



Sendromik olmayan ailesel işitme kaybının genetik temelini araştırılması

Research of genetic bases of hereditary non-syndromic hearing loss

Aslı Subaşıoğlu¹, Duygu Duman², Aslı Sırmacı³, Güney Bademci³, Fehime Carkıt⁴, Mehmet Akif Somdaş⁵, Mustafa Erkan⁵, Mustafa Tekin³, Munis Dünder¹

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Miami Üniversitesi Miller Tıp Fakültesi, John T. Macdonald, İnsan Genetiği Bölümü, Miami, ABD

⁴Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Odyoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

⁵Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Subaşıoğlu A, Duman D, Sırmacı A, et al. Research of genetic bases of hereditary non-syndromic hearing loss. Turk Pediatri Ars 2017; 52: 122-32.

Öz

Amaç: Toplumda yaklaşık 1 000 canlı doğumda bir görüldüğü bildirilen işitme kaybı en yaygın duyuşal işlev bozukluğudur. Bu çalışma ile toplumumuzda ailesel işitme kaybına sıklıkla neden olan genetik değişikliklerin belirlenmesi, ileride işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve hastaların tanı süreçlerine yardımcı bilgiler sunması ve genetik danışmanlık hizmetine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya akraba evliliği yapmış, sendromik olmayan işitme kayıplı en az iki çocuğu olan 21 aileden 122 birey alındı. İlk aşamada olgulardan elde edilen DNA örneğinde GJB2 geni dizi analizi ile ve mitokondriyal 12S RNA genindeki m.1555A>G mutasyonu polimeraz zincir reaksiyonu ve elde edilen ürünün restriksiyon enzimi ile kesilerek bant boylarının incelenmesi yaklaşımı kullanılarak hedefe yönelik test ile incelendi. Mutasyon saptanmayan ailelerde "open array" yöntemi kullanılarak TMIE geninde c.250C>T mutasyonu ve işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen bölgesindeki polimorfik belirteçlere bakılarak (SLC26A4, MYO7A, MYO15A, OTOF, CDH23, TMIE,TECTA, PCDH15, TMCI, TMPRSS3, TMHS) bu gen bölgelerinin işitme kaybıyla birlikte kalıtımı incelendi.

Bulgular: GJB2 gen dizi analizinde dört ailede c.[35delG];[35delG], iki ailede c.[35delG];[507C>A], bir ailede c.[35delG];[-23+1G>A] ve bir ailede c.457G>A heterozigot olarak saptandı. "Open array" yöntemi ile yapılan incelemede bir olguda TMIE geninde c.[250C>T];[250C>T], bir olguda OTOF, bir olguda TMPRSS3, bir başka olguda ise OTOF, TMPRSS3 ve TMHS genlerinin üçü için otozomal çekinik kalıtım ile uyumlu homozigot bölge taşıdıkları belirlendi.

Çıkarımlar: Bu çalışmada sendromik olmayan işitme kayıplı ailelerde daha ileri genetik tetkiklerin yapılması planlandı.

Anahtar Kelimeler: Dizi analizi, işitme kaybı, mikroçip, tek nükleotid polimorfizmi

Abstract

Aim: Hearing loss is the most common sensory disorder that affects approximately one per 1000 live births. With this project, we aimed to identify gene variants that were common causes of hearing loss in Turkey to contribute to the planning of genetic screening programs for hearing loss, as well as to improve genetic counseling to affected families.

Material and Methods: Twenty-one families with at least two affected individuals and parental consanguinity who presented with non-syndromic severe-to-profound sensorineural hearing loss were included in this study. We first screened for mutations in GJB2 and mitochondrial DNA 12S RNA genes. Subsequently, we genotyped the TMIE c.250C>T and SNP markers flanking the SLC26A4, MYO7A, MYO15A, OTOF, CDH23, TMIE, TECTA, PCDH15, TMCI, TMPRSS3, TMHS genes in the remaining twelve families without mutations in GJB2.

Results: Screening for mutations in GJB2 gene showed c.[35delG];[35delG] mutation in four families, c.[35delG];[507C>A] mutation in two families, c.[35delG];[-23+1G>A] mutation in one family, and c.457G>A heterozygous mutation in one family. Genotyping SNP markers showed the c.[250C>T];[250C>T] mutation in TMIE in one family. A homozygous region with SNP genotypes was detected with the OTOF gene in one family, the TMPRSS3 gene in another family, and also a homozygous region was detected with TMHS, OTOF, and TMPRSS3 genes in another family.

Conclusions: Further research will be required to determine the genetic bases of hearing loss in families with non-syndromic hearing loss.

Keywords: Hearing loss, microarray, sequence, single nucleotide polymorphism

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Aslı Subaşıoğlu E-posta / E-mail: asuzak78@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 07.06.2016 **Kabul Tarihi / Accepted:** 13.03.2017

©Telif Hakkı 2017 Türk Pediatri Kurumu Derneği - Makale metnine www.turkpediatriarsivi.com web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2017 by Turkish Pediatric Association - Available online at www.turkpediatriarsivi.com

DOI: 10.5152/TurkPediatriArs.2017.4254

Giriş

Toplumda yaklaşık 1 000 canlı doğumda bir olarak bilinen işitme kaybı; en yaygın duyuşsal işlev bozukluğudur. Bu durumun yaklaşık yarısından genetik nedenler, diğer yarısından ise çevresel etmenler sorumlu tutulmaktadır (1). Çevresel etmenler arasında; doğum öncesi annenin geçirdiği kızamıkçık, sitomegalovirus gibi enfeksiyon hastalıkları, prematürite, ototoksik ilaç kullanımı, doğum sonrası dönemde geçirilmiş menenjit, mastoidit ve kronik orta kulak iltihabı gibi hastalıklar ve travma öyküsü sayılmaktadır (2).

Kökeninde genetik etmenlerin olduğu işitme kaybı klinik olarak sendromik ve sendromik olmayan olarak iki gruba ayrılmaktadır. İşitme kaybına başka hiçbir organ sistemi ya da laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği durumlar sendromik olmayan işitme kaybı olarak tanımlanmaktadır ve bu grup genetik kaynaklı işitme kayıplarının yaklaşık %70-80'ini oluşturmaktadır (1). Sendromik işitme kaybı ise geriye kalan %20-30'luk grubu oluşturmaktadır (1). Bugüne kadar bulguları arasında işitme kaybının da gözlemlendiği 400'den fazla sendrom tanımlanmıştır. İşitme kaybının eşlik ettiği en sık görülen sendromlar; Pendred, Usher, Brankio-oto-renal (BOR), Waardenburg ve Alport sendromlarıdır (3). Bu sendromlar, işitme kayıplı topluluğunun %15-20'lik kısmını oluşturmaktadır (3).

Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'ini otozomal çekinik işitme kayıpları oluşturmaktadır (4). Bugüne kadar 60'dan fazla gendeki mutasyonların sendromik olmayan otozomal çekinik işitme kaybına neden olduğu gösterilmiştir (5). Sendromik olmayan işitme kaybı için belirlenen gen lokusları DFN (DeaFNess), otozomal baskın gen lokusları DFNA, otozomal çekinik gen lokuslar DFNB ve X kromozomu üzerindeki lokuslar DFN olarak tanımlanmaktadır. Otozom genindeki bir mutasyon çekinik, bir başka mutasyon baskın etkide olabilirken, aynı bir gen hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olabilmektedir (6-8).

Birçok toplumda genetik işitme kayıplarının önemli bir kısmı *GJB2* geni mutasyonlarıyla açıklanmaktadır (9). Mitokondriyal DNA'daki *12S RNA* geninde bulunan m.1555A>G mutasyonu da özellikle İspanya ve Uzak Doğu ülkelerinde sık görülen sendromik olmayan işitme kaybı mutasyonlarından. Türk hastalarda yapılan bir çalışmada bu mutasyonun sıklığı %1,8 olarak bildirilmektedir (10).

Çok sayıda araştırmaya rağmen, halen işitme kaybının etiolojisi ve moleküler etiopatogenezi net olarak bilinmemektedir. İç kulağın ve işitme mekanizmasının son derece karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle çok sayıda farklı genlerin kodladığı proteinlerin işlevde rolü olması beklenen bir durumdur. Tanımlı olan genlerin hücredeki işlevleri değerlendirildiğinde; adezyon molekülü, enzim, iyon kanalı ya da taşıyıcı, integral membran proteini olabildikleri gibi; hücre iskeletinde, ekstrasellüler matrikste, nekzuslarda, makromoleküllerin organizasyonunda, nöron ya da sinapslarda, translasyon ve transkripsiyon regülasyonunda ve nörolojik gelişimde görevli olabildikleri görülmektedir (7). Son yıllarda elde edilen veriler insan genlerinin en az %1'inin işitme için gerekli olduğunu öne sürmektedir (8).

Çalışmamızda; toplumumuzda ailesel işitme kaybına sıklıkla neden olan genetik değişikliklerin belirlenmesi, ilerleyen dönemlerde işitme kaybına yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına ve bunun yanı sıra bir sonraki kuşaklar için verilecek genetik danışmanlık hizmetine katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır. Ayrıca saptanacak mutasyonlar ile hastalara preimplantasyon genetik tanı olanağı sunmak da mümkün olabilecektir.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu 04.01.2011 tarihli, 2011/53 karar numarası ile kabul edildi ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-11-3483 nolu ve Miami Üniversitesi- Ankara Üniversitesi NIH (National Institute of Health) RO1 DC009645 (AÜ no: 2011ABH06739003) ortak projeleri ile desteklendi. Çalışmaya katılmayı kabul eden ailelerden gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formları alındı.

Bu çalışmaya iki ve daha fazla işitme engelli çocuğa sahip, ebeveynlerin akraba olduğu ve aile ağacı yapısı otozomal çekinik kalıtım düşündüren 21 aileden 122 birey alınmış olup, 62'sinde işitme kaybı vardı. Bireylerin ayrıntılı klinik muayenelerinde işitme kaybına eşlik eden sendromlar, özellikle Pendred, Usher, Brankio-oto-renal (BOR), Waardenburg ve Alport gibi sendromlar dışlandı. Etkilenmiş bireylerin işitme kaybı, sensörinöral, doğuştan ya da prelingual başlangıçlı, şiddeti hafiften derine kadar değişmekte idi. Sensörinöral işitme kaybı tanısı standart odyometrik testlerle konuldu.

DNA izolasyonu klasik fenol kloroform yöntemi ile yapıldı. Tüm etkilenmiş bireylerde öncelikle *GJB2* (NM_004004) geninin kodlayan ve kodlamayan ek-

zonu, uygun primerler kullanılarak uygun koşullarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve dizi analizi yöntemiyle (CEQ8800, Beckman Coulter, ABD) incelendi. Mitokondriyal DNA 12S RNA geni, m.1555A>G mutasyonu için uygun primerler ve koşullarda PZR ile çoğaltıldı, *BsmAI* (5'-GTCTCN↓N-3') restriksiyon endonükleaz enzimi (NEB, USA) ile kesildi ve agaroz jel elektroforezinde bant farklılıkları incelendi. Mitokondriyal DNA 12S RNA geninde m. 1555A>G mutasyonu ve *GJB2* geninde mutasyon saptanmayan 12 aileye "open array" yöntemi ile *SLC26A4* (NM_000441.1), *MYO7A* (NM_000260.3), *MYO15A* (NM_016239.3), *OTOF* (NM_194248.2), *CDH23* (NM_022124.5), *TMIE* (NM_147196.2), *TEC-TA* (NM_005422.2), *PCDH15* (NM_033056.3), *TMCI* (NM_138691.2), *TMPRSS3* (NM_024022.2), *LHFPL5* (NM_182548.3) genleri için tarama yapıldı (TaqManR OpenArrayR). Bu genler Türk toplumunda en sık işitme kaybına yol açan genler arasından seçildi. "Open array" platformuna yerleştirilmiş olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) <http://pga.gs.washington.edu/> sitesinden belirlendi. Her gen için SNP'ler; genin lokalizasyonu göz önünde bulundurularak, öncelikle genlerin içinden ve 1 5000 baza kadar 5' ve 3' tarafından seçildi. Çalışmada, minör allel frekans 0,2 ve üzerinde olan ve birbiriyle bağlantı dengesizliğinde (LD; linkage disequilibrium) olmayan (LD 0,8'den küçük değerler çalışmaya alındı) SNP'ler değerlendirildi. Daha sonra etkilenmiş ve etkilenmemiş aile bireylerinde elde edilen SNP genotiplerin aile bireylerinde dağılımı izlendi ve otozomal çekinik kalıtım gösteren gen bölgeleri ortaya çıkarıldı. *TMIE* geni için polimorfik noktalar yerine platforma c.250C>T (p.R48W) mutasyonu eklendi.

Bulgular

Çalışmamızda dört ailenin işitme kayıplı olan olgularında *GJB2* geninde homozigot c.35delG mutasyonu, bir ailenin işitme kayıplı olgularında c.457G>A (p.V153I) mutasyonu heterozigot olarak saptandı.

Üç ailenin işitme kayıplı olgularında ise bileşik heterozigotluk gösterildi; ikisi c.[35delG];[507C>A], biri c.[35delG];[-23+1G>A] (Tablo 1). *GJB2* geninde dizi analizi çalışmaları sonucunda mutasyon saptanmayan 12 ailede mitokondriyal DNA 12S RNA geninde m.1555A>G mutasyonu saptanmadı. Ailelerde yapılan "open array" çalışmalarında 902 nolu ailenin işitme kayıplı bireylerinde *TMIE* geninde c.250C>T mutasyonu saptandı (Tablo 2a). 909 nolu ailede *OTOF* geninde (Tablo 2b), 910 nolu ailede *TMPRSS3* geninde (Tablo 2c) ve 917 nolu ailede ise *OTOF*, *TMPRSS3* ve *TMHS* genlerinde homozigotluk saptandı (Tablo 2d, 2e, 2f). Kalan sekiz ailede çalışma kapsamında uygulanan yöntemler ile herhangi bir genetik değişiklik saptanmadı.

Tartışma

GJB2 geninde gözlenen mutasyonların dizin ile karşılaştırılması

GJB2 geninin mutasyonlarının, sendromik olmayan işitme kaybında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bin dokuz yüz doksan yedi yılında ilk kez *GJB2* genindeki mutasyonların araştırılmasından bu yana pek çok çalışma, birçok farklı toplumda gerçekleştirilmiştir (9). Gen otozomal çekinik sendromik olmayan işitme kayıplarının neredeyse yarısından sorumludur. *GJB2* geninde bugüne kadar 150 farklı mutasyon tanımlanmış olup, farklı toplumlarda farklı mutasyonlar dikkat çekmektedir. Patolojik mutasyonların çoğunluğu genin kodlama bölgesi olan ekzon 2'de yer almaktadır. Yine bu ekzonda gözlenen c.35delG mutasyonu ülkemizde ve dünya genelinde sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybının en önemli sebebidir.

GJB2 geninde beyaz ırkta ve Askenazi Yahudileri'nde en sık c.35delG mutasyonuna rastlanmakta olup, bu mutasyonu c.167delT izlemektedir. Doğu Asya toplumlarında ise bu mutasyonların yanı sıra c.235delC mutasyonu da sıklıkla saptanmaktadır (11).

Tablo 1. *GJB2* geni dizi analizi bulguları

Aile No	<i>GJB2</i> analizi yapılan bireyler	Saptanan mutasyon	Zigosite
901	101-102	c.35delG / c.508 C>A	Bileşik heterozigot
903	101-103	c.35delG / c.508 C>A	Bileşik heterozigot
905	101-102	c.457G>A / WT	Heterozigot
913	102-103	c.[35delG];[-23+1G>A]	Bileşik heterozigot
914	101-102	c.35delG / c.35delG	Homozigot
916	102-103	c.35delG / c.35delG	Homozigot
918	101-102	c.35delG / c.35delG	Homozigot
919	101-103	c.35delG / c.35delG	Homozigot

Tablo 2a. Olguların TMIE geni rs28942097 (c.250C>T, p.R84W) için "open array" verisinden elde edilen genotipleri

Aile No	Olgu No	rs28942097	Fenotip
902	102	CT	Sağlıklı kardeş
902	103	TT	İşitme kayıplı kardeş
902	104	CT	Sağlıklı kardeş
902	105	TT	İşitme kayıplı kardeş
902	202	CT	Sağlıklı anne
902	302	CT	Sağlıklı baba
902	501	TT	İşitme kayıplı 1. derece kuzen
902	502	TT	İşitme kayıplı 1. derece kuzen
902	503	TT	İşitme kayıplı 1. derece kuzen
904	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
904	102	CC	Sağlıklı kardeş
904	103	CC	İşitme kayıplı kardeş
904	104	CC	İşitme kayıplı kardeş
904	201	CC	Sağlıklı baba
904	301	CC	Sağlıklı anne
905	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
905	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
905	201	CC	Sağlıklı baba
905	301	CC	Sağlıklı anne
905	401	CC	İşitme kayıplı kardeş
905	501	CC	İşitme kayıplı kardeş
907	101	CC	Sağlıklı kardeş
907	102	CC	Sağlıklı kardeş
907	103	CC	İşitme kayıplı kardeş
907	104	CC	İşitme kayıplı kardeş
907	105	CC	İşitme kayıplı kardeş
907	201	CC	Sağlıklı baba
907	301	CC	Sağlıklı anne
908	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
908	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
908	103	CC	İşitme kayıplı kardeş
908	104	CC	İşitme kayıplı kardeş
908	201	CC	Sağlıklı baba
908	301	CC	Sağlıklı anne
909	101	CC	Sağlıklı kardeş
909	103	CC	İşitme kayıplı kardeş
909	301	CC	Sağlıklı baba
910	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
910	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
910	201	CC	Sağlıklı anne
910	301	CC	Sağlıklı baba
911	101	CC	İşitme kayıplı kardeş

911	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
911	201	CC	Sağlıklı baba
911	301	CC	Sağlıklı anne
912	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
912	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
912	201	CC	İşitme kayıplı baba
912	301	CC	Sağlıklı anne
917	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
917	102	CC	İşitme kayıplı kardeş
917	201	CC	Sağlıklı baba
917	301	CC	Sağlıklı anne
920	101	CC	İşitme kayıplı kardeş
920	102	CC	Sağlıklı kardeş
920	103	CC	İşitme kayıplı kardeş
920	201	CC	Sağlıklı anne
920	301	CC	Sağlıklı baba

Tablo 2b. OTOF geninde segregasyon gösteren 909 nolu ailenin "open array" verisi

Aile no- Olgu no/ Fenotip	909-101/ Sağlıklı kardeş	909-103 / İşitme kayıplı	909-301/ Sağlıklı baba
rs11674089	AG	GG	AG
rs2280516	GG	GG	GG
rs2272069	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	GG	CG
rs869440	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	AA	AA
rs939817	CT	CC	CT
rs6746918	AA	GG	AA
rs1879760	AA	AA	AA
rs4665874	CC	CC	CC
rs6547103	GG	GG	GG
rs13029128	GT	GG	GT
rs1011108	CT	CC	CT
rs939815	CC	CC	CC

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *GJB2* geninde saptanan diğer mutasyonların başında c.-23+1G>A gelmektedir (12). Bu mutasyonu c.360_362delGAT (p.delE120), c.71G>A (p.W24X), c.233delG, c.239A>G (p.Q80R), c.310_323del14, c.299-300delAT, c.167delT, c. 551G>C (p.R184P), c.269T>C (p.L90P), c. 517 C>T (p.P173S), c. 380G>A (p.R127H), c. 238C>A (p.Q80K) mutasyonları izlenmektedir (13, 14). c.35delG mutasyonu; altı guanin nükleotidinin oluşturduğu diziden, tek bir guanin nükleotidinin delesyona uğraması sonucunda oluşmaktadır ve bu durum çerçeve kaymasına neden olarak, 13. pozisyonunda dur kodonu (UGA) oluşturmaktadır. Mutas-

Tablo 2c. TMPRSS3 geninde segregasyon gösteren 910 nolu ailenin "open array" verisi

Aile no- Olgu no/ Fenotip	910-101/ İşitme kaybı	910-102/ İşitme kaybı	910-201/ Sağlıklı anne	910-301/ Sağlıklı baba
rs1079380	GG	GG	GG	GG
rs424694	TT	TT	CT	TT
rs2839490	TT	TT	CT	TT
rs462149	GG	GG	GG	GG
rs225310	GG	GG	GT	GG
rs1078272	TT	TT	TT	TT
rs1109352	GG	GG	GG	GG
rs225430	AA	AA	AA	AC
rs10887973	TT	TT	TT	GT
rs9981624	GG	GG	CG	GG
rs9980448	CC	CC	CT	CT
rs13052676	CC	CC	CC	CT

Tablo 2e. TMPRSS3 geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin "open array" verisi

Aile no- Olgu no/ Fenotip	917-101/ İşitme kaybı	917-102/ İşitme kaybı	917-201/ Sağlıklı Anne	917-301/ Sağlıklı Baba
rs1079380	AG	AA	AG	AG
rs424694	CC	CT	CT	CT
rs2839490	CT	CT	CT	TT
rs462149	AG	GG	GG	AG
rs225310	TT	UND	GT	GT
rs1078272	TT	TT	AT	TT
rs1109352	GG	GG	GG	GG
rs225430	AA	AA	AC	AA
rs10887973	TT	TT	TT	TT
rs9981624	GG	GG	GG	GG
rs9980448	TT	TT	TT	TT
rs13052676	CT	TT	TT	CT

Tablo 2d. OTOF geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin "open array" verisi

Aile no- Olgu no/ Fenotip	917-101/ İşitme kaybı	917-102/ İşitme kaybı	917-201/ Sağlıklı Anne	917-301/ Sağlıklı Baba
rs11674089	GG	GG	AG	GG
rs2280516	GG	GG	GG	GG
rs2272069	GG	GG	GG	CG
rs869440	AA	AA	AA	AG
rs939817	CC	CC	CC	CT
rs6746918	GG	GG	AG	GG
rs1879760	GG	GG	AG	GG
rs4665874	AA	AA	AC	Amplifikasyon gözlenmemiştir.
rs6547103	GG	GG	GG	CG
rs13029128	GG	GG	GT	GG
rs1011108	TT	TT	TT	CT
rs939815	CC	CC	CC	CC

Tablo 2f. TMHS geninde segregasyon gösteren 917 nolu ailenin "open array" verisi

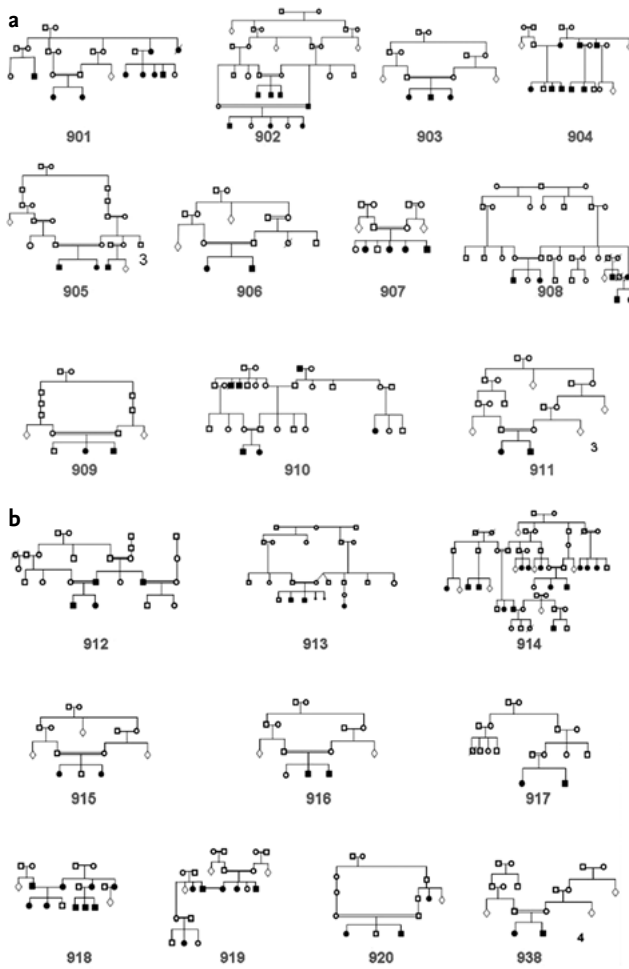
Aile no- Olgu no/ Fenotip	917-101/ İşitme kaybı	917-102/ İşitme kaybı	917-201/ Sağlıklı Anne	917-301/ Sağlıklı Baba
rs1343796	AG	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	AG	AA
rs10807154	GG	GG	GG	AG
rs2817012	CC	CC	CG	CC
rs2817013	AC	AC	AC	CC
rs6921084	TT	TT	CT	CT
rs1049649	AA	AA	AC	AA
rs2395637	GG	GG	GG	GG
rs7752049	AA	AA	AC	AA
rs2817057	GG	GG	AA	GG
rs2817064	AG	AG	AG	AG
rs9470094	GG	GG	GG	GG
rs12211728	AG	AA	Amplifikasyon gözlenmemiştir.	AG

yonun protein düzeyindeki etkisi ise; 226 aminoasitlik normal proteinin yerine, 12 aminoasitlik işlevsel olmayan bir Cx26 proteininin oluşumu (p.G12Vfs*2) şeklindedir (15).

Ülkelere göre bakıldığında ise İtalya'da bu mutasyonun taşıyıcı frekansı %3,4, Yunanistan'da %3,5, Fransa'da %2,7, Malta ve Portekiz'de %2,8 olarak belirlenirken bu oran Amerika, Avrupa ve Asya ülkelerinde belirgin olarak düşüş göstermektedir (16). Türkiye'deki taşıyıcılık sıklığı farklı çalışmalarda %1,17-1,78 arasında olduğu bildirilmektedir (17, 18). Türkiye'de yapılmış başka çalış-

malarda ise c.35delG mutasyonu işitme engellilerin %5 ile %53'ünde saptanmıştır (7, 10). İç Anadolu ve Güney Batı Anadolu'da mutasyon frekansı en yüksek olmakla birlikte, sporadik olgularda %13,2, ailesel olgularda ise %22,1 olarak bildirilmiştir (10).

Allel frekansının görülme sıklığının farklı toplumlarda değişken seyretmesine paralel olarak, homozigot c.35delG mutasyonunun sendromik olmayan işitme kaybına neden olma sıklığı, ırklara ve topluluklara göre büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin Çin, Japonya,



Şekil 1. a, b. Çalışmaya katılan ailelerin pedigrileri

Gana, Hindistan, Kore, Pakistan, Tayvan ve Tayland'da sendromik olmayan işitme kayıplı bireylerde yapılan çalışmalarda homozigot c.35delG mutasyonu bildirilmemiştir (19, 20). Buna karşın Danimarka'da yapılmış bir araştırmada homozigot c.35delG mutasyon oranı %1,8, Slovakya'da yapılmış bir araştırmada ise %40 oranında saptanmıştır (19).

Türkiye'de de bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bulgular coğrafi dağılıma ve çalışmaya katılan olgu sayısına göre farklılık göstermektedir. Barış ve ark. (21) yapmış oldukları bir çalışmada homozigot 35delG mutasyonu %20,4 olguda saptanırken, heterozigot mutasyon %2,1 olguda görülmüştür. Tekin ve ark. (22) tarafından yapılmış olan bir başka çalışmada ise; olguların %15'inde homozigot c.35delG mutasyonu, %7,81'inde ise heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır.

Bu konuda ailesel çalışmalar da yapılmış olup, Uyguner ve ark. (18) tarafından yapılmış otozomal çekinik işitme kayıplı 60 ailenin değerlendirildiği bir çalışmada,

ailelerin %21,7'sinde homozigot c.35delG mutasyonu, %3,3'ünde ise heterozigot c.35delG mutasyonu saptanmıştır. Tekin ve ark. (12) tarafından yapılmış bir başka ailesel olguların değerlendirildiği çalışmada ise %17,5 c.35delG homozigot mutasyonu, %1,9 c.35delG heterozigot mutasyonu saptanmıştır (10). Kalay ve ark. (13) yapmış oldukları ailesel işitme kayıplı bireylerin değerlendirildiği bir çalışmada ise homozigot c.35delG mutasyonu olguların %21,5'inde, heterozigot c.35delG mutasyonu ise olguların %4,3'ünde saptanmıştır.

Çalışmamıza alınan 21 aileden 122 bireyin 62'sinde işitme kaybı vardı (Şekil 1a, b). Dört ailede homozigot c.35delG mutasyonu, üç ailede ise heterozigot c.35delG mutasyonu saptanmıştır. Bu güne kadar yapılmış olan çalışmalarda *GJB2* mutasyonlarının genellikle şiddetli (81-100db) ve derin (100db'den fazla) prelingual sensorinöral işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (23). Çalışmamıza alınan grupta da işitme kaybı düzeyi dizin ile uyumlu olup, mutasyon saptanan tüm olgularda derin işitme kaybı vardı.

GJB2 geninde heterozigot c.35delG mutasyonu saptanan bir ailede c.IVS1+1G>A mutasyonu bileşik heterozigot olarak bulunmuştur. Bu durum ailedeki işitme kaybının sebebini açıklamaktadır. c.-23+1G>A mutasyonu ilk kez Denoyelle tarafından bildirilmiştir (24). Mutasyon genin kodlama yapmayan 1. ekzonunda yer almaktadır (rs80338940) ve ilk gösterildiği yıllarda -3170G>A olarak tanımlanmıştır ve kırılma işlevini bozarak etki ettiği öngörülmektedir (24, 25). Bu mutasyonla ilgili dizinde çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte son yıllarda Türkiye'nin de içinde olduğu bazı toplumlarda bu mutasyonun sıklığı bildirilmiştir. c.IVS1+1G>A mutasyonu Çek toplumunda daha yaygın olarak bulunmuş, tüm patolojik *GJB2* mutasyonları arasında %4 oranında saptanmıştır (26). Hollanda'da yapılmış başka bir çalışmada ise c.35delG ve del(*GJB6*-D13S1830) mutasyonlarından sonra üçüncü sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (27). Tüm bu yapılmış çalışmalarda; hastaların *GJB2* geninin kodlayan, 2. ekzonunda heterozigot olan bir patolojik mutasyona sahip olduğu saptanmıştır. Yine Çin'de yapılmış bir araştırma da ise *GJB2* geninde heterozigot mutasyon taşıyan hasta bireylerde bu mutasyon araştırılmış ve olguların %1,89'unda bildirilmiştir (28). Tüm bu yayınlarda bu mutasyonun sadece ekzon 2'de heterozigot mutasyon taşıyan bireylerde araştırılması gerektiği önerilmiştir. Ayrıca Tekin ve ark. (29) yaptığı bir çalışmada ekzon 2'de heterozigot mutasyon saptanmış 16 hastanın sekizinde heterozigot c.IVS1+1G>A mutasyonu saptanmıştır.

Padma ve ark. (30) tarafından yapılmış başka bir araştırmada ise, ekzon 2'de herhangi bir patolojik mutasyonu heterozigot ya da homozigot olarak taşımayan bireylerde bu mutasyon saptanmış olup (çalışma grubunun %0,3'ü), bu çalışmanın sonucunda da sendromik olmayan işitme kaybı olan tüm bireylerde bu mutasyonun çalışılması gerektiği vurgulanmıştır.

Çalışma grubumuzdaki bir ailede yine *GJB2* geninde, c.457G>A olarak da ifade edilen p.V153I değişikliği heterozigot olarak saptanmıştır. Bu değişiklik ile ilgili olarak dizinde çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda polimorfizm olarak değerlendirilirken, bazı çalışmalarda işitme kaybına yol açabilecek patojenik bir mutasyon olarak belirtilmiştir (31, 32). NCBI (National Center for Biotechnology Information) sitesinden incelendiğinde, c.457G>A, olası-patojenik olmayan SNP (rs111033186) olarak tanımlanmıştır (33). Sonuç olarak daha önce yapılmış çalışmalarda işitme kaybı olmayan bireylerde de saptanmış olması polimorfizm olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda, *GJB2* geninde, c.35delG heterozigot mutasyonu saptanan iki ailede aynı zamanda daha önce dizinde tanımlanmayan heterozigot c.507C>A (p.C169X) mutasyonu bileşik heterozigot olarak saptanmıştır. "TGC" sistemin aminoasidini kodlamaktadır ve ailelerde, kodonun üçüncü bazında bir heterozigot mutasyon söz konusudur. Dur kodonuna yol açan bu mutasyon; *GJB2* geninin kodladığı 226 aminoasitlik protein yerine 169 aminoasitlik bir proteinin oluşumuna sebep olacaktır.

Bu çalışmada sendromik olmayan otozomal çekinik işitme kayıplı 21 ailenin yedisinde işitme kaybı nedeninin *GJB2* mutasyonları olduğu gösterilmiştir (Tablo 1). Tekin ve Arıcı (12) yaptıkları çalışmada Orta Anadolu'da sendromik olmayan otozomal çekinik işitme kayıpları içinde *GJB2* homozigot mutasyon oranını %34,3 olarak bildirmişlerdir.

"Open Array" yöntemi ile değerlendirilen hastalarda saptanan değişiklikler

Araştırmamızda kullanılan *TaqMan® OpenArray®* Genotipleme teknolojisi, fazla sayıda genotiplendirmenin az miktarda örnek ve sarf malzeme kullanılarak yapılabildiği, geniş uygulama alanı bulunan bir platformdur. Veri kalitesi ile çözünürlüğünün çok yüksek olmasından dolayı tercih edilmiştir. Bu tarama yönteminin seçilme nedeni araştırmaya alınan ailelerin hepsinde anne ve babanın akraba olması ve en az iki çocuklarının etkilenmiş olması nedeniyle ortak atadan kalıtılmış olan mutasyonların, homozigot olma olasılığının yüksek olmasıdır. Böylece hasta bireylerde homozigot bölgeler

taranarak mutasyonun nerede olduğu hakkında bilgi edinilmektedir. Sonuç olarak yöntemin analiz aşaması; anne, baba ya da sağlıklı kardeş ve akrabalarda heterozigot olan bölgelerde, hasta birey ya da bireylerde homozigot blok tarama esasına dayanmaktadır. Ailelerdeki segregasyona bakılarak yorum yapılmıştır. Uygulanan tarama yöntemi ile genom ancak belli aralıklarla taranabildiğinden, söz konusu homozigot blokların küçük olması halinde, o gende mutasyon olması durumunda bile, gen göz ardı edilerek, atlanabilir. Ayrıca yöntem kesin sonuç vermemekle birlikte, klasik dizi analizleri ile doğrulama gerektirmektedir. Fakat aynı zamanda aday gen araştırmalarında bilinen genlerin dışlanması için kullanılacak hızlı ve ucuz bir yöntemdir.

Çalışmamızda *TaqMan® OpenArray®* Genotipleme ile bir ailede *TMIE* geninde homozigot p.R84W mutasyonu saptandı. *TMIE* geni, transmembran iç kulak proteini isimli bir proteini kodlamaktadır. Gen 3p21 kromozomal bölgesinde, 4 ekzondan oluşmaktadır (34). *TMIE* geni etkilenmiş fare çalışmalarında gözlenen iç kulak patolojisi; genin normal bir doğum sonrası olgunlaşma sürecinde, kokleadaki duysal tüy hücrelerinin olgunlaşması ve stereosilyaların da gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (35). Bu güne kadar 156 aminoasitlik proteini kodlayan bu gende sendromik olmayan işitme kaybı ile ilişkili; ikisi ekstrasellüler bölgede (4-BP INS, 125CGCC, p.E31G), ikisi intronik bölgede (6-BP DEL/1-BP INS intron 1'de, c.212-2A > C intron 2'de), üç tanesi de sitoplazmik bölgede (p.R81C, p.R84W, p.R92W) yer alan yedi mutasyon tanımlanmıştır (36). *TMIE* geni ile ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, Türkiye'de 49 birbiriyle akrabalığı bulunmayan sendromik olmayan işitme kayıplı aile ile yapılmış bir çalışmada %6,6 oranında *TMIE* geninde mutasyon saptanmıştır (37). Pakistan'da yapılmış geniş çaplı bir çalışma da ise, *TMIE* geninde %1,7 oranında mutasyona rastlanmıştır. c.250C>T (p.R84W) mutasyonu tek başına değerlendirilecek olursa, ilk kez kuzey Hindistan'dan bir ailede saptanmıştır (38). Daha sonra Türk toplumunda yapılmış bir çalışmada önce 51 aile değerlendirilmiş, dört ailede bu mutasyona rastlanmış ve daha sonra 254 aile söz konusu mutasyon açısından değerlendirilmiş ve dört ailede daha c.250C>T mutasyonuna rastlanmıştır. Yöresel dağılıma bakılınca en yüksek yüzde, %10,3 ile Güneydoğu Anadolu bölgesinde saptanmıştır. Ekzon 3'de gözlenen söz konusu bu mutasyonun Anadolu'da olası *founder* etki sonucunda daha sık gözlemlendiği düşünülmüş ve Orta Doğu toplumlarında sendromik olmayan işitme kaybı tarama programlarına söz konusu mutasyonun eklenmesi önerilmiştir (34). Bu mutasyonun 21 aile gibi kısıtlı bir çalışma grubu içinde dahi tespit edilmesi bu öneriyi destekler niteliktedir.

Tarama yaptığımız grupta iki ailede *OTOF* geninde segregasyon saptanmıştır. Otoferlin proteinini kodlayan *OTOF* geninin, korti organındaki iç tüy hücrelerinde utrikulus ve sakkulusta ve beyinde yüksek seviyede eksprese olmaktadır. Gendeki mutasyonların işitme kaybının özel bir tipi olan sendromik olmayan çekinik işitsel nöropatiye yol açtığı saptanmıştır. Bugüne kadar 40'tan fazla patolojik allelik varyant bildirilmiştir (39).

Pakistan'da 557 aileyi kapsayan geniş çaplı bir araştırmada *OTOF* mutasyonları 13 ailede saptanmış ve %2,3 sıklıkta gözlemlendiği bildirilmiştir (40). Chiu ve ark. (41) tarafından yapılmış başka bir çalışmada Asya toplumlarında söz konusu tipteki işitme kaybının en sık nedenlerinden biri olarak *OTOF* geni belirtilmiştir. İspanya'da tüm sendromik olmayan otozomal çekinik prelingual işitme kaybında yaygınlığı %5 olarak bildirilmiştir (42). Duman ve ark. (37) tarafından yapılmış bir çalışmada ise *GJB2* geninden sonra otozomal çekinik sendromik olmayan nörosensörial tipteki işitme kaybında, Türk toplumunda en sık rastlanılan genler bildirilmiş ve *OTOF* %5 sıklık ile, *MYO15A* (%9,9), *TMIE* (%6,6) ve *TMC1* (%6.6)'den sonra en sık mutasyon gösterilen dördüncü ilişkili gen olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda yine iki ailede *TMPRSS3* geninde segregasyon saptanmıştır. *TMPRSS3* transmembran serin proteaz 3 isimli proteinini kodlamakta ve korti organının destek hücreleri ile stria vaskulariste eksprese olmaktadır (43). Kodladığı proteinin amilorid duyarlı sodyum kanallarında, endolenften sodyum geri alımında görevli olduğu düşünülmektedir (44). Guipponi ve ark. (45) bir çalışmasında söz konusu genin mutasyonlarına, işitme kayıplı toplumda her ne kadar çok sık rastlanmasa da, işitmenin mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olduğu vurgulanmıştır. Wattenhofer ve ark. (46) tarafından yapılmış bir çalışmada İspanya, İtalya, Yunanistan ve Avustralya'dan toplam 448 aile incelenmiş ve %0,45 sıklıkta söz konusu gende mutasyon saptanmıştır. Yine aynı çalışmada beyaz ırkta yaklaşık olarak sıklığı %0,38 olarak bildirilmiştir. Pakistan'da 159 aileyi değerlendirildiği bir çalışmada dört ailede ilgili gende mutasyon saptanmış olup, Pakistan toplumunda yaklaşık olarak sıklığı %2,5 olarak belirtilmiştir.

Duman ve ark. (37) tarafından Türk toplumunda yapılmış bir çalışmada ise anne ve babanın akraba olduğu ve en az üç işitme kayıplı çocuğu bulunan aile taranmış ve *TMPRSS3* geninde %1,7 sıklıkta mutasyon saptanmıştır. Her ne kadar çalışma grubumuzda iki ailede de söz konusu gende segregasyon saptanmış olsa da *TMPRSS3* geni dizinden de edinilen bilgiler ışığında, işitme kaybına sıklıkla yol açan genlerden değildir. Diğer sıklıkla

mutasyon saptanan genlerde değişiklik saptanmadığı durumlarda incelenmesi, ya da *array* platformlarına eklenerek segregasyon saptanan ailelerde klasik yöntemlerle taranması önerilmektedir.

Çalışmamızda bir ailede *TMHS* geninde segregasyon saptanmıştır. *TMHS* geni, tüy hücreleri sterolsiliyası tetraspan membran proteinini kodlamaktadır. Tüy hücrelerinin morfogenezinde görevli olduğu, gendeki mutasyonların vestibüler işlev bozukluğuna, korti hasarlanmasına ve iç kulaktaki tüy yumaklarında anomalilere yol açabileceği düşünülmektedir (47). Gendeki mutasyonların işitme kaybı üzerindeki etkisi ilk defa farelerde tanımlanmış olup daha sonraki çalışmalarda Shabbir ve ark. (48) tarafından biri Pakistan ve diğeri Hindistan'dan olmak üzere iki ailede tanımlanmıştır. Daha sonra Kalay ve ark. (13) tarafından iki geniş Türk ailesinde yapılmış bir çalışmada söz konusu gende iki farklı mutasyon daha saptanmıştır (c.649delG, p.Glu216Argfs*26 ve c.494C>T, p.Thr165Met). Aynı çalışmada kontrol taramalarında c.649delG taşıyıcılığına rastlanmıştır. Dizinde *TMHS* geninde sadece dört mutasyon saptanarak bunlardan ikisinin Türk toplumunda gözlenmesi dikkat çekicidir. Bu gen ile ilgili çok fazla çalışma da bulunmamaktadır ve bu nedenlerle "open array" platformuna eklenerek çalışmamıza alınmıştır.

Çalışmamıza alınan 21 aileden 122 bireyin 62'sinde işitme kaybı vardı. Çalışma grubumuzdaki dört ailede *GJB2* geninde homozigot c.35delG mutasyonu, üç ailede ise heterozigot c.35delG mutasyonu, bir ailede ise c.457G>A polimorfizmi saptandı. *GJB2* geninde heterozigot 35delG mutasyonu saptanan bir ailede ek olarak heterozigot c.-23+1G>A mutasyonu da vardı. Çalışmamızda, c.35delG heterozigot saptanan diğer iki ailede ise; daha önce dizinde tanımlanmayan heterozigot p.C169* (c.507C>A) mutasyonu saptandı.

GJB2 geninde mutasyon saptanmayan 12 aile "open array" yöntemi kullanılarak işitme kaybına yol açtığı bilinen 11 gen açısından incelendi. Sadece *TMIE* geni için SNP yerine bir mutasyon (c.250C>T) platforma eklenerek, söz konusu mutasyon araştırıldı.

Çalışmamızda bir ailede *TMIE* geninde c.250C>T mutasyonu saptandı. Bir ailede *OTOF*, bir ailede *TMPRSS3* ve bir ailede de *TMHS*, *OTOF* ve *TMPRSS3* genlerinin üçü için informatif homozigotluk saptandı. Araştırmamızda söz konusu genlerde informatif homozigotluk saptadığımız ailelere sonraki çalışmalarda dizi analizi yapılması planlandı. Çalışmada değerlendirilen 21 ailenin sekizinde bu çalışma kapsamında uygulanan araştırma yöntemleri ile herhangi bir genetik değişiklik

saptanamadı ve bu aileler ile birlikte c.457G>A polimorfizmi saptanan ailede daha ileri ve kapsamlı tekniklerle sonraki çalışmalarda işitme kaybına yol açan genetik değişikliklerin araştırılması düşünüldü.

Çok sayıda araştırmaya rağmen, halen işitme kaybının etiolojisi ve gelişimi ile ilgili karanlık noktalar vardır. İç kulağın ve işitme mekanizmasının son derece karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle çok sayıda farklı genin olaya katılması beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda da desteklendiği gibi, işitme kaybına yönelik aday gen araştırmalarında, bilinen genlerin dışlanması için öncelikle *GJB2* geninin dizi analizi ile taranması, sonrasında ise son yıllarda daha yaygın kullanılmaya başlanan paneller yardımı ile bilinen genlerin dışlanması önerilmektedir. Panellerin hazırlanması topluluklara göre yapılmalı ve çeşitli toplumlarda daha sık rastlanılan gen ve mutasyonlara öncelik verilmelidir. Yirmi bir aileden oluşan çalışma grubumuzda nadir görülen *TMIE* geninde c.250C>T mutasyonu saptanması bu öneriyi destekler niteliktedir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (04.01.2011, 2011/53).

Hasta Onamı: Çalışmaya katılmayı kabul eden ailelerden gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Tasarım - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Denetleme - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Kaynaklar - M.T., M.D.; Malzemeler - A.S., M.T., M.D.; Veri Toplanması ya/ya da İşlemesi - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Analiz ya/ya da Yorum - A.S., M.T., M.D.; Dizin Taraması - A.S., D.D., M.T., M.D.; Yazıyı Yazan - A.S., D.D., M.T., M.D.; Eleştirel İnceleme - A.S., D.D., M.T., M.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-11-3483 nolu ve Miami Üniversitesi- Ankara Üniversitesi NIH (National Institute of Health) RO1 DC009645 (AÜ no: 2011ABH06739003) ortak projeleri ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Erciyes University (04.01.2011, 2011/53).

Informed Consent: Signed informed consent was obtained from each participant.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Design - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Supervision - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Resources - M.T., M.D.; Materials - A.S., M.T., M.D.; Data Collection and/or Processing - A.S., D.D., A.S., G.B., F.C., M.A.S., M.E., M.T., M.D.; Analysis and/or Interpretation - A.S., M.T., M.D.; Literature Search - A.S., D.D., M.T., M.D.; Writing Manuscript - A.S., D.D., M.T., M.D.; Critical Review - A.S., D.D., M.T., M.D.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This work was supported by the both Erciyes University, Scientific Research Projects Office's project (the project number TSU-11-3483) and a joint project of Miami University (National Institutes of Health Grant number R01DC009645) and Ankara University (the project number 2011ABH06739003).

Kaynaklar

1. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1589-97. [CrossRef]
2. Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; 342: 1101-9. [CrossRef]
3. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM, editors. Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford: Oxford University Press, 1995.p. 337-9.
4. Morton CCL, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354: 2151-64. [CrossRef]
5. The Hereditary Hearing loss Homepage [Internet]. Available from: <http://hereditaryhearingloss.org>. [Edited 13 Dec 2011].
6. The Hereditary Hearing loss Homepage [Internet]. Available from: <http://hereditaryhearingloss.org/main.aspx?c=HHH&n=86162>. [Edited 13 Dec 2011]
7. Tekin M, Arnos K, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358: 1082-90. [CrossRef]
8. Calapoğlu NŞ. Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği. *S.D.Ü Tıp Fak Derg* 2006; 13: 37-46.
9. Kellsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-3. [CrossRef]
10. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, et al. Spectrum of *GJB2* mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat* 2003; 21: 552-3. [CrossRef]
11. Choi SY, Lee KY, Kim HJ, et al. Functional evaluation of *GJB2* variants in nonsyndromic hearing loss. *Mol Med* 2011; 17: 550-6. [CrossRef]
12. Tekin M, Arici ZS. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 1583-91. [CrossRef]

13. Kalay E, Caylan R, Kremer H, Brouwer APM, Karagüzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res* 2005; 203: 88-93. [\[CrossRef\]](#)
14. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2173-7. [\[CrossRef\]](#)
15. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics* 1999; 103: 546-50. [\[CrossRef\]](#)
16. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear* 2003; 24: 275-88. [\[CrossRef\]](#)
17. Tekin M, Akar N, Cin S, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet* 2001; 108: 385-9. [\[CrossRef\]](#)
18. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003; 64: 65-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006; 69: 371-92. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002; 111: 394-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet* 2001; 60: 452-5. [\[CrossRef\]](#)
22. Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clin Genet* 2005; 67: 31-7. [\[CrossRef\]](#)
23. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106: 50-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of the childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999; 353: 1298-303. [\[CrossRef\]](#)
25. Shahin H, Walsh T, Sobe T, et al. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002; 110: 284-9. [\[CrossRef\]](#)
26. Seeman P, Sakmoryova I. High prevalence of the IVS1+1 G-A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients in the coding region of GJB2. *Clin Genet* 2006; 69: 410-3. [\[CrossRef\]](#)
27. Santos R, Aulchenko Y, Huygen P, et al. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69: 165-74. [\[CrossRef\]](#)
28. Yuan Y, Yu F, Wang G, et al. Prevalence of the GJB2 IVS1+1G >A mutation in Chinese hearing loss patients with monoallelic pathogenic mutation in the coding region of GJB2. *J Transl Med* 2010; 8: 127. [\[CrossRef\]](#)
29. Sirmacı A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J Genet* 2006; 85: 213-6. [\[CrossRef\]](#)
30. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T. GJB2 and GJB6 gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. *J Genet* 2009; 88: 267-72. [\[CrossRef\]](#)
31. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, et al. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67: 1331-5. [\[CrossRef\]](#)
32. Meşe 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: 191-9. [\[CrossRef\]](#)
33. Open database: The National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs111033186&SITE=NcbiHome&submit=Go>. [Edited 2012].
34. Sirmacı A, Oztürkmen-Akay H, Erbek S, et al. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin Genet* 2009; 75: 562-7. [\[CrossRef\]](#)
35. Mitchem KL, Hibbard E, Beyer LA, et al. Mutation of the novel gene Tmie results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1887-98. [\[CrossRef\]](#)
36. Yang JJ, Su MC, Chien KH, Hsin CH, Li SY. Identification of novel variants in the TMIE gene of patients with nonsyndromic hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 489-93. [\[CrossRef\]](#)
37. Duman D, Sirmacı A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15: 29-33. [\[CrossRef\]](#)
38. Naz S, Giguere CM, Kohrman DC, et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 632-6. [\[CrossRef\]](#)
39. Wang DY, Wang YC, Weil D, et al. Screening mutations of OTOF gene in Chinese patients with auditory neuropathy, including a familial case of temperature-sensitive auditory neuropathy. *BMC Med Genet* 2010; 11: 79. [\[CrossRef\]](#)
40. Choi BY, Ahmed ZM, Riazuddin S, et al. Identities and frequencies of mutations of the otoferlin gene (OTOF) causing DFNB9 deafness in Pakistan. *Clin Genet* 2009; 75: 237-43. [\[CrossRef\]](#)
41. Chiu YH, Wu CC, Lu YC, et al. Mutations in the OTOF gene in Taiwanese patients with auditory neuropathy. *Audiol Neurootol* 2010; 15: 364-74. [\[CrossRef\]](#)
42. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat* 2008; 29: 823-31. [\[CrossRef\]](#)
43. Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, et al. Insertion of betasatellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet* 2001; 27: 59-63. [\[CrossRef\]](#)

44. Lee K, Khan S, Islam A, et al. Novel TMPRSS3 variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet* 2012; 82: 56-63. [\[CrossRef\]](#)
45. Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. *Front Biosci* 2008; 13: 1557-67. [\[CrossRef\]](#)
46. Wattenhofer M, Di Iorio MV, Rabionet R, et al. Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 124-31. [\[CrossRef\]](#)
47. Longo-Guess CM, Gagnon LH, Cook SA, Wu J, Zheng QY, Johnson KR. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7894-9. [\[CrossRef\]](#)
48. Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, et al. Mutations of human *TMHS* cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2006; 43: 634-40. [\[CrossRef\]](#)