2503-2516, 1989
28. Tan, K.L., Tan, J.A.M.A., Wong, Y.C., Wee, Y.C., Thong, M.K., and Yap, S.F.: Combine-ARMS: A rapid and cost-effective protocol for molecular characterization of (β -Thalassemia in Malaysia. *Genetic Testing*, 5 (1): 17-22, 2001.
29. Glik, B.R., Pasternak, J.J.: Molecular Biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. ASM Press, Washington, 1994, pp.55-82.
30. Weaver, R.F., Hedrick, P. W.: Genetics, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1989, pp. 439-470.
31. Technical Manual: Silver Sequence TMDNA sequencing System Promega Corporation, Q4100, USA.

32. Willems, P. J.: Genetic cause of hearing loss. *The New England Journal of Medicine*, 342 (15): 1101-1109, 2000.
33. Çakır, N.: ;Otolaringoloji, Baş Boyun Cerrahisi. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1999, s. 12-16.
34. Carola, R., Harley, J.P., Noback, C.R.: Human Anatomy and Physiology. Second edition, McGRAW-HILL Inc., New York, 1992, pp. 462-513.
35. Guyotot, A C., Hall, J E.: Textbook of Medical Physiology W. B. Saunders Company, 9 th Edition ,1969 ,pp .66-376.
36. Tekin, M., Arnos, K.S., Pandya, A.: Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358: 1082-1090, 2001.
37. Lim, D.J., Kalinec, F.: Cell and molecular bases of hearing. *Kidney Int.*, 65 (suppl): 104-113. 1998.
38. Coucke, P.J., Van Hauwe, P., Kelley, P.M., et al.: Mutation in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in for DFNA2 families. *Hum. Mol. Genet*, 8 : 1321-28, 1999.
39. Markin, V.S., Hudspeth, A.J.: Gating-spring models of mechanoelectrical transduction by hair cells of the internal ear. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 24: 59-83, 1995.
40. Hudspeth, A.J.: How the ear's works work. *Nature*, 341: 397-404, 1989.
41. Nobil, R., Mammona, F., Ashmore, J.: How well do we understand the cochlea? *Trends Neurosci*, 12:159-67, 1998.
42. Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., et al.: KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet*, 17: 267-68, 1997.
43. Sneyrout, N., Tesson, F., Denjoy, I., et al.: A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet*, 15:186-89, 1997.
44. Derekoy, F.S.: Etiology of deafness in Afyon school for the deaf in Turkey. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*, 29; 55 (2): 125-31, 2000.
45. Gorlin, R.J., Toriella, H.3V., Cohen, M. M.: Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford monographs on medical genetics.: Oxford University Press, New York, 1995, pp. 337-9.

46. Bronya, J.B.K., Charles, I.B.: Genomics and hearing impairment. *Genom Reserch*, 9 (Issue1): 7-16, 1999.
47. Çakır, N.: Otolaringoloji: Baş boyun cerrahisi. İkinci baskı, Nobel tıp kitap evi, İstanbul, 1999, s. 96-101.
48. Davis, A., Parving, A.: Toward appropriate epidemiology data on childhood hearing disability: a comparative European study of birth-cohorts 1982-1988. *J. Audio.l Med.*, 3: 35-47, 1994.
49. Fraser, G.R.: The causes of profound deafness in childhood.: Jhons Hopkins University press, Baltimores, 1976.
50. Carrasquillo, M. M., Zlotogora, J., Barges, S., and Chakravarti, A.,: Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implication for genetic studies in isolated population. *Hum. Mol. Genet*, 6 (12): 2163-2172, 1997.
51. Apaydin, F., Pfister, M., Iber, M., Kandogan, T., Leal, S.M., Brandle, U., Cura, O., Zenner, H. P.: Hereditary deafness in Turkey. Initial results. *HNO*, 46 (9): 809-14, 1998.
52. Petit, C.: Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat. Gene.*, 14: 385-91, 1996.
53. Davis, A.C.: The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int. J. Epidemiol.*, 18: 911-7, 1989.
54. Resenders, B. L., Williamson, R. E., Morton, C. C.: At he speed of sound: Gene discovery in the auditory system. *Am. J. Hum. Genet.*, 69: 923-935, 2001.
55. Karen, P.S.: Science, medicine, and the future. *BMJ*, 320: 622-625, 2000.
56. Scot, D.A., Carmi, R., Elbedour, K., Duyk, G.M., Stone, E.M., Sheffield, V. C. : Non-syndromic autosomal recessive deafness is linked to the DFNB1 locus in a large inbred Bedouin family from israil. *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 965-968, 1995.
57. Brown, K.A., Janjua, A.H., Karbani, G., Parry, G., Noble, A., Crockford, G., Bishop, D.T., Newton, V.E., Markham, A.F., Mueller, R.F.: Linkage studies of non-syndromic recessive deafness (NSRD) in a family originating from the Mirpur region of Pakistan maps DFNB1 centromeric to D13S175. *Hum Mol Genet.*, 5: 169-73, 1996.
58. Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens. H.P. et al.: Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387: 80-83, 1997.

59. Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/GJB2> (MIM 121011)
60. Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabedian, E.N., Petit, C.: Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counseling. *Lancet*, 17; 353 (9161): 1298-303, 1999.
61. Kitamura, K., Steel, K.P.: Genetics in Otorhinolaryngology. *Adv. Otorhinolaryngology*, 56: 116-123, 2000.
62. Pitts, J.D.: The discovery of metabolic co-operation. *Bioessay*, 20: 1047-1051, 1998.
63. McGuirt, W.T., Smith, R.J.: Connexin 26 as a cause of hereditary hearing loss. *Am. J. of Audiol.*, 8 (2): 93-100, 1999.
64. Choudhry, R., Pitts, J.D., Hodgins, M.B.: Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexin distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryonic development. *Dev. Dyn.*, 210: 417-430, 1997.
65. Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L., Adams, J.C.: Gap junction in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.*, 191: 101-118, 1995.
66. Prasad, S., Cucci, R.A., Green, G.E., Smith, R.J.: Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum. Mutat.*, 16 (6): 502-8, 2000.
67. Murgia, A., Orzan, E., Polli, R., Martella, M., Vinanzi, C., Leonardi, E., Arslan, E., Zacchello, F.: Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J. Med. Genet.*, 36 (11): 829-32, 1999.
68. Rabionet, R., Zelante, L., López-Bigas, N., D'Agruma, L., Melchionda, S., Restagno, G., Arbonés, M.L., Gasparini, P., Estivill, X.: Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum. Genet.*, 106 (1): 40-44, 2000.
69. Sobe, T., Vreugde, S., Shahin, H., Berlin, M., Davis, N., Kanaan, M., Yaron, Y., Orr-Urtreger, A., Frydman, M., Shohat, M., Avraham, K.B.: The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum. Genet.*, 106 (1): 50-7, 2000.

70. Loffler, J., Nekahm, D., Hirst-Stadlmann, A., Gunther, B., Menzel, H.J., Utermann, G., Janecke, A.R.: Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur. J. Hum. Genet.*, 9 (3): 226-30, 2001.
71. Kelley, P.M., Harris, D.J., Comer, B.C., Askew, J.W., Fowler, T., Smith, S.D., Kimberling, W.J.: Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 62.(4): 792-9 1998.
72. Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P.M., Kimberling, W.J.: Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J. Med. Genet.*, 37 (1): 41-3, 2000.
73. Wilcox, S.A., Osborn, A.H., Allen-Powell, D.R., Maw, M.A., Dahl, H.H., Gardner, R.J.: Connexin26 deafness in several interconnected families. *J. Med. Genet.*, 36 (5): 383-5, 1999.
74. Kudo, T., Ikeda, K., Kure, S., Matsubara, Y., Oshima, T., Watanabe, K., Kawase, T., Narisawa, K., Takasaka, T.: Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am. J. Med. Genet.*, 17; 90 (2): 141-5, 2000.
75. Fuse, Y., Doi, K., Hasegawa, T., Sugii, A., Hibino, H., Kubo, T.: Three novel Connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport*, 10 (9):1853-7, 1999.
76. Hamelmann, C., Amedofu, G.K., Albrecht, K., Muntau, B., Gelhaus, A., Brobby, G.W., Horstmann, R.D.: Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum. Mutat.*, 18 (1): 84-5, 2001.
77. Park, H.J., Hahn, S.H., Chun, Y.M., Park, K., Kim, H.N.: Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 110 (9):1535-8, 2000.
78. Mueller, R.F., Nehammer, A., Middleton, A., Houseman, M., Taylor, G.R., Bitner-Glindzicz, M., Van Camp, G., Parker, M., Young, I.D., Davis, A., Newton, V.E., Lench, N.J.: Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*, 50 (1): 3-13, 1999.
79. Brobby, G.W., Muller-Myhsok, B., Horstmann, R.D.: Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl. J. Med.*, 338 (8): 548-50, 1998.

80. Wilcox, S.A., Saunders, K., Osborn, A.H., Arnold, A., Wunderlich, J., Kelly, T., Collins, V., Wilcox, L.J., McKinlay, Gardner, R.J., Kamarinos, M., Cone-Wesson, B., Williamson, R., Dahl, H.H.: High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet.*, 106(4):399-405, 2000.
81. Rouan, F., White, T.W., Brown, N., Taylor, A.M., Lucke, T.W., Paul, D.L., Munro, C.S., Uitto, J., Hodgins, M.B., Richard, G.: Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci.*, 114 (11):2105-13, 2001.
82. Denoyelle, F., Lina-Granade, G., Plauchu, H., Bruzzone, R., Chaib, H., Levi-Acobas, F., Weil, D., Petit, C.: Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature*, 393 (6683):319-20, 1998.
83. Morle, L., Bozon, M., Alloisio, N., Latour, P., Vandenberghe, A., Plauchu, H., Collet, L., Edery, P., Godet, J., Lina-Granade, G.A: Novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J Med Genet.*, 37(5):368-70, 2000.
84. Lerer, I., Sagi, M., Malamud, E., Levi, H., Raas-Rothschild, A., Abeliovich, D.: Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am. J Med Genet.*, 95:53-56, 2000.
85. David, P., Kelsell, Wei-Li, Di., and Mark, J. H.: Connexin Mutations in skin Disease and Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 68:559-568, 2000.
86. Heathcote, K., Syrris, P., Carter, N.D., Patton, M.A.: A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis. *J Med Genet.*, 37(1):50-1, 2000.
87. Maestrini, E., Korge, B.P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P., Munro, C.S.: A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet.*, 8(7):1237-43, 1999.
88. Richard, G., White, T.W., Smith, L.E., Bailey, R.A., Compton, J.G., Paul, D.L., Bale, S.J.: Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet.*, 103(4):393-9, 1998.

89. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acides Research*, 16 (3): p. 1215, 1988.
90. Heptinstall, J., Rapley, R.: Spectrophotometric Analysis of Nucleic acids. In *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Rapley, R. (Ed.), Totowa, New Jersey, Human Press Inc., 2000, pp. 57-60
91. Slatko, B. E., And Albrigth, M.: Denaturing gel electrophoresis for sequencing. In *current protocols in molecular biology, comprehensive protocols for sequencing gels* (ed. F.M.Ausubel et al.), Greene Publishing Associates and Jhon Wiley and Sons, New York, 1993, pp. 7.6.1-7.6.13.
92. Technical Manual: Wizard PCR Preps DNA Purification System. Promega Corporation, A7170, USA.
93. Resendes, B.L., Williamson, R.E., and Morton, C.C. At the Speed of Sound: Gene Discovery in the Auditory System. *Am J. Hum Genet.*, 69: 923-935, 2001.
94. Baki, A., Karagüzel, A., Beşer, E., Çakmakçı, T., Uçar, F., Ömeroğlu, A., Consanguineous marriages in the Province of Trabzon. *East African Medical Journal*. 69: 2.94-96, 1992.
95. Kupka, S., Mirghomizadeh, F., Haug, T., Braun, S., Leistenschneider, P., Schmitz-Salue, C., Arold, R., Blin, N., Zenner, H.P., Pfister, M. *HNO*, 48(9):671-4, 2000.
96. Rabionet R, Estivill X.. Allele specific oligonucleotide analysis of the common deafness mutation 35delG in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet.*, 36(3):260-1, 1999,
97. Dong, J., Katz, D.R., Eng, C.M., Kornreich, R., and Desnick, R.J. Nonradioactive Detection of the Common *Connexin* 26 167delT and 35delG Mutations and Frequencies among Ashkenazi Jews. *Molecular Genetics and Metabolism*. 73, 160–163, 2001,
98. Pasternak J.J.: An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases. Fitzgerald Science Press, Inc. USA. 1999, pp.205-228.
99. Tekin, M., Akar, N., Cin, S., Blanton, SH., Xia, XJ., Liu, XZ., Nance, WE., Pandya, A. Connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet*. 108:385-389, 2001.

100. Barış, İ., Kılınç, M.O., Tolun, A. Frequency of the 35delG mutations in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impairment patients. *Clin Genet.* 60: 452-455,2001.
101. Kudo, T., Ikeda, K., Qshima, T., Kure, S., Tammasaeng, M., Parasansuk. S., Matsubara, Y. GJB2 (Connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. *Otology & Neurotology.* 22:858-8, 2001.
102. Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, J.L., Goforth, L., Frederich K., Fisher, R., Camp, G.V., Berlin, C.I., Oddoux, C., Ostrer, H., Keats, B., Friadman, T.B. Mutation in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *The New Eng. J Med.*, 19:1500-1505, 1998.

