

**T.C  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**DENİZLİ VE ÇEVRESİNDE KONJENİTAL  
NON-SENDROMİK İŞİTME KAYBI OLAN OLGULARDA  
GJB2 (KONNEXİN 26) VE GJB6 (KONNEXİN 30) GENLERİNİN  
MUTASYON ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. BİLGE SARIKEPE**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. C. NUR SEMERCİ GÜNDÜZ**

**DENİZLİ - 2017**

**T.C  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**DENİZLİ VE ÇEVRESİNDE KONJENİTAL  
NON-SENDROMİK İŞİTME KAYBI OLAN OLGULARDA  
GJB2 (KONNEXİN 26) VE GJB6 (KONNEXİN 30) GENLERİNİN  
MUTASYON ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. BİLGE SARIKEPE**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. C. NUR SEMERCİ GÜNDÜZ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 27/04/2016 tarih ve  
2016TIPF009 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ - 2017**

Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ danışmanlığında Dr. BİLGE SARIKEPE tarafından yapılan “Denizli ve Çevresinde Konjenital Non-Sendromik İşitme Kaybı Olan Olgularda GJB2 (Konnexin 26) ve GJB6 (Konnexin 30) Genlerinin Mutasyon Analizi” başlıklı tez çalışması 21/07/2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

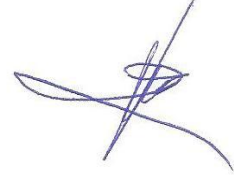
BAŞKAN

Prof. Dr. Sükeren Bağcı



ÜYE

Prof. Dr. Gökyaz Balcı



ÜYE

Prof. Dr. C. Nur Semerci Gündüz



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım. 1.8.2017



Doç. Dr. Şahika Pinar AKYER

Prof. Dr. ....

Dekan Yardımcısı

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgilerini, yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ'e; tecrübeleri, hoşgörüleri ve destekleri ile her zaman yanımda olan hocalarım Prof. Dr. Gülseren BAĞCI, Prof. Dr. Füsun DÜZCAN, Doç. Dr. Emre Tepeli, Doç. Dr. Vildan CANER'e; desteğini her zaman hissettiğim ilk danışman hocam Yrd. Doç. Dr. G. Ozan etin'e; Uz. Dr. Selcan ZEYBEK'e; tez çalışmalarındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Necdet Fazıl ARDIÇ, Yrd. Doç. Dr. Funda TÜMKAYA ve tüm KBB çalışanlarına; istatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı Hande ŐENOL'a; Şekil ve grafiklerdeki desteğinden dolayı Öğr. Gör. Gülderen ÇAVUŐ'a; asistanlık eğitimim sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve çalışma arkadaşlarıma; emekleri, maddi ve manevi fedakarlıkları için aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET .....	XI
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIII
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KULAĞIN ANATOMİSİ.....	3
Dış Kulak.....	3
Orta Kulak.....	4
İç Kulak.....	4
İŞİTMENİN FİZYOLOJİSİ .....	6
İŞİTME KAYBI.....	8
Genetik Faktörlere Bağlı İşitme Kayıpları.....	9
Non-Sendromik İşitme Kaybı.....	12
<i>Non-Sendromik İşitme Kaybından Sorumlu Genler.....</i>	<i>12</i>
GAP JUNCTION GENLERİ.....	15
GJB3 (Gap Junction Protein, Beta-3) Geni.....	16
GJB2 (Gap Junction Protein, Beta-2) Geni.....	16
GJB6 (Gap Junction Protein, Beta-6) Geni .....	19
<i>Digenik Kalıtım.....</i>	<i>19</i>

<b>GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>21</b>
<b>Çalışma Grubu.....</b>	<b>21</b>
<b>Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....</b>	<b>23</b>
<b>İzole Edilen DNA'ların Saflık Değerlerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>23</b>
<b>Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....</b>	<b>24</b>
<b>Agaroz Jel Elektroforez.....</b>	<b>26</b>
<b>PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu (Saflaştırılması).....</b>	<b>26</b>
<b>Sekans Reaksiyonunun Hazırlanması.....</b>	<b>27</b>
<b>İstatiksel Analiz .....</b>	<b>29</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
<b>GJB2 ve GJB6 Genlerinin Moleküler Analizi .....</b>	<b>32</b>
<i>PZR Sonuçları.....</i>	<b>32</b>
<i>Ürünlerin Dizi Analizi.....</i>	<b>34</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ACMG</b>	American College of Medical Genetics
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>CL</b>	Sitoplazmik loop
<b>cm</b>	Santimetre
<b>CNV</b>	Copy number variation (kopya numara sayısı değişimi)
<b>Cx</b>	Konneksin
<b>dB</b>	Desibel
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotit trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetikasit
<b>EL1</b>	Ekstrasellüler loop domaini-1
<b>ExAC</b>	The Exome Aggregation Consortium
<b>g</b>	Gravity
<b>GJB2</b>	Gap Junction Beta-2
<b>GJB6</b>	Gap Junction Beta-6
<b>gr</b>	Gram
<b>Hz</b>	Hertz
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>ml</b>	Mililitre
<b>Mb</b>	Megabaz

<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mV</b>	Milivolt
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NSİK</b>	Non-sendromik işitme kaybı
<b>PGT</b>	Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PolyPhen-2</b>	Polymorphism Phenotyping v2
<b>RP</b>	Retinitis pigmentosa
<b>rRNA</b>	Ribozomal ribonükleik asit
<b>rpm</b>	Revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
<b>SIFT</b>	Sorting Tolerant From Intolerant
<b>sn</b>	Saniye
<b>SNP</b>	Single (tek) nükleotid polimorfizm
<b>TAE</b>	Tris-asetat-EDTA
<b>Tm</b>	Melting temperature (erime sıcaklığı)
<b>TM1</b>	Transmembran domain-1
<b>wt</b>	Wild type (yabanıl tip)



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Şekil 1</b> Kulağın anatomik yapıları.....	3
<b>Şekil 2</b> Kohlea kesiti, içerdiği yapılar ve Korti organının yerleşimi.....	6
<b>Şekil 3</b> Kohlear K <sup>+</sup> döngüsü .....	7
<b>Şekil 4</b> Konneksinin yapısı ve bölgeleri, konneksin ve gap junction kanal yapısı .....	15
<b>Şekil 5</b> <i>GJB2</i> geni kodlayıcı eksonu ve kullanılan primerler.....	24
<b>Şekil 6</b> <i>GJB6</i> geni kodlayıcı eksonu ve kullanılan primerler.....	24
<b>Şekil 7</b> <i>GJB2</i> geni 1.bölgesine ait PCR ürününün (461bç) jel görüntüsü... 32	32
<b>Şekil 8</b> <i>GJB2</i> geni 2.bölgesine ait PZR ürününün (565 bç) jel görüntüsü... 33	33
<b>Şekil 9</b> <i>GJB6</i> geni 1.bölgesine ait PZR ürününün (535 bç) jel görüntüsü... 33	33
<b>Şekil 10</b> <i>GJB6</i> geni 2.bölgesine ait PZR ürününün (571 bç) jel görüntüsü... 34	34
<b>Şekil 11</b> H7'de saptanan <i>GJB2</i> geni homozigot c.35delG mutasyonu..... 36	36
<b>Şekil 12</b> H18'de saptanan <i>GJB2</i> geni heterozigot c.35delG mutasyonu..... 36	36
<b>Şekil 13</b> H27'de saptanan <i>GJB6</i> geni c.666A>G heterozigot değişimi..... 37	37
<b>Şekil 14</b> H1'de saptanan <i>GJB2</i> geni c.269T>C heterozigot değişimi..... 37	37
<b>Şekil 15</b> H31'de saptanan <i>GJB2</i> geni heterozigot c.457G>A değişimi (Reverse dizi)..... 38	38
<b>Şekil 16</b> H2'de saptanan <i>GJB2</i> geni heterozigot c.511G>A değişimi (Reverse dizi)..... 38	38
<b>Şekil 17</b> H34'te saptanan <i>GJB2</i> geni heterozigot c.167delT değişimi (Reverse dizi)..... 39	39

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> Sensorinöral işitme kaybı nedenleri.....	8
<b>Tablo 2</b> Odyolojik özelliklerine göre işitme kaybı dereceleri.....	9
<b>Tablo 3</b> Herediter işitme kayıplarında belirlenmiş gen sayıları.....	10
<b>Tablo 4</b> Non-sendromik işitme kaybında bilinen gen ve lokus sayıları.....	12
<b>Tablo 5</b> Non-sendromik işitme kaybından sorumlu bazı genler ve özellikleri	13
<b>Tablo 6</b> Çalışmaya dahil olma ve dışlama kriterleri.....	22
<b>Tablo 7</b> Primerlerin özellikleri.....	25
<b>Tablo 8</b> PZR karışım içeriği.....	25
<b>Tablo 9</b> PZR reaksiyon basamakları.....	26
<b>Tablo 10</b> Sekans PZR karışım içeriği.....	27
<b>Tablo 11</b> Sekans PZR reaksiyon basamakları.....	28
<b>Tablo 12</b> Stop solüsyon içeriği.....	28
<b>Tablo 13</b> Hastalara ait bilgiler.....	30
<b>Tablo 14</b> Hastalara ait DNA örneklerinin spektrofotometri ölçümleri.....	31
<b>Tablo 15</b> Hastaların GJB2 ve GJB6 gen mutasyon analiz sonuçları.....	34
<b>Tablo 16</b> Saptanan genotipler ve olgu sayısı.....	39
<b>Tablo 17</b> Saptanan değişimler ve allel frekansları.....	39

## ÖZET

### Denizli ve çevresinde konjenital non-sendromik işitme kaybı olan olgularda GJB2 (konnexin 26) ve GJB6 (konnexin 30) genlerinin mutasyon analizi

Dr. Bilge SARIKEPE

İşitme kaybı, en sık görülen duyuşal bozukluk olup çeşitli özelliklerine göre sensorinöral/iletim tipi, unilateral/bilateral, prelingual/postlingual olarak sınıflandırılmaktadır. Etiyolojisinde çevresel ve genetik nedenler rol oynamaktadır. Genetik nedenlerle oluşan işitme kayıpları başka sistemik bulgularla birlikte ise sendromik, tek başına bulunuyor ise non-sendromik olarak kabul edilmektedir. Gap junction genlerindeki mutasyonlar non-sendromik işitme kayıplarının önemli bir kısmına neden olmaktadır. Bu gruba ait *GJB2* genindeki mutasyonlar, çeşitli toplumlarda non-sendromik işitme kayıplarının yaklaşık yarısını oluşturabilmektedir. İç kulakta benzer şekilde eksprese olan ve digenik kalıtım özelliği de gösterebilen diğer bir gap junction geni *GJB6*'dır. *GJB2* ve *GJB6* genleri sıklıkla otozomal resesif tipte işitme kaybı ile ilişkili olmakla beraber otozomal dominant kalıtmı mutasyonları da tanımlanmıştır. Avrupa ülkelerinde ve ülkemizde en sık saptanan *GJB2* mutasyonu 35delG'dir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda saptanan diğer *GJB2* mutasyonları; W24X, delE120, 233delG, Q80R, 310del14, 167delT, P184R, 236-239delTGCAinsAGATCCG, L90P, R127H, Q80K'dır. *GJB6* ile ilgili olarak ise ülkemizde dizi analizi ile yapılan tek bir çalışma mevcut olup herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda non-sendromik bilateral sensorinöral işitme kaybı olan 36 hastada *GJB2* ve *GJB6* genlerinin kodlayıcı eksonları ve ekson-intron bileşkeleri Sanger sekans ile analiz edilmiştir. *GJB2* geninde; en sık saptanan mutasyon olan 35delG için allel frekansı %16,6 (12/72) olarak saptanmış ve biallelik 35delG mutasyonu oranı %11,1 (4/36) olarak bulunmuştur. *GJB2* geninde saptanan diğer patojenik değişimler olan 167delT, p.Leu90Pro için allel frekansı 1/72 (%1,38)'dir. *GJB2* genine ait patojenitesi tartışmalı olan p.Val153Ile, p.Ala171Thr değişimleri ve *GJB6* genine ait p.Ser222= değişimleri için allel frekansı 1/72 (%1,38)'dir. Sonuçlar; *GJB2* mutasyonlarının bölgemizde işitme kaybının önemli bir sebebi olduğunu ve ülkemizde yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildiğini

göstermiştir. İşitme kaybı için daha fazla olgu ile daha fazla gene yönelik çalışmalar hem etiolojinin aydınlatılması hem de genetik danışmanlık için yararlı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** işitme kaybı, gap junction, GJB2, GJB6, konneksin

## SUMMARY

### **Mutation analysis of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) genes in patients with congenital non-syndromic hearing loss around Denizli**

Dr. Bilge SARIKEPE

Hearing loss is the most common sensory disorder and is classified as sensorineural/conduction type, unilateral/bilateral, prelingual/postlingual according to its various characteristics. Environmental and genetic factors play roles in its aetiology. Hearing loss caused by genetic causes is described as syndromic if it is with other systemic findings and non-syndromic if it presents alone. Mutations in the gap junction genes cause a significant part of non-syndromic hearing loss. Mutations in the GJB2 gene which is a member of this family may leads to approximately half of non-syndromic hearing loss in various human populations. Another gap junction gene that shows similar expression patterns in the inner ear and can exhibit digenic inheritance is GJB6. The GJB2 and GJB6 genes are often associated with autosomal recessive type of hearing loss, and autosomal dominant inherited mutations are also described. The most common GJB2 mutation in European countries and in our country is 35delG. Other GJB2 mutations that are detected in the studies in our country are W24X, delE120, 233delG, Q80R, 310del14, 167delT, P184R, 236-239delTGCAinsAGATCCG, L90P, R127H, Q80K. There is only one study performed with Sanger sequencing in our country about GJB6 but any mutation was detected. In our study; the coding exons and exon-intron boundaries of GJB2 and GJB6 genes were analyzed by Sanger sequence in 36 patients with non-syndromic bilateral sensorineural hearing loss. Allele frequency for 35delG which is the most frequent mutation in the GJB2 gene was 16.6% (12/72) and the rate of biallelic 35delG mutation rate was found to be 11.1% (4/36). Allele frequency for the other pathological variants detected in GJB2 gene, 167delT and p.Leu90Pro is 1.38% (1/72). The allele frequency of p.Val153Ile, p.Ala171Thr variants in GJB2 gene and p.Ser222= variant in GJB6 gene whose pathogenicity is unclear is 1.38% (1/72). Results showed that GJB2 mutations are an important cause of hearing loss in our region and that similar results have been obtained with studies performed in our country. Further studies with large number cases including

more genes associated with hearing loss are required for both the identification of aetiology and for genetic counselling.

**Keywords:** hearing loss, gap junction, GJB2, GJB6, connexin

## GİRİŞ

İşitme duyusu; ortamda yayılan ses dalgalarının dış kulak aracılığıyla toplanıp orta kulağa aktarımı ve iç kulakta oluşturduğu elektriksel potansiyelin işitme korteksine iletimi ile meydana gelir. İşitme duyusunun; uyarıların algılanması, konuşma ve anlamaya ilişkili olması nedeniyle bireyin bilişsel ve sosyal becerilerinin gelişiminde oldukça önemli bir yeri vardır.

İnsanlardaki en sık duyuşal bozukluk olan işitme kaybı yaklaşık 500 doğumda bir sıklıkta görülür ve prevalansı yaşla beraber artar. İşitme kaybı çeşitli özelliklerine göre sensorinöral veya iletim tipi; unilateral veya bilateral; prelingual veya postlingual olarak sınıflandırılmaktadır (1-3).

Etiyolojisinde ototoksik ilaçlar, perinatal komplikasyonlar, menenjit, travma, konjenital enfeksiyonlar (toksoplazma, rubella, sitomegalovirüs) gibi çevresel nedenler ile genetik nedenler bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde prelingual işitme kayıplarının üçte ikisinin genetik nedenli olduğu düşünülmektedir. Genetik nedenli olanlar ise sendromik (%30) ve non-sendromik (%70) olarak ayrılır (1, 4). İşitme kaybının eşlik ettiği bazı sendromlar; Pendred sendromu, Brakio-Oto-Renal (BOR) sendromu, Usher sendromu, Waardenburg sendromu, Alport sendromu, Jervell ve Lange-Nielsen sendromlarıdır (5).

Non-sendromik işitme kayıplı (NSİK) olguların %80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %1'den az bir kısmı da X'e bağılı veya mitokondriyal kalıtım gösterir (1). Non-sendromik işitme kaybından sorumlu olan 100'den fazla gen, 1000'den fazla mutasyon ve 160'tan fazla gen lokusu tespit edilmiştir. Bu lokuslar DFN (DeafNess) olarak adlandırılır. DFNA, otozomal dominant lokusları; DFNB otozomal resesif lokusları; DFN X'e bağılı lokusları temsil eder. *GJB2* geni DFNA3A ve DFNB1A lokusunda; *GJB6* geni ise DFNA3B ve DFNB1A lokusunda yerleşmiş olup konneksini kodlamaktadır (6). Konneksin hücreler arası küçük molekül geçişini sağlayan gap junction yapısının temel birimidir (7). *GJB2* ve *GJB6* genlerindeki mutasyonlar sonucu kohlear potasyum döngüsü bozulur ve işitme kaybı ortaya çıkar (8).

*GJB2* geni 13q12.11 bölgesinde bulunur ve 226 amino asitlik konneksin 26 proteinini kodlar (9). Bu gen ile ilgili HGMD veri tabanına göre 300'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (10). DFNB1 lokusundaki mutasyonlar çeşitli toplumlardaki otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarının %50'sinden fazlasını

oluşturabilmektedir (11). İşitme kayıplı hastalardaki biallelik *GJB2* mutasyonları ortalama olarak %17,3'tür. Mutasyonlar toplumlar arası farklılık göstermektedir. Avrupa ve Orta Doğu'da 35delG en sık görülen mutasyondur (12). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da *GJB2* geninde en sık 35delG mutasyonu saptanmıştır. Saptanan diğer mutasyonlar W24X, DelE120, 233delG, Q80R, 310del14, c.167delT, P184R, 236-239delTGCAinsAGATCCG, L90P, R127H, Q80K olarak bildirilmiştir (13-20). DFNA3A lokusundaki mutasyonlar ise otozomal dominant tip işitme kaybıyla ilişkilidir. İlk kez Chaib ve ark. (21) tarafından Fransız bir ailede gösterilmiştir. Daha sonra Piazza ve ark. (22), bir Türk ailede yeni bir mutasyon olan R75Q'yu tanımlamışlardır.

*GJB6* geni 13q12.11 bölgesinde bulunur ve 261 amino asitlik konneksin 30 proteinini kodlar (9). Konneksin 26 ile %76 benzerlik gösterir (23). Grifa ve ark. (23) tarafından; İtalyan bir ailede *GJB6* (DFNA3) geninde otozomal dominant kalıtım örneği gösteren mutasyon tanımlanmıştır. Ülkemizde işitme kaybı ile ilişkili *GJB6* genine yönelik tüm gen analizi sadece Tekin ve ark. (17) tarafından yapılmış tek bir çalışma mevcut olup bu çalışmada mutasyon saptanmamıştır. Bazı toplumlarda DFNB1 lokusunda bulunan *GJB6*'ya yakın büyük delesyonların işitme kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu delesyonların; *GJB2* ile birlikte otozomal resesif ve digenik kalıtım gösterdiği saptanmıştır. En sık görülenleri del(GJB6-D13S1830) ve del(GJB6-D13S1854) değişimleridir (1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda; mutasyona özgü analizlerde del(GJB6-D13S1830) saptanmamıştır (14, 15, 17, 24). Bilindiği kadarıyla del(GJB6-D13S1854) ile ilgili çalışma yapılmamıştır.

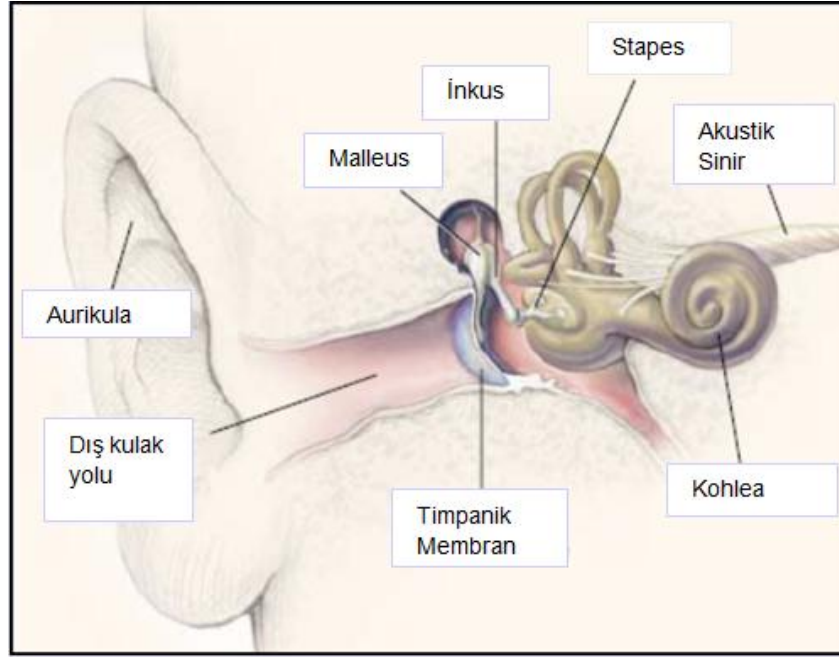
Çalışmamızda; Denizli ve çevresindeki non-sendromik konjenital bilateral sensorinöral işitme kaybı olan olgularda *GJB2* ve *GJB6* genlerindeki mutasyon sıklığı ve mutasyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Moleküler etiyojinin belirlenmesi; ailelere doğru genetik danışma verilebilmesini; hastalarda takip, alınabilecek önlemler ve rehabilitasyonda yol gösterici verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Bu sonuçlar; ülkemizde yapılmış diğer çalışmalara katkısının dışında ilerde yapılması hedeflenen daha detaylı çalışmalar için ilk basamağı oluşturacaktır.



## GENEL BİLGİLER

### KULAĞIN ANATOMİSİ

Kulak, kafatasının her iki yanında bulunan temporal kemiğe yerleşmiştir. Anatomik olarak dış kulak, orta kulak, iç kulak olarak üç bölgeden oluşan karmaşık bir yapıdır. Dış kulak; aurikula (kulak kepçesi) ve dış kulak kanalından; orta kulak üç küçük kemikçikten; iç kulak ise kohlea ve labirenter sistemden meydana gelir (25, 26). Şekil 1'de kulağın anatomik yapıları gösterilmiştir.



**Şekil 1:** Kulağın anatomik yapıları. Willems ve ark. (2000)'dan değiştirilerek alınmıştır (27). Timpanik membrana kadar olan kısım dış kulak; malleus, inkus ve stapes kemikçiklerinin bulunduğu boşluk orta kulak; kohlea ve vestibüler sistemin bulunduğu kısım ise iç kulağı oluşturur.

### Dış Kulak

Kafanın her iki yanında açılı biçimde bulunan, konkav ve konveks alanlar içeren, deri ve perikondriumla sarılmış üzerinde fibroelastik kıkırdaktan oluşan yapıya aurikula (kulak kepçesi) denir. Aurikula ses dalgalarını dış kulak yolu aracılığıyla kulak zarına iletir (26).

Dış kulak yolu erişkinde ortalama 25 mm uzunluğunda, 7-8 mm çapındadır. Şekli ve çapı değişken olan kanal, konkal kıkırdak ile timpanik membran arasında

anteroinferior yönde 'S' şeklinde ilerler. Dış 1/3'lük kısmı kıkırdak ile, iç 2/3'lük kısmı kemik yapı ile sarıdır. İç kısmı kulak zarı aracılığıyla orta kulağa bağlanır (25, 28).

### **Orta Kulak**

Orta kulak boşluğu; dış kulaktan timpanik membran ile ayrılmakta olup, iç kulakla oval pencere aracılığı ile ilişki kurar. Şeffaf ve çok katlı yapıda olan timpanik membran, oval biçimli ve konkavdır. Temporal kemiğin timpanik parçasında bulunan 'Gerlach halkası' denilen fibröz anulusuna tutunur. Orta kulakta malleus, inkus, stapes isimli üç kemikçik bulunmakta olup, sesi timpanik membrandan iç kulağa iletir. Malleusun timpanik membrana yapışık bulunan manubrium mallei kısmı ve inkusun gövdesiyle eklem yapan baş kısmı bulunur. Inkusun ise gövdesi dışında biri uzun ve biri kısa olan iki kolu vardır. Kısa kolu kavitenin arka duvarına bağlı iken, uzun kolu stapesin başı ile eklem yapar. Stapesin baş, boyun, iki kolu ve tabanı bulunur. Timpanik kemikten gelen titreşimler kemikçikler ve aralarındaki eklemler aracılığıyla iletilerek stapesin tabanının oturduğu oval pencereye iletilir (26).

Timpanik membrana yansıyan akustik basınç ve kasların hareketiyle kemikçikler hareket eder. Tensor timpani, malleus ile boşluğun üstteki tüpü açıklığına yakın kısmı arasında yer alır. Kasıldığında malleusu mediyale çekip timpanik membranı gerer ve kemikçiklerin kompliyansını azaltır (25). Stapes kası ise stapes başına tutunur. Kasıldığında stapesi piston benzeri harekete dik şekilde çeker, akustik uyarımın harekete dönüşen şiddetini azaltır (26).

Orta kulak boşluğunun ön duvarını farinkse bağlayan üstaki kanalı (tuba auditiva) 35-45 mm uzunluğunda ince bir kanaldır. Üst kısmı kemik yapıdan, alt kısmı ise kıkırdaktan oluşur. Atmosfer basıncı ve orta kulak boşluğu arasındaki hava basıncını dengeler. Timpanik membranın her iki tarafında basıncın dengeli olması, dış kulak yolundan ses dalgası geldiğinde en iyi düzeyde yanıt vermesini sağlar. Normalde kapalı olan bu kanal esneme ve yutkunma sırasında açılır (28).

### **İç Kulak**

İç kulak temporal kemiğin petröz parçasında bulunur. Kemik ve membranöz labirentten oluşur. Kemik labirent perilenf denilen sodyumdan zengin potasyumdan

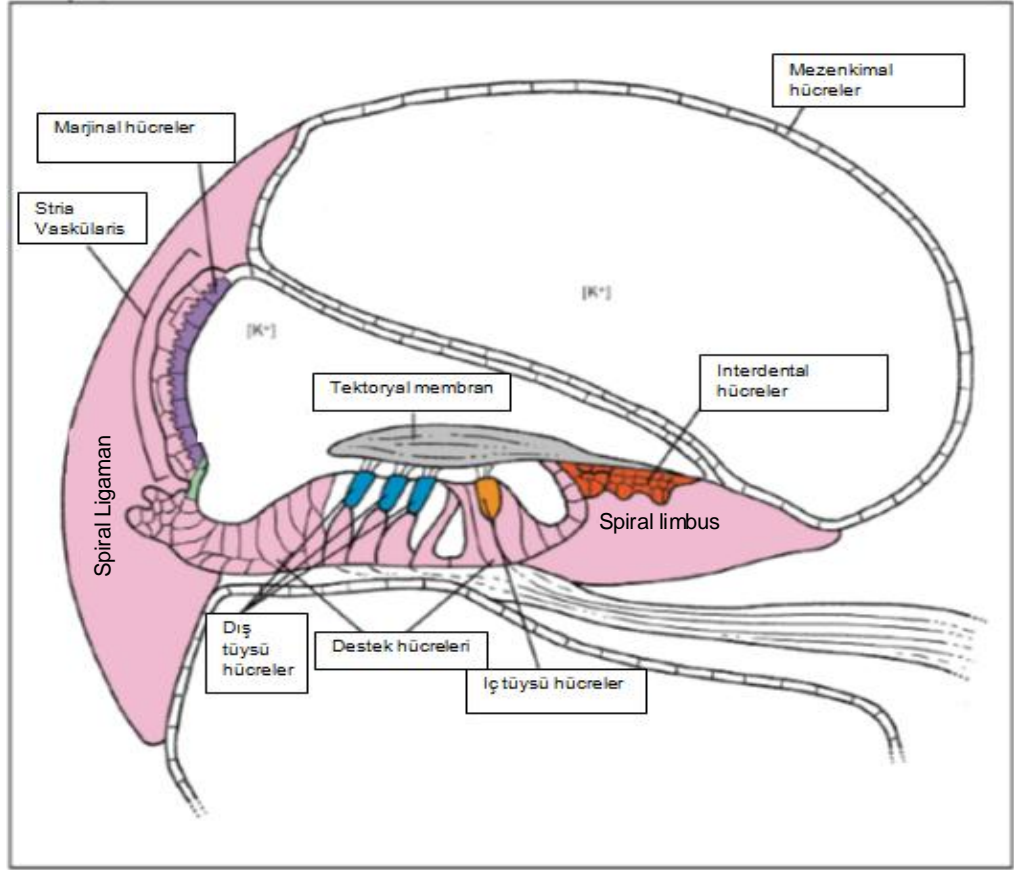
fakir sıvı içerir. Perilenfin içinde yer alan membranöz labirentte ise sodyumdan fakir potasyumdan zengin olan endolenfatik sıvı bulunur (26).

Labirenter sistem fonksiyonel olarak vestibüler sistemi ve kohleayı oluşturur. Vestibül ve semisirküler kanallardan oluşan vestibüler sistem denge ile, Korti organını içeren kohlea ise işitme ile ilgili fonksiyon gösterir (28).

Kohlea kemik labirentin salyangoza benzeyen kısmıdır. Kendi üzerinde 2,5 kez sarmal yapar. Sarmalın üst noktası kapalıdır (29). Uzunluğu yaklaşık 3,3 cm'dir. İçerisinde birbirine paralel ve sıvı dolu skala vestibüli, skala media ve skala timpani isimli üç boşluk bulunur. Skala vestibüli ve skala timpani perilenf, skala media ise endolenf içerir. Skala media orta kısmında yerleşmiş olup; skala vestibuliden Reissner membranı ile, skala timpaniden ise baziler membranla ayrılır. Skala media kohleanın tepesinde daralır ve helikotrema denilen açıklık aracılığıyla skala vestibüli ve skala timpani arasında iletişim sağlanır (25). Skala vestibuli kohleanın tabanında vestibüle bağlanır. Skala media ise yuvarlak pencere ile sonlanır (28).

Skala mediada bulunan ve baziler membran üzerinde bulunan Korti organı 'sensorinöral end organ' özelliğindedir. Belirli bir düzende dizilmiş tüysü ve destek hücreleri içerir. Her tüysü hücre dört destek hücresi ile sarılmıştır. İç tüysü hücreler kohlear kanalda tek sıra halinde 'U' şeklinde dizilmişlerdir. İşitme duyusunun afferent liflerinin reseptörü gibi görev yapar. Dış tüysü hücreler ise genellikle üç sıra halinde 'W' yada 'V' şeklinde dizilmişlerdir. Efferent lifler tarafından uyarılırlar, kohleanın seçiciliğini ve duyarlılığını artırır (30). İç ve dış tüysü hücrelerin arasında baziler membrana yakın kısmındaki boşluğa ise Korti tüneli denir (29). Şekil 2'de kohlea ve Korti organının yapısı gösterilmiştir.

Her tüysü hücrenin üst kısmında stereosiliya bulunmaktadır. Stereosiliyalar apikalde saç demeti gibi toplanırlar. Dış tüysü hücrelerin orta kısmındaki stereosiliyaları tektoryal membrana gömülü iken, iç tüysü hücrelere ait olanlar serbesttir (25). Dış tüysü hücrelerde; hücre ve stereosiliya boyları kohleanın apikaline ve laterale doğru gittikçe artar (26).



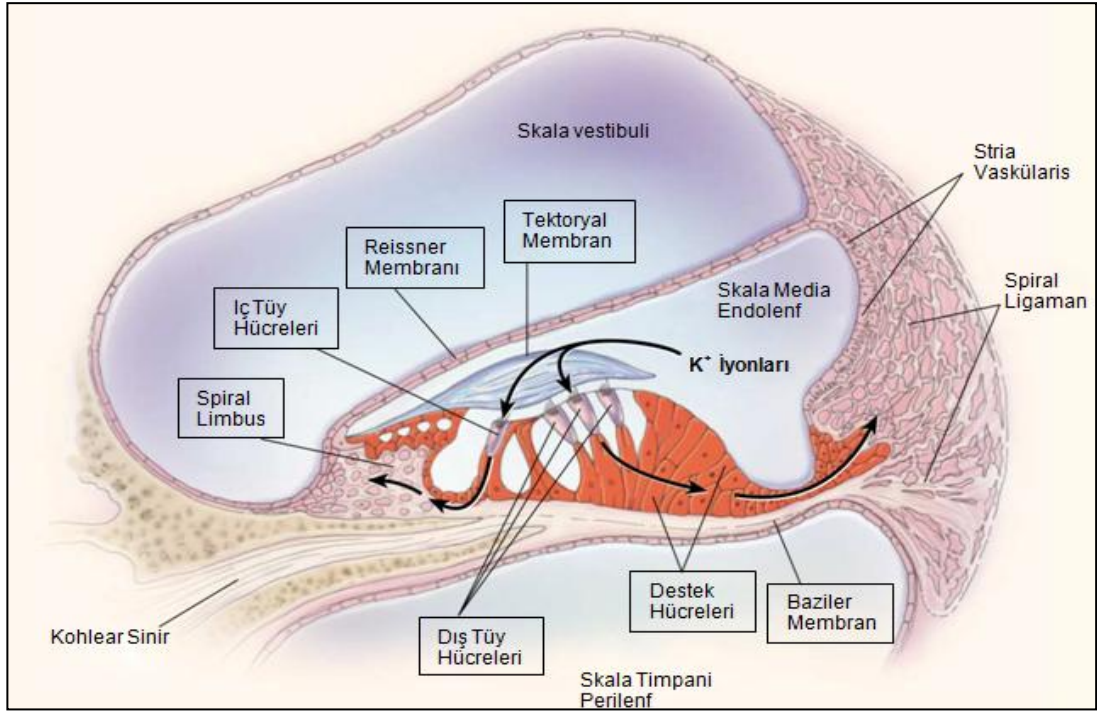
**Şekil 2:** Kohlea kesiti, içerdiği yapılar ve Korti organının yerleşimi. Tekin ve ark. (2000)'dan değiştirilerek alınmıştır (31).

## İŞİTMENİN FİZYOLOJİSİ

İşitme duyusu uyarı ve iletişim için gerekli olan ana duyulardan birisidir (29). İşitmenin gerçekleşebilmesi için ses kaynağından çıkan ses dalgaları, bu dalgaların yayılacağı uygun ortam ve algılanması için de kulak olmalıdır. Bir enerji olan ses, titreşimlerin bir kaynaktan çıkmasından sonra katı, sıvı veya gaz ortamda sıkışıp gevşeyen moleküller sonucu ortaya çıkar. Ses dalgaları ise titreşimlerin ortamda yayılması ile oluşur. Frekans; saniyedeki titreşim sayısını, amplitüd ise sesin şiddetini ifade eder. Frekansın birimi Hertz (Hz) iken, sesin şiddetinin birimi desibel (dB) dir. Normal insan kulağı 20-20000 Hz ve 0-120 dB arasındaki sesleri duyabilir (32).

Kulak kepçesi ile sesler toplanır, amplifikasyon ve filtreleme sonrası dış kulak yoluna iletilir. Timpanik membrandaki titreşimler kemikçiklerde titreşim yaratır. Stapes tabanındaki titreşimler oval pencere aracılığıyla bağlantılı olduğu kohleanın

skala vestibuli kısmındaki perilenfte dalgalanmaya yol açar (29, 32). Bu dalgalanma tektoryal membranda titreşim ve sonrasında tüysü hücrelerin membranda gömülü olan stereosilyumlarında bükülmeye neden olur. Bükülme ile katyon kanalları açılır ve potasyum ( $K^+$ ) hücre içine girer. Aksiyon potansiyeli başlamış olur. Kalsiyum kanalları da aktive olur, böylece akustik siniri uyaran nörotransmitter salınımını sağlayan kalsiyum iyonları hücre içerisine girer. Oluşan uyarım kohlear sinir ile beyin korteksine iletilir. İşitmenin devamı için  $K^+$  iyonlarının belirli bir döngü içinde olması gerekir. Tüysü hücrelerdeki  $K^+$  iyonları hücre zarının bazolateral kenardan destek hücrelerine geçer. Daha sonra konneksin proteinlerinden oluşan gap junctionlar aracılığıyla spiral limbus ve spiral ligamanda bulunan hücelere, son olarak da skala medianın lateral duvarında bulunan stria vaskularise ulaşan iyonlar voltaj-kapılı potasyum kanalları ile endolenfe geri pompalanır (31). Stria vaskularis bu nedenle kohlear iyon homeostazisini sağlayan temel yapıdır (8). Kohlear  $K^+$  döngüsü Şekil 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3:** Kohlear  $K^+$  döngüsü Willems ve ark. (2000)'dan değiştirilerek alınmıştır (27).

## İŞİTME KAYBI

İnsanlarda en sık rastlanılan duyuşsal bozukluk işitme kaybıdır (3). 40 dB'den fazla işitme kaybının prevalansı yaklaşık 500 doğumda birdir ve prevalans yaşla beraber artar. İşitme kaybı çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Orta yada dış kulaktaki defekte bağılı ise iletim tipi, iç kulaktaki defekte bağılı ise sensorinöral işitme kaybı, her ikisi de eşlik ediyorsa mixt tip işitme kaybı olarak adlandırılır. Etkilenen tarafa göre unilateral veya bilateral olarak ortaya çıkabilir. Başlangıç yaşına göre; işitme kaybı eğer dil gelişiminden önce başladıysa prelingual, dil gelişiminden sonra başladıysa postlingual olarak adlandırılır (1, 2). Sensorinöral işitme kaybı nedenleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1:** Sensorinöral İşitme Kaybı Nedenleri

<p><b>1. Genetik Nedenler</b> a.Sendromik İşitme Kayıpları i. Waardenburg Sendromu ii. Alport Sendromu iii. Usher Sendromu iv. Kromozomal Anomaliler b.Non-Sendromik İşitme Kayıpları</p> <p><b>2. İç Kulak Gelişim Anomalileri</b> a.Michel Displazisi b.Mondini Displazisi c.Schiebe Aplazisi d.Alexander Aplazisi</p> <p><b>3. Enfeksiyöz hastalıklar</b> a.Labirentit b.Otitis Media c.Viral Enfeksiyonlar d.Sfiliz e.Lyme Hastalığı</p> <p><b>4. Renal hastalıklar</b> a.Kronik Renal Yetmezlik</p> <p><b>5. Nörolojik Hastalıklar</b> a.Multiple Sklerozis b.Benign İntrakraniyal Hipertansiyon</p> <p><b>6. Vasküler Hastalıklar</b> a.Migren b.Vertebrobaziller Arter Yetmezliği</p> <p><b>7. Romatizmal hastalıklar ve Kan Diskrazileri</b> a.Waldenström Makroglobülinemi b.Kriyoglobülinemi</p> <p><b>8.Radyasyon</b></p>	<p><b>9. Hematolojik Hastalıklar</b> a.Orak Hücreli Anemi b.Kan Vizkozite Hastalıkları</p> <p><b>10.İmmün hastalıklar</b> a.Cogan Sendromu b.Poliarteritis Nodosa c.Relapsing Polikondrit d.Wegener Granülomatozu e.Primer Otoimmün İç Kulak Hastalığı</p> <p><b>11.Endokrin Hastalıklar</b> a.Diabetes Mellitus b.Hipotiroidi</p> <p><b>12.Kemik Hastalıkları</b> a.Otoskleroz b.Paget Hastalığı c.Tümörler</p> <p><b>13.Ototoksik İlaçlar</b> a.Aminoglikozitler b.Makrolid Antibiyotikler c.Loop Diüretikler d.Salisilatlar e.Nonsteroid Antinflamatuarlar f.Vankomisin g.Sisplatinium h.Nitrojen Mustard i.Vinkristin ve Vinblastin j.Ototopikal Tedaviler</p> <p><b>14.Travmalar</b> a.Kafa Travmaları b.Akustik Travma ve Gürültü c.Barotravma</p> <p><b>15.Perilenf fistülü</b></p>
--	--

Odyolojik özellikleri dikkate alındığında işitme kayıpları derecesine göre (Tablo 2) 6 grupta incelenir (34).

**Tablo 2:** Odyolojik özelliklerine göre işitme kaybı dereceleri

Saf ses ortalaması (dB)	İşitme kaybı derecesi
0-15 dB	Normal işitme
16-40 dB	Çok hafif işitme kaybı
41-55 dB	Hafif derecede işitme kaybı
56-70 dB	Orta derecede işitme kaybı
71-90 dB	İleri derecede işitme kaybı
91 dB ve üzeri	Çok ileri derecede işitme kaybı

Etiyolojisine göre; çevresel veya genetik nedenli olabilmektedir. Çevresel faktörler arasında; ototoksik ilaç kullanımı, perinatal komplikasyonlar, menenjit, akustik travma, kabakulak, konjenital enfeksiyonlar (toksoplazma, rubella, sitomegalovirüs) gibi nedenler yer almaktadır (4).

### **Genetik Faktörlere Bağlı İşitme Kayıpları**

Genetik faktörlere bağlı işitme kayıpları ise başka sistemik bulgular içerip içermemesine bağlı olarak sendromik veya non-sendromik olarak incelenebilir (4). %30'luk kısmını oluşturan sendromik grupta; işitme kaybı dışında başka sistemik bulgular da gözlenirken, non-sendromik grupta işitme kaybı dışında ek bulgu gözlenmez. Non-sendromik grupta otozomal resesif işitme kaybı prelingual dönemde, otozomal dominant işitme kaybı genellikle postlingual dönemde ortaya çıkma eğilimindedir ve %70'ini oluşturur (35-37).

İşitmenin karmaşık bir mekanizma olması nedeniyle çok sayıda gen bu fonksiyonda görevlidir. Bazen aynı genin farklı mutasyonları sendromik veya non-sendromik işitme kaybına da neden olabilmektedir. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®) veri tabanında 400'den fazla işitme kaybı ile giden sendrom tanımlıdır (20).

Bugüne kadar belirlenmiş sendromik ve sendromik olmayan herediter işitme kayıplarında gen sayısı Tablo 3'teki gibidir. (6)

**Tablo 3:** Herediter işitme kayıplarında belirlenmiş gen sayıları\*

	Gen sayısı	Herediter işitme kaybında yüzde (%) oran
<b>Non-Sendromik</b>	<b>106</b>	<b>68,8</b>
Otozomal Resesif	64	41,5
Otozomal Dominant	35	22,7
X'e Bağlı Kalıtım	4	2,5
Mitokondriyal	2	1,2
Diğer	1	0,6
<b>Sendromik</b>	<b>44</b>	<b>28,5</b>
<b>Mitokondriyal (Sendromik)</b>	<b>4</b>	<b>2,5</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>154</b>	<b>100</b>

\*<http://hereditaryhearingloss.org> veri tabanı, 03.01.2017 tarihli verilerine göre

İşitme kaybının eşlik ettiği en sık görülen sendromlardan bazıları şunlardır;

**Down Sendromu:** Etiyolojisi 21. kromozomun trizomisi olan ve yaklaşık 700 doğumda bir sıklıkta görülen; psikomotor gerilik, konjenital kalp hastalığı, dismorfik yüz bulguları ile seyreden kromozomal anomali sendromudur. Bu hastalarda dış kulak yolu darlıkları nedeniyle iletim tipi işitme kayıpları görülebileceği gibi, iç kulaktaki kohlea hipoplazisi, dar kohlear sinir kanalı gibi iç kulak displazilerinin görülebilmesi nedeniyle sensorinöral işitme kaybı da eşlik edebilmektedir (38, 39).

**Pendred Sendromu:** Prevalansı 100.000 doğumda 7,5'tur. Otozomal resesif kalıtım gösterir. Hafif veya şiddetli düzeyde progresif seyirli işitme kayıpları prelingual dönemde veya daha ileri yaşlarda başlayabilmektedir. Bu nedenle klinik olarak heterojendir. Hastalarda ayrıca tiroid disfonksiyonu, radyolojik olarak genişlemiş vestibüler aquadukt, temporal kemik anomalileri saptanabilmektedir. En sık *SLC26A4* gen mutasyonları (%50) sorumlu olmakla birlikte *FOX11* ve *KCNJ10* gen mutasyonları da %2'den az bir oranda saptanmıştır. Yaklaşık yarısında moleküler etiyoloji bilinmemektedir (35).



**Brankio-Oto-Renal (BOR) Sendromu:** Otozomal dominant kalıtım gösteren ve 40.000 doğumda bir görülen bu sendromda; işitme kaybı, brankiojenik malformasyonlar, renal anomaliler görülebilmektedir. Renal anomalilerin görülmediği Brankio-Otik sendromla alleliktir. *EYA1*, *SIX1* ve *SIX5* genlerinin sorumlu olduğu bilinmekle birlikte hastaların yarısında etiyoloji bilinmemektedir (40). Kopya numara sayısı (CNV) değişimlerinin de sorumlu olabildiği çalışmalarla gösterilmiştir (41).

**Usher Sendromu:** Otozomal resesif kalıtlı olup 25.000 doğumda 1-4 sıklıkta görülür. İşitme kaybı, görme kaybı, denge bozukluğu görülebilir. Klinik olarak 3 tipi vardır. Tip I'de ağır-ileri derecede sağırılık, vestibüler arefeksi, ilk dekatta retinitis pigmentosa (RP) gözlenir. Tip II'de konjenital orta-ağır derecede sağırılık, 2. dekatta RP görülürken; Tip III'de postlingual işitme kaybı, değişken vestibüler yanıt ve progresif RP seyretmektedir. Etiyolojisinde bilinen genler; Tip I için *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2* genleri; Tip II için *ADGRV1*, *WHRN*, *USH2A*, *PDZD7* genleri; Tip III için *CLRN1*, *HARS* genleridir (42-44).

**Waardenburg Sendromu:** Otozomal dominant kalıtlı ve 40.000'de bir sıklıkta görülür. 4 tipi vardır. Ortak bulguları saç ve iriste pigmentasyon bozukluğu, konjenital sensorinöral işitme kaybı ve dismorfik yüz bulgularıdır. Tip I, Tip III ve Tip IV ek bulguları ile Tip II'den ayrılır. Tip I'de distopia canthorum bulgusu tipiktir. Tip III'te üst ekstremitelerde kas-iskelet anormallikleri görülür. Tip IV'te ise Hirschsprung hastalığı eşlik eder. *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDN3*, *SNAI2* ve *EDNRB* genleri bilinen genleridir (35).

**Alport Sendromu:** Sıklığı 10.000'de birdir. Otozomal resesif veya X'e bağlı kalıtlıdır. Progresif sensorinöral işitme kaybı, anterior lentikonus, retina bulguları ve glomerüler bazal membran hastalığı ile karakterizedir. *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genleri sorumludur (45).

**Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu:** Konjenital sağırılık ve elektrokardiyogramda uzamış QT intervali nedeniyle artmış ani kardiyak ölüm riski ile seyreder. Otozomal resesif kalıtlıdır. *KCNQ1* ve *KCNE1* genleri sorumludur (45).

**Treacher Collins Sendromu:** Ağırıklı olarak otozomal dominant kalıtlı ve yaklaşık 1/50.000 sıklıkta görülür. Malar ve mandibular hipoplazi, mikrotia, alt göz kapağında kolobom gibi yüz bulguları vardır. Hastaların %30-50'sinde dış kulak yolu

ve orta kulak malformasyonları nedeniyle iletim tipi işitme kaybı bulunur. *TCOF1*, *POLR1C* ve *POLR1D* genlerinin sorumlu olduğu bilinmektedir (46, 47).

### **Non-Sendromik İşitme Kayıpları**

Non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili olarak 100'den fazla gen, 1000'den fazla mutasyon ve 160'tan fazla gen lokusu bulunmuştur. Bu lokuslar DFN olarak adlandırılmıştır. Otozomal dominant lokuslar DFNA, otozomal resesif lokuslar DFNB, X'e bağlı lokuslar DFN olarak temsil edilmektedir. Non-sendromik işitme kaybında bilinen gen ve lokus sayıları Tablo 4'teki gibidir.

**Tablo 4:** Non-sendromik işitme kaybında bilinen gen ve lokus sayıları\*

<b>NSİK- Kalıtım Tipi</b>	<b>Lokus Sayısı</b>	<b>Gen sayısı</b>
<b>Otozomal Dominant</b>	70	35
<b>Otozomal Resesif</b>	88	64
<b>X'e Bağlı Kalıtım</b>	6	4
<b>Y Kalıtım</b>	1	-
<b>TOPLAM</b>	<b>165</b>	<b>103</b>

\*<http://hereditaryhearingloss.org> veri tabanı, 03.01.2017 tarihli verilerine göre

### **Non-Sendromik İşitme Kaybından Sorumlu Genler**

Non-sendromik işitme kaybından sorumlu bazı genler ve özellikleri Tablo 5'te görülmektedir (6, 9, 31, 48).

**MYO15A** geninin kodladığı myozin15 proteini, konvansiyonel olmayan miyozin grubunda olup aktine bağlı motor proteindir. Kohleadaki tüysü hücrelerin stereosilyalarının uzamasından ve saç demeti şeklindeki organizasyonundan sorumludur. Mutasyonlarında otozomal dominant non-sendromik işitme kaybı ortaya çıkar (49).

**Tablo 5:** Non-sendromik işitme kaybından sorumlu bazı genler ve özellikleri

Gen	Lokus	Kromozomal Bölge	Protein	Fonksiyon
<b>GJB2</b>	DFNB1A DFNA3A	13q12.11	Konneksin26	Gap Junction, Potasyum döngüsü
<b>GJB6</b>	DFNB1B DFNA3B	13q12.11	Konneksin30	Gap Junction, Potasyum döngüsü
<b>OTOF</b>	DFNB9	2p23.3	Otoferlin	Vezikül-membran füzyonu
<b>MYO15A</b>	DFNB3	17p11.2	Miyozin 15	Stereosilya organizasyonu ve hareketi
<b>CDH23</b>	DFNB12	10q22.1	Kaderin23	Hücre-hücre adezyonu
<b>SLC26A4</b>	DFNB4	7q22.3	Pendrin	Klor ve anyon iyon taşıyıcısı
<b>TMC1</b>	DFNB7/11 DFNA36	9q21.13	Transmembran protein	İyon kanalı
<b>KCNQ4</b>	DFNA2A	1p34.2	Voltaj kapılı potasyum kanalı	Potasyum kanalı, Potasyum döngüsü
<b>POU3F4</b>	DFNX2	Xq21.1	Transkripsiyon Faktörü	Nöronal gelişim
<b>WFS1</b>	DFNA6/14/8	4p16.1	Wolfraamin	Transmembran protein
<b>TECTA</b>	DFNB21 DFNA8/12	11q23.3	$\alpha$ -tektorin	Tektoryal membran yapısına katılır.
<b>COCH</b>	DFNA9	14q12	Cochlin	Kohlear hücrenin devamlılığı

**OTOF** geninin kodladığı otoferlin proteini iç kulaktaki tüsü hücrelerde kalsiyuma ve zarlara bağlanır. Nörotransmitter içeren veziküllerin plazma membranı ile birleşmesinde rol alarak sinaptik vezikülün egzozitozunu sağlar (50). Prelingual non-sendromik işitme kaybı yaptığı ve işitme kaybının işitsel nöropati/işitsel senkronizasyon bozukluğu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (51). İşitme kaybı ileri veya çok ileri düzeydedir (52).

**CDH23** geni hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunda görevli kaderin-ilişkili 23 proteinini kodlar. Kulakta kohleadaki tüsü hücrelerde ve vestibüler organda eksprese olur. Mutasyonları Usher Sendromu Tip1D ve non-sendromik işitme kaybı ile ilişkilidir (53).

**SLC26A4** geni epitelyal anyon değiştirici fonksiyonu olan pendrin proteinini kodlar. Pendred sendromu ve temporal kemik anomalilerine neden olabilen farklı derecelerde ortaya çıkan otozomal resesif işitme kaybıyla ilişkilidir. Ayrıca heterozigot mutasyonları ve *KCNJ10* geni ile digenik kalıtım özelliği gösteren işitme kayıpları da bildirilmiştir (54).

**TMC1** geni transmembran kanal-benzeri protein kodlar. Bu proteinin, tüysü hücrelerde bulunan stereosilyaların uç kısımlarındaki mekanotransdüksiyonla ilişkili kanal yapısında görevli olduğu düşünölmektedir. Mutasyonları, non-sendromik tipte; ilerleyici otozomal dominant ve ileri–çok ileri derecede otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilidir (55).

**KCNQ4** geni iç kulakta K<sup>+</sup> döngüsünün sağlanması için gerekli olan voltaj kapılı potasyum kanal proteini kodlar. Mutasyonlarında geç başlangıçlı yüksek frekanslarda ve progresif otozomal dominant işitme kaybı göröölür (56).

**POU3F4** geni; mezensefalik nöral kök hücrelerin nöronal farklılaşmasında ve yenidoğanda nöronların maturasyonunda dolayısıyla kohlea gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörünü kodlar. Mutasyonlarında hızlı ilerleyen, iletim tipini de içerebilen ileri–çok ileri sensorinöral işitme kaybı; bilateral iç kulak anomalileri göröölmemektedir (57, 58).

**WFS1** geni, wolframin isimli ve temel olarak endoplazmik retikulumda bulunan proteini kodlar. Bu proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte endolenfin iyonik homeostazisinin sürdürölmesinde rol aldığı tahmin edilmektedir (59). Mutasyonlarında düşük frekanslarda ve progresif işitme kaybı göröölmemektedir (48).

**TECTA** geninin kodladığı  $\alpha$ -tektorin proteini tüysü hücreleri uyaran tektoryal membranın yapısına katılır. Fare alışmalarında, *TECTA* gen delesyonlarında tektoryal membranın duyu epitelinden ayrıldığı saptanmıştır. Değişken fenotipte otozomal dominant işitme kaybı ve orta-ileri düzeyde prelingual otozomal resesif işitme kayıpları ile ilişkilidir (60).

**COCH** geni tarafından kodlanan cochlin proteinin fonksiyonu net olarak bilinmemektedir (61). *COCH* geni mutasyonları geç başlangıçlı progresif işitme kaybına neden olmaktadır. Vestiböler disfonksiyon da eşlik edebilmektedir (62).

Ayrıca, aminoglikozit grubu antibiyotiklerin terapötik dozda kullanımı sonrası gelişen işitme kayıplarından bazı mitokondriyal mutasyonlar sorumlu olabilmektedir.

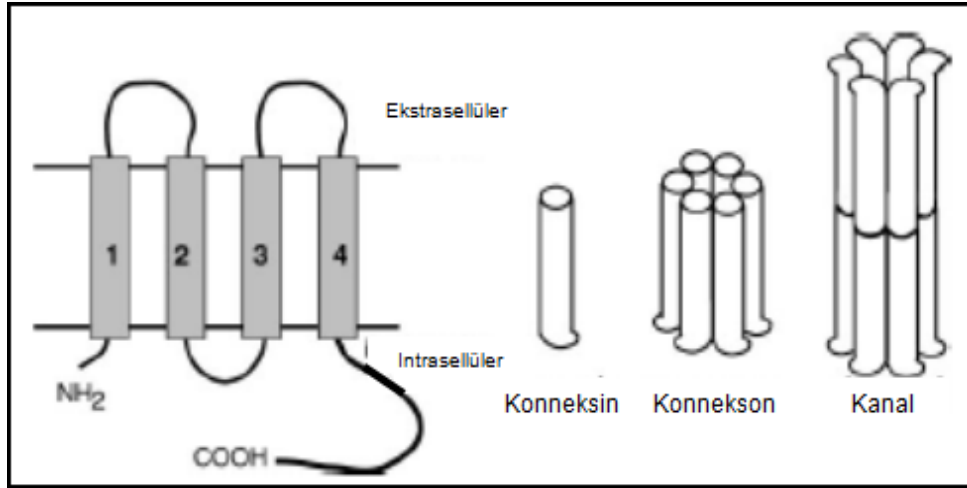
Örneğin, 12S rRNA geninde A1555G mutasyonu ve C1494T mutasyonu taşıyan bireylerde kohleanın aminoglikozitlere olan duyarlılığının arttığı düşünülmektedir (48).

## GAP JUNCTION GENLERİ

Gap junction bağlantısı komşu hücreler arasındaki küçük moleküllerin (<1 kDa) geçişini sağlayan; böylece proliferasyon, farklılaşma, hücrenin homeostazisi gibi hücreyel olayların düzenlenmesine yardımcı olan kanal yapısıdır (63).

Gap junction yapısının temel birimi konnexindir. Gap junction yapısı 'konnekson' denilen 2 hemikanaldan, her hemikanal da 6 konneksin (Cx) subünitinden oluşur (7).

Konneksin yapısında 4 transmembran domaini (TM1-TM4), iki ekstrasellüler loop domaini (EL1, EL2), bir sitoplazmik loop (CL), amino- ve karboksi-terminal sonlanma bölgesi bulunur (7). Şekil 4'te konneksin yapısı ve oluşturduğu kanal yapıları şematize edilmiştir (64). Tanımlı 20'den fazla konneksin bulunmaktadır. Bu yapıları birbirinden ayıran temel özellik; sitoplazmik lup ve karboksi-terminal domainin dizisi ve uzunluğudur (65). Transmembran ve ekstrasellüler lup bölgeleri korunmuştur (66).



**Şekil 4:** Konneksinin yapısı ve bölgeleri, konneksin ve gap junction kanal yapısı Petit ve ark. (2001)'dan değiştirilerek alınmıştır (64).

Konneksin subünit sentezi endoplazmik retikulumda başlar, daha sonra golgiye taşınır. Bu süreçte 6 konneksin subüniti oligomerize olarak konneksinleri oluşturur (7). Konneksin hücre zarına taşınır ve komşu hücrenin zarındaki

konneksonla karşılıklı gelerek hücreler arası kanal oluşturur. Konneksinlerin ekstrasellüler loop domainleri sayesinde hemikanallar birbirlerine kenetlenerek gap junction kanalı oluşumunu sağlar (67). Hemikanal olarak kalırsa hücre dışı çevreyle hücre içi madde alışverişini sağlayabilir (63). Bu hemikanallara aynı zamanda nonjunctional kanal da denilmektedir. Gap junction kanal; aynı tip konneksinden oluşuyorsa homotipik, farklı tipte konneksinlerden oluşuyorsa heterotipik kanal denilmektedir (7). Konnekson tek konneksin tipinden oluşuyorsa homomerik, birden fazla konneksin tipinden oluşuyorsa heteromerik kanal denilmektedir (68). Her kanalın içerdiği konneksin tipine göre geçirgenliği ve fonksiyonu değişmektedir (66).

Mutasyonunda kohlear  $K^+$  döngüsünün bozulduğu bilinen konneksin genleri ve kodladıkları proteinler şunlardır; *GJB2* (Gap Junction Protein, Beta-2)-konneksin 26 (Cx26), *GJB6* (Gap Junction Protein, Beta-6)-konneksin 30 (Cx30), *GJB1* (Gap Junction Protein, Beta-1)-konneksin 32 (Cx32), *GJA1* (Gap Junction Protein, Alfa-1)-konneksin 43 (Cx43) (8).

*GJB2* ve *GJB6* benzer ekspresyon özelliği göstererek spiral ligaman fibrositlerinde, stria vaskularisin bazal hücrelerinde, spiral limbusta, Korti organının destek hücrelerinde eksprese olmaktadır (66). *GJB1* (Cx32) ve *GJB3* (Cx31) ise bazal membran, spiral ligament ve spiral limbusta eksprese olur (8).

### **GJB3 (Gap Junction Protein, Beta-3) Geni**

*GJB3* geni 1p34'te lokalize olup 31 kDa ağırlığındaki konneksin 31 (Cx31) proteinini kodlar. Otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtmımlı non-sendromik işitme kaybı; Eritrokeratoderma Variabilis hastalığı ile ilişkilidir (69).

### **GJB2 (Gap Junction Protein, Beta-2) Geni**

*GJB2* geni 13. Kromozomun q12.11 bölgesinde 20,761,604-20,767,114 (hg19) bazları arasında bulunan 5.5 Mb büyüklüğünde bir gendir. 2 eksonu mevcuttur ve 681 baz çifti büyüklüğünde 1 kodlayıcı ekson içerir. Konneksin 26 isimli 226 amino asit içeren 26 kDa ağırlığında protein kodlar (9). Promotör bölgesi 6 GC kutusu, iki GT kutusu, bir TTA AAA kutusu, bir YY1 bağlanma bölgesi, memeli

salgı faktörü bağlanma bölgesi içerir (70). *GJB2* geni kohlea dışında plasenta, hepatosit, cilt, pankreas, böbrek, barsaklarda eksprese olur (71).

Korti organındaki tüy hücrelerinin  $K^+$  ile depolarize olmasından sonra,  $K^+$  epitelyum hücreleri, spiral ligaman ve perilenf aracılığı ile stria vaskülarise dönmelidir. Endokohlear potansiyelin devamı için gap junction ve iyon kanalları aracılığıyla  $K^+$  döngüsünün devamı gereklidir (72). *GJB2* gen mutasyonları sonucunda kohleadaki hücrelerin gap junction yapısının bozulması nedeniyle, potasyum döngüsü de bozulur ve endolenfte  $K^+$  birikimi ile sonuçlanır. Tüysü hücrelerin fonksiyonu bozulur ve işitme kaybı meydana gelir (24). Ayrıca artmış  $K^+$  iyonunun, iç tüysü hücreleri destekleyen hücrelerde eksprese olan glutamat taşıyıcısını etkileyerek ekstrasellüler ortamda glutamat artışına neden olabileceği, bu durumda bir antioksidan olan glutatyon üretiminde olumsuz etki yaratıp serbest radikal hasarını artırdığı düşünülmektedir. Serbest radikaller de Korti organında hücre ölümüne neden olabilmektedir (73).

*GJB2* ile ilgili HGMD veri tabanına göre 300'den fazla mutasyon bulunmaktadır (10). *GJB2* (DFNB1) otozomal resesif ve non sendromik sensorinöral işitme kayıplarının toplumlara göre değişmekle beraber %50'sini oluşturabilmektedir. %6-20'si monoallelik mutasyonlardan oluşur, bu oran Avrupada %50'ye kadar yükselebilmektedir (11). Chan ve ark. (12)'nin yaptığı meta-analize göre; Avrupa'da ve Orta Doğu'da 35delG, Doğu Asya'da 235delC, Güney Asya'da V731, Hindistan'da W24X mutasyonlarının daha ağırlıklı olduğu saptanmıştır. 167delT ve R143W mutasyonları ise Askenazi ve Gana toplumlarında tanımlanmıştır. İşitme kaybı olan hastalarda biallelik *GJB2* mutasyonları ortalama olarak %17,3'tür. Genellikle inaktive edici güdük protein oluşumuna neden olan mutasyonlar ileri-çok ileri derecede işitme kaybına neden olurken, tek nükleotid değişimi sonucu oluşan mutasyonlar daha ılımlı düzeyde işitme kaybına yol açma eğilimindedirler (48). Yine de bilinmeyen faktörler nedeniyle fenotipik varyasyon mevcuttur (2).

35delG mutasyonu Avrupa'da en sık Yunanistan olmak üzere Akdeniz Bölgesindeki toplumlarda yoğundur. Sağlıklı bireylerde taşıyıcılık oranı 1/49'dur. Bu oran Ankara için 1/78, İstanbul için 1/120 olarak bulunmuştur (74, 75). Akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda bu durum önem kazanmaktadır.

Ülkemizdeki çalışmalara bakacak olursak; Kalay ve ark. (14), birbiriyle akraba olmayan 93 non-sendromik otozomal resesif işitme kayıplı bireyin 29'unda (%31,2)

*GJB2* geninde en sık 35delG mutasyonu olmak üzere 7 farklı mutasyon saptarken; *GJB2* genindeki mutant allel oranı 35delG için %76 oranında saptanmıştır. Uyguner ve ark. (15) bilateral sensorinöral işitme kayıplı 2-12 birey içeren 60 ailede yaptıkları çalışmada %31,7 oranında *GJB2* mutasyonu saptarken; Tekin ve ark. (17), proband haricinde en az bir bireyin etkilendiği 154 aileyi içeren çalışma grubunda *GJB2* mutasyon oranını %20 olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmalarda 35delG mutasyonu dışında saptanan en sık 2. mutasyon W24X'tir. DelE120, 233delG, Q80R, 310del14, c.167delT, P184R, 236-239delTGCAinsAGATCCG, L90P, R127H, Q80K mutasyonları da saptanan diğer mutasyonlardır (14, 15, 17). Tarkan ve ark. (24)'nin kohlear implant tedavisi uygulanan 94 bireyden oluşan hasta grubunda mutasyona özgü analizinde ise 35delG mutasyonu %12,7 oranında olarak bulunurken, 167delT mutasyonu saptanmamıştır.

*GJB2* genini içeren 13q12.11 kromozom bölgesinin (DFNA3A) non-sendromik tipte otozomal dominant işitme kaybı ile ilişkili olduğu ilk kez Chaib ve ark. (21)'nin Fransız kökenli bir ailede yaptığı bağlantı analizinde gösterilmiştir. Bu ailede; ilk 4 yaşta ortaya çıkan, bilateral ve simetrik, bazı bireylerde progresif ilerleyen, hastaların yarısında yüksek frekanslarda kayıp var iken yarısında çok ileri derecede kaybın olduğu, klinik olarak heterojen işitme kaybı belirlenmiştir. OD ileri derecede işitme kayıplı bir Türk ailede de yeni bir mutasyon olan R75Q mutasyonunu tanımlanmıştır (22). Tekin ve ark. (76) ise Avrupa–Amerika kökenli ve erken başlangıçlı, progresif, non-sendromik ve ileri işitme kayıplı bir ailede W44C mutasyonunu göstermişlerdir.

*GJB2* ayrıca otozomal dominant kalıtmımlı, cilt problemleri ve işitme kaybı ile ilgili bazı hastalıklarla da ilişkilidir. Bunlar; keratit, iktiyoz, işitme kaybı ile giden KID sendromu (Keratitischthyosis–Deafness); palmoplantar hiperkeratoz ve işitme kaybı (MIM:148350); palmoplantar hiperkeratoz, otoamputasyon, tırnak anomalileri, işitme kaybı, alopesi ile seyreden Vohwinkel sendromu; kohlear sağırılık, lökonişya, eklem dorsalinde nodüllerle seyreden palmar ve plantar keratozla giden Bart-Pumphrey sendromu; hiperkeratoz, ihtiyozis, sağırılık ile giden 'Hystrix ichthyosis with deafness' ile ilişkilidir. (77-81)



## **GJB6 (Gap Junction Protein, Beta-6) Geni**

*GJB6* geni 13. Kromozomun q12.11 bölgesinde 20,796,101-20,806,534 (hg19) bazları arasında bulunan 10.4 Mb büyüklüğünde bir gendir. 3 eksonludur, 786 baz çiftinden oluşan 1 kodlayıcı ekson içerir. Konneksin 30 isimli 261 amino asit içeren, 30 kDA ağırlığında protein kodlar (9). *GJB6* kohlea dışında astrositte de eksprese olur (71). Konneksin 30 diğer konneksinlerle benzer yapıda olup, konneksin 26 ile %76 benzerlik gösterir (23).

Heteromerik kanalda Cx26 ve Cx30 birlikte bulunabilmektedir. Bu nedenle *GJB2* mutasyonlarına benzer olarak, Cx30 *knockout* fare çalışmalarında tüysü hücrelerde apoptoz ve K<sup>+</sup> döngüsünün bozulduğu saptanmıştır (82).

Grifa ve ark. (23); otozomal dominant kalıtım paterni gösteren, bireylerde farklı şiddetlerde işitme kaybı ile seyreden ve *GJB2* gen mutasyonu bulunmayan İtalyan bir ailede *GJB6* (DFNA3) geninde mutasyon tanımlamıştır.

Ülkemizde işitme kaybı ile ilişkili *GJB6* genine yönelik tüm gen analizi sadece Tekin ve ark. (17) tarafından yapılmış ve mutasyon saptanmamıştır.

*GJB6* gen mutasyonları; hipotrikozis, palmoplantar hiperkeratoz, hiperpigmentasyon, tırnak distrofisi ile giden otozomal dominant kalıtlı Clouston Sendromu (hidrotik ektodermal displazi) ile de ilişkilidir (81).

### ***Digenik Kalıtım***

Bazı işitme kayıplarında monoallelik *GJB2* mutasyon taşıyıcılığı yanında, digenik kalıtım nedeniyle *GJB3* ve *GJB6* mutasyonları da eşlik edebilmektedir. (83).

Yapılan çalışmalarda *GJB2* genini içeren DFNB1 ve *GJB6* gen mutasyonları non-sendromik sensorinöral işitme kayıplarının en sık nedeni olarak değerlendirilmiştir. Bu genler farklı popülasyonlarda hastaların %10-40'ında etiyolojiyi aydınlatmıştır (71). Bazı toplumlarda *GJB6*'ya yakın büyük delesyonların işitme kaybı ile ilişkili olduğu ve *GJB2* ile birlikte otozomal resesif ve digenik kalıtım gösterdiği saptanmıştır. En sık görülenleri del(*GJB6*-D13S1830) ve del(*GJB6*-D13S1854) değişimleridir (1). DFNB1 lokusundaki *GJB6* genine yakın delesyonların, muhtemelen *GJB2* genine ait düzenleyici elementini de içermesi nedeniyle *GJB2*

geninin ekspresyonunu bozduğu düşünölmektedir. Bu durumda hem *GJB2*'nin iki alleli hem *GJB6*'nın bir allelinin ekspresyonu bozulacağından işitme kaybı daha ağır olacaktır (1). Del Castillo ve ark. (84, 85) farklı toplumlarda heterozigot *GJB2* mutasyonu olan hastaların %10-42'sinde *GJB6* genini de içeren heterozigot delesyonlar tanımlamışlardır.

Ölkemizde ise; Tekin ve ark. (17) *GJB2* mutasyonu bulunmayan 108 ve *GJB2* heterozigot mutasyonu olan 18 hastada; Kalay ve ark. (14) *GJB2* mutasyonu bulunmayan 62 ve *GJB2* heterozigot mutasyonu olan 2 hastada; Uyguner ve ark. (15) 60 hastada; Tarkan ve ark. (24) kohlear implant tedavisi almış 94 hastada mutasyona özgü analizlerinde del(*GJB6-D13S1830*) bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (86), *GJB2* için heterozigot olan 108 hastada yaptıkları *GJB3* (*Cx31*) sekans analizinde 3 hastada 2 farklı mutasyon tanımlayarak *GJB2* ve *GJB3*'ün digenik kalıtımını göstermişlerdir. Ayrıca fare kohleasında yapılan immünpresipitasyon çalışmasıyla; konneksin 31 ve konneksin 26'nın ekspresyonunun benzerlik gösterdiği, *Cx26*, *Cx30* *Cx31*'in heterotipik kanal oluşumunda birlikte görev aldığı doğrulanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışma Grubu

Bu projede Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı tarafından konjenital bilateral sensorinöral işitme kaybı tanısıyla izlenmekte olan hastalar çalışmaya uygunluk açısından değerlendirildi. Kayıtlı olup çalışmaya katılmayı kabul eden hastalar daha sonra tarafımızca Tıbbi Genetik polikliniğinde Tablo 6'da belirtilmiş olan çalışmaya dahil olma kriterleri açısından tekrar değerlendirildi. 6 ay-65 yaş aralığında 36 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından 29.12.2015 tarih ve 22 sayılı kurul kararı ile onaylanmış olup Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya dahil olan tüm bireylere bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı ve tüm bireylerden 1 adet K3 EDTA'lı tüpe (VACUTEE®) 2 ml periferik kan örneği alındı. Kan örnekleri kodlanarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışmaya dahil olma ve dışlama kriterleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6: Çalışmaya dahil olma ve dışlama kriterleri**

<b>Dahil olma kriterleri</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Konjenital prelingual ya da postlingual başlangıçlı bilateral sensorinöral işitme kaybı olması</li><li>2. İşitme testinde saf ses ortalamasının çocuklarda 15 dB'den, erişkinlerde 20 dB'den fazla olması</li><li>3. Sendrom şüphesine neden olabilecek dismorfik bulgunun saptanmaması</li><li>4. Öyküsünde prenatal, natal, postnatal işitme kaybı risk faktörlerinin olmaması<ul style="list-style-type: none"><li>- Konjenital enfeksiyon (toksoplazma, sifiliz, rubella, sitomegalovirüs, herpes)</li><li>- Düşük doğum ağırlığı (&lt;1500 gr),</li><li>- Transfüzyon gerektirecek düzeyde hiperbilirubinemi,</li><li>- Ototoxik ilaç kullanımı,</li><li>- Bakteriyel menenjit,</li><li>- 1.dakikada 0-4 veya 5.dakikada 0-6 arası APGAR skoru,</li><li>- En az 5 gün süren mekanik ventilasyon,</li><li>- Şiddetli kafa travması,</li><li>- En az 3 ay süren rekürren/persistan otitis media,</li><li>- Östaki fonksiyonunu etkileyebilecek durumlar</li></ul></li><li>5. Karyotipin normal olması</li></ol>
<b>Dışlama kriterleri</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Mikst tip ve/veya iletim tipi işitme kaybının olması</li><li>2. Sendrom şüphesine neden olabilecek dismorfik bulgunun saptanması</li><li>3. Öyküsünde prenatal, natal, postnatal işitme kaybı risk faktörünün olması<ul style="list-style-type: none"><li>• Konjenital enfeksiyon (toksoplazma, sifiliz, rubella, sitomegalovirüs, herpes)</li><li>• Düşük doğum ağırlığı (&lt;1500 gr),</li><li>• Transfüzyon gerektirecek düzeyde hiperbilirubinemi,</li><li>• Ototoxik ilaç kullanımı,</li><li>• Bakteriyel menenjit,</li><li>• 1.dakikada 0-4 veya 5.dakikada 0-6 arası APGAR skoru,</li><li>• En az 5 gün süren mekanik ventilasyon,</li><li>• Şiddetli kafa travması,</li><li>• En az 3 ay süren rekürren/persistan otitis media,</li><li>• Östaki fonksiyonunu etkileyebilecek durumlar</li></ul></li><li>4. Kromozomal anomali bulunması</li></ol>

### **Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu**

Periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit (QuickGene DNA Whole Blood Kit S, Fujifilm) kullanılarak otomatize nükleik asit izolasyon cihazında (Fujifilm Nucleic Acid Isolation System, QuickGene-810, Fujifilm) gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir;

1. EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden 200 µl periferik kan örneği alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

2. 200 µl periferik kan örneklerine 250 µl lizis tamponu (Lysis Buffer; LDB) ve 30 µl Proteaz (EDB) eklenerek, maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse vorteks). Örnekler 56°C'de 2 dk inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrasında örneklere 250 µl >%99 etanol eklenerek maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse vorteks).

4. Otomatize genomik izolasyon cihazının kartuşuna filtreli tüpler yerleştirilerek lizatlar bu tüplere aktarıldı ve 'DNA WHOLE BLOOD' modu ile süzme işlemi yapıldı.

5. Filtreli tüplere, kit içeriğinde bulunan Wash Buffer'dan 750 µl ilave edildi, tekrar süzme işlemi yapıldı. Bu işlem toplam 3 kez art arda yapıldı.

6. Kartuş, önceden cihaza yerleştirilmiş olan ependorfların üzerine aktarıldı.

7. Filtreli tüplere kit içeriğinde bulunan elüsyon bufferdan 200 µl ilave edildi. Filtrede bulunan DNA'ların ependorflara aktarılması amacıyla süzme işlemi yapıldı.

8. Filtreli tüpler atılıp, DNA içeren süzüntü ependorf içinde saklandı.

### **İzole Edilen DNA'ların Saflık Değerlerinin Belirlenmesi**

İzole edilen DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon tayini spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) yapıldı. Her örneğin konsantrasyon, 'A260/230' ve 'A260/280' değerleri kaydedildi. Ölçümü yapılan DNA örnekleri çalışmaya alınincaya kadar -20°C'de buzdolabında saklandı.

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

GJB2 ve GJB6 genlerinin kodlayıcı eksonlarını incelemek amacıyla DNA dizisini amplifiye etmek için özgün primerler tasarlandı. Kodlayıcı birer eksonları bulunan bu genlerin ilgili bölgelerinin büyük olması nedeniyle iki bölgeye ayrılarak incelendi. GJB2 geni kodlayıcı bölgesi ve kullanılan primerler Şekil 5'te, GJB6 geni kodlayıcı bölgesi ve kullanılan primerler Şekil 6'da gösterilmiştir. Kodlayıcı dizi koyu harflerle gösterilmiştir.

```
CCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCCTGTGTTGTGTGCATT
CGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACG
ATCCTGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTACCGTCC
TCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAG
CAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATC
ACTACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACG
CCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCTACC GGAGACATGAGAAGAAGAGGAAG
TTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGA
AGGTCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTCCGGGT
CATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCA
GCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCC
CGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCAT
CCTGCTGAATGTCAGTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAA
AAAGCCAGTTTAACGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGAT
GAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTC AAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCEAACACAAAGATTC
```

Şekil 5: GJB2 geni kodlayıcı eksonu ve kullanılan primerler

```
TTGGCTTCAGTCTGTAATATCACCGTGTCACTTCCCAAGGCCTCTTCCACTAATAAACCT
TTGCCCACTTTTGCTGTTTAGGGATAAACAGCGCAATGGATTGGGGGACGCTGCACA
CTTTCATCGGGGTGTCAACAAACACTCCACCAGCATCGGGAAGGTGTGGATCACAGT
CATCTTTATTTCCGAGTCATGATCCTCGTGGTGGCTGCCAGGAAGTGTGGGGTGACG
AGCAAGAGGACTTCGTCTGCAACACACTGCAACCGGGATGCAAAAATGTGTGCTATGA
CCACTTTTCCCGGTGTCCACATCCGGCTGTGGGCCCTCCAGCTGATCTTCGTCTCCA
CCCCAGCGCTGCTGGTGGCCATGCATGTGGCCACTACAGGCACGAAACCACTCGCAA
GTTCAGGCGAGGAGAGAAGAGGAATGATTTCAAAGACATAGAGGACATTA AAAAGCA
GAAGGTTCGGATAGAGGGTCTGCTGTGGTGGACGTACACCAGCAGCATCTTTTCCGA
ATCATCTTTGAAGCAGCCTTATGTATGTGTTTACTTCCTTACAATGGGTACCACCTG
CCCTGGGTGTTGAAATGTGGGATTGACCCCTGCCCAACCTTGTGACTGCTTATTTCT
AGGCCAACAGAGAAGACCGTGTGTTACCATTTTATGATTTCTGCGTCTGTGATTTGCATG
CTGCTTAACGTGGCAGAGTTGTGCTACCTGCTGCTGAAAGTGTGTTT TAGGAGATCAA
GAGAGCACAGACGCAAAAAAATCACCCCAATCATGCCCTAAAGGAGAGTAAGCAGAA
TGAATGAATGAGCTGATTTAGATAGTGGTCAAATGCAATCACAGGTTTCCCAAGCT
AAACATTTCAAGGTAAAATGTAGCTGCGTCAT AAGGAGACTTCTGTCTTCTCCAGAAGGC
AATACC AACCTGAAAGTTCCTTCTGTAGCCTGAAGAGTTTGTAAATGACTTTTCATAATAAA
```

Şekil 6: GJB6 geni kodlayıcı eksonu ve kullanılan primerler

Primer tasarımları Primer3Plus programı kullanılarak yapıldı. Primerlerin özellikleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7:** Primerlerin özellikleri

Hedef Bölge		Dizi	Baz Uzunluğu (Baz çifti)	Bağlanma Sıcaklığı	Tm	Ürün Büyüklüğü (Baz çifti)
GJB2 1.ekson 1.bölge	F	ACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTTC	22	55	60,3	461
	R	TGGGTTTGGATCTCCTCGATGT	22		58,4	
GJB2 1.ekson 2.bölge	F	GGCTGCAAGAACGTGTGCTACG	22	61	64	565
	R	GCTGAGCACGGGTTGCCTCATC	22		65,8	
GJB6 1.ekson 1.bölge	F	TGTAATATCACCGTGCACTTTCC	24	56	59,3	535
	R	AAGGCTGCTTCAAAGATGATTC	22		56,5	
GJB6 1.ekson 2.bölge	F	TACTACAGGCACGAAACCACTC	22	56	60,3	571
	R	CTTTCAGGTTGGTATTGCCTTC	22		58,4	

GJB2 ve GJB6 geninin çoğaltılacak bölgeleri için reaksiyon başına toplam hacim 50 µl olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı. PZR karışım içeriği Tablo 8'de gösterilmiştir. Bu karışım içeriği örnek sayısı ile çarpılarak PZR için gerekli miktar hazırlandı.

**Tablo 8:** PZR karışım içeriği

Kimyasal	Miktar
Mastermiks	25 µl
Forward Primer	3 µl
Reverse Primer	3 µl
DNA	5 µl
Su	14 µl
<b>Toplam</b>	<b>50 µl</b>

Kullanılan mastermiks; Taq DNA Polimeraz (1ünite/10 µl), 2X reaksiyon buffer, 4mM MgCl<sub>2</sub>, enzim stabilizör, sediment, loading dye, 0,5 mM dNTP (dATP, dGTP dCTP dTTP -her biri için) içermektedir. (ExPrime Taq Premix (2x), Genet Bio, Katalog No: G-5000N)

PZR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 9'daki PZR reaksiyon basamakları izlendi.

**Tablo 9: PZR reaksiyon basamakları**

PZR basamakları	Isı	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Primer bağlanma	*	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	5 dk	1
Sonuçlanma	4°C	∞	1

\*Primer bağlanma sıcaklığı GJB2 1.bölge için 55°C, 2.bölge için 61°C, GJB6 1.ve 2.bölgesi için 61°C'dir.

### **Agaroz Jel Elektroforez**

100 ml 10x TAE stok solüsyonuna, 900 ml distile su eklenip tampon çözeltisi hazırlandı. Toz halindeki agarozdan 2 gr tartılarak 100 ml tampon çözelti ile karıştırılıp mikrodalga fırında maksimum sıcaklıkta agaroz eriyip saydam görümlü jel haline gelinceye kadar ısıtıldı. Sıvı agarozu 0,8 µl akrinin oranj eklendi. Bu karışım taraklar yerleştirilip elektroforez tepsisine dökülüp soğumaya bırakıldı. Agaroz jel katılınca elektroforez tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 100 bç'lik DNA marker, diğer kuyucuklara PZR ile elde edilen ürünler yüklendi. 100 mV'ta 30 dk elektroforetik olarak yürütüldü. Jel, 'Vilbert Lourmat' UV görüntüleme cihazına yerleştirilip görüntüledi. Görüntüler bilgisayar ortamına kaydedildi. PZR bantları uygun olan örnekler pürifikasyon için ayrıldı.

### **PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu (Saflaştırılması)**

Görüntüleme sonrası uygun PZR ürünleri, PZR artıklarının uzaklaştırılması amacıyla E.Z.N.A Cycle Pure Kit D6492-02 (OMEGA, BİOTEK) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu protokolda aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

1. 45 µl PZR ürününe 55 µl su eklenip 100 µl'ye tamamlandı.
2. 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 500 µl kit içeriğindeki CP Bufferdan konuldu, üzerine PZR ürünü eklendi. Maksimum hızda vortekslenip kısa süreli spin yapıldı.
3. Önceden hazırlanmış numaralı toplama tüplerine kolonlar yerleştirildi.
4. Karışım kolona aktarıldı.



5. 16.000x g (14.000 rpm)'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında toplama tüpüne süzülen materyal atılıp kolonlar tekrardan toplama tüpüne yerleştirildi.
7. Üzerine kit içeriğindeki Wash Bufferdan (önceden üzerine 60 µl %100 etanol eklenmiş) 700 µl eklendi.
8. 16.000x g (14.000 rpm)'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edildi.
9. Toplama tüpüne süzülen materyal atılıp kolonlar tekrardan toplama tüpüne yerleştirildi.
10. Kolonları alkolden uzaklaştırmak için kolonlar boş iken 16.000x g (14.000 rpm)'de oda sıcaklığında 2 dk santrifüj edildi.
11. Kolonlar önceden numaralandırılmış 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirilip, üzerine kit içeriğindeki elüsyon bufferdan 50 µl eklendi.
12. Oda sıcaklığında 2 dk beledikten sonra 16.000x g (14.000 rpm)'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonrası kolonlar atıldı. Ependorf tüplerinde kalan sıvı pürifiye PZR ürünü olarak ayrıldı ve +4°C'de saklandı.

Pürifiye PZR ürünleri akridin oranj ile hazırlanmış %2'lik agaroz jelde elektroforetik olarak yürütüldü. Jel, 'Vilbert Lourmat' UV görüntüleme cihazına yerleştirilip görüntülendi. Görüntüler bilgisayar ortamına kaydedildi. PZR bantları uygun olan örnekler sekans PZR'ı için ayrıldı.

### **Sekans Reaksiyonunun Hazırlanması**

Sekans PZR reaksiyonu için Dye Terminator Cycle Sequencing With Quick Start Kit (Genome Lab) kullanıldı. Sekans reaksiyonu için ürün başına hazırlanan karışım Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 10:** Sekans PZR karışım içeriği

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktar</b>
DTCS Quick Start mastermiks	4 µl
Forward / Reverse Primer	1 µl
Su	11 µl
PZR ürünü	4 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Reaksiyon başlamadan önce PZR ürünlerine 85°C'de 5 dk predenatürasyon uygulandı, daha sonra tüplere 16'şar µl karışım eklendi. Reaksiyon için tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 11'deki basamaklar takip edildi.

**Tablo 11:** Sekans PZR reaksiyon basamakları

PZR basamakları	Isı	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94°C	2 dk	1
Denatürasyon	96°C	20 sn	30
Primer bağlanma	50°C	20 sn	
Uzama	60°C	4 dk	
Son uzama	94°C	30 sn	1
Sonuçlanma	4°C	∞	1

Sekans PZR tamamlanınca Tablo 12'de belirtilen miktarlarda taze stop solüsyonu hazırlandı ve aşağıda belirtilen aşamalar sırasıyla yapıldı.

**Tablo 12:** Stop solüsyon içeriği

Kimyasal	Miktar
Na-Asetat	2 µl
Na-EDTA	2 µl
Glikojen	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>5 µl</b>

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ince çeperli ependorf tüpleri hazırlandı.
2. Her tüpe taze hazırlanmış stop solüsyonundan 5 µl eklendi.
3. Stop solüsyonu eklenmiş tüplere sekans PZR ürünleri ilave edildi ve yoğun pipetajla iyice karıştırıldı.
4. Tüplere -20°C'de saklanan %96'lık etanolden 70 µl eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Karışım -20°C'de 30 dk bekletildi.
6. Önceden 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 16.000x g (14.000 rpm)'de 15 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüplerin dibindeki pellete dikkat edilerek pipetle süpernatant alınıp atıldı.
8. Pelletin üzerine -20°C'de saklanan %70'lik etanolden 170 µl eklendi ve pipetaj yapıldı.

9. 4°C'deki santrifüjde 16.000x g (14.000 rpm)'de 7 dk santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası tüplerin dibindeki pellete dikkat edilerek, süpernatant pipetle alınıp atıldı.
11. Örnekler, etanolün uçurulması amacıyla önceden 40°C'ye ısıtılmış dry block'ta 40 dk bekletilip kurumaya bırakıldı.
12. Etanol çöktürme işleminden sonra; kurutulan örnekler, -20°C'de saklanan ve kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş formamidden (yükleme solüsyonu) 40 µl eklendi.
13. Formamid eklenmiş ürünler vortekslenip pipetaj yapılarak sekans PZR ürününün çözülmesi sağlandı.
14. Dizi analizi cihazının (Beckmann-Coulter CEQ 8000™ Genetic Analysis System) programı açılıp örnekler sisteme kaydedildi ve LFRa programı seçildi.
15. Jel ve kapiller protokole uygun şekilde cihaza yerleştirildi.
16. Ependorf tüpünde bulunan örnekler 'sample plate'e yüklendi. Üzerlerine buharlaşmayı önlemek amacıyla mineral yağı damlatıldı.
17. 'Buffer plate'e her kuyucuğun 3/4'ü dolacak şekilde Seperate buffer solüsyonu eklendi.
18. Plateler Beckmann-Coulter CEQ 8000™ Genetic Analysis System cihazına yerleştirildi ve analiz başlatıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmamıza Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı tarafından konjenital bilateral sensorinöral işitme kaybı tanısıyla izlenmekte olan 29'u (%80,6) prelingual başlangıçlı, 7'si (%19,4) postlingual başlangıçlı olan 36 hasta dahil edildi. Olgular Tablo 6'da belirtilen dahil olma ve dışlanma kriterlerine göre belirlendi. Hastalara ait bilgiler Tablo 13'te gösterilmiştir.

**Tablo 13:** Hastalara ait bilgiler

<b>Hasta No</b>	<b>İşitme Kaybı Başlangıç Dönemi</b>	<b>İşitme Kaybı Derecesi (Sağ Kulak/Sol Kulak)</b>
H1	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H2	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H3	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H4	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H5	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H6	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H7	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H8	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H9	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H10	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H11	Prelingual	Çok ileri / İleri
H12	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H13	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H14	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H15	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H16	Prelingual	Orta / Orta
H17	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H18	Postlingual	İleri / Çok ileri
H19	Prelingual	İleri / Çok ileri
H20	Postlingual	İleri / Çok ileri
H21	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
H22	Postlingual	İleri / Çok ileri
H23	Postlingual	Çok ileri / Çok ileri
H24	Postlingual	Çok ileri / Çok ileri

(Tablo 13'ün devamı)

<b>H25</b>	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
<b>H26</b>	Postlingual	Hafif / Hafif
<b>H27</b>	Prelingual	Hafif / Çok ileri
<b>H28</b>	Prelingual	Hafif / Çok ileri
<b>H29</b>	Prelingual	Hafif / Hafif
<b>H30</b>	Prelingual	Çok ileri / İleri
<b>H31</b>	Postlingual	Çok ileri / Çok ileri
<b>H32</b>	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
<b>H33</b>	Prelingual	Çok ileri / Orta
<b>H34</b>	Prelingual	Çok ileri / Çok ileri
<b>H35</b>	Prelingual	Orta/ Orta
<b>H36</b>	Prelingual	İleri / Orta

Hastalara ait periferik kandan elde edilen DNA'ların konsantrasyonları 'Thermo Scientific Nanodrop 2000c' spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş olup sonuçlar Tablo 14'te gösterilmiştir.

**Tablo 14:** Hastalara ait DNA örneklerinin spektrofotometri ölçümleri

Hasta No	Konsantrasyon ng/µl	A° 260/280	A° 260/230
<b>H1</b>	25.5	1.82	0.9
<b>H2</b>	23	1.97	1.75
<b>H3</b>	32.4	1.94	1.65
<b>H4</b>	29.8	2.05	1.81
<b>H5</b>	19.5	1.90	1.95
<b>H6</b>	22.6	1.75	1.86
<b>H7</b>	27.2	1.68	2.2
<b>H8</b>	21.5	1.76	1.9
<b>H9</b>	34.2	1.88	1.65
<b>H10</b>	20.7	1.95	1.68
<b>H11</b>	28.3	1.87	1.87
<b>H12</b>	24	1.99	2.05
<b>H19</b>	23.9	2.1	1.88
<b>H20</b>	27	1.81	2.05
<b>H21</b>	28.4	1.92	1.97
<b>H22</b>	21.7	1.97	1.78
<b>H23</b>	26.4	1.88	1.96
<b>H24</b>	33.4	1.86	1.79
<b>H25</b>	30.5	1.69	1.86
<b>H26</b>	27.9	2	1.97
<b>H27</b>	18.7	1.84	1.76
<b>H28</b>	22.6	1.96	2.03
<b>H29</b>	23.2	1.9	1.65
<b>H30</b>	27.5	1.69	1.76

(Tablo 14'ün devamı)

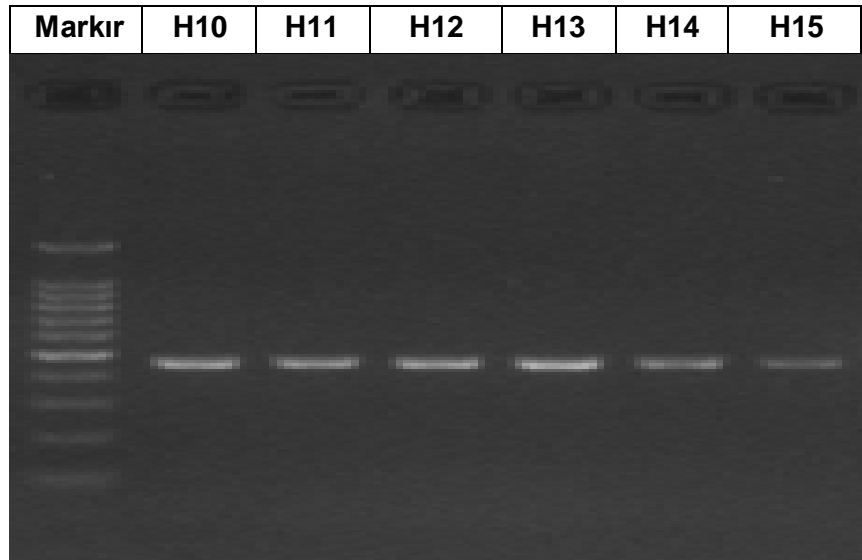
H13	31	1.96	1.81	H31	25.8	1.82	1.72
H14	26.2	1.78	1.55	H32	34.2	1.76	1.86
H15	35.3	2.08	1.98	H33	30.7	1.72	1.93
H16	42.1	1.93	1.7	H34	28.3	1.93	2.02
H17	37.3	1.84	1.93	H35	26.7	1.97	1.68
H18	26.8	1.79	1.67	H36	32.6	1.82	1.95

### GJB2 ve GJB6 Genlerinin Moleküler Analizi

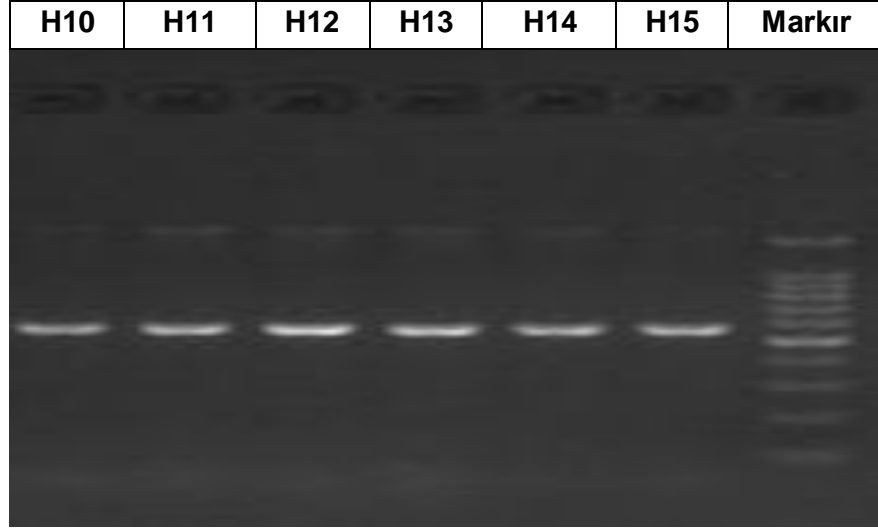
#### *PZR Sonuçları*

GJB2 ve GJB6 genlerine ait birer kodlayıcı ekson bulunmaktadır. Bu bölgelerin uzun olması nedeniyle ikişer primer çifti ve iki ayrı PZR ile çoğaltıldı.

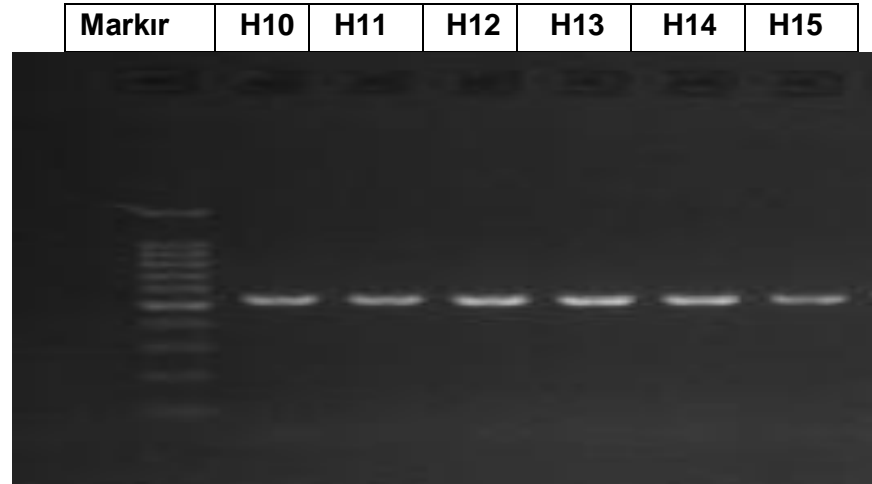
GJB2 ve GJB6 genlerinin özgün primerler kullanılarak çoğaltılan 1. ve 2. bölgelerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforezdeki görüntüleri Şekil 7-10'da gösterilmiştir.



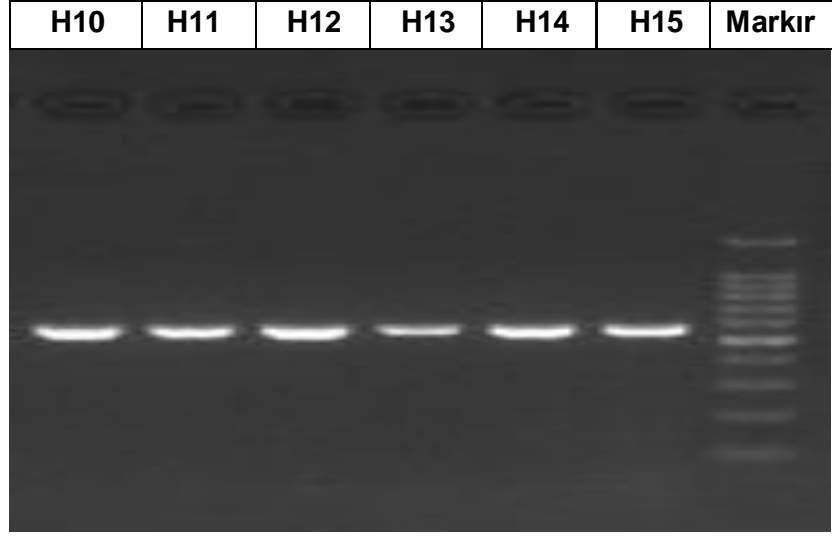
**Şekil 7:** GJB2 geni 1. bölgesine ait PZR ürününün (461bç) jel görüntüsü. Markır 100 bç büyüklüğündedir.



**Şekil 8:** GJB2 geni 2. bölgesine ait PZR ürününün (565 bç) jel görüntüsü. Markır 100 bç büyüklüğündedir.



**Şekil 9:** GJB6 geni 1. bölgesine ait PZR ürününün (535 bç) jel görüntüsü. Markır 100 bç büyüklüğündedir.



**Şekil 10:** GJB6 geni 2. bölgesine ait PZR ürününün (571 bç) jel görüntüsü. Markır 100 bç büyüklüğündedir.

### Ürünlerin Dizi Analizi

Sekans PZR ürünleri Beckmann-Coulter CEQ 8000™ Genetic Analysis System cihazında analiz edildi. 24 (%66,7) hastada GJB2 ve GJB6 genlerinde herhangi bir değişim saptanmazken; 11 hastada (%30,6) GJB2 geninde, 1 hastada (%2,8) GJB6 geninde değişim saptandı. GJB2 ve GJB6 mutasyon analiz sonuçları Tablo 15'te gösterilmiştir.

**Tablo 15:** Hastaların GJB2 ve GJB6 gen mutasyon analiz sonuçları

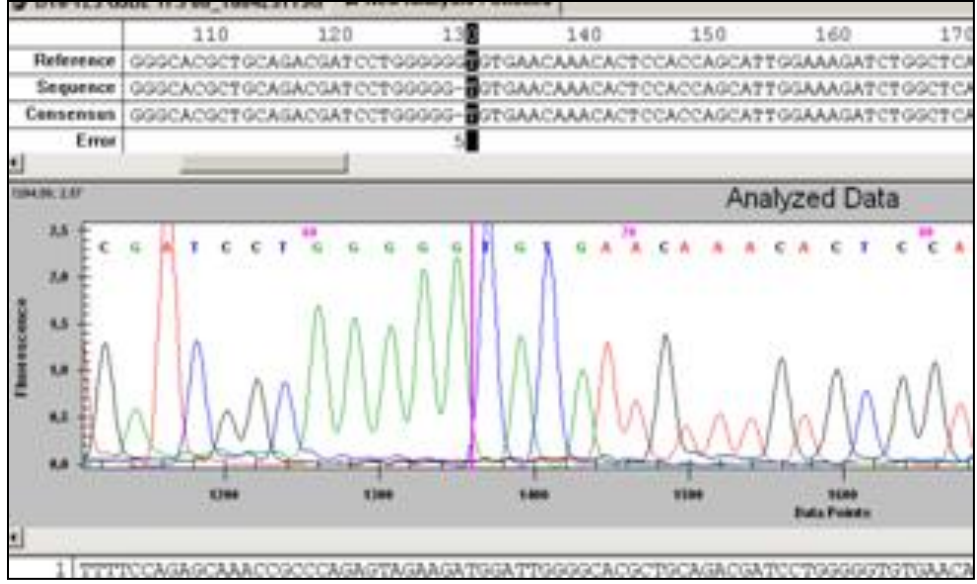
Hasta No	Gen	Nükleotit Değişimi	Protein değişimi	dbSNP	Homozigot /Heterozigot	Varyant Tipi
H1	GJB2	c.269T>C	p.Leu90Pro	rs80338945	Heterozigot	Missense
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H2	GJB2	c.511G>A	p.Ala171Thr	rs201004645	Heterozigot	Missense
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H3	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H4	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H5	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H6	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Homozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H7	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Homozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H8	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H9	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					



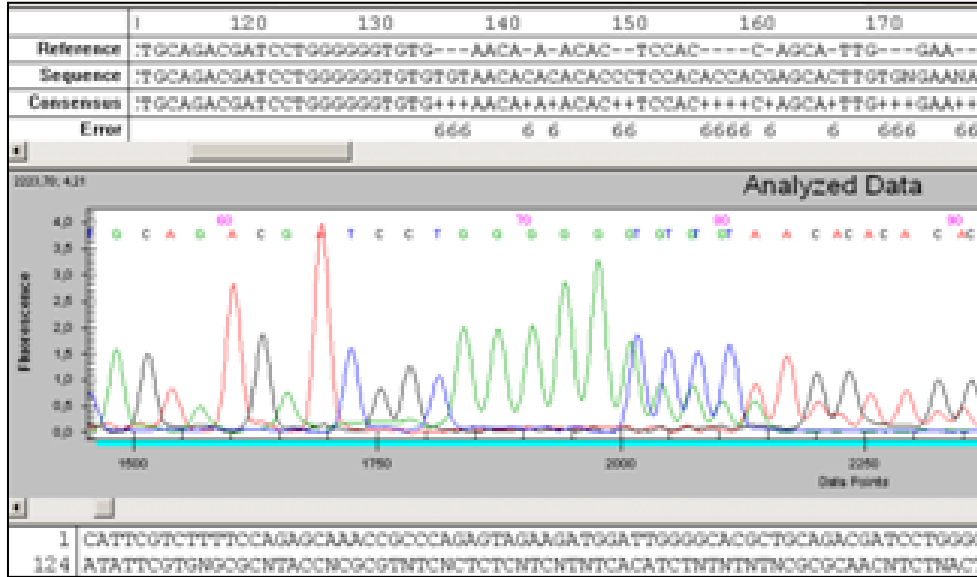
(Tablo 15'in devamı)

H10	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H11	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H12	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Homozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H13	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Homozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H14	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H15	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H16	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H17	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H18	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Heterozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H19	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H20	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H21	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H22	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Heterozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H23	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H24	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Heterozigot	Frameshift
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H25	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H26	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H27	GJB2	Değişim saptanmadı.				
	GJB6	c.666A>G	p.Ser222=	rs138571061	Heterozigot	Sinonim
H28	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H29	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H30	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H31	GJB2	c.457G>A	p.Val153Ile	rs111033186	Heterozigot	Missense
	GJB6	Değişim saptanmadı.				
H32	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H33	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H34	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	rs80338939	Heterozigot	Frameshift
		c.167delT	p.Leu56Argfs*26	rs80338942	Heterozigot	Frameshift
GJB6	Değişim saptanmadı.					
H35	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					
H36	GJB2 ve GJB6 genlerine ait değişim saptanmadı.					

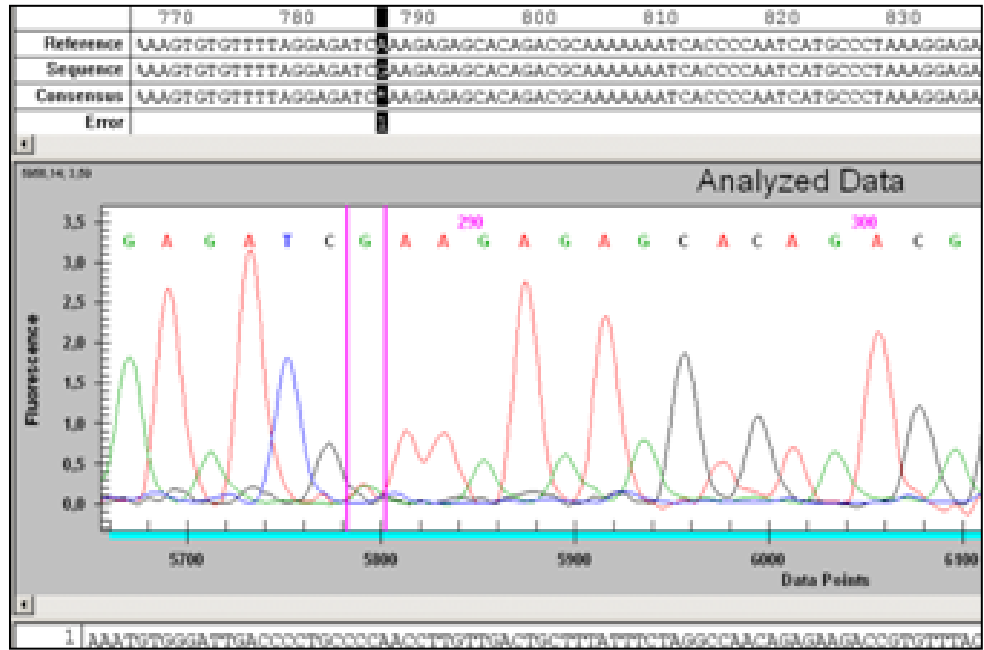
Sekans analizi ile saptanan değişimlerin görüntüleri Şekil 11-17'de gösterilmiştir.



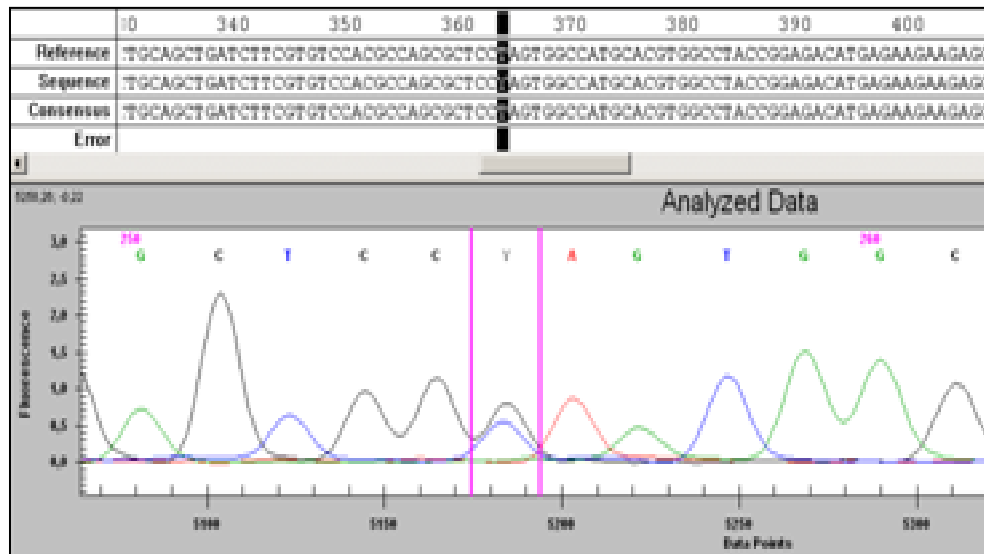
Şekil 11: H7'de saptanan GJB2 geni homozigot c.35delG mutasyonu. 35. pozisyonundaki guanin nükleotidinin delesyonu görülmektedir.



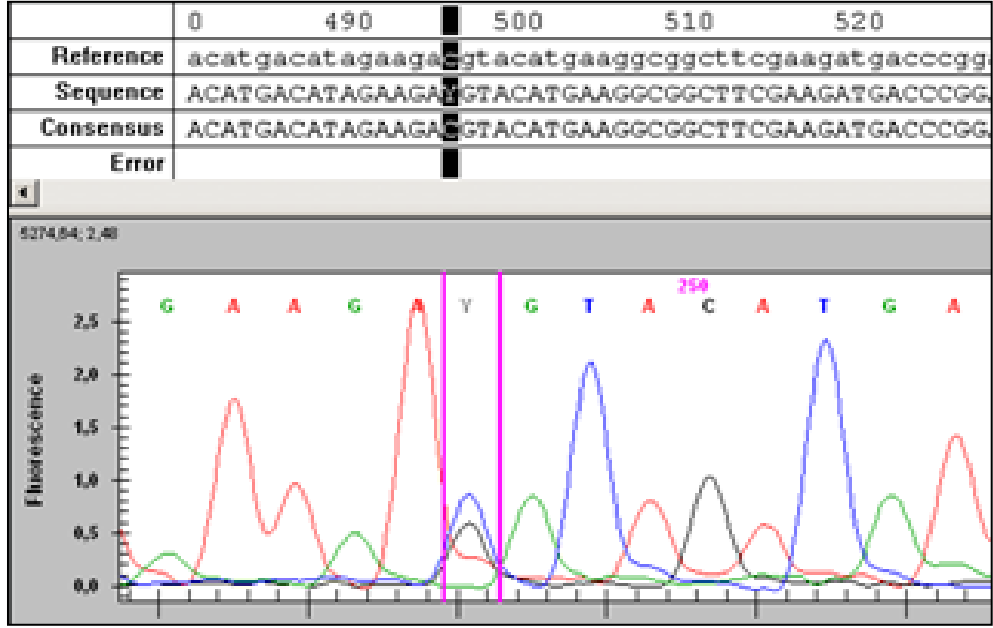
Şekil 12: H18'de saptanan GJB2 geni heterozigot c.35delG mutasyonu



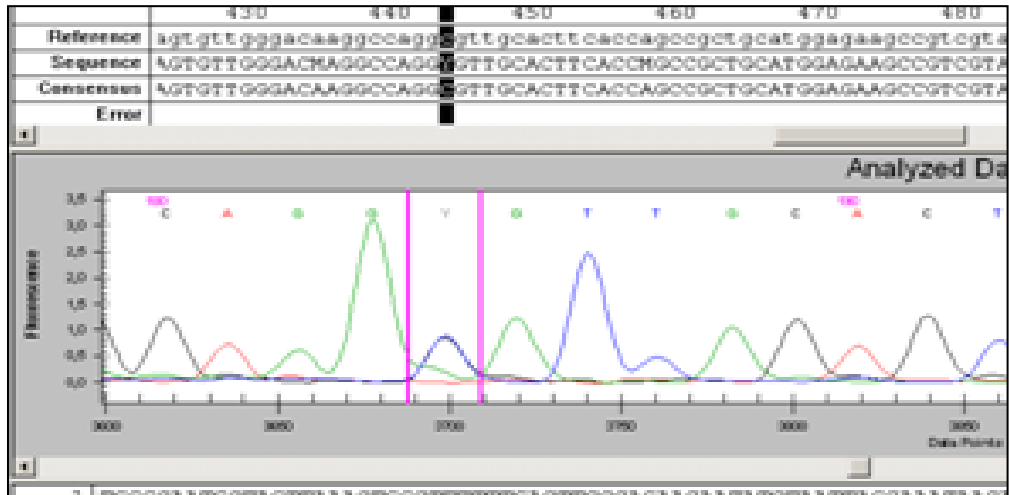
Şekil 13: H27'de saptanan GJB6 geni c.666A>G heterozigot değişimi



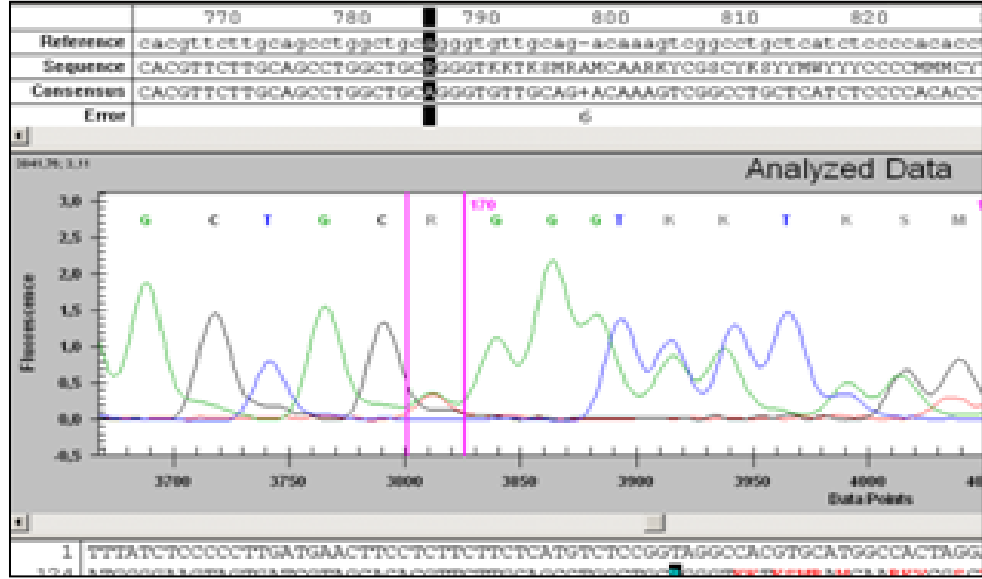
Şekil 14: H1'de saptanan GJB2 geni c.269T>C heterozigot değişimi



**Şekil 15:** H31’de saptanan GJB2 geni heterozigot c.457G>A değişimi (Reverse dizi)



**Şekil 16:** H2’de saptanan GJB2 geni heterozigot c.511G>A değişimi (Reverse dizi)



**Şekil 17:** H34'te saptanan GJB2 geni heterozigot c.167delT değişimi (Reverse dizi)

Saptanan genotipler ve olgu sayıları Tablo 16'da, saptanan değişimlere ait allel frekansları Tablo 17'de gösterilmiştir.

**Tablo 16:** Saptanan genotipler ve olgu sayısı

Değişim Saptanan Gen	Genotip	Olgu Sayısı
<b>GJB2</b>	c.35delG / c.35delG	4
	c.35delG / c.167delT	1
	c.35delG / wt	3
	c.269T>C / wt	1
	c.511G>A / wt	1
	c.457G>A / wt	1
<b>GJB6</b>	c.666A>G / wt	1
<b>GJB2 ve GJB6</b>	wt / wt	24
	<b>Toplam</b>	<b>36</b>

**Tablo 17:** Saptanan değişimler ve allel frekansları

Değişim	Allel Frekansı
c.35delG	% 16,6 (12/72)
c.167delT	% 1,38 (1/72)
c.269T>C	% 1,38 (1/72)
c.511G>A	% 1,38 (1/72)
c.666A>G	% 1,38 (1/72)
c.457G>A	% 1,38 (1/72)

## TARTIŞMA

Konjenital işitme kaybı 500 doğumda bir görülebilen en sık duyuşal bozukluktur. Genetik ve çevresel faktörlere bağlı ortaya çıkmaktadır. Genetik faktörlere bağlı olanların yaklaşık %70'i non-sendromik formdadır ve 100'den fazla gen tanımlanmıştır. İşitme kaybından sorumlu genler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında gap junction genleri önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda konjenital bilateral sensorinöral işitme kaybı tanısı konulan 36 hastanın işitme kaybının moleküler etiyojisinin belirlenmesi amacıyla gap junction genlerinden *GJB2* ve *GJB6* genlerinin kodlayıcı eksonları Sanger sekans yöntemi ile dizilenmiştir. *GJB2* geninde daha önceden tanımlanmış c.35delG, c.167delT, c.269T>C, c.457G>A, c.511G>A değişimleri saptanırken; *GJB6* genine ait sadece c.666A>G değişimi saptanmıştır.

*GJB2* gen mutasyonları, dünyada konjenital sensorinöral işitme kaybının en sık genetik nedeni olup yaklaşık prevalansı %17,3'tür. Biallelik *GJB2* mutasyonları en fazla %27 oranı ile Avrupa'da olup bunu; %17,8 ile Güney Afrika, %17,6 ile Kuzey Afrika, %17,4 ile Orta Doğu, %15,5 ile Asya, %13,9 ile Kuzey Amerika takip eder. En düşük oran Sahra-Altı Afrika'da olup %5,6'dır. Mutasyon tipleri toplumlara göre dağılım göstermektedir. Örneğin; Avrupa'da ve Orta Doğu'da 35delG, Doğu Asya'da 235delC, Güneydoğu Asya'da V37I, Hindistan'da W24X, Askenazi Yahudilerinde 167delT mutasyonları daha sık görölmektedir (12). Ülkemizde ise, yapılan çalışmalarda en sık *GJB2* mutasyonu 35delG olarak bildirilmiştir (13-20). Bizim çalışmamızda da biallelik 35delG mutasyonu %11,1 oranı (4/36) ile en sık görölen mutasyon olarak olarak saptanmıştır. Tekin ve ark. (17)'nin çalışmasında %14,5, Bayazit ve ark. (16)'nin çalışmasında %14,3 olarak bulunmuş ve çalışmamıza yakın oranlardır. Uyguner ve ark. (15)'nin çalışmasında %31,7, Kalay ve ark. (14)'nin çalışmasında ise %31,2 oranlarında daha yüksek olarak bulunmuştur. Bunun nedeninin hasta grubuyla ilişkili olabileceği düşünölmüştür.

Çalışmamızda 35delG mutasyonu 4 hastada (%11,1) homozigot, 3 hastada (%8,3) heterozigot, 1 hastada (%2,7) bileşik (kompound) heterozigot olmak üzere 8/36 (%22,2) hastada saptanmış olup allel frekansı %16,6 (12/72)'dir. Uyguner ve ark. (15)'nin çalışmasında allel frekansı %23 olup, bu oranın yüksek bulunmasının nedeninin otozomal resesif hasta grubunda çalışılmış olduğu düşünölmöktedir. Literatürde sadece ileri derecede işitme kayıplı hastalar seçilmiş olmasına rağmen

kalıtım paterni gözetilmeksizin yapılan çalışmalarda, çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tekin ve ark. (17)'nin çalışmasında %18,5, Baysal ve ark. (18)'nin çalışmasında %13, Yılmaz ve ark. (19)'nin çalışmasında %17 olarak bildirilmektedir.

*GJB2* genindeki 35delG (p.Gly12Valfs\*2) mutasyonu (rs80338939) 35. pozisyondaki guaninin delesyonu neticesinde çerçeve kaymasına neden olarak konneksin 26 proteinin sentezinin erken sonlanmasına neden olmaktadır (87). Homozigot 35delG saptanan hastalarda hafif düzeyden çok ileri düzeye kadar değişen derecelerde işitme kaybı görülebilir, fakat kaybın şiddetli düzeylerde olması daha sıktır (88). Hilgert ve ark. (89) homozigot 35delG saptanan hastalarda yaptıkları çalışmada kohleada eksprese olan *RPS23* ve *ATG10* genlerine ait tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) modifiye edici etkisi olabileceğini ve bireyler arasındaki fenotipik farklılıklarda rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Kalay ve ark. (14)'nin 96 hastayı kapsayan otozomal resesif çalışma grubunda 35delG saptanan 5 hastada bilateral çok ileri; 3 hastada bir tarafta ileri, bir tarafta çok ileri ve 4 hastada bilateral çok ileri düzeylerde işitme kaybı saptanırken 8 hastanın odyolojik sonuçları bilinmemektedir. Ocağ ve ark. (90)'nin 50 hastayı kapsayan otozomal resesif çalışma grubunda 35delG saptanan 7 hastada bilateral çok ileri; 1 hastada bir tarafta ileri, bir tarafta çok ileri düzeyde işitme kaybı saptanmıştır. Çalışmamızda ise; homozigot 35delG saptanan 4 hastanın tümünde işitme kaybı bilateral ve çok ileri düzeyde idi.

Genellikle *GJB2* genine ait her iki allelde truncate tipi mutasyon bulunan hastalarda, bir allelinde non-truncate bir allelinde truncate tip mutasyon bulunanlara göre daha ağır işitme kaybı bulunur. Her iki allelinde non-truncate tip mutasyon bulunanlar ise bu iki gruba göre daha hafif seyirlidir (91, 92). Çalışmamızda tamamı prelingual başlangıçlı ve bilateral çok ileri düzeyde işitme kaybı bulunan homozigot 35delG saptanan 4 hasta ve 35delG/167delT saptanan H34 bu bulguyu desteklemektedir.

*GJB2* geninin 167. pozisyonundaki timin bazının delesyonu ile karakterize olan 167delT (rs80338942) mutasyonunda; ilk 56 amino asit doğru şekilde kodlanır fakat protein dizisi, takip eden 25 farklı amino asit ile erkenden sonlanır (p.Leu56Argfs\*26) (93). Bizim çalışmamızda 167delT mutasyonu sadece bir vakada 35delG ile bileşik heterozigot olarak saptanmıştır. Taşıyıcılık oranı en yüksek Askenazi Yahudi toplumunda görülmekte olup, bu oran %4,03'tür ve *GJB2* mutant allellerinin %84'ünü oluşturmaktadır (91, 94). Bu durumun 'founder effect' nedeniyle

olduğu düşünölmektedir. Diğer toplumlarda bu mutasyon daha çok sporadik olarak görölmektedir. Dzhemileva ve ark. (95)'nin Doğu Avrupa, Sibiry ve Orta Asya'yı kapsayan 18 toplumda ve 2038 sağlıklı bireyde yaptığı çalışmada taşıyıcılığı Çuvaş Türklerinde 1/100 oranında, Komi-Permyak toplumunda 2/80 oranında saptamışlardır. Batissoco ve ark. (96)'nin Brezilya'da 300 işitme kayıplı hasta ile yaptığı çalışmada 2 hastada heterozigot olarak saptanmıştır. Bonyadi ve ark. (97) İnan'da 508 hastayı içeren otozomal resesif işitme kayıplı grupta bu mutasyonu 1 hastada homozigot olarak saptamışlardır. İtalya'da ise 196 hastadaki allelik frekansı %2,2 olarak belirlenmiştir (98). 167delT mutasyonu ölkemizde yapılan çalışmalarda sadece Tekin ve ark. (17) tarafından, çalışmamızda olduğu gibi bir vakada 35delG ile bileşik heterozigot olarak bildirilmiş olup allel frekansı %0,3'tür. Bizim alışmamızda muhtemelen vaka sayımızın azlığı nedeniyle bu oran daha yüksek saptanmış olup 1/72 (%1,38)'dir.

*GJB2* geninin 269. pozisyonundaki timinin sitozine dönüşümü (rs80338945) sonucunda protein dizisindeki 90. amino asit olan lösin proline (p.Leu90Pro) dönüşmektedir. Çalışmamızda p.Leu90Pro değişimi, prelingual başlangıçlı çok ileri düzeyde işitme kaybı olan H1'de heterozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyon Avusturya'da 35delG'den sonra en sık görölen ikinci mutasyon olup, hastalıkla ilişkili *GJB2* allelleri içinde %9,8-16,7 oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durumun 'founder effect' nedeniyle olabileceği düşünölmektedir (99, 100). p.Leu90Pro değişimi fonksiyon kaybettirici özelliğinde bir mutasyon olup, *Xenopus* oositleri ile yapılan fonksiyonel çalışmada eşlenmiş hücrelerin arasında homotipik kanal bağlantısının oluşmadığı gösterilmiştir (101). Buna rağmen, bu mutasyonu taşıyan bireylerin daha ılımlı fenotipe sahip olmaya eğilimli olduğu, hafif-orta düzeyde işitme kaybının göröldüğu bildirilmiştir (88, 91, 92). Ölkemizde yapılan çalışmalarda ise; Tekin ve ark. (17) bir probandin babasında 35delG ile bileşik (kompond) heterozigot olarak bildirmiştir fakat klinik bilgisi bulunmamaktadır. Yılmaz ve ark. (19)'nin yaptığı çalışmada ise çok ileri düzeyde işitme kaybı olan ve homozigot olarak bildirilen bir olgu mevcut olup, bu mutasyonun allelik frekansı %0,3 olarak hesaplanmıştır. Bizim alışmamızda ise p.Leu90Pro değişiminin allelik frekansı 1/72 (%1,38)'dir.

Postlingual başlangıçlı ve bilateral çok ileri düzeyde işitme kaybı olan H31'de *GJB2* geninde heterozigot olarak saptanan p.Val153Ile değişiminin (rs111033186) alışmamızdaki allelik frekansı 1/72 (%1,38)'dir. 457. pozisyonundaki guaninin adenine



dönüşümü (c.457G>A) sonucunda protein düzeyinde 153. amino asit olan valinin izolösine dönüşmesine (p.Val153Ile) neden olan bu değişimin patojenitesi tartışmalıdır. SIFT (skor:1) ve PolyPhen-2 (skor:0,005) veri tabanında 'benign' olarak değerlendirilirken, Mutation Taster'a göre protein özellikleri etkilenebilir ve hastalık yapıcı (prob:0,815) olarak değerlendirilmektedir. DVD (<http://deafnessvariationdatabase.org>) veri tabanına göre ise benign bir varyant olarak değerlendirilmektedir. Guerci ve ark. (102), konuşma geriliği olan fakat işitme kaybı bulunmayan bir hastada bu değişimi heterozigot olarak saptamışlardır. Hastanın postlingual bilateral işitme kaybı bulunan babasında ve sağlıklı olan annesinde bu değişim heterozigot olarak saptanmıştır, bu nedenle olasılıkla patojenik öneminin olmadığını belirtmişlerdir. Bıyıklı ve ark. (103)'ün prelingual otozomal resesif non-sendromik işitme kaybı bulunan hastalarda yaptıkları çalışmada bu değişim heterozigot olarak 5 hastada saptanmıştır ve allelik frekansı %4,9'dur. 90 bireyden oluşan kontrol grubunda ise 6 bireyde heterozigot olarak saptanmış ve allelik frekansı %6,6 olarak bulunmuştur. Bayazit ve ark. (16), 14 ailede yaptıkları çalışmada 2 bireyde p.Val153Ile saptamış ve polimorfizm olarak değerlendirmişlerdir. Wu ve ark. (104) bu değişimi T8M mutasyonu ile bileşik heterozigot olarak tanımlayarak patojenik olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bunun yanında ileri derecede işitme kaybı olan bir bireyde homozigot olarak da tanımlanmıştır (105). Meşe ve ark. (106)'nın *Xenopus* oositleri ile yaptığı fonksiyonel çalışmada bu değişimin, hücrelerarası fonksiyonel kanal oluşumunun bozulmasına neden olduğu saptanmıştır. Bunun aksine Guerci ve ark. (102), memeli hücresi olan HeLa hücrelerinde bu fonksiyonun korunduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da bir hastada heterozigot olarak saptadığımız bu değişim; American College of Medical Genetics (ACMG)' ye göre amino asit dizisinde değişime neden olması ve ExAC (The Exome Aggregation Consortium) veri tabanında allel frekansının % 5'ten az olması nedeniyle ve fonksiyonel çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda 'klinik önemi belirsiz varyant' olarak değerlendirilmiştir. Bu değişimin diğer genlerde bulunan olası mutasyonlarla beraber hastanın kliniğinde rol oynayabileceği de göz ardı edilmemelidir.

*GJB2* genindeki c.511G>A değişimi (rs201004645); 511. pozisyondaki guanin nükleotidin adenine dönüşmesi sonucunda meydana gelir. Bunun sonucunda konneksinin EC2 (ikinci ekstrasellüler lup) bölgesinde, nonpolar bir amino asitten polar bir amino asite; alaninden treonine dönüşüm (p.Ala171Thr) meydana gelir (104). Çalışmamızda prelingual başlangıçlı çok ileri düzeyde işitme kaybı olan ve

temporal kemik görüntüleme bilgisi olmayan H2'de bu değişim heterozigot olarak saptanmış olup allelik frekansı 1/72 (%1,38)' dir. İn siliko veri tabanlarında, SIFT'e göre tolere edilebilir (skor:0,5), PolyPhen-2'ye göre benign (skor:0,273), Mutation Taster'a göre polimorfizm (prob:0.99) olarak değerlendirilen bu değişimin allelik frekansı ExAC'a göre %5'ten az olup, türler arası korunmanın az olduğu bilinmektedir. Bu değişim ile ilgili fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. American College of Medical Genetics (ACMG)'e göre 'klinik önemi belirsiz varyant' olarak değerlendirilebilir. Literatürde bahsedilen çalışmalarda da patojenite açısından sınıflandırılmamıştır. Bu değişimi ilk kez; Lin ve ark. (107), tek taraflı iç kulak yolu darlığı ve kohlear sinir aplazisi olan bir hastada heterozigot olarak saptamışlardır. Wu ve ark. (104), çocukluk çağı işitme kaybı olan 324 hastayı kapsayan çalışmasında; bu değişimi Lin ve ark. (107)'na benzer şekilde orta düzeyde işitme kaybı olan ve kohlea anomalisi olan bir hastada heterozigot olarak saptamışlardır, allel frekansı % 0,8'dir. Fakat bu çalışmalarda *SLC26A4* geni gibi kohlear anomalilerle ilişkili olan genler incelenmemiştir. İnan'da yapılan bir meta analizde p.Ala171Thr değişiminin sıklığı %0,05 olarak belirlenmiştir (108). Nishio ve ark. (109)'nın Japonya'da yaptığı 1120 non-sendromik işitme kayıplı bireyi ve 269 sağlıklı bireyi kapsayan kohortta, bu değişim 1 hastada heterozigot olarak saptanırken sağlıklı bireylerde saptanmamıştır. Han ve ark. (110)'nın Kore'de *GJB2* mutasyon taşıyıcılığını saptamak amacıyla, normal işitmeye sahip 2072 yenidoğanda yaptığı çalışmada, bir olguda heterozigot olarak saptanmıştır (allel frekansı %0,02). Bu çalışmalarda da olduğu gibi çalışmamızda p.Ala171Thr değişimi saptanan olgu H2'deki işitme kaybından bu değişimin sorumlu olmadığı görülmektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda ise bu değişim saptanmamıştır (13-17, 19, 20).

Konjenital sensorinöral işitme kaybından sorumlu olabilen diğer bir gen konneksin 30 proteinini kodlayan gen *GJB6*'dır. Bu gen ile ilgili literatürde bildirilen olgulara bakacak olursak; Grifa ve ark. (23) tarafından geç başlangıçlı ve orta-yüksek frekanslarda görülen, otozomal dominant ve non-sendromik formda işitme kaybı olan bir ailede T5M mutasyonu tanımlanmıştır. Nishio ve ark. (109)'nın Japonya'da yaptığı kohort çalışmasında; c.689dupA değişimi hasta grubuna ait 9 allelde saptanırken, sağlıklı bireylerde saptanmamış ve bu nedenle işitme kaybıyla ilişkilendirilmiştir. Yang ve ark. (111) p.A40V değişiminin non-sendromik işitme kaybıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Oh ve ark. (66) ise p.A40V değişiminin patojenik olmadığını yaptıkları fonksiyonel çalışma ile göstermişlerdir. Çalışmamızda

ise bu gende; sağda hafif, solda çok ileri düzeyde işitme kaybı olan olgu H27'de c.666A>G değişimi (rs138571061) heterozigot olarak saptanmış olup allelik frekansı 1/72 (%1,38)'dir. Bu değişim, protein düzeyinde amino asit değişimine yol açmamaktadır (p.Ser222=). İn siliko veri tabanlarında, SIFT'e göre tolere edilebilir (skor:0,4), Mutation Taster'a göre polimorfizm (prob:0,99) olarak değerlendirilen bu değişimin allelik frekansı ExAC'a göre %5'ten azdır. Literatürde de c.666A>G değişiminin saptandığı vaka bildirilmemiştir, dolayısıyla bu değişimin klinik önemi bilinmemektedir. Ülkemizde dizi analizi tekniği ile yapılan çalışmalarda, Tekin ve ark. (17) *GJB6* geninde herhangi bir değişim saptamamışlardır.

Konjenital işitme kayıplı olgulardaki genetik heterojenite etiolojinin aydınlatılmasını güçleştirmektedir. Çalışmamızda 31 olguda (%86,1) *GJB2* ve *GJB6* genlerinin sekans analizi ile işitme kaybı etiolojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır. *GJB2* geninde heterozigot 35delG saptanan postlingual ve ileri-çok ileri düzeylerde işitme kaybına sahip olan 3 olgu (H18, H22, H24) ve yine *GJB2* geninde heterozigot p.Leu90Pro saptanan prelingual ve çok ileri düzeyde işitme kayıplı olgu H1'de ise eşlik eden başka mutasyonlar veya digenik kalıtılan genlerdeki mutasyonların sorumlu olma olasılığı bulunmaktadır. Bunun yanında değişken penetrans, sağlam allelin epigenetik inaktivasyonu da söz konusu olabilmektedir. Bununla beraber bu değişimler raslantısal olarak da saptanmış olabilir. Yapılan çalışmalarda *GJB2* geninde 35delG mutasyon taşıyıcılığının sık olduğu saptanmıştır. Ankara için 1/78, İstanbul için 1/120 olarak bulunmuştur (74, 75). Bu nedenle çalışmamızdaki söz konusu olgular için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

İşitme kaybı gibi genetiği oldukça heterojen hastalıklarda yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanımı ve gelişimiyle tanı imkanı artmıştır. Buna rağmen, Seco ve ark. (112) tüm ekzom sekanslama ile yaptıkları panel gen çalışması ile %33,5 oranında, Shearer ve ark. (113) yeni nesil dizileme ile işitme kaybı ile ilişkili genlerde kopya numara sayısı değişimlerine yönelik çalışmada %38,9 oranında tanı imkanı sağlayabilmişlerdir. Halen bilinen lokus sayısının, tanımlı gen sayısından fazla olması aday gen çalışmalarına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Artan genetik tanı oranı hastalara daha fazla genetik danışma imkanı sağlayacaktır. Bu sayede riskli bireylerin belirlenmesi, preimplantasyon genetik tanı (PGT), prenatal veya postnatal dönemde erkenden tanı konulması, tedavi ve rehabilitasyonun zaman kaybedilmeden başlanmasını sağlayabilecek; böylelikle

kişinin dil ve zihinsel gelişimine olumlu katkı sağlayarak hem kendisi hem de toplum için yararlı olacaktır.

## SONUÇLAR

1. Çalışmamıza bilateral sensorinöral işitme kaybı olan 29'u (%80,6) prelingual başlangıçlı, 7'si (%19,4) postlingual başlangıçlı olan 36 hasta dahil edildi. Bu hastalarda *GJB2* ve *GJB6* genlerinin kodlayıcı eksonları ve ekson-intron bileşkeleri Sanger sekans ile analiz edildi. 36 olgunun 5'inde işitme kaybını açıklayabilecek patojenik olarak kabul edilen değişimler saptanmış olup, *GJB2* geni 35delG mutasyonu; 4/36 olguda (%11,1) homozigot (35delG/35delG), 1/36 olguda (%2,7) ise 167delT ile bileşik heterozigot (35delG/167delT) olarak saptanmıştır.

2. 35delG mutasyonu 3/36 olguda (%8,3) ise heterozigot olarak saptandı. Toplamda bu mutasyon için allel frekansı 2/72 (%16,6)'dir.

3. 35delG ile bileşik heterozigot olarak bir hastada saptanan 167delT'nin ve bir hastada heterozigot olarak saptanan p.Leu90Pro'nun allelik frekansı 1/72 (%1,38)'dir.

4. Patojenitesi tartışmalı olan *GJB2* genindeki p.Val153Ile, p.Ala171Thr değişimleri, ve *GJB6* genindeki p.Ser222= değişimi için allel frekansı 1/72 (%1,38)'dir.

5. 31/36 olgunun (%86,1) işitme kaybı etiyojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır.

6. Sonuç olarak, 35delG mutasyonu çalışma grubumuzdaki konjenital işitme kayıplı bireylerde en sık görülen mutasyon olarak belirlenmiştir.

7. *GJB2* gen analizi, işitme kayıplı hastalarda ilk sıra test olmalıdır. Bu gende mutasyon saptanmayan veya heterozigot mutasyon saptanan olgulara sonraki aşamada işitme kaybı etiyojisinde rol aldığı belirlenmiş olan diğer genleri içeren panel test çalışmaları yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-Six Genes Causing Nonsyndromic Hearing Impairment: Which Ones Should Be Analyzed in DNA Diagnostics? *Mutat Res.* 2009;681(2-3):189-96.
2. Parker M, Bitner-Glindzicz M. Republished: Genetic Investigations in Childhood Deafness. *Postgraduate Medical Journal.* 2015;91(1077):395-402.
3. Jasper KM, Jamshidi A, Reilly BK. Pediatric Otolaryngology, Molecular Diagnosis of Hereditary Hearing Loss: Next-Generation Sequencing Approach. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;23(6):480-4.
4. Kalatzis V, Petit C. The Fundamental and Medical Impacts of Recent Progress in Research on Hereditary Hearing Loss. *Human Molecular Genetics.* 1998;7(10):1589-97.
5. Robson CD. Congenital Hearing Impairment. *Pediatric Radiology.* 2006;36(4):309-24.
6. Van Camp G SR. Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>. Erişim tarihi: 3 Ocak 2017.
7. Kim HR, Oh SK, Lee ES, Choi SY, Roh SE, Kim SJ, et al. The Pathological Effects of Connexin 26 Variants Related to Hearing Loss by in Silico and in Vitro Analysis. *Hum Genet.* 2016;135(3):287-98.
8. Stöver T, Diensthuber M. Molecular Biology of Hearing. *Laryngo Rhino Otologie.* 2011;90(1):S22.
9. The UCSC Human Genome Browser. <https://genome.ucsc.edu/>. Erişim tarihi: 9 Ocak 2017.
10. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>. Erişim tarihi: 8 Ocak 2017.
11. Kim SY, Kim AR, Kim NK, Lee C, Kim MY, Jeon EH, et al. Unraveling of Enigmatic Hearing-Impaired GJB2 Single Heterozygotes by Massive Parallel Sequencing: DFNB1 or Not? *Medicine (Baltimore).* 2016;95(14):e3029.

12. Chan DK, Chang KW. GJB2-Associated Hearing Loss: Systematic Review of Worldwide Prevalence, Genotype, and Auditory Phenotype. *The Laryngoscope*. 2014;124(2):E34-E53.
13. Tekin M, Arıcı ZS. Genetic Epidemiological Studies of Congenital/Prelingual Deafness in Turkey: Population Structure and Mating Type Are Major Determinants of Mutation Identification. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143(14):1583-91.
14. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A. GJB2 Mutations in Turkish Patients with Arnsht: Prevalence and Two Novel Mutations. *Hear Res*. 2005;203(1-2):88-93.
15. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of Gap-and Tight-Junction Mutations in Turkish Families with Autosomal-Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. *Clinical Genetics*. 2003;64(1):65-9.
16. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJH, et al. GJB2 Gene Mutations Causing Familial Hereditary Deafness in Turkey. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2003;67(12):1331-5.
17. Tekin M, Duman T, Boğoçlu G, İncesulu A, Çomak E, İlhan İ, et al. Spectrum of GJB2 Mutations in Turkey Comprises Both Caucasian and Oriental Variants: Roles of Parental Consanguinity and Assortative Mating. *Human Mutation*. 2003;21(5):552-3.
18. Baysal E, Bayazit YA, Ceylaner S, Alatas N, Donmez B, Ceylaner G, et al. GJB2 and Mitochondrial A1555G Gene Mutations in Nonsyndromic Profound Hearing Loss and Carrier Frequencies in Healthy Individuals. *Journal of Genetics*. 2008;87(1):53-7.
19. Yilmaz A, Menevse S, Bayazit Y, Karamert R, Ergin V, Menevse A. Two Novel Missense Mutations in the Connexin 26 Gene in Turkish Patients with Nonsyndromic Hearing Loss. *Biochemical Genetics*. 2010;48(3-4):248-56.
20. Atik T, Onay H, Aykut A, Bademci G, Kirazli T, Tekin M, et al. Comprehensive Analysis of Deafness Genes in Families with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142154.

21. Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P, Plauchu H, Levilliers J, Morgon A, et al. A Gene Responsible for a Dominant Form of Neurosensory Non-Syndromic Deafness Maps to the NSRD1 Recessive Deafness Gene Interval. *Human Molecular Genetics*. 1994;3(12):2219-22.
22. Piazza V, Beltramello M, Menniti M, Colao E, Malatesta P, Argento R, et al. Functional Analysis of R75Q Mutation in the Gene Coding for Connexin 26 Identified in a Family with Nonsyndromic Hearing Loss. *Clinical Genetics*. 2005;68(2):161-6.
23. Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, et al. Mutations in GJB6 Cause Nonsyndromic Autosomal Dominant Deafness at DFNA3 Locus. *Nature Genetics*. 1999;23(1):16-8.
24. Tarkan Ö, Sari P, Demirhan O, Kiroğlu M, Tuncer Ü, Sürmeliöğlu Ö et al. Connexin 26 and 30 Mutations in Paediatric Patients with Congenital, Non-Syndromic Hearing Loss Treated with Cochlear Implantation in Mediterranean Turkey. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2013;127(01):33-7.
25. Moller AR. *Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System*. Texas: Elsevier 2006:3-17.
26. Aslan A. Kulak Anatomisi, Koç C. ed. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2013:47-63.
27. Willems PJ. Genetic Causes of Hearing Loss. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(15):1101-9.
28. Maroonroge S, Emanuel DC, Letowski TR. *Basic Anatomy of the Hearing System*. *Helmet-Mounted Displays: Sensation, Perception and Cognition Issues*. Fort Rucker, Alabama: US Army Aeromedical Research Laboratory. 2000:279-306.
29. Alberti PW. The Anatomy and Physiology of the Ear and Hearing. In: Goelzer B, Hansen CH, Sehrndt G, eds. *Occupational exposure to noise: Evaluation, prevention, and control*. World Health Organisation 2001:53-62.
30. Raphael Y, Altschuler RA. Structure and Innervation of the Cochlea. *Brain Research Bulletin*. 2003;60(5-6):397-422.
31. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in Hereditary Deafness. *The Lancet*. 2001;358(9287):1082-90.



32. Belgin E. İşitme Fizyolojisi, Koç C. ed. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2013: 65-72.
33. Kılıç R, Ünlü İ. Sensörinöral İşitme Kayıpları, Koç C. ed. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2013: 239-57.
34. Genç G A, Belgin E. Temel Odyoloji, Koç C. ed. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2013:73-86.
35. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB. Genetics of Hearing Loss: Syndromic. *Otolaryngol Clin North Am.* 2015;48(6):1041-61.
36. Vozzi D, Morgan A, Vuckovic D, D'Eustacchio A, Abdulhadi K, Rubinato E, et al. Hereditary Hearing Loss: A 96 Gene Targeted Sequencing Protocol Reveals Novel Alleles in a Series of Italian and Qatari Patients. *Gene.* 2014;542(2):209-16.
37. Özkarakaş H. İşitme Kaybı ve Genetik. Koç C. ed. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi 2013:87-110.
38. Coppede F. Risk Factors for Down Syndrome. *Arch Toxicol.* 2016;90(12):2917-29.
39. Ramia M, Musharrafieh U, Khaddage W, Sabri A. Revisiting Down Syndrome from the Ent Perspective: Review of Literature and Recommendations. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(5):863-9.
40. Morisada N, Nozu K, Iijima K. Branchio-Oto-Renal Syndrome: Comprehensive Review Based on Nationwide Surveillance in Japan. *Pediatr Int.* 2014;56(3):309-14.
41. Brophy PD, Alasti F, Darbro BW, Clarke J, Nishimura C, Cobb B, et al. Genome-Wide Copy Number Variation Analysis of a Branchio-Oto-Renal Syndrome Cohort Identifies a Recombination Hotspot and Implicates New Candidate Genes. *Hum Genet.* 2013;132(12):1339-50.
42. Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, et al. PDZD7 Is a Modifier of Retinal Disease and a Contributor to Digenic Usher Syndrome. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1812-23.
43. Mathur P, Yang J. Usher Syndrome: Hearing Loss, Retinal Degeneration and Associated Abnormalities. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(3):406-20.

44. Plantinga RF, Kleemola L, Huygen PL, Joensuu T, Sankila EM, Pennings RJ, et al. Serial Audiometry and Speech Recognition Findings in Finnish Usher Syndrome Type III Patients. *Audiol Neurotol.* 2005;10(2):79-89.
45. Savige J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG, Colville D. Ocular Features in Alport Syndrome: Pathogenesis and Clinical Significance. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):703-9.
46. Polanski JF, Plawiak AC, Ribas A. Hearing Rehabilitation in Treacher Collins Syndrome with Bone Anchored Hearing Aid. *Revista Paulista de Pediatria (English Edition).* 2015;33(4):483-7.
47. Vincent M, Genevieve D, Ostertag A, Marlin S, Lacombe D, Martin-Coignard D, et al. Treacher Collins Syndrome: A Clinical and Molecular Study Based on a Large Series of Patients. *Genet Med.* 2016;18(1):49-56.
48. Chang KW. Genetics of Hearing Loss--Nonsyndromic. *Otolaryngol Clin North Am.* 2015;48(6):1063-72.
49. Fang Q, Indzhukulian AA, Mustapha M, Riordan GP, Dolan DF, Friedman TB, et al. The 133-kDa N-Terminal Domain Enables Myosin 15 to Maintain Mechanotransducing Stereocilia and Is Essential for Hearing. *Elife.* 2015;4.
50. Avraham KB. What's Hot About Otoferlin. *EMBO J.* 2016;35(23):2502-4.
51. Yasunaga Si, Grati Mh, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, et al. A Mutation in OTOF, Encoding Otoferlin, a Fer-1-Like Protein, Causes DFNB9, a Nonsyndromic Form of Deafness. *Nature Genetics.* 1999;21(4):363-9.
52. Yildirim-Baylan M, Bademci G, Duman D, Ozturkmen-Akay H, Tokgoz-Yilmaz S, Tekin M. Evidence for Genotype-Phenotype Correlation for OTOF Mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014;78(6):950-3.
53. Noonan KY, Russo J, Shen J, Rehm H, Halbach S, Hopp E, et al. CDH23 Related Hearing Loss: A New Genetic Risk Factor for Semicircular Canal Dehiscence? *Otol Neurotol.* 2016;37(10):1583-8.
54. Wolf A, Frohne A, Allen M, Parzefall T, Koenighofer M, Schreiner MM, et al. A Novel Mutation in SLC26A4 Causes Nonsyndromic Autosomal Recessive Hearing Impairment. *Otol Neurotol.* 2017;38(2):173-9.

55. Imtiaz A, Maqsood A, Rehman AU, Morell RJ, Holt JR, Friedman TB, et al. Recessive Mutations of TMC1 Associated with Moderate to Severe Hearing Loss. *Neurogenetics*. 2016;17(2):115-23.
56. Naito T, Nishio SY, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, et al. Comprehensive Genetic Screening of Kcnq4 in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63231.
57. Pollak A, Lechowicz U, Kedra A, Stawinski P, Rydzanicz M, Furmanek M, et al. Novel and De Novo Mutations Extend Association of POU3F4 with Distinct Clinical and Radiological Phenotype of Hearing Loss. *PLoS One*. 2016;11(12):e0166618.
58. Smeds H, Wales J, Asp F, Löfkvist U, Falahat B, Anderlid B-M, et al. X-Linked Malformation and Cochlear Implantation. *Otology & Neurotology*. 2017;38(1):38-46.
59. Cryns K, Thys S, Van Laer L, Oka Y, Pfister M, Van Nassauw L, et al. The WFS1 Gene, Responsible for Low Frequency Sensorineural Hearing Loss and Wolfram Syndrome, Is Expressed in a Variety of Inner Ear Cells. *Histochemistry and Cell Biology*. 2003;119(3):247-56.
60. Behloul A, Bonnet C, Abdi S, Hasbellaoui M, Boudjenah F, Hardelin JP, et al. A Novel Biallelic Splice Site Mutation of Tecta Causes Moderate to Severe Hearing Impairment in an Algerian Family. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;87:28-33.
61. Tsukada K, Ichinose A, Miyagawa M, Mori K, Hattori M, Nishio SY, et al. Detailed Hearing and Vestibular Profiles in the Patients with Coch Mutations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:100S-10S.
62. Kim BJ, Kim AR, Han KH, Rah YC, Hyun J, Ra BS, et al. Distinct Vestibular Phenotypes in DFNA9 Families with Coch Variants. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(10):2993-3002.
63. Aypek H, Bay V, Mese G. Altered Cellular Localization and Hemichannel Activities of KID Syndrome Associated Connexin26 I30N and D50Y Mutations. *BMC Cell Biol*. 2016;17:5.
64. Petit C, Levilliers J, Hardelin J-P. Molecular Genetics of Hearing Loss. *Annual Review of Genetics*. 2001;35(1):589-645.

65. Oshima A. Structure and Closure of Connexin Gap Junction Channels. *FEBS Lett.* 2014;588(8):1230-7.
66. Oh SK, Choi SY, Yu SH, Lee KY, Hong JH, Hur SW, et al. Evaluation of the Pathogenicity of GJB3 and GJB6 Variants Associated with Nonsyndromic Hearing Loss. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(1):285-91.
67. Bai D, Wang AH. Extracellular Domains Play Different Roles in Gap Junction Formation and Docking Compatibility. *Biochem J.* 2014;458(1):1-10.
68. Cottrell GT, Burt JM. Heterotypic Gap Junction Channel Formation between Heteromeric and Homomeric Cx40 and Cx43 Connexons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2001;281(5):C1559-C67.
69. Li TC, Kuan YH, Ko TY, Li C, Yang JJ. Mechanism of a Novel Missense Mutation, p.V174M, of the Human Connexin31 (GJB3) in Causing Nonsyndromic Hearing Loss. *Biochem Cell Biol.* 2014;92(4):251-7.
70. Kiang DT, Jin N, Tu Z-J, Lin HH. Upstream Genomic Sequence of the Human Connexin26 Gene. *Gene.* 1997;199(1):165-71.
71. Mikstiene V, Jakaitiene A, Byckova J, Gradauskiene E, Preiksaitiene E, Burnyte B, et al. The High Frequency of GJB2 Gene Mutation c.313\_326del14 Suggests Its Possible Origin in Ancestors of Lithuanian Population. *BMC Genet.* 2016;17:45.
72. Locher H, de Groot JC, van Iperen L, Huisman MA, Frijns JH, Chuva de Sousa Lopes SM. Development of the Stria Vascularis and Potassium Regulation in the Human Fetal Cochlea: Insights into Hereditary Sensorineural Hearing Loss. *Dev Neurobiol.* 2015;75(11):1219-40.
73. Burke WF, Warnecke A, Schoner-Heinisch A, Lesinski-Schiedat A, Maier H, Lenarz T. Prevalence and Audiological Profiles of GJB2 Mutations in a Large Collective of Hearing Impaired Patients. *Hear Res.* 2016;333:77-86.
74. Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH, Xia X J, Liu X Z et al. Connexin 26 ( GJB2 ) Mutations in the Turkish Population: Implications for the Origin and High Frequency of the 35delG Mutation in Caucasians. *Human Genetics.* 2001;108(5):385-9.
75. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Spectrum of Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in Turkish Families with Inherited

Nonsyndromic Deafness and Determination of the GJB2 35delG Mutation Carrier Frequency in Turkish Population. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(S1):283.

76. Tekin M, Arnos K, Xia X, Oelrich M, Liu XZ, Nance W, et al. W44C Mutation in the Connexin 26 Gene Associated with Dominant Non-Syndromic Deafness. *Clinical Genetics.* 2001;59(4):269-73.

77. Dalamon VK, Buonfiglio P, Larralde M, Craig P, Lotersztejn V, Choate K, et al. Connexin 26 (GJB2) Mutation in an Argentinean Patient with Keratitis-Ichthyosis-Deafness (KID) Syndrome: A Case Report. *BMC Med Genet.* 2016;17(1):37.

78. Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA. A Connexin 26 Mutation Causes a Syndrome of Sensorineural Hearing Loss and Palmoplantar Hyperkeratosis (MIM 148350). *Journal of Medical Genetics.* 2000;37(1):50-1.

79. Zhang M, Song K, Ding N, Shu C, Wang Y. Using a Distant Abdominal Skin Flap to Treat Digital Constriction Bands: A Case Report for Vohwinkel Syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(6):e2762.

80. Richard G, Brown N, Ishida-Yamamoto A, Krol A. Expanding the Phenotypic Spectrum of Cx26 Disorders: Bart-Pumphrey Syndrome Is Caused by a Novel Missense Mutation in GJB2. *J Invest Dermatol.* 2004;123(5):856-63.

81. Avshalumova L, Fabrikant J, Koriakos A. Overview of Skin Diseases Linked to Connexin Gene Mutations. *International journal of dermatology.* 2014;53(2):192-205.

82. Teubner B. Connexin30 (GJB6)-Deficiency Causes Severe Hearing Impairment and Lack of Endocochlear Potential. *Human Molecular Genetics.* 2003;12(1):13-21.

83. Chinetti V, Iossa S, Auletta G, Corvino V, De Luca M, De Falco F, et al. Mutational Analysis for GJB2, GJB6 and GJB3 Genes in Campania within a Universal Neonatal Hearing Screening Programme. *Int J Audiol.* 2011;50(12):866-70.

84. Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Álvarez A, Tellería D et al. A Deletion Involving the Connexin 30 Gene in Nonsyndromic Hearing Impairment. *New England Journal of Medicine.* 2002;346(4):243-9.

85. Del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A Novel Deletion Involving the Connexin-30 Gene, Del(GJB6-D13S1854), Found in Trans with Mutations in the GJB2 Gene (Connexin-26) in Subjects with DFNB1 Non-Syndromic Hearing Impairment. *J Med Genet.* 2005;42(7):588-94.
86. Liu X-Z, Yuan Y, Yan D, Ding EH, Ouyang XM, Fei Y, et al. Digenic Inheritance of Non-Syndromic Deafness Caused by Mutations at the Gap Junction Proteins Cx26 and Cx31. *Human Genetics.* 2009;125(1):53-62.
87. Cifuentes L, Arancibia M, Torrente M, Acuña M, Farfán C, Ríos C. Prevalence of the 35delG Mutation in the GJB2 Gene in Two Samples of Non-Syndromic Deaf Subjects from Chile. *Biological research.* 2013;46(3):239-42.
88. Cryns K. A Genotype-Phenotype Correlation for GJB2 (Connexin 26) Deafness. *Journal of Medical Genetics.* 2004;41(3):147-54.
89. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, Fransen E, Dieltjens N, Mueller-Malesinska M, et al. Phenotypic Variability of Patients Homozygous for the GJB2 Mutation 35delG Cannot Be Explained by the Influence of One Major Modifier Gene. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(4):517-24.
90. Ocak Z, Tatar A, Yesilyurt A, Oztas S. Molecular Diagnosis of Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Losses. *Abant Medical Journal.* 2012;1(2):45-50.
91. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *The American Journal of Human Genetics.* 2005;77(6):945-57.
92. Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, et al. GJB2 and GJB6 Mutations: Genotypic and Phenotypic Correlations in a Large Cohort of Hearing-Impaired Patients. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery.* 2005;131(6):481-7.
93. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD et al. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics.* 1998;62(4):792-9.

94. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with Nonsyndromic Recessive Deafness. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(21):1500-5.
95. Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, Khusainova RI, Akhmetova VL, Kutuev IA, et al. Carrier Frequency of GJB2 Gene Mutations c.35delG, c.235delC and c.167delT among the Populations of Eurasia. *J Hum Genet*. 2010;55(11):749-54.
96. Batissoco AC, Abreu-Silva RS, Braga MCC, Lezirovitz K, Della-Rosa V, Alfredo Jr T, et al. Prevalence of GJB2 (Connexin-26) and GJB6 (Connexin-30) Mutations in a Cohort of 300 Brazilian Hearing-Impaired Individuals: Implications for Diagnosis and Genetic Counseling. *Ear and hearing*. 2009;30(1):1-7.
97. Bonyadi MJ, Fotouhi N, Esmaeili M. Spectrum and Frequency of GJB2 Mutations Causing Deafness in the Northwest of Iran. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(4):637-40.
98. Amorini M, Romeo P, Bruno R, Galletti F, Di Bella C, Longo P, et al. Prevalence of Deafness-Associated Connexin-26 (GJB2) and Connexin-30 (GJB6) Pathogenic Alleles in a Large Patient Cohort from Eastern Sicily. *Ann Hum Genet*. 2015.
99. Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Günther B, Menzel H-J, Utermann G, et al. Sensorineural Hearing Loss and the Incidence of Cx26 Mutations in Austria. *European Journal of Human Genetics: EJHG*. 2001;9(3):226.
100. Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Utermann B, Muller T, Loffler J, et al. Progressive Hearing Loss, and Recurrent Sudden Sensorineural Hearing Loss Associated with GJB2 Mutations--Phenotypic Spectrum and Frequencies of GJB2 Mutations in Austria. *Hum Genet*. 2002;111(2):145-53.
101. Bruzzone R, Veronesi V, Gomès D, Bicego M, Duval N, Marlin S, et al. Loss-of-Function and Residual Channel Activity of Connexin26 Mutations Associated With Non-Syndromic Deafness. *FEBS letters*. 2003;533(1):79-88.
102. Guerci VI, Grasso DL, Morgutti M, Amoroso A, D'Andrea P, Bicego M, et al. Connexin 26 Gene: Defining the Role of the V153I Mutation. *Audiological Medicine*. 2009;5(3):200-6.

103. Biyikli TA. Prevalence of the IVS1 (+ 1) G>A and 35delG Mutations in the GJB2 Gene of Turkish Patients with Nonsyndromic Hearing Loss. *Turkish Journal of Biology*. 2012;36(1):1-6.
104. Wu B-L, Lindeman N, Lip V, Adams A, Amato RS, Cox G, et al. Effectiveness of Sequencing Connexin 26 (GJB2) in Cases of Familial or Sporadic Childhood Deafness Referred for Molecular Diagnostic Testing. *Genetics in Medicine*. 2002;4(4):279-88.
105. Rickard S, Kelsell DP, Sirimana T, Rajput K, MacArdle B, Bitner-Glindzicz M. Recurrent Mutations in the Deafness Gene GJB2 (Connexin 26) in British Asian Families. *Journal of Medical Genetics*. 2001;38(8):530-3.
106. Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW. Altered Gating Properties of Functional Cx26 Mutants Associated with Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. *Hum Genet*. 2004;115(3):191-9.
107. Lin D, Goldstein JA, Mhatre AN, Lustig LR, Pfister M, Lalwani AK. Assessment of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) in Screening for Mutations in Connexin 26 (GJB2). *Human Mutation*. 2001;18(1):42-51.
108. Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic Causes of Nonsyndromic Hearing Loss in Iran in Comparison with Other Populations. *J Hum Genet*. 2010;55(10):639-48.
109. Nishio SY, Usami S. Deafness Gene Variations in a 1120 Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Molecular Epidemiology and Deafness Mutation Spectrum of Patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:49S-60S.
110. Han SH, Park HJ, Kang EJ, Ryu JS, Lee A, Yang YH, et al. Carrier Frequency of GJB2 (Connexin-26) Mutations Causing Inherited Deafness in the Korean Population. *J Hum Genet*. 2008;53(11-12):1022-8.
111. Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC, Li SY. Identification of Mutations in Members of the Connexin Gene Family as a Cause of Nonsyndromic Deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol*. 2007;12(3):198-208.



112. Zazo Seco C, Wesdorp M, Feenstra I, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Lelieveld SH, et al. The Diagnostic Yield of Whole-Exome Sequencing Targeting a Gene Panel for Hearing Impairment in the Netherlands. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(3):308-14.

113. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, et al. Copy Number Variants Are a Common Cause of Non-Syndromic Hearing Loss. *Genome Medicine.* 2014;6(5):37.