

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KULAK BURUN BOĞAZ KLİNİĞİ

PRELİNGUAL NON-SENDROMİK SENSÖRİNÖRAL İŞİTME
KAYBI BULUNAN HASTALARDAKİ GENETİK
MUTASYONLARIN VE EPİGENETİK MODİFİKASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. OĞUZ KADİR EĞİLMEZ

İSTANBUL - 2015

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KULAK BURUN BOĞAZ KLİNİĞİ

PRELİNGUAL NON-SENDROMİK SENSÖRİNÖRAL İŞİTME
KAYBI BULUNAN HASTALARDAKİ GENETİK
MUTASYONLARIN VE EPIGENETİK MODİFİKASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. OĞUZ KADİR EĞİLMEZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. M. TAYYAR KALCIOĞLU

İSTANBUL – 2015

Bu çalışma İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin TTU-2013-456 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden itibaren hem bilimsel hem de sosyal tecrübelerini benden esirgemeyen, bizi adeta bir evladı olarak gören ve desteklerini ömür boyu unutmayacağım saygıdeğer hocam ve Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Muhammet TEKİN'e,

Ayrıca bilimsel düşünceyi yaşam biçimi olarak algılamamı sağlayan, KBB asistanlığım esnasında her zaman beni destekleyen, takdir ve taltif eden, bir öğrencisi olarak değil meslektaş olarak gören ve bana hep güvenen sayın hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. M. Tayyar KALCIOĞLU'na,

Bilimsel tecrübelerinden uzmanlık eğitimim boyunca faydalandığım ve mesleğime önemli katkılarda bulunan sevgili hocalarım Prof. Dr. Lokman UZUN'a ve Doç. Dr. Gül ACAR'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, cerrah olabilmemde çok büyük katkıları olan, kıymetli ağabeylerim, uzmanlarım, Op. Dr. Süha ÖZBİLGİN'e, Op.Dr Fikri Can ARIBAL'a, Op.Dr. Şefik ÇAĞLAR'a, Op.Dr. Numan KÖKTEN'e, Op.Dr Osman İlkey ÖZDAMAR'a , Op.Dr. Turhan SAN'a ve Op. Dr. Osman KILIÇ'a,

Eğitimim süresince bana yol gösteren ve KBB cerrahisi adına bilmem gerekenleri ilk kez öğrenmemde yardımcı olan sevgili kıdemlilerim Op.Dr. Osman Halit ÇAM'a, Op.Dr. Adem KILIÇASLAN'a, Op.Dr. Fatih Mehmet HANEĞE'ye, Op.Dr. Soner KURTGÖZ'e, Op.Dr. Çiğdem KAFKASLI'ya ve Op.Dr. Çağlayan YAVUZ'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarım; Dr. Fatma Rüya TUNÇTÜRK'e, Dr. Servet KARACA'ya, Dr. Emine TİMURLENK'e, Dr. Tolga ÇİÇEK'e ve Dr. Ozan TÜYSÜZ'e,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen ve katkıları açısından üniversitemiz Tıbbi Genetik Anabilimdalı'ndan Doç.Dr. İbrahim Akalın'a, Uzm.Dr. Sarenur YILMAZ'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'ndan Doç.Dr. Berna DEMİRCAN TAN'a,

Tez çalışmamın bir bölümündeki katkıları açısından İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği'nden Prof. Dr. Özgür YİĞİT'e ve Dr. Yusuf DURNA'ya,

Birlikte mutlu ve uyumlu bir şekilde çalıştığım KBB Kliniği servis ve ameliyat hemşireleri ve personellerine, odyometrist arkadaşlara,

Hayatım boyunca tüm eğitim süreçlerimde bana sonsuz destek veren annem, babam ve kardeşime,

Bu eğitim sürecinin sonlarına doğru ailemize katılan ve hayatımda en önemli yere sahip olan biricik kızım Zeynep Nira EĞİLMEZ'e ve bana en büyük desteği gösteren, bu paha biçilemez manevi destek sayesinde ayakta durabildiğim sevgili eşim Dr. Zeliha EĞİLMEZ'e
Teşekkür ederim.

Dr. Oğuz Kadir EĞİLMEZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İşitme Duyusu ve Ses.....	3
2.2. Kulağın Yapısı.....	3
2.2.1. Dış Kulak.....	3
2.2.2. Orta Kulak.....	5
2.2.3. İç Kulak.....	5
2.3. İşitme Kayıpları.....	8
2.3.1. Genetik İşitme Kayıpları.....	9
2.3.1.1. Otozomal dominant kalıtım.....	10
2.3.1.2. Otozomal resesif kalıtım.....	10
2.3.1.3. X'e bağlı kalıtım.....	10
2.3.1.4. Mitokondriyal kalıtım.....	11
2.3.2. Sendromik İşitme Kayıpları.....	11
2.3.2.1. Otozomal Dominant Sendromik İşitme Kayıpları.....	11
2.3.2.2. Otozomal Resesif Sendromik İşitme Kayıpları.....	13
2.3.2.3. X'e Bağlı Sendromik İşitme Bozuklukları.....	14
2.3.2.4. Mitokondriyal Sendromlar.....	14
2.3.3. Non-Sendromik İşitme Kayıpları.....	15
2.3.3.1. Otozomal dominant non-sendromik işitme bozuklukları.....	15
2.3.3.2. Otozomal resesif non-sendromik işitme bozuklukları.....	15
2.3.3.3. X'e bağlı non-sendromik işitme bozuklukları.....	16
2.3.3.4. Mitokondriyal non-sendromik işitme bozukluğu.....	16
2.4. Epigenetik Modifikasyonlar ve İşitmedeki Rolü.....	17
2.4.1. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki etkilenme.....	20
2.4.2. Gelişim ve Epigenetik.....	20
2.4.3. Kanser Epigenetiği.....	21
2.4.4. Epigenetik Düzenleyici Farmakolojik Ajanlar.....	22
2.4.5. İşitme ile İlgili Hastalıklarda Epigenetik.....	23
2.4.6. İşitmeyle ilgili sendromlar.....	25
2.4.7. Kanserlerle işitmenin ilişkisi.....	28
2.4.8. İşitme araştırmalarında epigenetik modifikasyonların etkin kullanımı.....	28
2.4.9. İşitme gelişimini içeren epigenetik mekanizmalar.....	30
2.4.10. İşitme, reaktif oksijen türleri ve epigenetik.....	31
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. GEREÇLER.....	33
3.1.1. Kan örneklerinin elde edilmesi.....	33
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	33
3.2. YÖNTEM.....	34
3.2.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	34
3.2.2. DNA Örneklerinin Bisülfid Modifikasyonu.....	35
3.2.3. PyroMark Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	35

	3.2.4. PyroMark CpG Dizileme Analizi.....	36
	3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	40
4	SONUÇLAR.....	41
5	TARTIŞMA.....	55
6	SONUÇ.....	61
	KAYNAKLAR.....	62
	EKLER.....	70



KISALTMALAR

ATP	: Adenoizin trifosfat
AS	: Alport sendromu
A-G	: adenozin-guanin
ark.	: Arkadaşları
CG	: Sitozin-guanin
Cx	: Connexin
Ca	: Kalsiyum
CpG	:sitozin-fosfat-guanin
CHD	: chromodomain-helicase-DNA bağlayıcı protein
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dB	: Desibel
DNMT	: DNA metil transferaz
dsRNA	: çift sarmallı RNA
EDTA	: Etildiamintetraasetik asit
FSHD1	: Fasyopulmohomoral musküler distrofi
GJB	: Gap Junction Beta
HL	: Hearing level
Hz	: Hertz
IHC	: İç tüylü hücre
JLNS	: Jarvell- Lange-Nielson sendromu
K	: Potasyum
mm	: milimetre
mM	: mikromol
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mRNA	: mitokondriyal RNA
MeCP	: metil sitozin guanin
µl	: mikrolitre
Na	: Sodyum
NF	: Nörofibromatozis
OHC	: Dış tüylü hücre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PS	: Pendred sendromu
RNA	: Ribo nükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RB	: Retinoblastom
SLC	: Solute Carrier
SiRNA	: small interfering RNA
US	: Usher sendromu
WS	: Waardenburg sendromu
VŞ	: Vestibüler şvannom

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Hastaların demografik bulguları.....	42
Tablo-2: GJB-2 genindeki metilasyon yüzdelerinin gruplara göre ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri.....	47
Tablo-3: GJB-6'daki metilasyon bölgelerinin gruplara göre yüzde ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri.....	49
Tablo-4: SLC26A4'ün gruplara göre ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri.....	50
Tablo-5: Hasta ve kontrol gruplarının metilasyon bölgelerinin yüzde ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılması.....	52
Tablo-6: GJB2 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları.....	53
Tablo-7: GJB 6 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları.....	54
Tablo-8: SLC26A4 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Kulak bölümleri; Dış, Orta ve İç Kulak yapıları.....	4
Şekil-2: İç kulakta ses dalgasının Apex'e doğru gittikçe frekansının durumu.....	7
Şekil-3: Epigenetik modifikasyonlar.....	18
Şekil-4: Örnek bir plate kurulumu.....	39
Şekil-5: Pozitif kontrolde metile olan GJB2 genindeki CpG adaları.....	40
Şekil-6: GJB2 geninde hasta, negatif ve pozitif kontrol için metilasyon yüzdeleri.....	44
Şekil-7: GJB6 geninde hasta, negatif ve pozitif kontrol için metilasyon yüzdeleri.....	45
Şekil-8: SLC26A4 geninde hasta, negatif ve pozitif kontrol için metilasyon yüzdeleri.....	46
Şekil-9: GJB-2'nin bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması.....	48
Şekil-10: GJB-6'nın bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması.....	49
Şekil-11: SLC26A4'ün bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması...	51

ÖZET

PRELİNGUAL NON-SENDROMİK SENSÖRİNÖRAL İŞİTME KAYBI BULUNAN HASTALARDAKİ GENETİK MUTASYONLARIN VE EPIGENETİK MODİFİKASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

Amaç: İşitme, insanoğlunun konuşmayı öğrenerek etrafı ile iletişim kurmasındaki en önemli duyularından bir tanesidir. İşitmenin oluşmasını engelleyecek herhangi bir durumda işitme kaybı oluşmaktadır. Klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık olarak seyreder. İnsanlarda konjenital işitme kayıpları yaygındır, insidansı yaklaşık olarak 1:1000'dir. Non-sendromik işitme kayıpları hereditör işitme kayıplarının %70'ini kapsar. Uluslararası literatürdeki çalışmalarda işitme kaybına neden olan genlerin yapısına ve fonksiyonel mutasyonlarına odaklanılmışken sadece birkaç çalışma bu genlerde oluşabilecek epigenetik modifikasyonları incelemiştir. Bu alanda ülkemizde yapılan çalışma yoktur. Bu çalışmada amaç GJB2, GJB6 ve SLC26A4 genlerinin promotör bölgesinde epigenetik bir modifikasyon olarak meydana gelen CG (sitozin-guanin) metilasyonu derecesinin saptanıp bilinen mutasyonlara ilaveten metilasyon artışı ile genin fonksiyonunu tamamen yitirmiş olup olmadığını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde prelingual non-sendromik bilateral sensörinöral işitme kaybı tanısı almış ve bu nedenle tedavi amacıyla kohlear implantasyon yapılan 26 hasta ve ayrıca anne ve babaları (ebeveynleri) ve çocuk hastalıkları polikliniğine başvuran ve işitme kaybı veya herhangi bir sendromu olmayan 20 adet kontrol hastası dahil edildi. Çalışmadaki bütün bireylerden periferik kan örneği alınıp Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik laboratuvarlarında incelemeye tabi tutuldu ve DNA parçaları PyroMark Q24 cihazı ile analiz edilerek metilasyon yüzdeleri hesaplandı.

Bulgular: Bu çalışmada 3 ayrı genin; GJB-2, GJB-6, SLC24A genlerinin promotör bölgelerinde CG(sitozin guanin) nükleotidlerinin metilasyon düzeyleri araştırıldı ve bu

metilasyon düzeyleri kontrol grubunun aynı bölgelerindeki CG metilasyon düzeyleri ile karşılaştırıldı. Ayrıca hastalar, anneleri ve babaları ayrı ayrı değerlendirildi. GJB2'nin hiçbir bölgesinde hasta ve hasta olmayan gruplar arasında fark bulunmamışken, GJB6'nın 1. bölgesinde ve SLC26A4'ün 1. ve 4. bölgesinde anlamlı fark tespit edildi (sırasıyla $p=0.039$, $p=0.042$ ve $p=0.029$). Hasta ile anne, hasta ile baba ve hastanın anne babası arasında metilasyon oranları açısından hiçbir çift arasında anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışma sonucuna göre genetik mutasyonlara ek olarak epigenetik etkileşimlerin de işitme kaybında rol oynayabileceği gösterilmiştir. Konu ile ilgili daha fazla denekle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: işitme kaybı, epigenetik, metilasyon, CG(sitozin-guanin)

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENETIC MUTATIONS AND EPIGENETIC MODIFICATIONS IN PATIENTS WITH NON-SYNDROMIC SENSORINEURAL HEARING LOSS

Aim: Hearing is one of the most important senses to communicate humans with the surroundings and environment. In any case to prevent the hearing consists of the hearing loss. It progresses clinically and genetically as a heterogenous disease. Congenital hearing loss is more common in people, the incidence is approximately 1:1000. Non-syndromic hearing loss covers 70% of hereditary hearing loss. In previous studies from international literature, the structure of the genes and functional mutations that cause hearing loss were focused; only a few studies studied the epigenetic modifications that may occur in these genes. There are no studies in this field in our country. This study aims to detect CG (cytosine-guanine) methylation degree occurring as an epigenetic modification in GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes' promoter regions and to evaluate the function of the gene with the increase in methylation additional to known mutations.

Materials and Methods: In this study, 26 patients with bilateral prelingual non-syndromic sensorineural hearing loss and therefore undergoing treatment for cochlear implantation in ENT Clinics and 20 patients without any hearing loss or sendromic illness as control group were included in this study. Peripheral blood samples were taken from all subjects in the study and examples were subjected to examination in Medical Biology and Medical Genetics laboratories. DNA fragments were analyzed by Pyromark Q24 device and methylation percentage was computed.

Results: In this study methylation levels of CG (cytosine, guanine) nucleotide in GJB-2, GJB-6, SLC24 promoter regions was investigated and CG methylation levels in the same area

of methylation levels were compared with the control group. In addition, the patients were also evaluated separately by comparison with the mother and father. While no difference between the groups of patients and non-patients in GJB2 methylation regions, significant differences were detected in the first region of GJB6 and first and fourth region of SLC26A4 (in orderly p value=0.039, p value=0.042 ve p value=0.029). There was no significant difference between any pair in terms of methylation rates among patients with the mother, patients with the father and the patient's parents.

Conclusion: As a result of this study, epigenetic interactions should be kept in mind that in addition to genetic mutations may play a role in hearing loss. There is a need to do further studies with more subjects about this issue.

Keywords: hearing loss, epigenetics, methylation, CG(cytosine-guanine)

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İşitme, insanoğlunun çevresiyle iletişim kurmasındaki en önemli duyularından bir tanesidir. İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın algılama bozukluklarından biridir. İşitme duyusu bu nedenle insanoğlunun konuşmayı öğrenerek etrafı ile iletişim kurabilmesi için önemlidir.

İşitme kayıpları etiyolojilerine göre genetik ve non-genetik; başlama yaşına göre prelingual, perilingual ve postlingual; fenotipik özelliklerine göre sendromik ve non-sendromik; işitme yolu üzerinde etkili olduğu bölgeye göre iletim tipi, sensörinöral ve mikst tip ve şiddetine göre hafif, orta, orta derece şiddetli, şiddetli ve derin olarak sınıflandırılabilir (1).

İnsanlarda konjenital işitme kayıpları insidansı yaklaşık olarak 1000 canlı doğumda 1'dir (1). Sendromik ve non-sendromik olarak ikiye ayrılan genetik etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal işitme kayıpları, işitme kayıplarının %60'ını oluşturur (2). Non-sendromik konjenital işitme kayıpları genellikle iç kulak komponentlerinde (özellikle koklea) yapı ve fonksiyon değişiklikleri ile beraber seyreder ve konjenital grubun %70'lik bölümünü oluşturur. Non-sendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif, %18'i otozomal dominant, %2'si ise X'e bağlı olarak kalıtılmaktadır (2).

Non-sendromik işitme kaybına neden olan genler içinde en önemlisi ve ilk tanımlanan 'Gap Junction Beta 2 (GJB2/Cx26)'dir. Bir diğer 'gap junction' proteini, connexin 30(Cx30) connexin 26'nın bulunduğu aynı iç kulak komponentlerinde GJB6 geni tarafından eksprese edilerek üretilir ve bu iki proteinin fonksiyon olarak birbiriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (3). SLC26A4 geni 7q22-31 kromozomu üzerinde bulunan, 21 eksondan oluşan ve yüksek hidrofobik özelliğe sahip 780 aminoasitten oluşan 'pendrin' proteininin eksprese edilmesinde görevlidir. Pendrin SLC26 ailesine üye bir anyon transportudur ve özellikle tiroid ve iç kulakta eksprese edilir (3).

Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde bir mutasyon olmadan gen anlatımında meydana gelen değişimlerdir. Bu modifikasyonlar gen anlatımının susturulmasında (gene slicing) ve susturulmanın sistematik olarak yayılmasında etkin olan mekanizmalardır. Epigenetik değişimleri başlatan ve devam ettiren genel olarak üç ayrı ve birbiriyle örtüşen mekanizma tanımlanmıştır:

(a) DNA metilasyonları

(b) Histon modifikasyonları

(c) Kodlama yapmayan RNA'lar(2).

Daha önceki çalışmalar yukarıda bahsedilen genlerin genetik yapısına ve fonksiyonel mutasyonlarına odaklanmışken sadece birkaç çalışma bu genlerde oluşabilecek epigenetik modifikasyonları incelemiştir (4). Bizim çalışmamızda bu üç genin; GJB2, GJB6, SLC24A genlerinin promotör bölgelerinde CG nükleotidlerinin metilasyon dereceleri araştırıldı ve bu metilasyon dereceleri kontrol grubunun aynı bölgelerindeki CG metilasyon düzeyleri ile karşılaştırıldı. Çalışmamızdaki hasta gruplarında çalışılan genlerin önceki literatür bilgisine göre mutasyona uğradığı bilinmektedir. Araştırılmak istenilen bu mutasyonlara ilaveten metilasyon artışı ile genlerin fonksiyonlarının kaybolup kaybolmadığını ve bu durumun işitme kaybı ile bağlantısını değerlendirmektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Duyusu ve Ses

İşitme, insanoğlunun çevresiyle iletişim kurmasındaki en önemli duyularından bir tanesidir. İnsanlar duyuları vasıtasıyla dış dünyayı algılar; zihinsel, duygusal ve sosyal olarak gelişimini bu şekilde sağlar. Duyulardan birinin eksikliği insanda algılamayı bozarak yaşamı etkiler. İşitme duyusu da insanoğlunun konuşmayı öğrenerek etrafı ile iletişim kurabilmesi için önemlidir. İşitmenin meydana gelebilmesi için sesin yayıldığı bir ses kaynağı, bu sesi ileten bir ortam ve bunu algılayan reseptör organ yani kulak gereklidir.

Ses bir enerji kaynağından yayılan titreşimlerin etkisi sonucu gaz, sıvı ve katı ortamlarda moleküllerin sıkışıp gevşemesi ile ortaya çıkan enerjidir. Moleküllerin bir defa sıkışıp gevşeme hareketi içinde kalan mesafe sesin dalga boyunu, bir saniyedeki titreşim sayısı da o sesin frekansını ifade eder. Sesin frekansı Hertz (HZ) olarak gösterilmektedir. Normal bir insan kulağı her titreşim enerjisini ses olarak algılayamaz ancak 20-20.000 Hz arası sesleri işitebilir. Ses dalgalarının amplitüdü ise sesin şiddetini oluşturur. Sesin şiddet birimi desibel (dB) olarak gösterilir. Normal bir insan kulağı 0-120 dB arasındaki şiddetteki sesleri duyabilir (5).

Bazı ses türlerinin şiddetlerine örnekler:

-Fısıltı:20-25 dB

-Konuşma: 50-70 dB

-Bağırma: 70-85 dB

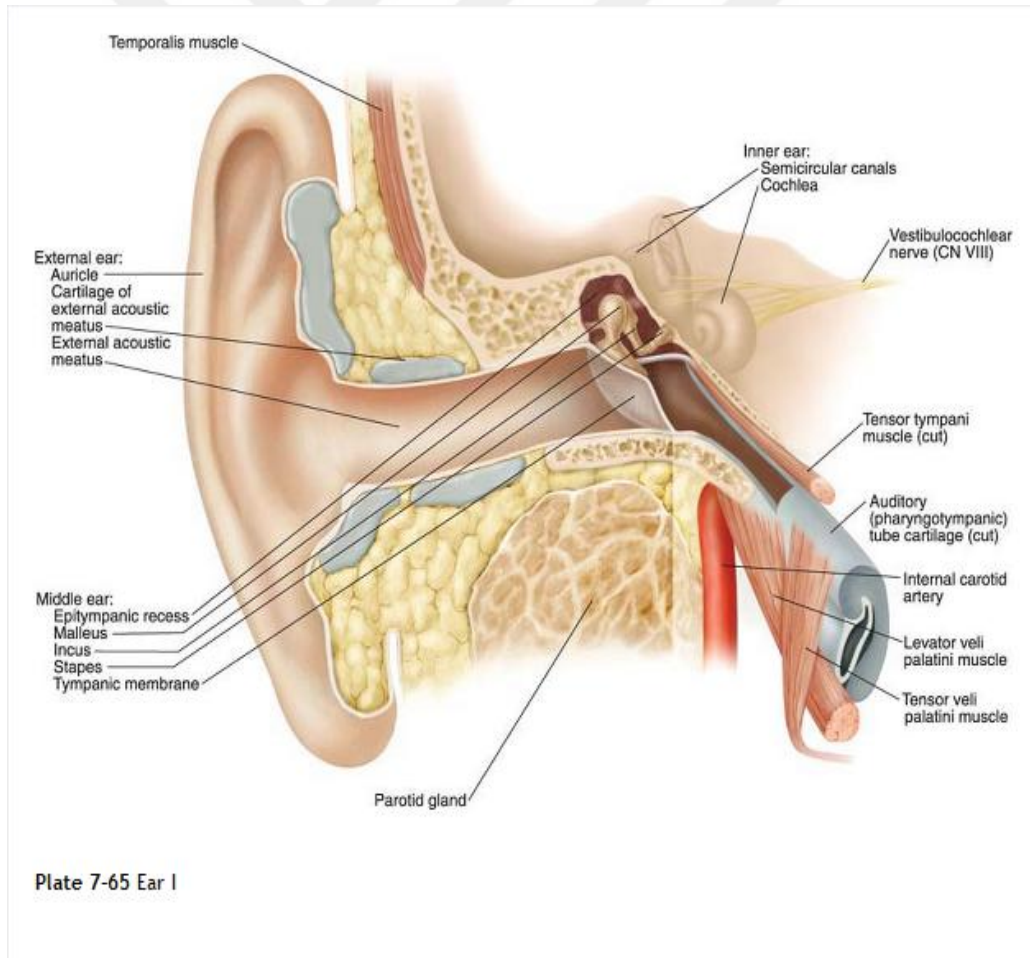
-Dış ortamda trafik gürültüsü: 90-100 dB'dir.

2.2. Kulağın Yapısı

2.2.1. Dış Kulak

Kulağın en dışında bulunan kulak kepçesi (aurikula) sesin lokalize edilmesini sağlayan elastik kıkırdaktan meydana gelmiş bir yapıdır. Ses dalgaları aurikulada toplandıktan sonra dış kulak yoluna iletilir. Dış kulak yolu embriyolojik olarak birinci faringeal yarıktan bir ektodermal kalınlaşma şeklinde gelişir. Erişkin yaşta normal boyutu yaklaşık 2,5 cm olup sesin kulak zarına iletilmesini sağlar. Kanalin 1/3 dış kısmını kepçenin kıkırdağı oluştururken içte kalan 2/3'lük kısım kemik yapıdadır (2) (Şekil-1).

Aurikula ve dış kulak yolu rezonans özelliklerinin de katkısı ile kulak zarı seviyesinde ses basınç değerlerini arttırmaya yarar. Dış kulak yolu, rezonans frekansı sebebiyle sesin 3000-4000 Hz olduğu zamanlarda en yüksek derecede amplifiye eder ki bu değer 4000 Hz de 12 dB'e kadar ulaşmaktadır (1).



Şekil-2: Kulak bölümleri; Dış, Orta ve İç Kulak yapıları

(Kaynak: Tank, Patrick W.; Gest, Thomas R. Lippincott Williams & Wilkins Atlas of Anatomy, 1st Edition.p.360)

2.2.2. Orta Kulak

Kulak zarı ve birbirine eklenmiş 3 tane kemikçikten (Malleus, İnkus, Stapes) oluşan içi hava dolu bir boşluktur. Orta kulağın dış yan duvarında timpanik membran bulunur. Bu bölgede işitme açısından en önemli yapılar kemikçiklerdir. Bu yapıların görevi ses dalgalarının hava ortamdan sıvı ortama iletilmesini sağlamak ve iç kulak sıvılarının akustik direncinden dolayı oluşan enerji kaybını karşılamaktır (6).

Malleus ve inkus arasındaki kaldıraç şeklindeki eklem özelliği ile malleus kolundaki işitsel enerjinin inkus koluna 1.3 kat daha fazla aktarılmasına olanak tanır. Buna ek olarak kulak zarının yüzey alanı yaklaşık 55 milimetre kare iken stapesin alanı ortalama 3.2 milimetre karedir. Bu 17 katlık fark ile kaldıraç sisteminin 1.3 katlık oranının çarpımı koklea sıvısı üzerine uygulanan basıncın kulak zarı üzerine ses dalgasının uyguladığı basınçtan 22 kat daha büyük olmasını sağlamaktadır. Bu değer ses basıncındaki artış oranı olup desibel olarak hesap yapılırsa 24 dB'e karşılık gelmektedir (5).

2.2.3. İç Kulak

İç kulak işitme merkezi olan 'koklear sistem' ve denge ile ilişkili olan 'vestibüler sistem' içermektedir. Temporal kemiğin içine gömülmüş olan iç kulak; membran ve kemik labirent adı verilen içi sıvı dolu iki yapıdan oluşmuştur. Membran labirent içinde endolenf, kemik labirent ve membran labirent arasında ise perilenf bulunmaktadır. Kemik labirent; kohlea, yarım daire kanalları ve bu kanalların yapısında bulunan utrikul ve sakkulu içeren vestibül aygıtlarından oluşmuştur. Kohlea 35 mm boyunda kıvrım yapan sarmal bir tüptür. Bağ dokusundan oluşan bazillar membran ve ince zar şeklinde Reissner membran kohleayı uzunluğu boyunca üç bölüme ayırmaktadır. Ortadaki bölüm scala media adını alır ve işitme reseptörü olan korti organı bu bölümde bulunur. Scala media'nın bir tarafında scala timpani diğer tarafında scala vestibuli bulunur. Scala media endolenf, scala vestibuli ve scala timpani perilenfle doludur. Endolenf ve perilenfin iyonik kompozisyonları birbirinden farklıdır.

Endolenfin perilenften farklı olan iyon konsantrasyonu kohlear kanalın yan duvarında bulunan stria vaskularisin marginal hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Endolenf yüksek K^+ (150 mM), düşük Na^+ (1 mM) ve çok az miktarda Ca^{++} (0,02 mM) iyon konsantrasyonuna sahipken perilenf plazmaya benzer şekilde düşük K^+ (3,5 mM), yüksek Na^+ (140 mM) ve endolenften daha yüksek bir Ca^{++} (1 mM) iyon konsantrasyonuna sahiptir (1).

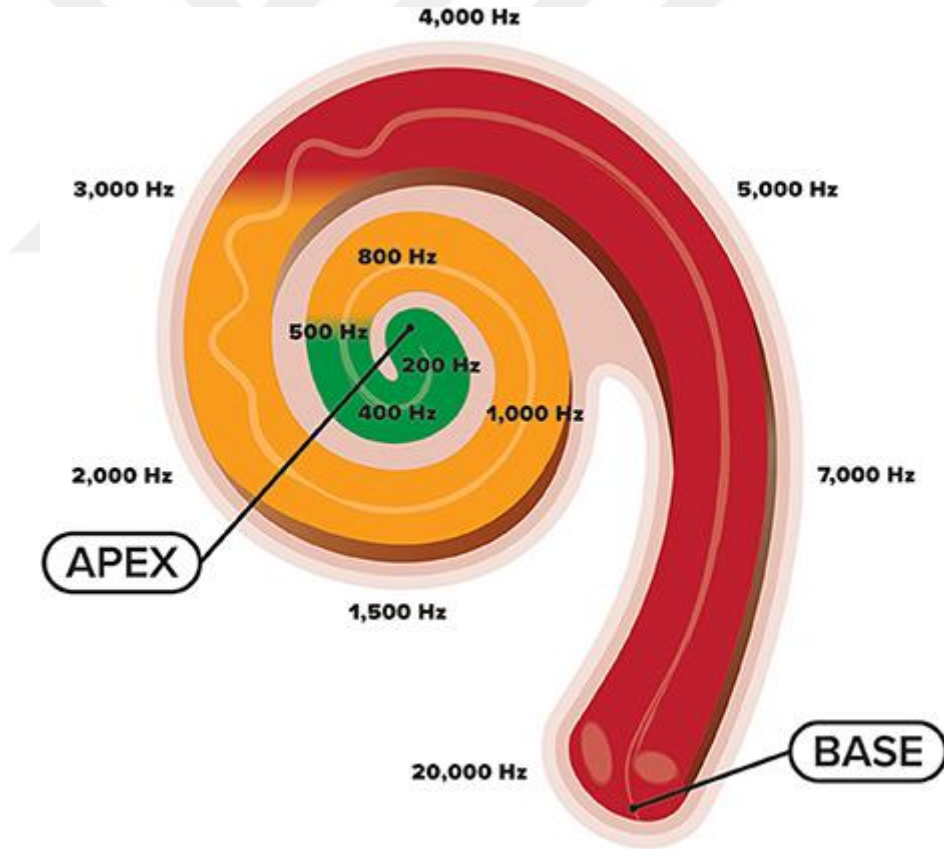
Kohlea'da işitmeden sorumlu yapı, korti organıdır. Bu yapı bazal membran üzerinde bulunur. Korti organı işitme sisteminde en önemli eleman olup reseptörlere sahip tüy hücreleri içermektedir. Bu tüy hücreleri iç tüy hücresi (IHC) ve dış tüy hücresi (OHC) şeklinde iki çeşittir. Tüy hücreleri mekanik uyarıların elektriksel uyarılara dönüşümüne neden olurlar. İç tüy hücreleri akustik sinire ve işitme korteksine sinyaller ileten reseptör hücrelerdir. Dış tüy hücreleri ise hem sensorinöral elemanlarına hem de alınan sesleri arttırarak işitmenin frekans seçiciliğine ve hassasiyetine katkıda bulunan elemanlara sahiptir. Akustik olarak uyarıldıklarında uzayıp bükülme özelliğine sahiptirler. Ses dalgalarının mekanik etkisi ile perilenf içindeki sıvı dalgalanmaya başlar. Bu dalgalanma titreşimlere yol açar ve stereosiller bükülür. Stereosillerin tepe uçlarında bulunan harekete duyarlı katyon kanalları açılır böylece K^+ iyonu endolenften hücre içine girer, böylece hücrelerde depolarizasyon oluşur. Bu durum bazolateral kısımdaki Ca^{++} kanallarını aktive eder. Ca^{++} iyonları akustik siniri aktive eden nörotransmitterlerin salınımını tetikler. Bunun sonucunda mekanik enerji elektrik enerjisine (kohlear sinire aktarılan) dönüşmüş olur (6).

Normal işitmenin devamı için; tüy hücrelerine girerek aksiyon potansiyelini tetikleyen K^+ iyonlarının endolenfe geri dönmesi gerekmektedir. Hücrede Ca^{++} iyonu miktarının artmasıyla Ca^{++} iyonuna duyarlı K^+ iyonu geçiş yollarını açılır ve K^+ iyonlarının hücreden dışarı çıkmaları sağlanmış olur. Bu sırada K^+ iyonları ilk olarak tüy hücrelerinin bazolateral kısmındaki kanalı geçer. Burada iyonlar gap junctionları kullanarak hücreler içinde yol alırlar.

K^+ iyonları stria vaskularise ulaşınca voltaj uyarımlı potasyum kanallarından geçerek endolenfe geri pompalanır (6).

Skalalarda oluşan dalgaların baziller membran üstünde en büyük titreşim yaptığı yer her frekans için belirli bir bölgededir. En büyük amplitüde titreşen bölge yüksek frekanslarda bazal bölgede yani oval pencereye yakın, sesin frekansı düştükçe basiller membranın en çok titreşen bölgesi kokleanın tepe bölgesine yakın olmaktadır (7) (Şekil-1).

Ses implusları 8. kranial sinir (vestibülokoklear sinir) lifleri yoluyla santral sinir sistemi merkezine iletilir. Primer işitme merkezi Gyri Temporales Transversi yani Heschel gyrusudur. İşitme merkezinde de pes ve tiz seslerin algılandığı bölgeler ayrı ayrıdır; yüksek tonlar işitme merkezinin derinlerinde, düşük tonlar ise yüzeyinde sonlanır (6).



Şekil-2: İç kulakta ses dalgasının Apex'e doğru gittikçe frekansının durumu

(Kaynak: Lahav A., Skoe E. An acoustic gap between the NICU and womb: a potential risk for compromised neuroplasticity of the auditory system in preterm infants. Front. Neurosci., 05 December 2014)

2.3. İşitme Kayıpları

İşitme kaybının çeşitli şekillerde sınıflamak mümkündür. İşitme kayıpları şiddetine göre (hafif, orta, orta ileri ve çok ileri), ortaya çıkış zamanına göre (prenatal, perinatal, postnatal), konuşmanın edinilmesi ile ilişkisine göre (prelingual, perilingual ve postlingual) ve patolojinin yerleştiği bölgeye göre sınıflandırılabilir (8).

İşitme kaybının tipleri (1)

a. İletim tipi işitme kaybı: Aurikula, dış kulak yolu, timpanik membran ile orta kulak kavitesini, kemikçikleri tutan patolojilerde kokleaya ulaşan ses şiddetinin azalmasına bağlı gelişen işitme kayıplarıdır. Sadece iletim tipi patolojisine bağlı işitme kayıplarında saf ses ortalaması 60 dB HL' yi geçmez.

b. Sensörinöral işitme kaybı: Koklea ve/veya koklear sinir ve işitme yollarındaki patolojilere bağlı işitme kaybıdır. Prenatal, perinatal ve postnatal patolojiler bu tip işitme kaybına neden olabilir.

c. Mikst tip işitme kaybı: İletim ve sensörinöral işitme kaybına neden olan patolojilerin aynı kulakta bir arada bulunması halinde mikst tip işitme kaybindan söz edilir.

d. Santral tip işitme kaybı: İşitsel sinir sistemini ve özellikle korteks bölümünü tutan patolojilerle birlikte ortaya çıkan konuşmayı anlama zorluğudur.

e. Fonksiyonel tip işitme kaybı: İşitme kaybı yakınması olan hastada yapılan subjektif ve objektif işitme ölçüm yöntemleri ile işitme kaybının olmadığı veya yakınmayı açıklayacak düzeyde bir patolojinin bulunmadığı durumlardır. Simulasyon durumlarında gözlenir.

İşitme kayıpları şiddetine göre ve etyolojik nedenlerine göre şu şekilde sınıflanabilir;

Şiddetine göre işitme kayıpları (2):

25 dB HL'nin altında: Normal işitme

26-40 dB HL: Hafif işitme kaybı

41-55 dB HL: Orta derecede işitme kaybı

56-70 dB HL: Orta-ileri derecede işitme kaybı

71-90 dB HL: İleri derecede işitme kaybı

90 dB HL' yi aşan: Çok ileri derecede işitme kaybıdır.

Etiyolojiye göre işitme kayıplarında sınıflama (3)

A. Konjenital işitme kayıpları

- a. Ailesel- Genetik
- b. Gebelik ve doğumla ilgili
 - i. Enfeksiyonlar: Rubella, toksoplazma, sitomegalovirus, sfilis, herpes
 - ii. Teratojenik ilaçlar: Talidomid vb.
 - iii. Hipoksi
 - iv. Travma
 - v. Sarılık
 - vi. Prematürite

B. Kazanılmış işitme kayıpları

- a. Menenjit
- b. Kafa travması
- c. Ototoksik ilaçlar: Aminoglikozid grubu antibiyotikler vb.
- d. Otitis media
- e. Labirentit: Viral, kabakulak, kızamık, influenza, bakteriyel menenjit
- f. Metabolik bozukluklar
- g. Cerrahi girişimler
- h. Perilenfatik fistüller
- i. Endolenfatik hidrops
- j. Otoimmün işitme kayıpları

2.3.1. Genetik İşitme Kayıpları

İnsanlarda konjenital işitme kayıpları nispeten daha yaygındır, insidansı yaklaşık olarak 1000 canlı doğumda 1'dir. Vakaların %60'si genetik olduğu halde çok faktörlüdür. Genetik işitme kayıpları fenotipe yansımalarına göre sendromik ve non-sendromik, kalıtım formları açısından otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı kalıtım ya da mitokondriyal kalıtım şeklinde olabilir (9).

2.3.1.1. Otozomal dominant kalıtım:

Otozomal dominant hastalıklarda heterozigot yani genin her iki varyantını da taşıyan bireylerde hastalığın fenotipi görülür. Etkilenmiş birey embriyoya %50 olasılıkla hastalıklı alleli ya da normal alleli geçirir.

Otozomal dominant geçişin 3 temel özelliği bulunmaktadır (9);

- Hastalık fenotipi için seksüel farklılık yoktur.
- Mitokondriyal ya da X'e bağlı kalıtım olmadığının kanıtı açısından erkekten erkeğe (babadan oğula) geçiş görülmektedir.
- Hastalıklı gen non-penetrant (genin fenotipte hiç ifade bulmaması) olmadıkça hastalık nesil atlamaz. Bu geçişe "dikey geçiş" denir (8).

2.3.1.2. Otozomal resesif kalıtım:

Otozomal resesif hastalıklarda homozigot yani genin iki aynı allelini taşıyan bireylerde hastalığın fenotipi görülür. Homozigot erişkin tüm embriyolara hastalıklı allelleri geçirir. Embriyo, diğer erişkin aynı genin en az bir mutant kopyasını taşımıyorsa hastalık fenotipini göstermeyecektir. Otozomal resesif geçişin özellikleri (9);

- Otozomal dominant kalıtımda olduğu gibi seksüel farklılık yoktur.
- Otozomal resesif hastalıklar jenerasyona spesifiktir. Nadir görülen bir hastalık ise akrabalık ihtimali yüksektir.

2.3.1.3. X'e bağlı kalıtım:

X'e bağlı kalıtım ya resesif ya da dominanttır.

- **X'e bağı resesif kalıtım:** Kadın yani 46 XX karyotipli bireylerin hasta olabilmeleri için mutant allelleri homozigot durumda taşımaları gerekir. Erkekler sadece tek bir X kromozomuna sahip oldukları için daima hastalık fenotipini gösterirler. Bu tip geçişte babadan oğula Y kromozomu aktarılıp X kromozom transferi olmadığı için geçiş yoktur. Hasta babalar hastalıklı allelleri, ileride hasta erkeklere sahip olabilecek tüm kadın embriyolara aktarırlar. Buna “nesil atlama” denir. Heterozigot kadınlar hastalıklı allelleri tüm erkeklere ve kızların yarısına geçirirler(6).

- **X'e bağı dominant kalıtım:** Hasta babalar hastalıklı allelleri tüm kızlara geçirir ve bu kızlarda hastalık fenotipi gösterirler. Babadan oğla geçiş yoktur. Heterozigot kadınların tamamı hastadır ve hastalığı tüm erkeklere ve kızların yarısına aktarırlar (6).

2.3.1.4. Mitokondriyal kalıtım:

Mitokondri insan hücresinde oksidatif fosforilasyon yolu ile adenozin trifosfat (ATP) sentezinin yapıldığı enerji merkezleridir. Mitokondri kendi ekstrasik DNA'sını oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın tamamı döllenme esnasında yumurta hücresi sitoplazmasında bulunan çok sayıdaki mitokondrilerce belirlendiği için mitokondriyal kalıtım maternaldir yani sadece anne tarafından belirlenir. Mitokondriyal DNA moleküllerinin tamamı anormal ise homoplasmi olarak adlandırılır, bu hücrelerden köken alan tüm hücreler anormal mitokondri içerirler. Anormal ve normal mtDNA ların ikisinin de beraber bulunmasına ise heteroplasmi adı verilir. Heteroplasmi yeni kuşak hücrelerin tamamında rastgele dağılım gösterir ve yapısını korur. Mitokondriyal DNA tamir mekanizmasına sahip olmadığından, mtDNA mutasyonları nukleer DNA'dan daha yüksek orandadır (9).

2.3.2. Sendromik İşitme Kayıpları

2.3.2.1. Otozomal Dominant Sendromik İşitme Kayıpları:

-**Waardenburg sendromu:** Prevalansı 1:10.000 ile 1:20.000 arasındadır. 4 alt tipi bulunmaktadır (10).

-*WS tip I*: Sensörinöral işitme kaybı, iriste pigmenter bozukluk, beyaz perçem, distopia kantarum, iç kantusta ve lakrimal punktumda yer değişikliği ile tanınır.

-*WS tip II*: WS tip I'den distopia kantarum'un olmaması ile ayrılır.

-*WS tip III*: Klein-Waardenburg sendromu olarak adlandırılır. WS tip I'in özelliklerine ek olarak üst ekstremitelerde kontraktür ya da hipoplazi ile karakterizedir.

-*WS tip IV*: Waardenburg-shah sendromu olarak adlandırılır. Hirschsprung hastalığı ile beraber WS'nu içerir.

WS tip I, II ve III kalıtsal olarak otozomal dominant bir hastalık olduğu halde WS tip IV otozomal resesiftir. WS'da işitme kaybı genellikle ileri, bilateral ve zaman içerisinde sabit seyir gösteren bir işitme kaybıdır.

-Brakiyo-Oto-Renal sendrom: Otozomal dominant geçiş göstermekle birlikte prevalans 1/40.000 dir. Dış, orta ya da iç kulakta anomaliler ile birlikte brankiyal anomaliler, kişilerin %25'in ise renal anomaliler eşlik eder. Neden olan gen EYA1 genidir (11).

-Stickler sendromu: Hastalığın prevalansı 1:10.000 dir. Hastalığın nedeni tip II proteinlerin ve tip IV kollajenin yapılıması için kodlanan COL2A1, COL11A2 ya da COL11A1 genlerindeki mutasyonlardır. Hastalarda görülebilecek anomaliler konjenital vitreus anomalisi, retina dekolmanı, myopi, sensorinöral işitme kaybı, eklem hipermobilitesi, orta hat yarıklarıdır (12).

-Nörofibromatozis tip II: Bilateral vestibüler şvannom ve diğer intrakraniyal ve spinal tümörlerin (şvannom, meningiom, gliom ve ependimom) gelişimine ek olarak hastalarda posterior subkapsüler lentiküler opasite görülebilir. Neden olan gen 22q12 kromozomu üzerinde bulunan merlin 48 ismi verilen gendir. İnsidansı 1:40.000 ile 1:90.000 arasındadır (10).

-Treacher–Collins sendromu: Maksilla ve mandibulada gelişim geriliği, anormal kantus yerleşimi, oküler koloboma, koanal atrezi ve ossiküler fiksasyona bağlı gelişen iletim tipi işitme kaybını içerir. Neden olan gen TCOF'dur (13).

2.3.2.2. Otozomal Resesif Sendromik İşitme Kayıpları:

-Jervell ve Lange- Nielsen sendromu: Konjenital sağırılık, uzamış QT intervali ve senkop atakları ile karakterizedir. Mutasyona uğramış genler iç kulakta ve kalpte potasyum kanallarını hedefler. İşitme kaybı genellikle konjenital, bilateral ve ileri derecededir. JLNS in prevalansı konjenital sağırılığı olan çocukların arasında sadece %0.21 olmasına rağmen kardiyak belirtilerinden dolayı teşhisi önemlidir (14).

-Usher sendromu: Sensörinöral işitme kaybı, retinitis pigmentosa ve sıklıkla vestibüler disfonksiyonla karakterize bir sendromdur. Klinik olarak 3 tipi bulunmaktadır (15):

-US tip I: Çocukluk döneminde ciddi ya da derin konjenital işitme kaybı, vestibüler disfonksiyon, retinitis pigmentosa varlığı ile karakterizedir.

-US tip II: Orta ya da ciddi konjenital işitme kaybı, normal vestibüler fonksiyonlar ve üçüncü ya da dördüncü dekadlarda ortaya çıkan retinitis pigmentosa ile karakterizedir.

-US tip III: Progresif işitme kaybı, değişken vestibüler fonksiyonlar ve değişken zamanda ortaya çıkabilen retinitis pigmentosa ile karakterizedir.

Usher sendromu genetik olarak heterojendir. Yapılan çalışmalarda değişik ailelerde 6 farklı gende 10 farklı gen bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Mutasyon saptanan genler; MYO7A (USH1B), USH1C, USH1F, USH1D, USH2A ve USH3 olarak bildirilmiştir (15,16).

-Pendred sendromu: Hastalığın prevalansı 100.000 de 7,5 ile 10 kişi arasında değişmektedir. Pendred sendromu herediter sağırılıkların %10'undan sorumlu tutulmaktadır. Neden olan gen pendrin olarak adlandırılan bir proteini kodlayan SLC26A4'tür (17). Fonksiyonu klor/iyot taşıyıcılığıdır ve iç kulak, böbrek ve tiroid hedeflenmiştir. Etkilenmiş kişilerde genellikle 2. dekatta gelişen guatra ek olarak prelingual, bilateral ve ileri derecede işitme kaybı gözlenir.

Radyolojik olarak hemen daima geniş vestibuler kanal ya da Mondini displazisi gibi temporal kemik anomalileri saptanmaktadır (18).

2.3.2.3. X'e Bağlı Sendromik İşitme Bozuklukları

-Alport sendromu: Hematürik nefrit, oküler değişiklikler ve işitme bozukluğu ile karakterize tip IV kollagen hastalığıdır. Tip IV kollagen bazal membranların en büyük komponentidir ve 6 farklı tip IV kollagen geninin değişik kombinasyonlarının trimerizasyonu ile yapılandırılır.5 zincirini kodlayan COL4A5'teki mutasyonlar X'e bağlı Alport sendromu nun (AS'nin) nedenidir. Bu proteindeki yetersizlik böbrek, göz ve kokleada bazal membrandaki trimerize 3-4-5 kompleksinde parsiyel ya da tam yetmezliğe neden olmaktadır (19). Bu kompleksin baziler membranda radyal gerginlik için önemli olduğu düşünülmektedir. Tanısal kriterler dört karakteristik özellikten en az 3 tanesini içermelidir (20);

- 1) Kronik böbrek yetmezliği ile beraber olan ya da olmayan ailede hematüri hikayesi
- 2) Progresif yüksek frekans sensörinöral işitme kaybı
- 3) Anterior lentikonus ve/veya maküler benekler gibi tipik göz bulguları
- 4) Böbreklerde glomeruler bazal membranda histolojik değişiklikler

Hastalık X'e bağlı hastalıklarda beklendiği üzere daha çok erkeklerde görülür. Hematüri hastalığın esas belirtisi olmakla birlikte oküler belirtiler hastaların 1/3'ünde görülmektedir (21). İşitme kaybı çoğunlukla simetrik, geç çocukluk döneminde saptanabilen, yüksek frekanslarda başlayıp daha sonra tüm frekansları tutan sensörinöral işitme kaybı şeklindedir (20).

2.3.2.4. Mitokondriyal Sendromlar

Mitokondriyal hastalıklar tipik olarak kas, beyin sapı, retina, pankreas ve koklea gibi yüksek enerjiye ihtiyaç duyan dokularda hastalığa neden olur. Sendromik mitokondriyal hastalıklar genellikle multisistemiktir ve hastaların %70'inde işitme kaybı eşlik eder (22).

-MERRF sendromu: İşitme kaybı, demans, ataksi, optik sinir atrofi ve kısa boy ile karakterizedir (22).

-MELAS sendromu: Mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz ve epizodik felcin tipik olduğu sendromda işitme kaybı yüksek frekanslarda, sensörinöral, progresif ve bilateraldir (22).

-Kearns-Sayre sendromu: Progresif eksternal oftalmopleji, atipik retinal pigmentasyon ve tipik olarak 20 yaş öncesinde başlayan kalp bloğunu kapsar. Hastaların %50'sinde sensörinöral işitme kaybı ve kokleosakküler dejenerasyon mevcuttur (22).

2.3.3. Non-Sendromik İşitme Kayıpları

Nonsendromik işitme kayıpları herediter işitme kayıplarının %70'ini kapsar. Kalıtım %80 otozomal resesif, %18 otozomal dominant, %2 X'e bağlı ya da mitokondriyal olabilir (23).

Nonsendromik işitme kayıplarının terminolojisinde ön ek olarak “DFN” temel alınmıştır. DFN'yi takip eden “A” dominant kalıtımı, “B” resesif kalıtımı ve hiçbir harfin konmaması X'e bağlı kalıtımı ifade etmektedir. Son takı keşfedilen lokusu gösterir (23).

2.3.3.1. Otozomal dominant non-sendromik işitme bozuklukları:

Otozomal dominant non-sendromik işitme bozuklukları için 51 lokus haritalandırılmış ve 17 neden olan gen klonlanmıştır. Genellikle işitme kaybının ortaya çıkışı postlingual, progresif ve orta derecededir.

2.3.3.2. Otozomal resesif non-sendromik işitme bozuklukları

Otozomal resesif non-sendromik işitme bozuklukları için 39 lokus haritalandırılmış ve 17 neden olan gen klonlanmıştır. İşitme kaybı genellikle prelingual olmakla beraber derecesi tüm frekanslarda farklı olmaktadır.

Guilford ve ark. 1994 yılında ilk otozomal resesif non-sendromik sağırılık lokusunu 13q12-13'e haritalandırmışlar ve bunu DFNB1 olarak adlandırmışlardır (24). Kelsell ve ark.

DFNB1 genini, GJB2 olarak adlandırılan bir gap junction geni olarak tanımlamışlardır (25). Kodlanan protein konneksin 26 (Cx 26) bir konnekson formu oluşturmak üzere diğer 5 konneksin proteini ile oligermize olur. İki konneksonun birbirine yanaşması ile komşu hücreler bir gap junctionı oluşturur (26).

İç kulakta, Cx26 konneksonların potasyum iyon döngüsünde önemli olduğu bilinmektedir. GJB2 nonsensöriyal epitel hücreleri, stria vaskularis, spiral ligaman ve spiral limbusta bu görev için rol almaktadır (27). GJB2 genindeki mutasyonların, konnexin 26 gap junction fonksiyonunda değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (27,28).

Dünyada GJB2'deki mutasyonların otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarının %50'sinin nedeni olduğu gösterilmiştir (25).

DFNB1'nin işitsel fenotipi orta derecede işitme kaybından ileri derecede sağırlığa kadar değişkenlik gösterir. İşitme kaybı her iki kulakta simetrik olmakla beraber uzun süre boyunca ilerleme göstermez. Temporal kemik anomalileri DFNB1 fenotipinin bir parçası olmadığı için rutin olarak temporal kemik görüntülemesine gerek yoktur (29).

GJB2'ye bağlı sağırlığın tespiti için genetik test çalışmaları mevcuttur. Mutasyon taramaları genetik danışmanlık için ve rekürrens şansının gösterilmesi açısından kolaylık sağlamaktadır (30). Birçok çalışmada GJB2 bağlantılı sağırlığı olan koklear implant alıcılarının çok iyi oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle genetik tarama testleri prognostik bilgi açısından da katkı sağlamaktadır.

2.3.3.3. X'e bağlı non-sendromik işitme bozuklukları:

X'e bağlı non-sendromik işitme kayıpları, non-sendromik işitme kayıplarının %2'sinden daha azından sorumludur. Beş lokus ve neden olan bir gen tanımlanmıştır. En genel görüleni DFNB3'tür ve bu tipte internal işitme kanallarında genişleme, stapes fiksasyonu ve vestibülde dilatasyon eşlik edebilir (31).

2.3.3.4. Mitokondriyal non-sendromik işitme bozukluğu:

Mitokondriyal non-sendromik işitme bozuklukları değişik mtDNA mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunların içerisinde en iyi karakterize olan 1555 A-G mtDNA mutasyonudur. Bu mutasyonun aminoglikozid toksisitesi ile de beraberliği vardır (10).

2.4. Epigenetik Modifikasyonlar ve İşitmedeki Rolü

Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde bir mutasyon olmadan gen anlatımında meydana gelen değişimlerdir. Bu değişimler kalıtsaldır, sonraki kuşaklara aktarılabilir. Ancak; bu modifikasyonların hücre bölünmesi sırasında yavru hücreye nasıl aktarıldığı tam olarak anlaşılamamakla birlikte, kalıtılan epigenetik modifikasyonların kromatin yoluyla taşındığı düşünülmektedir (4).

Epigenetik modifikasyonlar gen anlatımının susturulmasında ve susturulmanın sistematik olarak yayılmasında etkin olan mekanizmalardır. Epigenetik değişimleri başlatan ve devam ettiren genel olarak üç ayrı ve birbiriyle örtüşen mekanizma tanımlanmıştır:

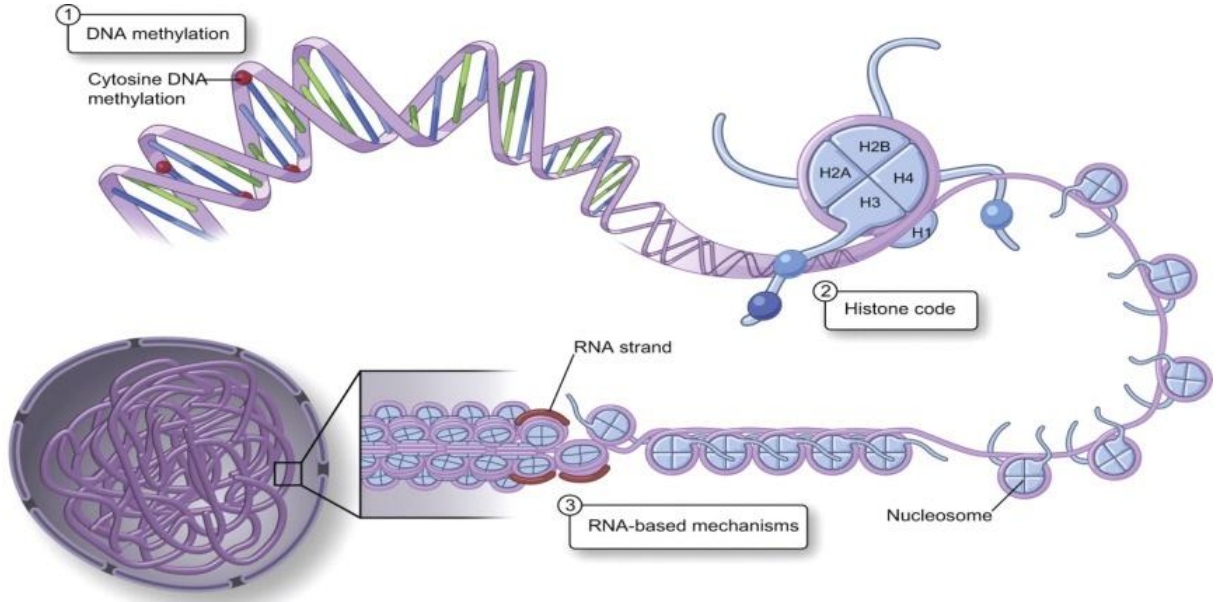
(a) DNA metilasyonları

(b) Histon modifikasyonları

(c) Kodlama yapmayan RNA'lar (32) (Şekil-3).

Bu işlemler transkript kararlılığını, DNA katlanmasını, nükleozom yerleşimini, kromatin paketlenmesini ve nükleus organizasyonunu etkiler.

(a) DNA metilasyonu: Gelişim süresince kromatin organizasyonu, gen düzenlenmesi, CpG (Sitozin-fosfat-Guanin)'nin yoğun olduğu bölgelerde transkripsiyonel baskılama, memeli canlılarda genomik imprinting, tekrar eden ve sentromerik dizilerde sessizleşme ve dişi memelilerde X kromozom inaktivasyonunda önemli bir role sahiptir. DNA metilasyonu kararlı ve dölden döle aktarılan önemli bir epigenetik mekanizmadır (33).



Şekil-3: Epigenetik modifikasyonlar

(Kaynak: Luca Lovrečić, Aleš Maver, Maja Zadel and Borut Peterlin (2013). The Role of Epigenetics in Neurodegenerative Diseases, Neurodegenerative Diseases, Dr. Uday Kishore (Ed.), ISBN: 978-953-51-1088-0, InTech, DOI: 10.5772/54744. Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases/the-role-of-epigenetics-in-neurodegenerative-diseases>)

Eğer bir DNA intron, tekrarlanan element ve aktif olarak yer değiştiren diziler için kodlama yapmıyor ve uzun süreli sessizleştirilmesi icap ediyorsa bazı etkili mekanizmaların devreye girmesi gereklidir. Memeliler bunun için sitozin metilasyonunu kullanmaktadırlar. DNA metilasyonları, DNA metiltransferazlar (DNMT) aracılığı ile DNA’da sıklıkla sitozin bazının metillenmesi ile oluşur (34). DNMT enzimleri S-adenozil-L-metiyonin molekülünden metil grubu alarak sitozine aktarır. Bu metilasyonlar, DNA’nın 3 boyutlu yapısını değiştirerek transkripsiyonla ilgili enzim ve faktörlerin genlerle olan ilişkilerini etkiler. Histon deasetilasyonları ve DNA metilasyonu, kromatini daha yoğun hale getirerek gen anlatımını değiştirir. DNA metilasyonu, stabil olması sebebi ile en kolay incelenebilen epigenetik mekanizmadır (32).

(b) Histon modifikasyonları: Kromatini oluşturan nükleozomlar, 147 baz çifti büyüklüğündeki DNA'nın histon oktameri çevresinde dönümler yaparak oluşur. Histonlar küçük bazik proteinler olup küresel bir domen ile yüklü ve daha esnek amino ucundan oluşur. Her histon (H) oktameri, iki ayrı H2A-H2B dimerine tutunmuş, bağlı iki H3-H4 dimerinin oluşturduğu kararlı tetramerden meydana gelir (35). Her nükleozom 10-60 baz çiftinin oluşturduğu DNA parçası ile birbirine bağlanır ve yaklaşık 10 nm çapında kromatin ipliği oluşur. İç kısımdaki her histon proteininin bazik aminoasit bakımından zengin, nükleozom yüzeyinden uzanan 20-35 aminoasit bakiyesi içeren amino-terminal domenleri ile oktamer içindeki histon-histon etkileşimlerini ve nükleozomal DNA'yı düzenleyen domenleri bulunur. Histon kodunu histon kuyrukları denilen bölgeler oluşturur ve nükleozomal dizilerin katlanmasında önemli rol oynar (36).

Histonlar çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirirler. Bunlar; arjinin (R) ve lizin (K) bakiyelerinin metilasyon ve asetilasyonu, lizin bakiyelerinin ubikitilasyon, serin (S) ve treonin (T) bakiyelerinin fosforilasyonu, SUMOylasyon ve ribozilasyonunu içerir (37). Bu modifikasyonlar kromatin ipliğine histon olmayan preoteinlerin bağlanmasını kontrol eder. Yapılan bazı çalışmalar, özgün histon modifikasyonlarının transkripsiyon ve transkripsiyonel baskılama gibi çeşitli biyolojik işlevlerle bağlantılı olduğunu göstermiştir (38).

(c) Kodlama yapmayan RNA'lar: 21-24 baz çifti uzunluğunda çift iplikli RNA olan siRNA'lar (small interfering RNAs) epigenetik mekanizmalarda rol almaktadır (39). Bunlar tek iplikli hale dönüşerek RISC (RNA-induced silencing complex) adı verilen protein yapılarıyla birleşir ve hedef mRNA'ya bağlanarak parçalanmasını sağlar. Bu şekilde mRNA'nın translasyonda kalıp olarak kullanılması engellenmiş olur (40). Heterokromatin oluşumunun başlayabilmesi için çift iplikli RNA'lara (dsRNA) gereksinim vardır. Çeşitli model organizmalarda siRNA mekanizması ile ilgili genler mutasyona uğratıldığı zaman heterokromatin oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (40).

2.4.1. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki etkileşim:

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarından ayrı ayrı bahsedilse de epigenetik düzenleme bu ikisinin etkileşimi ile olmaktadır. Son zamanlarda gelişmekte olan bir düşünce DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunun birlikte uyum içinde çalıştığıdır (41). Yeni yapılan bilimsel çalışmaların bir kısmında DNA metilasyonunun histon fosforilasyonunu tetikleyebileceği gösterilmiştir (42). DNA metilasyonu ayrıca metil-CpG proteinlerinin (MeCP) de toplanmasını sağlar. Bu proteinler histon metiltransferaz, histon deasetilaz ve sin3 gibi diğer transkripsiyonel protein komplekslerinin oluşumunu mümkün kılar. Bu yolla transkripsiyonel açıdan DNA metilasyonun baskıcı doğası, ileri kromatin kondansasyonu tarafından takviyelendirilir. Bu takviye DNA metilasyonuna sebep olabilen histon modifikasyonları tarafından başlatılabilir. Bir başka çalışmada da DNA metilasyonunun histon deasetilasyonundan sonra oluşabileceği gösterilmiştir (43).

Epigenetik süreçte gen ekspresyonunu susturmak için bu iki mekanizmanın sadece birlikte çalışması değil gen ekspresyonu için de kooperasyon içinde olmaları gereksinimi mevcuttur. Son bulgular histon hiperasetilasyonunun promoter bölgelerde DNA metilasyonunu indüklediği gösterilmektedir (42). Bu durum daha önceki çalışmalarda elde edilen bilgilere göre DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonunu baskılamak için kullanılan tedavi yönteminin bazı genlerin ekspresyonunun sinerjistik şekilde arttırdığını kanıtlamaktadır. Bazı çalışmalarda histon metilasyonunun, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunun koordineli bir etkileşim halinde olmasına olanak sağlar (44).

2.4.2. Gelişim ve Epigenetik:

Epigenetik mekanizmalar aynı zamanda embriyogenez ve gelişim aşamalarındaki gen ekspresyonlarında görev almaktadır. DNA metilasyonu genomik imprintlemeye öncülük eder böylece spesifik parental alleli susturur (45). Bu pROTeS'in karmaşıklığı uygunsuz gen ekspresyonuna ve Angelman sendromu gibi bazı hastalıkların oluşmasına neden olur (45).

Tam gelişmiş insan vücudunda DNA demetilleme enzimi bulunduğuna dair kanıt yokken demetilasyonun embriyogenez ve gelişim sürecinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Primordial hücreler hindguttan genital ridge doğru göç ederken DNA demetilasyon olayına maruz kalırlar. Demetilasyon için hızlı ve seçilmiş spesifik gen bölgeleri gösterir ki bu pROTeS enzimatik olarak kontrol altındadır ve 5-metilsitozin glikozilaz aktivitesi tarafından yönetilir. Gelişim sürecinde DNA metilasyonunun ilk basamağı daha önceden imprinte edilen genin intakt kalması iken kalan DNA metilasyonu 24 saat içinde yok edilir. Son ürün tamamen silinmiş bir genom içeren, parental epigenetik bilgiden yoksun, embriyonu düzgün, cinsiyete spesifik DNA metilasyonuna olağanak sağlayan bir üründür. DNA metilasyonu bir kez tamamlandığında gamet genomları remetilasyona gider. Bu son ürün daha önceki epigenetik bilgiyi silmiş yeni metilasyon kodu bekleyen bir gamettir. Bu pROTeS fertilizasyon ve embriyogenez döneminde sık tekrarlar. Daha önce kurulan gamet metilasyon modelleri kaldırılır ve gelişen embriyo genomik imprinting pROTeSine başlar. Dişi embriyo gelişiminde genetik kompanzasyonu sağlamak için gereken X kromozomunun inaktivasyonu DNA metilasyonunun ve histon modifikasyonunun embriyogenezdeki rolünü çok iyi yansıtır. İlk olarak kromozom ve histon modifikasyonları ile örtülü X kromozomunun inaktivasyonuna spesifik RNA oluşumu, DNA metilasyonunu takip eder. Bu değişiklikler kromozomu transkripsiyonel olarak olumsuz onayla yer değiştirir. Histon modifikasyonları X kromozomuna limitli değildir ayrıca gelişim sürecinde kromatin remodellemesinde de önemli rol oynar (46).

2.4.3. Kanseri Epigenetiği:

Kanser patogenezi birçok gene etki eden histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerle oluşabilmektedir. Bu durum işitme ile ilgisiz malinitelerde çok sık gözlenmektedir fakat son yapılan çalışmalarda vestibüler şvannomların patogenezinde epigenetik değişikliklerin rol oynadığı üzerine durulmaktadır (47).

Vestibüler şvannom (VŞ), odituar vestibülde şvan hücrelerinin benign bir tümörü olup sensörinöral işitme kaybına yol açar. Gonzalez-Gomez ve ark. yaptığı bir çalışmada VŞ'nin gelişiminde epigenetiğin rol oynadığı ile ilgili ipuçları elde edilmiştir (48). DNA metilasyon çalışmaları göstermiştir ki CASP8 ve RASSF1A gibi iki tümör süpressör genin metilasyon paterni VŞ'nin boyutuyla ve işitme kaybının derecesi ile alakalıdır. Bir başka çalışmada NF2 geninin normal Şvan hücrelerine kıyasla VŞ'de anormal DNA metilasyonu gösterdiği bildirilmiştir. Histon modifikasyonları da ayrıca VŞ'de NF2'nin etkisine katkı sağlamaktadır. FK228 isimli histon deasetilaz inhibitörünün NF2 olmayan hücrelerin büyümesini engellediği tespit edilmiştir (49).

2.4.4. Epigenetik Düzenleyici Farmakolojik Ajanlar:

Epigenetik pROTeSi ve gen reaktivasyonunu etkileyen az sayıda farmakolojik ajan geliştirilmiştir. Bu ajanlar esas olarak kanser tedavisinde gen ekspresyonunu manipüle etmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca epigenetik olarak regüle edilen gelişimle alakalı genlerin ekspresyonunu desteklemek amacıyla da kullanılır. Ve sodyum-iyot simporter gibi normal fizyoloji açısından da kullanılabilmektedir (50). Fakat literatürde işitme kaybıyla ilgili kullanım alanları tam olarak araştırılmamıştır.

-DNA Metiltransferaz Inhibitörleri:

Bu ajanlar, DNA metilasyonunu inhibe edici ajanlar ve histon modifiye edici ajanların bulunduğu geniş bir kategoriyi kapsarlar. DNA metilasyonunu etkileyen bu ilaçlar, bunu DNA metil transferaz enzimini inhibe ederek yaparlar (51).

Bu enzimin inhibe olması ile DNA replikasyonu sırasında kız sarmalın metilasyonu engellenir. Bununla birlikte bu durum hücrelerin aktif olarak bölünmesi için gereklidir. Desitabin (5-aza-2'-deoksisitidine, genellikle kısaltılmış olarak: 5-aza-dC) ve onun kardeş ilacı Vidaza (5-azasitidine, kısaltılmış: 5-azaC) pek çok malignensiyi tedavi etmek amacıyla (52) ve anjiogenez gibi çeşitli biyolojik pROTeSleri etkilemek için kullanılmaktadır (53).

Buna rağmen bu ilaçların toksisiteleri ve fizyolojik şartlar altındaki kararsız durumları bu ilaçların kullanımını sınırlandıran durumlardır (54). Bir diğer ajan olan Zebularine de kanser tedavisinde kullanılmaktadır ve diğer metil transferaz inhibitörlerine göre daha az yan etki profiline sahiptir (54). Zebularine, diğer DNA metil transferaz inhibitörleri gibi gen aktivasyonunun nonspesifik olarak hedef alır. Bu ajanlar ile yapılan tedavi sonlandırıldığında DNA metilasyonu tekrar başlar ve gen ekspresyonu tedavi öncesindeki durumuna geri döner.

-Histon Modifiye Edici Ajanlar

Histon modifiye edici ajanlar çok büyük ve birbirinden ayrı bileşik grupları kapsamaktadır (53), Bu grup temel olarak histon deasetilasyonunu inhibe eden ilaçlardan oluşmaktadır. Bu grup hem Trichostatin A gibi yeni histon deasetilaz inhibitörlerini (HDAC inhibitörleri) hem de Valproik Asit gibi non epigenetik uygulamalarda kullanılan ilaçları kapsamaktadır.

Bu farmasötik ajanların, DNA metiltransferaz inhibitörlerinden farklı olarak, aktiviteleri DNA replikasyonundan bağımsızdır. Bu nedenle bu ajanlar düzenli hücre bölünmesine uğramayan hücrelerin hedef alınmasında daha etkilidirler. DNA metiltransferaz inhibitörleri gibi bileşikler küresel histon asetilasyonu seviyelerini etkiler ve diğer epigenetik modifiye ajanlar gibi genetik özgülüklerin aynı olmamasından muzdariptir.

Bu iki grup ajanların kombine kullanılması ile hem bireysel olarak kendi işlemleri hem de birbirlerini de karşılıklı olarak takviye etmeleri sağlanmış olur (55). DNA metilasyonunu etkileyen ajanlar ile histon deasetilazların birlikte kullanılması ile histon hipoasetilasyonu aracılığıyla gen ekspresyonu bastırılmaktadır. Kanser tedavilerinde bu tarz farmakolojik stratejiler uygulanmaktadır (56). Buna rağmen bu ajanların işitme araştırmalarındaki uygulamaları halen test edilme aşamasındadır.

2.4.5. İşitme ile İlgili Hastalıklarda Epigenetik:

İşitme ile ilgili epigenetik çalışmalar literatürde çok az sayıdadır. Bu nedenle kulak gelişiminde ya da işitme kaybında DNA metilasyonunun ve histon modifikasyonlarının rolünü göstermede yeterli veri yoktur. Ancak, bu tarz epigenetik olayların işitme dışında insan vücudundaki diğer tüm sistemlerde önemli role sahip olması son derece zor görülmektedir.

Spesifik DNA mutasyonlarının saptanması insanlarda sağlığın nedenini anlamakta paha biçilemez çalışmalardır. Bu önemli çalışmalara rağmen pek çok işitme ilgili hastalıkta halen bilinmeyen mutasyonlar vardır ve muhtemelen bunların çoğu hiçbir zaman tespit edilemeyecek mutasyonlardır. Bu nedenle, DNA sekanslarında mutasyonların gösterilemediği işitme ile ilgili hastalıklarda ve sendromlarda, epigenetiğin önemli bir role sahip olduğunu düşünmek oldukça makul görünmektedir. Hatta mutasyonların bilindiği hastalıklarda bile fenotipik farklılıkların oluşmasında epigenetik modifikasyonlar önemli olabilmektedir.

Mutasyonlu genin ekspresyonundaki değişiklikler kromatin dizisinde remodelinge neden olur ve bu durum, ikincil değişikliklerle normalde mutasyona uğramış genlerden direk olarak etkilenmeyecek olan bireyde bazı değişikliklere neden olur. Bu düşünce monozigotik ikizlerdeki fenotipik değişikliklerin araştırılmasıyla ortaya çıkmıştır. Okulo-oto-radial sendromlu ikizlerin gösterildiği bir çalışmada ikizlerden birinin diğerine göre çok daha ileri fenotipik değişikliklere sahip olduğu görülmüştür. Ve yazarlar gen ekspresyonundaki değişikliklerde epigenetik mekanizmanın olasılığı üzerinde durmuşlardır (57).

İşitme kayıplarının epigenetik nedenlerini gösteren çalışmaların azlığı ya da yokluğunun muhtemel nedeni kusurlu biyolojik mekanizmanın kurulmasının zorluğundan kaynaklanmaktadır. DNA metilasyon çalışmaları, genomik DNA metilasyon paternini belirlemek için sıklıkla sodyum bisülfid dönüşümünü kullanmaktadır. Bu işlemde, dönüşüm sırasında metile sitozin, sitozin olarak korunurken; metillenmemiş sitozin kimyasal olarak modifiye edilir ve urasile dönüşür.

Pek çok PCR tekniği DNA metilasyon paternlerini belirlemede kullanılabilir. Olası DNA metilasyon hedef bölge sayısının çokluğu PCR tekniği ile kombine edildiğinde, anormal DNA metilasyonunu taramak oldukça zahmetli bir süreçtir. Histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin belirlenmesi çok daha zor bir işlemdir. Histonlardaki olası amino asit hedeflerinin sayısı, histon modifikasyonları çeşitliliği ve kromatin konfirmasyonunun aslında birden çok farklı modifikasyonun kombinasyonu ile olduğu ihtimali göz önüne alındığında, histon perturbasyonunu göstermek oldukça zor olabilir.

Western Blot, immunopresipitasyon, kromatin çalışmaları ve bir dizi farklı tetkikler histon değişikliklerini inceleme amacıyla kullanılmaktadırlar. Maya ve bitkiler üzerindeki histon modifikasyonları hakkında yapılan çalışmalar da mevcuttur. Buna rağmen bunların işitme araştırmalarında kullanılabilmesi sınırlı görülmektedir. Bu zorluklara rağmen, işitme kaybında epigenetik mekanizmaların rolunu gösteren kanıtlar da mevcuttur.

2.4.6. İşitmeyle ilgili sendromlar:

DNA mutasyonlarının analizi epigenetik mekanizmaların duyma üzerine etkinliğini göstermesi açısından önemlidir. Rett sendromunun biyolojik orjininin X kromozomundaki metilCpG-binding protein(MeCP2)deki mutasyonları içerdiği gösterilmiştir. Bu hastalığın fenotipinde tipik el hareketleri, motor ve nörolojik defisitler ile işitme kaybı mevcuttur. Rett sendromunun değerlendirilmesinde işitme testleri önemli bir komponenttir. Bu hastalıkta sorumlu tutulan ve çoğu CpG bölgesinde yer alan mutasyonların analizi göstermiştir ki başka çalışmalarda da tartışılmış olan CpG dinükleotidleri mutasyona açık bölgelerdir (58). MeCP proteinlerinin fonsiyonunun bilinmesiyle, Rett sendromlu hayvanların beyinlerinde gen ekspresyonunda değişimler görülmesi şaşırtıcı bulunmamaktadır. Bu hastalığın başlangıç zamanı olarak, MeCP bağlayıcı proteinlerin fonksiyonuna da bağlı olarak, bazı yazarlar semptomların, gelişim yolağından onarım yolağına geçişi sağlayan genlerdeki shift ile ortaya çıktığını öne sürmektedirler. MeCP2'nin kaybında, kromatin yapısındaki ortaya çıkan

değişikliklerle birlikte, yapısal yolağın onarım yolağına geçişteki gerekli olan genlerin shiftleri etkilenebilir. MeCP2 nin eksikliğinde doğru genin susturulması mümkün olmayabilir ve metilasyona uğramış DNA histon deasetilasyonunu sağlayan ek biyolojik mekanizmaları ve diğer alakalı transkripsiyonel represif histon kromatin modifikasyonlarını oluşturamaz. Dana önce de belirtildiği gibi DNA metilasyonu ile alakalı görülen mutasyona açık bölgeler, Stickler sendromunda da önemli rol oynar. 20.yüzyılın ortalarında tanımlanan Stickler Sendromu sadece iyi tanımlanmış olan oftalmolojik problemler değil ayrıca çoğu hastada görülen işitme kaybını da yapmaktadır (59). İşitme kayıplı bu hastaların analizi göstermiştir ki bu hastalarda büyük oranda COL11A1 geninde değişiklikleri mevcuttur. Bu sendromla ilgili ayrı bir çalışmada gösterilmiştir ki metilsitozin deaminasyon mekanizması Stickler sendromu ile ilişkili genlerin mutasyonundan sorumludur. Bu tarz bir vakada mutasyonlar durdurma kodonunun devreye girmesi ile sonuçlanır.

Asıl olarak kas yapısını etkilediği bilinen Fasyopulohumoral musküler distrofinin (FSHD1) de işitme ile ilgili manifestasyonları vardır. Sensörinöral işitme kaybı bu hastalıktan muzdarip hastalarda rapor edilmiştir ve anlaşılmıştır ki sağırılık bu musküler distrofide önemli bir bulgudur. Ek çalışmalarla bu işitme kaybının 4000-6000 Hz arasında olduğu gösterilmiştir. (60). Bu işitme kaybı için mekanizma tam olarak anlaşılamamasına rağmen distrofinin etiyolojisinde epigenetik faktörlerin önemi bildirilmiştir. D4Z4 tekrar dizisinde FSHD1 ile ilgili önemli delesyonlar gösterilirken, D4Z4 bölgesindeki hipometilasyonun hastalığın fenotipinde anahtar olay olduğu ortaya çıkarılmıştır (61). Bu hipometilasyonun kromatin yapısını ve ek genlerin ekspresyonunu etkileyeceği hipotezi güçleşmiştir.

DNA hipometilasyonunun ayrıca immünyetmezlik-sentromerik instabilite-fasyal anomaliler sendromundaki (ICF sendromu) iletim tipi işitme kaybından da büyük oranda sorumlu olduğu düşünülmektedir (62). Daha önce de belirtildiği gibi metilasyon, SINES ve LINES olarak bilinen DNA bölgelerindeki stabilizasyonu sağlaması ve rekombinasyon

olaylarını engellemesi açısından önemli rol oynamaktadır. Bu hastalıkta perisentromerik DNA kromozomları 1, 9 ve 16 neredeyse tamamen metilasyona uğramamıştır ve bu da dramatik kromozom değişikliklerine yol açmaktadır. DNA metilasyonu ayrıca kromatin doğrulamasında değişikliğe sebep olarak kromatin yoğunlaşmasını engellemektedir (63). Bu rekombinasyon olayları ve anormal kromatin doğrulanması gen ekspresyonunda açık bir etkiye sahiptir.

Kromozomal yazılım bozukluğu olan hastalardaki epigenetik değişiklikler ayrıca Beckwith-Wiedemann Sendromundaki anormalliklere de yansır. Bu sendromda, posterior helikste ve stapesde patolojiler sebebiyle işitme kaybıyla da ortaya çıkabilen bir grup anatomik anomaliler mevcuttur (64; 65). Çalışmalar göstermiştir ki Potasyum kanal KCNQ1OT1 geninin yazılımındaki hatalar bu sendromla ilişkilidir (66). Bu çalışma, işitme kaybından sorumlu gen ailesinin diğer üyeleriyle ilgili yapılan yayınla da uyumlu görülmüştür (67, 68). Ek çalışmalarla da bu sendromla ilgili olan bir dizi genler ortaya çıkarılmıştır. İlginç olarak, DNA metilasyonu ve yazılımındaki değişikliklerden bu diğer genler sorumlu tutulmaktadır (69) ve bu da bütün hastaların DNA metilasyon yazılımındaki bir bozukluğu paylaştığı görüşü hakkındaki spekülasyonlara yol açmaktadır.

Hastalık ile ilgili başka bir durum da CHARGE sendromunun epigenetikle ilişkili olabileceğidir. Bu sendrom oküler kolobom, koanal atrezi, işitme kaybı, kranial sinir defekti ve genital defekt ile karakterizedir. Bu sendromun nedeni olarak son çalışmalar CHD7 mutasyonları, DNA helikaz proteini kromozom alanları üzerinde odaklanmıştır (59). CHD7 ve histon modifikasyonları veya DNA metilasyonları arasındaki kesin iletişim detaylı olarak tarif edilmelidir, fakat CHD3 ve CHD4 proteinleri arasındaki ilişki CHD çalışmalarında histon asetilasyonunun önemini göstermiştir (58). CHD7’de histon modifikasyonlarının rol oynayabileceği mümkündür. Bu CHARGE sendromu ile ilişkiyi yükseltebilir, ve CHD7 mutasyonu yüzünden özellikle histon asetilasyonu ve kromatin değişimi işitme kaybına neden

olabilir. Burada yer alan örneklerin hepsi sendroma bağlı işitme kaybı dahil bir dizi organ sistemlerini etkilemektedir. Bu bulgu fizyolojik ve biyolojik süreçlerin yanı sıra gelişimsel süreçte epigenetik gelişimin de kanıtıdır. Normal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu farklılıkları bir çok gende ifade değişimlerine sebep olarak anomalilere yol açar. Kanserdeki epigenetik karışıklık organ ve dokulardaki moleküler mekanizmaların değişmesi, problemlerin artması patolojik hücre klonunun artmasına neden olacaktır. İşitme kaybının izole olarak epigenetik anormalliklerden oluştuğu söylenemez. Ancak bu büyük olasılıkla hem izole gen etkisi hem de kulağa özgü bir olaydır.

2.4.7. Kanserlerle işitmenin ilişkisi:

İşitme araştırmalarında araştırılan epigenetik düzenleme malignitelerde de rol oynamaktadır. Retinoblastom ile ilişkilendirilen RB gen değişimi insanlarda işitme sonuçlarına neden olabilir (65). Çalışmalar göstermiştir ki RB gen kaybı kohlea dejenerasyonu ile işitme kaybına neden olabilmektedir (66). Kapsamlı bir açıklaması olmasına rağmen bu gen bu tez kapsamı dışında kalmaktadır çünkü epigenetik mekanizmaların RB gen ekspresyonunda rol oynadığına dair bir kanıt yoktur (70, 71). Bu gen DNA metilasyonunda değişiklik ile kohlea içinde rol alarak işitme kaybına sebep olabilir. Daha önce de ele alındığı gibi DNA metilasyonu vestibüler şvannom patolojisinde önemli rol oynamaktadır. Diğer bulgularla birlikte çalışmalarda histon değişiklikleri şvannom hücrelerinde, şvan hücre disfoksiyonu ve vestibuler şvannom patogenezinde önemli rol oynayabilir. Gerçek bir malignite olmamasına rağmen, epigenetik modifikasyonlar tedavideki istihdamı artırma olasılığı yükselir. Aslında bu ilaçlar VŞ büyümesini tersine çevirme veya yavaşlatma olarak kanser tedavisinde tasarlanmışlardır. Bu bileşikler normal SC fonksiyonlarını manipule etme olasılığını yükseltebilir. Epigenetik modifikasyon işitme sisteminin yaşamsal kısmını güçlü şekilde koruyarak normal SC büyümesini kontrol eder.

2.4.8. İşitme araştırmalarında epigenetik modifikasyonların etkin kullanımı:

Bazı epigenetik etken maddelerin zehirlilik etkisi ve instabil durumlarının olmasına rağmen, bu maddeler işitme sürecine dahil olan pasif kalmış kasların aktive edilmesinde hala güçlü bir yardımcı olarak yerini korumaktadır. Tedavi öncesi ve sonrasında kullanılan bu maddelerin basit bir görüntüleme sistemi yardımıyla hem iç kulaktaki epigenetik gelişim hem de normal kulak fizyolojisi üzerinde oynadığı rolü anlamada yardımcı olabilmektedir. Bugüne kadar, tam işitme kaybı vakalarında yapılan araştırmalarda bu güçlü maddelerden yararlanılmıştır.

Bunlar özel amaçlı ilaçlar olmamalarına rağmen, kullanımları RNA inhibisyonu ve gen transferi gibi diğer metodlarla karşılaştırıldığında açıcı kasları aktive etmede en basit metot olabilir. Bu maddelerin işitme kaybından sonra fonksiyonel işitme uzuvlarını yeniden aktive etme gibi diğer alanlardaki kullanımı, işitme araştırmalarında kullanımı açısından etkileyici sonuçlar sunmaktadır. Yakın zamanda yapılan araştırmalar sinirsel farklılıkların histon deasetilaz uygulaması yardımıyla harekete geçirebileceğini gösteriyor (53,57). Bu araştırmalar işitme kaybıyla işlevini kaybeden duyma sinirlerinde tekrar kullanılabilirliğine dair önemli sonuçlar sunmaktadır. Histon deasetilaz uygulaması iç kulakta işitme işlevini kaybetmiş işitme sinirlerinin yerine yeni işitme sinirlerinin gelişmesini de mümkün kılar. Saç hücreleri üzerinde etkisini daha iyi anlayabilmek adına hücrelerin tekrar oluşumuna yardım eden ilaçların kullanımına bu maddeler önderlik etmiştir. Kohlea ve iki hibrid levürden alınan DNA analizleri gen ekspresyonunda düzenleyici etki gösteren proteinlerin tekrar biçimlenmesinde kromatinin rol oynadığını göstermiştir (67). Ek ilave çalışmalar zarar görmüş saç hücrelerinin amino glikozit ile hücre aracılığında opeasyondan sonra gen ekspresyonunda histon deasetilaz aracılığıyla meydana gelen değişimi de ortaya koymaktadır (55). Histon değişimi yeni hücrenin uyum sağlamasını sağlamaktadır. Bu durum HDAC inhibitörü gibi histon modifiye edici ilaçların histon modifikasyonlarından etkilenebileceği olasılığını arttırmaktadır.

Bu ilaçların erken kullanılması belki tüylü hücrelerin bazılarını kurtarabilir ve işitmenin biraz düzelmesini sağlayabilir. Bu bileşikler ile ek çalışma göstermiştir ki; epigenetik düzenlenmiş embriyonik hücre belirteçlerinde yeniden ekspresyon oluşmaktadır. Bu epigenetik düzenlenmiş gelişim süreci, sağır bir yetişkinde iç kulağa fonksiyonlarını geri kazandırabilme ihtimalini oluşturur. Sox-2 geni iç kulak gelişimi için gerekli olan ve DNA metiltransferaz inhibitörü ile tedavi edildiği gösterilmiş bir gendir (61, 63). Nanog ve Oct4 gibi embriyonik kök hücrelerin içinde ifade edilen ilave bir takım genlerin, aynı zamanda 5-Aza C ile tedavi sonrası farklı hücrelerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu ilaçların verilmesi ile gelişimsel süreçlerin tekrarlanması, belki de kök hücre nakline bir alternatif olabilecektir.

2.4.9. İşitme gelişimini içeren epigenetik mekanizmalar:

İç kulak gelişiminde ve işitmede önemli bir takım genler, işitme araştırması ve epigenetik arasındaki bağlantıyı geliştirmesi açısından faydalı olabilecek ek epigenetik bağlantılara sahiptir. Bu iki gen β -catenin ve WNT ailesi üyelerinin genleridir. Bu genlerin ikisi de işitme araştırmasında önemlidir. β -catenin, farklı bir takım proteinlerle kombine şekilde adhezyon noktalarında bulunan, iç kulak ve odituar epitel gelişiminde rol alan bir gendir.

İmmünolojik olarak, gelişmekte olan sıçan iç kulağında β -catenin ekspresyonu gösterilmiştir. (72). Diğer çalışmalarda da odituar epitelin hücre proliferasyonunda azalmaya neden olan β -catenin nükleus içinde lokalize olduğu gösterilmiştir (72). Vestibüler epitel ile ilgili çalışmalarda aminoglikozid hasarı sonrası β -catenin ekspresyonu ve buna bağlı vestibüler epitelde değişiklikler oluşmaktadır.

Apopitoza girmiş epitel hücresinin ekspresyonunda azalma olurken, destek hücrelerinde beta kateninin arttığı gösterilmiştir (65).

Epitel gelişimindeki rolüne ek olarak, kolesteatomlarda da beta kateninin rolü kanıtlanmıştır (70). İşitmede önemi olan beta kateninin, kromatin biçimlendirilmesi ve epigenetik değişikliklerde kritik bir rolü mevcuttur. Bu, kromatin yapısını değiştirmek için, CRB/p300 gibi bir takım farklı kromatin biçimlendirme proteinleriyle etkileşir (73). Bugüne kadar beta kateninin oditüvar epitelyumla ilgili rolü ile kromatin biçimlendirilmesi fonksiyonu ile ilişkisini gösteren bir bilgi bulunmamaktadır. Beta katenin, fonksiyonlarını sıklıkla WNT proteinleri ile birlikte gerçekleştirir. WNT bir dizi protein ailesinde tespit edilmiştir ve gelişimdeki rolü için yoğun çalışmalar yapılmıştır. WNT ve pax2 ile yapılan çalışmalar otik plakod gelişiminde WNT'nin önemini göstermişlerdir (70). Bazı başka çalışmalarda da tavuk iç kulağında önemi gösterilmiştir (67). WNT de beta katenin gibi kromatin biçimlendirilmesinde önemli role sahiptir.

WNT'nin kontrol altına alınmış gen ile ilişkili histon modifikasyonları ve özellikle histon metilasyonunda rol oynadığı görülmektedir (70). Kromatin değişikliğindeki rolünün yanında, WNT, bir takım farklı sinyal yollarının önemli bir üyesidir. İşitme ile ilişkili yolları ortaya çıkaran çalışmalara rağmen, WNT nin kromatin biçimlendirilmesi ile ilişkisi açıktır. Kromatin biçimlendirilmesinin işitme üzerindeki rolünü açıklamak için WNT ile ilgili epigenetik fenomen başlıca bir fırsattır.

2.4.10. İşitme, reaktif oksijen türleri ve epigenetik:

İşitme araştırması epigenetik mekanizmalarla ilgili çok az bilgi içeriyor olsa da, birçok çalışmada reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikallerin işitme süreci ve tüylü hücreler üzerindeki etkisi gösterilmiştir. ROT bağımlı işitme hasarının nedenleri, sisplatin gibi ototoksik ilaçların verilmesi ve ses bağımlı travmadır. ROT ve epigenetik arasında ciddi ilişki vardır. MnSOD gibi önemli ROT genlerinin transkripsiyonel sessizleştirilmesi ile epigenetik mekanizmalar arasında sağlam ilişki bulunmuştur (66). ROT artışları, SAM sentezini ve dolayısıyla DNA metilasyon kalıpları değiştirilerek glutatyon seviyesi etkilenebilir. Kromatin

yapısında değişikliklere yol açabilecek hidrojen peroksid içeren ek ROT ilişkili mekanizmalar vardır (66). Belirtilmiş işitme kaybı mekanizması, ROT ve epigenetik mekanizmalar arasındaki ilişkiye yeni bir bakış açısı sunar. Bir takım farklı bileşikler ve vitaminlerin işitmeyi koruyucu etkisi üzerine de çalışmalar yapılmıştır, bu yüzden epigenetik modifiye ajanların değerlendirilmesi, yeni bakış açısı sunma ve işitme kaybına karşı olası koruma olanağı sağlayabilir.

Sonuç olarak epigenetik, işitme kaybı, kulak gelişimi ve işitmeyi anlamada büyük fırsatlar sunar. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, ticari olarak temin edilebilen kitler ve iyi bilinen protokoller kullanılarak kolaylıkla yapılabilir. Birçok epigenetikle ilgili deneyler sırasında çoğu moleküler biyologlar için tanıdık ortak laboratuvar teknikleri kullanılır. Epigenetik modifiye edici ajanlar ile tedavi, gen ekspresyonunu değiştirmek için yeni fırsatlar sunmaktadır. Diğer birçok biyolojik sistem merkezi gibi, epigenetik ile ilgili mekanizmalar, işitme nedeniyle araştırma alanında dikkat çeken yeniliklerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER:

3.1.1. Kan örneklerinin elde edilmesi:

Bu çalışmada İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda ve İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde prelingual non-sendromik bilateral sensörinöral işitme kaybı tanısı almış ve bu nedenle tedavi amacıyla koklear implantasyon yapılan 26 hasta ve ayrıca anne ve babaları (ebeveynleri) ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları polikliniğine başvuran ve işitme kaybı veya herhangi bir sendromu olmayan 20 adet kontrol hastası dahil edildi. Çalışma ve kontrol grubu hastalarından ve çalışma grubundaki çocukların ebeveynlerinden 5 cc periferik kan alındı ve pıhtılaşmayı önlemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere konuldu. 7 dk 3000 devirde santrifuj edilerek ependorf tüplerinde -32 derece soğuklukta çalışma yapılincaya kadar bekletildi. Örnekler İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik laboratuvarlarında incelemeye tabi tutuldu.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar:

Çalışmanın genetik ile ilgili basamaklarında Amerika Birleşik Devletleri'nden QIAGEN marka malzemeler kullanıldı. DNA izolasyonu için Qiagen QiAamp DNA Mini Kit, bisülfite modifikasyonu için Qiagen EpiTect Bisülfite Kiti ve polimeraz zincir reaksiyonu için Qiagen PyroMark PCR kiti kullanıldı.

QiAamp DNA Mini Kit içeriği:

- Toplama kapları
- Çözelti AL
- Çözelti ATL
- Çözelti AW1 (konsantre)

- Çözelti AW2† (konsantre)
- Çözelti AE
- Proteinase K

Qiagen EpiTect Bisülfite Kiti içeriği:

- Toplama kapları
- Çözelti BL
- Çözelti BW (konsantre)
- Çözelti BD (konsantre)
- Çözelti EB
- Taşıyıcı RNA

Qiagen PyroMark PCR kiti içeriği:

- PyroMark PCR Master Mix
- CoralLoad® konsantresi
- Q-Solution®
- MgCl₂, 25 mM
- RNase-yoksun su

3.2. YÖNTEM:

3.2.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu:

Hasta (80) ve kontrol (20) numunelerinden ilk olarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, Qiagen QiAamp DNA Mini Kit kullanıldı. (Qiagen, Katalog No: 51304). Protokolde 200 uL kan örneklerine 20 uL Proteinaz K ve 200 uL lizis tamponu eklendi. 56 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 200 uL etanol ilave edildi. Karışım QIAamp spin kolonlarına aktarıldı. Kolon içerisindeki numuneler 8000rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından safsızlıklardan arındırılmak üzere 500 uL AW1 tamponu ilave edildi ve santrifüj

işlemi tekrarlandı. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı ve bu defa 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj gerçekleştirildi. İzolasyonun son aşamasında kolonlara 100 uL elüsyon tamponu eklenerek 8000 rpm’de 1 dak santrifüj yapılarak genomik DNA örnekleri elde edildi.

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları nanodrop cihazı vasıtasıyla belirlendi. Konsantrasyon birimi nanogram/mikrolitre olarak ölçüldü.

3.2.2. DNA Örneklerinin Bisülfıt Modifikasyonu:

Hasta ve kan numunelerinde elde edilmiş genomik DNA örneklerinden bisülfıt deaminasyon reaksiyonun gerçekleştirildi. Protokol Qiagen EpiTect Bisülfıt Kiti aracılığıyla uygulandı (Qiagen, Katalog No: 59104).

Bu işlem için her bir DNA örneğinden 500 ng kullanıldı. 200uL hacimli PCR tüpleri içerisinde sırasıyla gereken hacimde DNA numunesi, 85 uL bisülfıt mix solusyonu, 35 uL DNA koruyucu tamponu eklendi. Numuneler termal cyler cihazında (Elips- BioRad, Katalog No: 1861096) yaklaşık 5 saat süreli değişen sıcaklıklarda inkübasyona tabii tutuldu. (sırasıyla 95°C-5 dk, 60°C-25 dk, 95°C-5 dk, 60°C-85 dk, 95°C-5 dk, 60°C-175 dk). İnkübasyonun ardından numuneler EpiTect spin kolonlarına aktarıldı ve safsızlıklardan arındırmak amacıyla sırasıyla BL, BW ve BD tamponları eklendi ve her defasında numuneler maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlara 20 uL elüsyon tamponu eklendi ve 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edilerek saflaştırılan bisülfıt ile modifiye edilmiş DNA örnekleri elde edildi.

3.2.3. PyroMark Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Bisülfıt deaminasyon reaksiyonu ile modifiye edilen genomik DNA örneklerinden GJB2, GJB6 ve SLC26A4 genlerinin sırasıyla; 179, 136, 251 baz çiftlik belli bölgeleri PCR aracılığıyla çoğaltıldı. Qiagen PyroMark PCR kiti kullanıldı (Qiagen, Katalog no: 978703) Reaksiyon için PCR tüplerine sırasıyla 12,5 uL Pyromark PCR master mix, 2,5 uL CoralLoad solusyonu, 2uL forward ve reverse primer karışımı, 1 uL bisülfıt ile modifiye edilmiş DNA ilave edildi. Toplam hacim distile su ile 25 uL’ye tamamlandı. Termal cyler cihazında

(Elips- BioRad, Katalog No: 1861096) PCR tüpleri sırasıyla; 95°C-15 dk aktivasyon, 94°C-30sn denatürasyon, 58°C-30sn primer bağlanması, 72°C-30 sn zincir uzama aşamalarından geçirildi. Denatürasyon, primerlerin bağlanması ve zincir uzama aşamaları 45 kez tekrar edildi. Son olarak 72°C-10 dk final uzama basamağı sonrasında PCR reaksiyonu tamamlandı. Pyrosekans ile nükleotid dizi analizi öncesi PCR ürünlerinin doğruluğu ve kalitesi agaroz jel elektroforezi vasıtasıyla incelendi. Bu amaçla, 2 gr Agaroz (Lonza, Katalog No: 50002) 100ml, pH:8 Tris, EDTA, Asetik Asit (Lonza, Katalog No: BE51216) tamponunda çözöldü. Mikrodalga fırında kaynatılarak çözölen agaroz solösyonuna 5uL Ethidium Bromide eklendi. Jel tepsisine dökölen sıvı agaroz solösyonunun üst kısımlarına yükleme kuyularının oluşması için uygun taraklar yerleştirildi. Jelin katılaşması beklendi ve katılaşma tamamlandığında taraklar çıkarıldı. Elektroforez tankı (MedsanTek, Elite 300 Plus) içerisine yerleştirilen jel üzerine yükleme tamponu (Tris, EDTA, Asetik Asit) eklendi.

Her bir kuyucuğā 10uL PCR ürünü yüklendi. Yükleme öncesi PCR ürünleri yükleme boyası (Lonza, Katalog no: 50655) ile karıştırıldı. İlk kuyucuğā DNA marker (50-1000bp, Lonza, Katalog No: 50461) yüklendi. Yükleme tamamlandıktan sonra, jelin iki ucunda bulunan elektrodlara voltaj uygulanarak (5-10 V/cm) jel içerisinde numunelerin hareket etmesi sağlandı. Katoddan anoda göçü tamamlanan numunelerden akım kesildi ve jel çıkarılarak transillüminatör (MedSanTek, DNR Minibis Pro) vasıtasıyla DNA bantları UV ışık altında görüntölendi.

DNA marker ile büyüklüğü ve ayrıca gözlenen bantlar ile kalitesi kontrol edilen PCR ürünlerine bir sonraki aşamada PyroMark CpG assay dizileme analizi uygulandı.

3.2.4. PyroMark CpG Dizileme Analizi:

İlk aşamada PCR ürünlerinin immobilizasyonu sağlandı. Bunun için öncelikle her bir örnek için mix hazırlandı. Mix için 2µl streptavidinle birleştirilmiş sepharoz boncukları, 40 µl Binding buffer, 28 µl ultra saf su, 10 µl PCR ürünü kullanıldı. Her bir kuyusunda 80 µl'lik

karişım olan well-plate oda sıcaklığında 10 dakika çalkalayıcıda bekletilerek PCR rnlerinin manyetik boncuklara bağlanması sağlandı.

İkinci aşamada DNA parçaları ayrıştırılarak PyroMark Q24 plate içine alındı. PyroMark Q24 plate için karişım hazırlandı. Bu karişımda 2.5 µl/örnek sekans primeri, 22.5 µl/rnek Annealing Buffer kullanıldı. PyroMark alışma istasyonu 50 ml %70'lik etanol, 40 ml denaturasyon solüsyonu, 50 ml wash buffer, 50 ml ultra saf su (H₂O-1), 70 ml ultra saf su (H₂O-2) kullanılarak hazırlandı. alkalayıcıdan well-plate alındı ve çalışma istasyonuna konuldu. PyroMark vakum pompası açılarak tüm PCR rnleri-sefaroze boncukların vakum filtresine geçmesi sağlandı (~15 sn). Sırasıyla etanolde 10 sn, denaturasyon solüsyonunda 10 sn ve son olarak wash buffer'da 15 sn bekletildi ve sonra vakum pompası kapatılarak PyroMark Q24 plate içine yerleştirildi. 2 dk süresince vakum nazik bir şekilde ovalanılarak filtrelerindeki PCR rnlerinin PyroMark Q24 plate içindeki karişıma geçmesi beklenildi. Vakum H₂O-1 kısmında sallanarak ucunda kalmış olabilecek PCR ürünlerinden arındırıldı. H₂O-2 kısmına geçildiğinde vakum pompası açılarak tüm suyu çekmesi sağlandı ve park pozisyonuna alındı.

nc aşamada sekans primerleri DNA parçalarına bağlandı. PyroMark Q24 plate ise 80°C'de 2 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığında en az 5 dk soğumaya bırakıldı.

Son aşamada sekans reaksiyonu için gerekli nükleotidler, enzim ve substrat aşağıda belirtilen miktarlarda kartuşa yerleştirildi:

- Enzim: 119 µl
- Substrat: 119 µl
- Adenin: 63 µl
- Sitozin: 66 µl
- Guanin: 77 µl
- Timin: 80 µl

Kullanılan sekans primerleri her 3 genin promotor bölgesine ait dizilere uygun olarak tasarlandı.

GJB2 geni için:

- Analiz edilecek dizi: GGCGCCGCTGGTGCCGGCGAAGCCCCGC
- Bisulfit uygulamasıyla elde edilecek dizi:
GGYGTyGTTGGTGTyGGYGAAGTTTTyGT
- Nükleotid atma sırası: TGTCAGTCGTGTAGTCAGTCGATGTTTCG

GJB6 geni için:

- Analiz edilecek dizi:
GTTCCCTCGAGGGCCTGAGCAGGCGCCCCACACCTGCACCCGT
- Bisulfit uygulamasıyla elde edilecek dizi:
GTTTTTTyGAGGGTTTGAGTAGGYGTTTTATATTTGTATTyGT
- Nükleotid atma sırası: TGTTTCGATGTGACGTCAGTCGATTAGTATGTATCG

SLC26A4 geni için:

- Analiz edilecek dizi:
CGCCCGGCCCGGGCTCCACTCCCGGGGAGGCCTCGAGGGTTGCGGA
- Bisulfit uygulamasıyla elde edilecek dizi:
YGTTYGGTTYGGGTTTTATTTTyGGGGAGGTTYGAGGGTTGYGGA
- Nükleotid atma sırası:
GTCGTCGTCGTTAGTTCGGATGTTTCGAGTGTTCG

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2
	B2-71	B2-72	B2-73	B2-74	B2-75	B2-76	B2-77	B2-78
B	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2
	B2-79	B2-80	B2-81	B2-82	B2-83	B2-84	B2-85	B2-86
C	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2	GJB2
	B2-87	B2-88	B2-89	B2-90	B2-91	B2-92	B2-93	B2-94

Şekil-4: Örnek bir plate kurulumu

Analiz edilecek dizi PyroMark Q24 cihazı ve 005 numaralı metod kullanılarak aşağıdaki grafikte yer alan örneğe göre T nükleotidi yerine C nükleotidi varlığına göre (Instrument Name PyroMark Q24, Serial Number 001856, Instrument Method PyroMark Q24 Method 005) analiz edildi. Pozitif kontrolde olduğu gibi, T yerine C nükleotidi varlığı metilasyon varlığı olarak kabul edildi ve analizlerdeki yüzdesi hesaplandı.



Şekil-5: Pozitif kontrolde metile olan GJB2 genindeki CpG adaları. 5 pozisyonda beklenen metilasyon gerçekleşmiş olup dizi analizinde T yerine C nükleotidinin varlığını sürdürmesi ile gösterilmektedir (Kırmızı oklar). Not: Üstteki tablo örneklerin cihazdaki yerleşimini göstermektedir. Orta kısım ilgili genin dizi analizi sonucunu göstermekte, son kısım ise beklenen dizi analizini göstermektedir. Kırmızı dikdörtgenler ise dizideki C>T yer değişiminin olabileceği pozisyonları göstermektedir. Ortadaki grafikte bu pozisyonlardaki nükleotidler gösterilmektedir.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS v22.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standard sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında student t testi kullanıldı. Birbiri ile ilişkili niceliksel verilerin karşılaştırılmasında bağımlı t testi ve niceliksel veriler arasındaki doğrusal ilişkiyi ölçmek amacı ile Pearson korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

Hastalarla ilgili demografik bilgiler Tablo-1’de verilmektedir. Buna göre çalışmamıza eşit sayıda erkek ve kadın (13 erkek, 13 kadın) hasta dahil edilmiştir. Hastaların 14’ünde (%56) anne ve baba akrabalığı vardı. Bunlardan 4 tanesinin anne babası 1. derece, 5 tanesi 2. derece ve 5 tanesi de 3. derece akraba idi. 6 hastanın (%23) ailesinde işitme kaybı olan yakını mevcuttu. Hastaların hiçbirinin annesinde gebelikte radyasyon maruziyeti, ateşli hastalık öyküsü ve fetüse geçebilecek ilaç kullanım öyküsü bulunmamaktaydı. 5 hasta (%19) prematür doğum şeklinde dünyaya gelmiştir. 1 hastada (%4) kafa travması öyküsü ve yine 1 hastada (%4) doğum sonrası patolojik sarılık öyküsü bulunmaktadır. Hastaların %15’inde (4 hasta) menenjit gibi yüksek ateşe neden olabilecek ciddi hastalık geçirme öyküsü bulunmaktadır. Bu veriler demografik data elde etmek amacıyla toplanmıştır. Kontrol grubundan bu veriler toplanmadığından analizlerde kullanılmamıştır.

	Sayı	Yüzde
Cinsiyet		
Erkek	13	%50
Kadın	13	%50
Anne baba akraba mı?		
Evet	14	%54
Hayır	12	%46
Ailede işitme kaybı olan var mı?		
İşitme kaybı var	6	%23
İşitme kaybı yok	20	%77
Annenin gebelikte ateşli hastalık öyküsü var mı?		

Var	0	%0
Yok	26	%100
Annenin gebelikte ilaç kullanımı?		
Var	0	%0
Yok	26	%100
Annenin gebelikte radyasyon maruziyeti var mı?		
Var	0	%0
Yok	26	%100
Erken doğum		
Var	5	%19
Yok	21	%81
Hastada kafa travması öyküsü var mı?		
Var	1	%4
Yok	25	%96
Hastanın doğum sonrası patolojik sarılık öyküsü var mı?		
Var	1	%4
Yok	25	%96
Hastada menenjit vb. ateşlik hastalık öyküsü var mı?		
Var	4	%15
Yok	22	%85

Tablo-1: Hastaların demografik bulguları

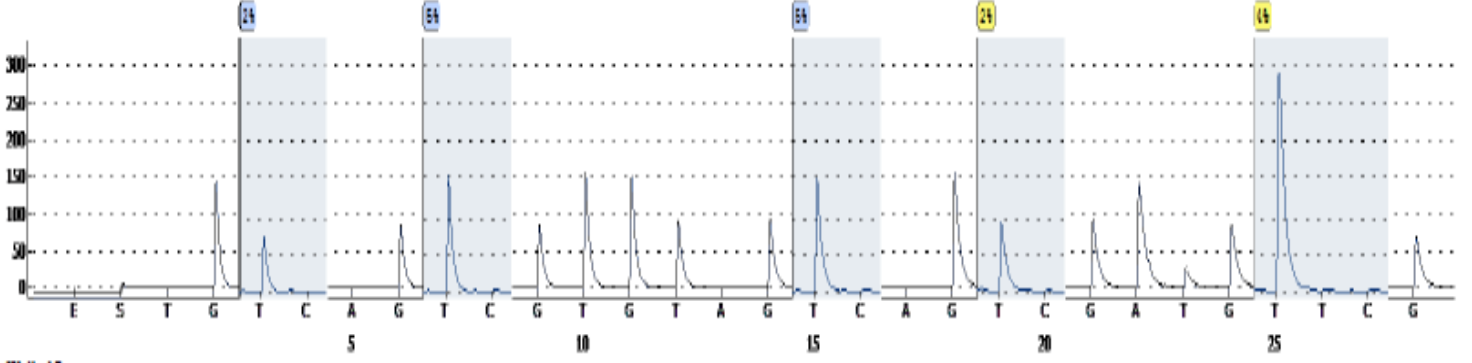
Bu çalışmada 3 ayrı genin; GJB-2, GJB-6, SLC24A genlerinin promotör bölgelerinde CG(sitozin guanin) nükleotidlerinin metilasyon düzeyleri araştırıldı ve bu metilasyon düzeyleri kontrol grubunun aynı bölgelerindeki CG metilasyon düzeyleri ile karşılaştırıldı. Metilasyon değerleri yüzde değerleri olarak verilmiştir.

Genin promotör bölgesinde CG nükleotidleri metillenmiş ise ve kontrol grubuna kıyasla bu düzey anlamlı yüksek ise o genin ifadesi baskılanır yani gen fonksiyon göremez.

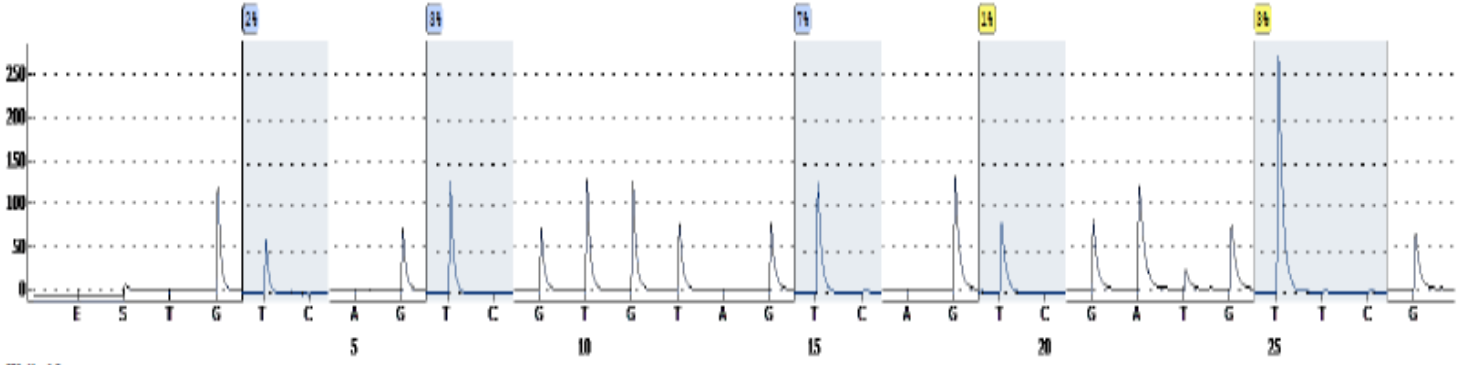
Bu çalışmadaki hasta gruplarında çalışılan genlerin önceki literatür bilgisine göre mutasyona uğradığı bilinmektedir. Araştırılmak istenilen acaba mutasyona ilaveten metilasyon artışı ile genin fonksiyonunu tamamen yitirmiş olup olmadığını değerlendirmektir. GJB-2 için 5, GJB-6 için 3, SLCA24 için 6 adet CG nukleotidinin metilasyon yüzdeleri araştırıldı ve kontrol grubunun aynı sayıda CG nukleotid metilasyon düzeyi ile karşılaştırılmıştır.

PyroMark Q24 Method 005 uygulanan örneklerde PyroMark Q24 Analysis version: 2.0.6 kullanılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. rnek olarak GJB-2 (Resim-2), GJB-6 (Resim-3) ve SLC26A4 (Resim-4) geninde hasta sonucu, negatif ve kontrol metilasyon yüzdeleri gsterilmiştir.

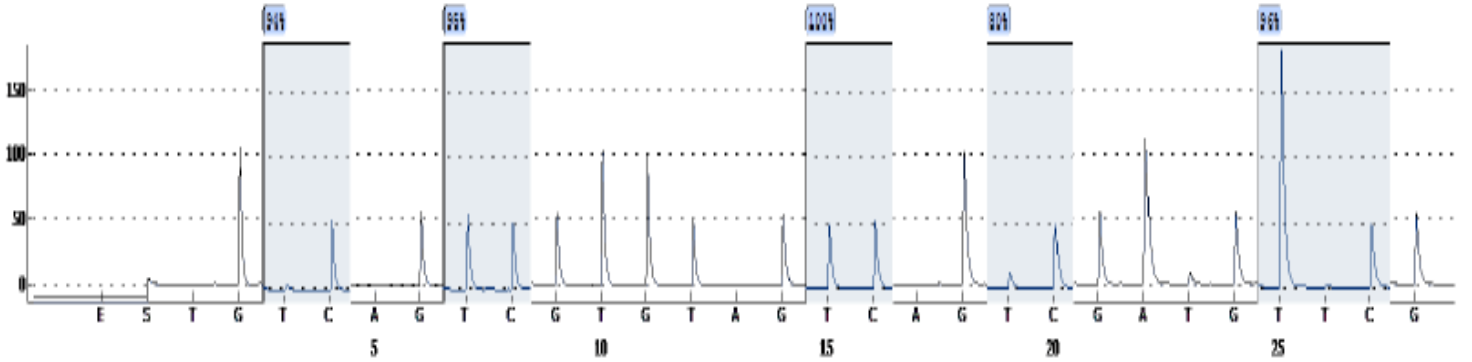
Well: A5
Assay: GJB2
Sample ID: B2-99
Sequence to analyze: GGYGTYGTTGGTGTGGYGAAGTTTTTGT



Well: A7
Assay: GJB2
Sample ID: B2-NEG
Sequence to analyze: GGYGTYGTTGGTGTGGYGAAGTTTTTGT

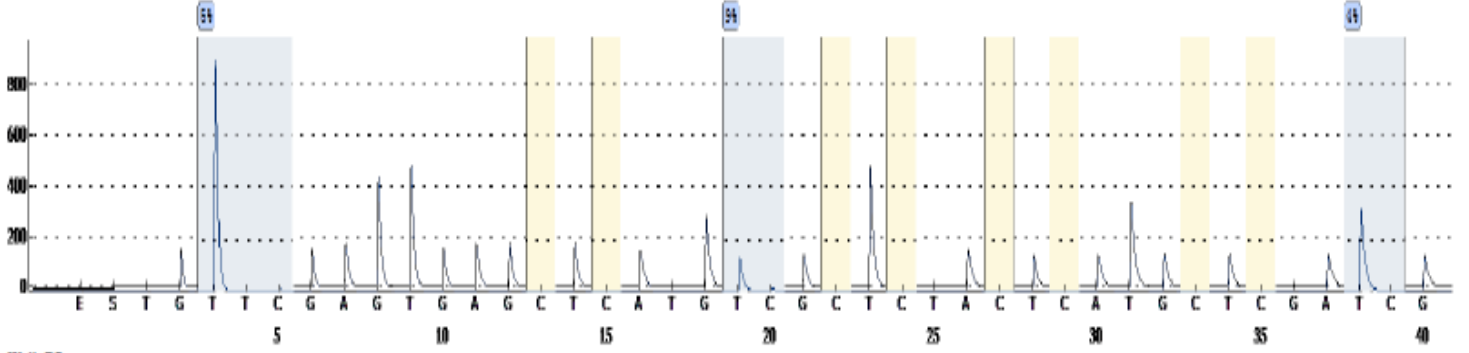


Well: A8
Assay: GJB2
Sample ID: B2-POS
Sequence to analyze: GGYGTYGTTGGTGTGGYGAAGTTTTTGT

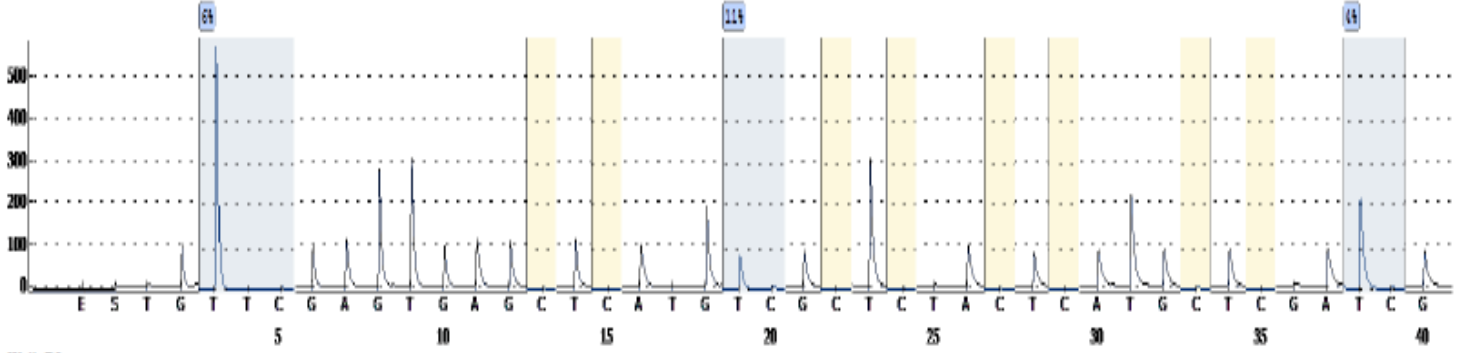


Şekil-6: GJB2 geninde hasta (ilk satır), negatif (ikinci satır) ve pozitif (üçüncü satır) kontrol için metilasyon yüzdeleri verilmektedir. Mavi bölgeler C>T nükleotid dönüşümü olan pozisyonları göstermektedir. C>T nükleotid dönüşümü olmayan bölgeler pozitif kontrolde olduğu gibi metilasyon varlığını göstermektedir. Verilen yüzdeler C nükleotid varlığını yani metilasyon yüzdesini göstermektedir.

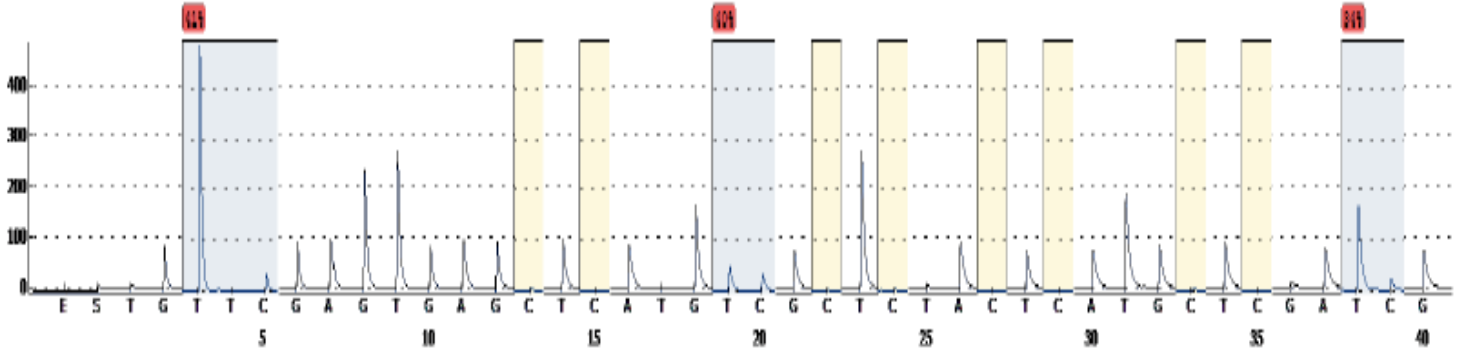
Well: B5
Assay: GJB6
Sample ID: B6-99
Sequence to analyze: GTTTTITYGAGGGTTTGAGTAGGYGTTTATATTGTATTYGT



Well: B7
Assay: GJB6
Sample ID: B6-NEG
Sequence to analyze: GTTTTITYGAGGGTTTGAGTAGGYGTTTATATTGTATTYGT

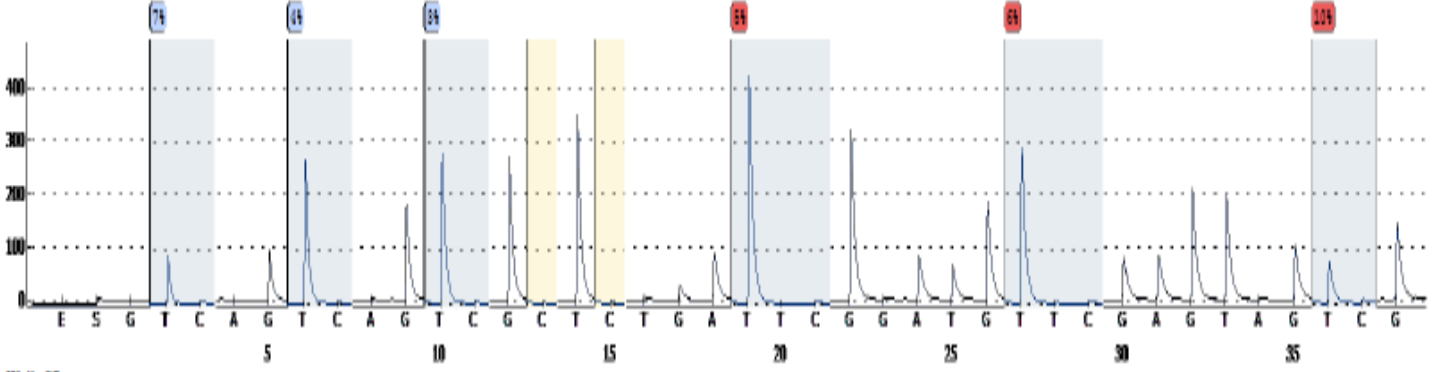


Well: B8
Assay: GJB6
Sample ID: B6-POS
Sequence to analyze: GTTTTITYGAGGGTTTGAGTAGGYGTTTATATTGTATTYGT

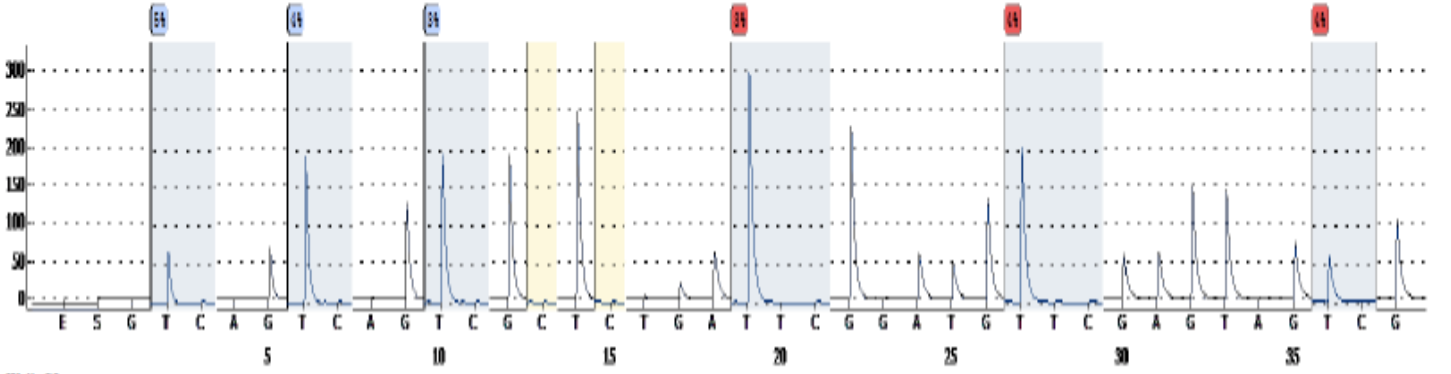


Şekil-7: GJB6 geninde hasta (ilk satır), negatif (ikinci satır) ve pozitif (üçüncü satır) kontrol için metilasyon yüzdeleri verilmektedir. Mavi bölgeler C>T nükleotid dönüşümü olan pozisyonları göstermektedir. C>T nükleotid dönüşümü olmayan bölgeler pozitif kontrolde olduğu gibi metilasyon varlığını göstermektedir. Verilen yüzdeler C nükleotid varlığını yani metilasyon yüzdesini göstermektedir.

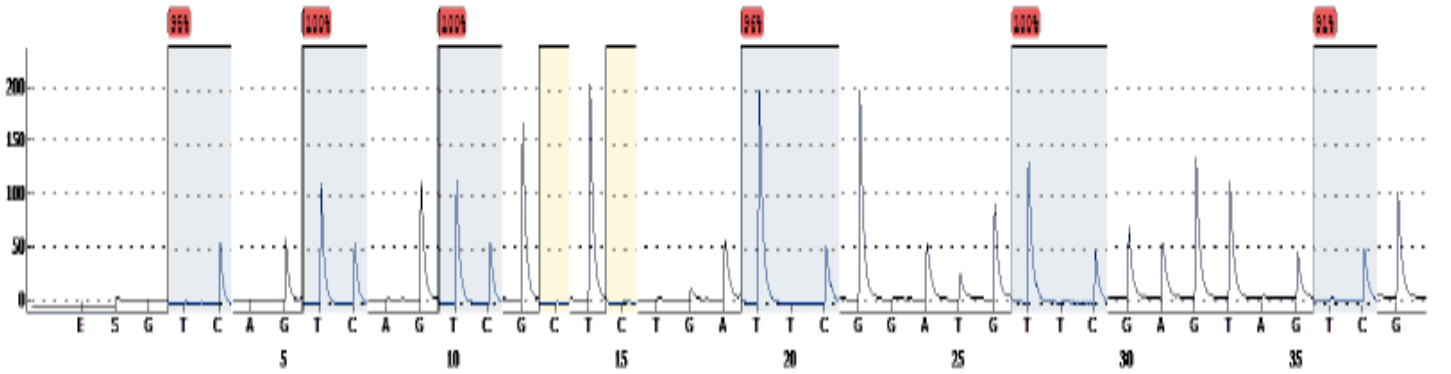
Well: C5
Assay: SLC26A4
Sample ID: S-99
Sequence to analyze: YGTTYGGTTYGGGTTTATTTTGGGGAGGTTTGGAGGGTTGYGGA



Well: C7
Assay: SLC26A4
Sample ID: S-NEG
Sequence to analyze: YGTTYGGTTYGGGTTTATTTTGGGGAGGTTTGGAGGGTTGYGGA



Well: C8
Assay: SLC26A4
Sample ID: S-POS
Sequence to analyze: YGTTYGGTTYGGGTTTATTTTGGGGAGGTTTGGAGGGTTGYGGA



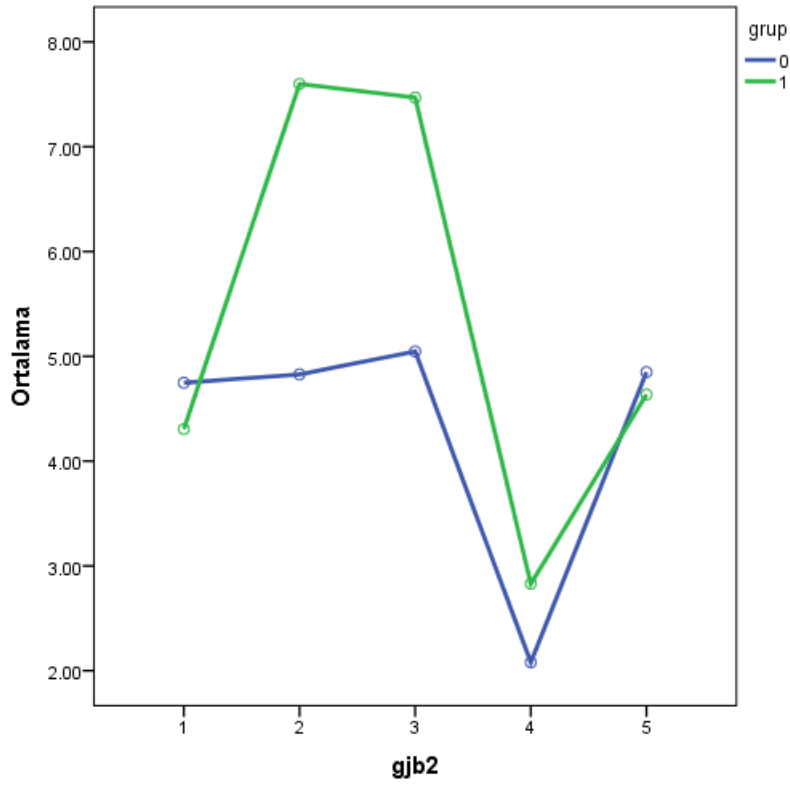
Şekil-8: SLC26A4 geninde hasta (ilk satır), negatif (ikinci satır) ve pozitif (üçüncü satır) kontrol için metilasyon yüzdeleri verilmektedir. Mavi bölgeler C>T nükleotid dönüşümü olan pozisyonları göstermektedir. C>T nükleotid dönüşümü olmayan bölgeler pozitif kontrolde olduğu gibi metilasyon varlığını göstermektedir. Verilen yüzdeler C nükleotid varlığını yani metilasyon yüzdesini göstermektedir.

Tablo-2’de GJB-2 geninde hastaların ve kontrol grubunun örneklerinden elde edilen gen üzerindeki metilasyon yüzde ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri verilmektedir.

	Grup	N	Ort.	Std. Sapma	p Değeri	t Değeri
GJB2.posi.1	Hasta	23	4.3061	1.75754	0.356	-0.933
	Kontrol	20	4.7475	1.26118		
GJB2.posi.2	Hasta	23	7.5996	16.21559	0.450	0.762
	Kontrol	20	4.8275	1.06031		
GJB2.posi.3	Hasta	23	7.4687	10.44366	0.309	1.030
	Kontrol	20	5.0465	1.21430		
GJB2.posi.4	Hasta	23	2.8296	3.50677	0.353	0.939
	Kontrol	20	2.0795	.69817		
GJB2.posi.5	Hasta	23	4.6348	1.33472	0.606	-0.520
	Kontrol	20	4.8495	1.36936		

Tablo-2: GJB-2 genindeki metilasyon yüzdelerinin gruplara göre ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri.

Yukarıdaki tabloya göre 2. ve 3. bölgelerde hasta olan grubun metilasyon yüzdesi hasta olmayan gruba göre ve diğer bölgelere göre daha yüksektir. Her iki grup için de en düşük metilasyon yüzdesi 4. bölgede görülmektedir. Bu farkların anlamlı olup olmadığı son tablo ile test edilmiştir ve anlamlı bir fark saptanamamıştır.



Şekil-9: GJB-2'nin bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması

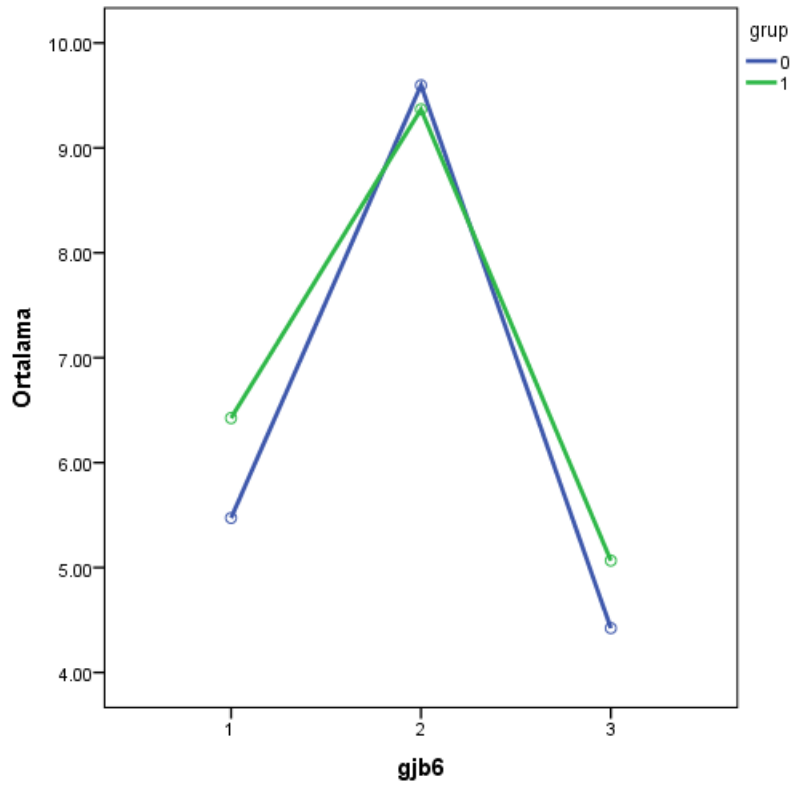
Grafikte GJB-2'nin bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamaları karşılaştırılmıştır. Grafikte hastaların metilasyon yüzdesinin 2., 3. ve 4. bölgelerde hasta olmayan gruba göre fazla olduğu görülmektedir. 1. ve 5. bölgelerde ise hasta olmayan grubun metilasyon yüzdesi hasta gruba göre daha yüksektir.

Tablo-3'te GJB-6 geni üzerinde promotör bölgedeki metilasyon bölgelerinin yüzde ortalamaları ve istatistiksel anlamlılık değerleri gösterilmiştir.

	grup	N	Ort.	Std. Sapma	p Değeri	t Değeri
GJB6.posi.1	Hasta	26	6.4246	1.98024	0.039*	2.138
	Kontrol	20	5.4735	.97034		
GJB6.posi.2	Hasta	26	9.3677	1.74309	0.770	-0.294
	Kontrol	20	9.5965	3.44323		
GJB6.posi.3	Hasta	26	5.0665	1.39889	0.104	1.663
	Kontrol	20	4.4225	1.16352		

Tablo-3: GJB-6'daki metilasyon bölgelerinin gruplara göre yüzde ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri

Her iki grup için de en yüksek metilasyon oranı 2. bölgededir. Grup ortalamaları her bölge için birbirine yakındır.



Şekil-10: GJB-6'nın bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması

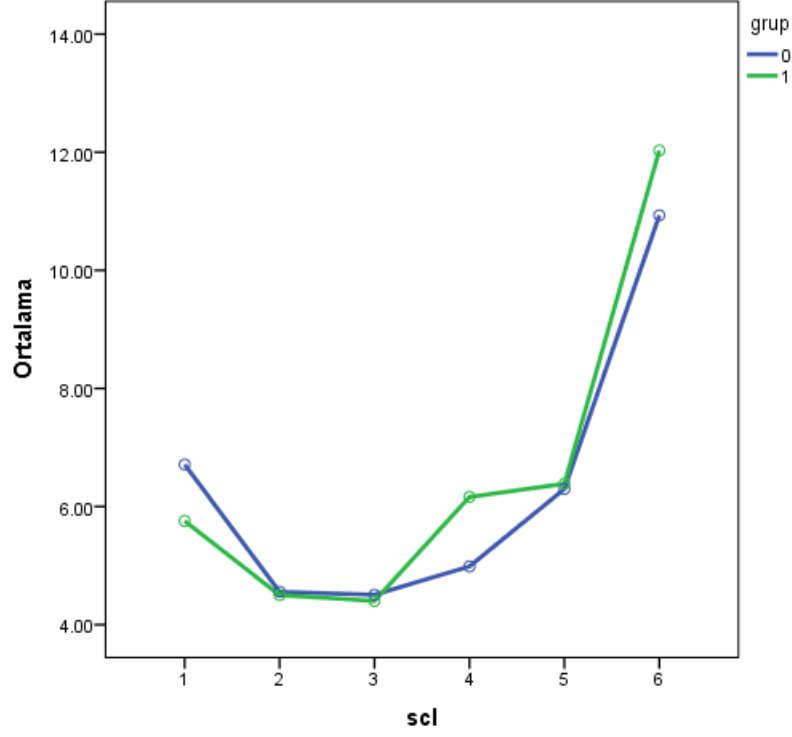
GJB-6'nın gruplara göre yüzde ortalamaları karşılaştırılmıştır. Grafikte 2. bölgedeki metilasyon oranının diğer bölgelerden fazla olduğu görülmektedir. 2. bölgede gruplar yaklaşık ortalamaya sahiptir. 1. ve 3. bölgede birinci grup biraz daha yüksek ortalamaya sahiptir. Grupların birbirine yakın değerler aldığı ve birbirine yakın olduğu görülmektedir. Sadece 1. bölgenin metilasyon yüzde ortalaması hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p=0.039$). İkinci ve üçüncü bölgenin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.77$, $p=0.104$).

	grup	N	Ortalama	Std. Sapma	p Değeri	t Değeri
SLC26A4.posi.1	Hasta	26	5.7558	1.41401	0.042*	-2.089
	Kontrol	20	6.7120	1.68892		
SLC26A4.posi.2	Hasta	26	4.5004	1.27098	0.858	-0.180
	Kontrol	20	4.5560	.81307		
SLC26A4.posi.3	Hasta	26	4.4019	1.44941	0.784	-0.276
	Kontrol	20	4.5065	.99363		
SLC26A4.posi.4	Hasta	26	6.1635	2.38285	0.029*	2.284
	Kontrol	20	4.9865	.97019		
SLC26A4.posi.5	Hasta	26	6.3854	2.43294	0.886	0.144
	Kontrol	20	6.2970	1.45899		
SLC26A4.posi.6	Hasta	26	12.0281	3.44482	0.165	1.414
	Kontrol	20	10.9320	1.69879		

Tablo-4: SLC26A4'ün gruplara göre ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri

SLC26A4 geninin promotör bölgesinde metilasyon bölgelerinin metilasyon yüzde ortalamaları, standart sapmaları, p ve t değerleri Tablo-4'te gösterilmektedir. Hem hasta hem

de kontrol grubu için 6. bölgedeki metilasyon oranları en yüksek bulunmuştur. Bölgeler içinde grup ortalama değerleri birbirine yakın görünmektedir.



Şekil-11: SLC26A4'ün bölgelere göre metilasyon yüzde ortalamalarının karşılaştırılması

Grafikte 3. bölgeye kadar hasta olmayan grubun metilasyon oranları yüksek iken 4. bölgeden sonra hasta grubun metilasyon oranları daha yüksektir. Genel olarak her iki grubun ortalamaları yakın olmakla birlikte 1. ve 4. bölgede istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmektedir ($p=0.042$, $p=0.029$).

	Ortalama Farkı (Hasta-Kontrol)	Farkın Std. Hatası	t	p-değeri
GJB2-posi.1	-0.44	0.47	-0.933	0.356
GJB2-posi.2	2.77	3.64	0.762	0.450
GJB2-posi.3	2.42	2.35	1.030	0.309
GJB2-posi.4	0.75	0.79	0.939	0.353
GJB2-posi.5	-0.21	0.41	-0.520	0.606
GJB6-posi.1	0.95	0.44	2.138	0.039*
GJB6-posi.2	-0.23	0.78	-0.294	0.770
GJB6-posi.3	0.64	0.38	1.663	0.104
SLC26A4-posi.1	-0.96	0.46	-2.089	0.042*
SLC26A4-posi.2	-0.06	0.33	-0.180	0.858
SLC26A4-posi.3	-0.11	0.38	-0.276	0.784
SLC26A4-posi.4	1.18	0.52	2.284	0.029*
SLC26A4-posi.5	0.09	0.62	0.144	0.886
SLC26A4-posi.6	1.09	0.78	1.414	0.165

*. Fark 0.05 önem düzeyinde anlamlıdır.

Tablo-5: Hasta ve kontrol gruplarının metilasyon bölgelerinin yüzde ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılması

Her bir genin çeşitli metilasyon bölgelerindeki metilasyon yüzde oranlarının hasta ve kontrol grupları arasında fark olup olmadığına bakmak için t istatistiği kullanılmıştır. T

istatistikleri ve ilgili p değerleri Tablo-5’te gösterilmiştir. GJB2’nin hiçbir bölgesinde hasta ve hasta olmayan gruplar arasında fark bulunmamıştır. GJB6’nın 1. bölgesinde hasta grubunun metilasyon oranı hasta olmayan grubunkinden anlamlı derecede yüksektir ($p=0.039$). Fakat GJB6’nın 2. ve 3. bölgesinde hasta ve hasta olmayan gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. SLC26A4’ün 1. bölgesinde hasta olmayan kişilerin metilasyon oranları hasta olan kişilerden anlamlı derecede yüksek iken ($p=0.042$) SLC26A4’ün 4. bölgesinde hasta kişilerin metilasyon oranları hasta olmayan kişilerden anlamlı derecede yüksektir ($p=0.029$).

Hasta ile anne, hasta ile baba ve hastanın anne babası arasında GJB2, GJB6 ve SLC26A4 genlerindeki metilasyon oranları arasında fark olup olmadığını bakmak için t-testi kullanılmıştır. Tablo 6,7 ve 8’de sonuçlar gösterilmektedir ve p-değerlerine göre hiçbir çift arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

		Farklar					t	p-değeri
		Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	Fark için 95% güven aralığı			
					Alt sınır	Üst Sınır		
GJB2 posi.1	hasta - anne	.08696	1.08134	.22548	-.38065	.55456	.386	.703
	hasta - baba	.03043	.93234	.19441	-.37274	.43361	.157	.877
	anne - baba	-.05652	1.22022	.25443	-.58419	.47114	-.222	.826
GJB2 posi.2	hasta - anne	.08565	1.18439	.24696	-.42652	.59782	.347	.732
	hasta - baba	.21000	1.20467	.25119	-.31094	.73094	.836	.412
	anne - baba	.12435	1.44451	.30120	-.50030	.74900	.413	.684
GJB2 posi.3	hasta - anne	-.26652	2.38149	.49657	-1.29635	.76331	-.537	.597
	hasta - baba	-.29739	3.64919	.76091	-1.87542	1.28064	-.391	.700
	anne - baba	-.03087	2.03036	.42336	-.90886	.84712	-.073	.943
GJB2 posi.4	hasta - anne	.39261	1.22763	.25598	-.13826	.92347	1.534	.139
	hasta - baba	.24870	1.04856	.21864	-.20474	.70213	1.137	.268
	anne - baba	-.14391	.83768	.17467	-.50616	.21833	-.824	.419
GJB2 posi.5	hasta - anne	-.58652	5.40389	1.12679	-2.92334	1.75030	-.521	.608
	hasta - baba	-.20348	1.46471	.30541	-.83687	.42991	-.666	.512
	anne - baba	.38304	5.56456	1.16029	-2.02325	2.78934	.330	.744

Tablo-6: GJB2 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları

		Farklar					t	p-değeri
		Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	Fark için 95% güven aralığı			
					Alt sınır	Üst Sınır		
GJB6 posi.1	hasta - anne	.1300	1.5599	.3059	-.5000	.7600	.425	.675
	hasta - baba	.13538	1.93420	.37933	-.64586	.91663	.357	.724
	anne - baba	.00538	1.60243	.31426	-.64185	.65262	.017	.986
GJB6 posi.2	hasta - anne	.01154	2.23841	.43899	-.89258	.91565	.026	.979
	hasta - baba	-.34846	2.81169	.55142	-1.48413	.78720	-.632	.533
	anne - baba	-.36000	2.96558	.58160	-1.55782	.83782	-.619	.542
GJB6 posi.3	hasta - anne	.38500	1.48651	.29153	-.21541	.98541	1.321	.199
	hasta - baba	.01269	1.52102	.29830	-.60166	.62705	.043	.966
	anne - baba	-.37231	1.78512	.35009	-1.09333	.34872	-1.063	.298

Tablo-7: GJB 6 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları

		Farklar					t	p-değeri
		Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	Fark için 95% güven aralığı			
					Alt sınır	Üst Sınır		
SLC26A4 posi.1	hasta - anne	-.50577	2.48102	.48657	-1.50787	.49634	-1.039	.309
	hasta - baba	-.75385	2.88023	.56486	-1.91720	.40950	-1.335	.194
	anne - baba	-.24808	3.68881	.72343	-1.73802	1.24186	-.343	.735
SLC26A4 posi.2	hasta - anne	.06423	1.75290	.34377	-.64378	.77224	.187	.853
	hasta - baba	.38462	1.43387	.28121	-.19454	.96377	1.368	.184
	anne - baba	.32038	1.81560	.35607	-.41295	1.05372	.900	.377
SLC26A4 posi.3	hasta - anne	-.01769	1.69266	.33196	-.70137	.66599	-.053	.958
	hasta - baba	-.02538	2.03751	.39959	-.84835	.79758	-.064	.950
	anne - baba	-.00769	1.82208	.35734	-.74364	.72826	-.022	.983
SLC26A4 posi.4	hasta - anne	-.08731	2.02984	.39808	-.90718	.73256	-.219	.828
	hasta - baba	.31808	2.36794	.46439	-.63836	1.27451	.685	.500
	anne - baba	.40538	2.23537	.43839	-.49750	1.30827	.925	.364
SLC26A4 posi.5	hasta - anne	-.24846	2.42800	.47617	-1.22915	.73223	-.522	.606
	hasta - baba	.24077	2.50681	.49163	-.77175	1.25329	.490	.629
	anne - baba	.48923	2.57651	.50529	-.55144	1.52990	.968	.342
SLC26A4 posi.6	hasta - anne	.88731	4.75396	.93233	-1.03286	2.80747	.952	.350
	hasta - baba	.98269	3.73950	.73338	-.52773	2.49311	1.340	.192
	anne - baba	.09538	4.47207	.87704	-1.71092	1.90169	.109	.914

Tablo-8: SLC26A4 için hasta-anne-baba metilasyon yüzdeleri karşılaştırmaları

5. TARTIŞMA

İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın algılama bozukluklarından biridir (1). Klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır; bu hastalığa neden olan etkenler arasında çevresel faktörler (akustik travma, ototoksik ilaç maruziyeti, viral enfeksiyonlar vb.), genetik faktörler (nükleer veya mitokondriyal genlerdeki mutasyonlar) ve gen-çevre etkileşimleri yer alır (3). Epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir ki yaklaşık her 1000 çocuktan bir tanesi prelingual işitme kaybı ile doğar ve bunların %60 kadarı genetik işitme kaybına sahiptir yani genetik sağırılık görülme insidansı yaklaşık 1/2000'dir (2).

İşitme bozuklukları etiyolojilerine göre genetik ve non-genetik; başlama yaşına göre prelingual, perilingual ve postlingual; fenotipik özelliklerine göre sendromik ve non-sendromik; işitme yolu üzerinde etkili olduğu bölgeye göre iletim tipi, sensörinöral ve mikst tip ve şiddetine göre hafif, orta, orta derece şiddetli, şiddetli ve derin olarak sınıflandırılabilir (2). Sendromik ve non-sendromik olarak ikiye ayrılan genetik etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal işitme kayıpları %60 oranında görülmektedir. Sendromik formlar çocuk yaşta işitme kayıplı hastaların %30'unu oluşturur ve diğer sistemlerdeki fiziksel ve tıbbi anormalliklerle (körlük, kalp-akciğer rahatsızlığı vb.) birliktelik gösterir. Non-sendromik formda ise genellikle iç kulak komponentlerinde (özellikle koklea) yapı ve fonksiyon değişikliklikleri gözlenir ve hastaların %70'lik bölümünü oluşturur (10).

Non-sendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif, %18'i otozomal dominant, %2'si ise X'e bağlı olarak kalıtılmaktadır. Otozomal resesif kayıplar için 60 lokus-21 gen, otozomal dominant kalıtım için 56 lokus-21 gen ve X'e bağlı kalıtım için de 8 lokus-1 gen tespit edilmiştir (15). İşitme mekanizmasında etkin olan gen ürünleri arasında iyon hemostazında görev alan 'connexin' proteinleri başta olmak üzere, transkripsiyon faktörleri,

ekstrasellüler matriks proteinleri, hücre iskelet proteinleri ve fonksiyonu tam anlaşılamamış birçok protein bulunmaktadır.

Non-sendromik işitme kaybına neden olan genler içinde en önemlisi ve ilk tanımlanan ‘Gap Junction Beta 2 (GJB2/Cx26)’dir. 1997 yılında Kelsell ve arkadaşları tarafından 13q11-q12’de yerleştiği tespit edilen bu gen küçük moleküllerin ve iyonların hücreler arasındaki difüzyonunu sağlayan ‘gap junction’ (geçit bölgesi) kanallarının oluşumundan sorumlu, 226 aminoasitlik ‘Connexin 26 (Cx26)’ proteininin kodlanmasında görevlidir (25). Otomozal resesif kalıtılan non-sendromik işitme kayıplarının yaklaşık olarak %50’si GJB2 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır. Şu ana kadar literatürde bu gen için 100’ün üzerinde mutasyon tanımlanmış olup bunların arasında arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşan 35delG mutasyonunun Akdeniz bölgesi, Kuzey Amerika, Kuzey ve Güney Avrupa Kökenli olguların yaklaşık yarısında işitme kaybından sorumlu olduğu bildirilmiştir (7). 35delG mutasyonu dışında dünyada farklı popülasyonlara özgü atasal GJB2 mutasyonları (Yahudi popülasyonunda 167delT, Afrika popülasyonunda R143W, Japonya ve Kore’de 235delC vb.) saptanmış olsa da beyaz ırkta ve Türkiye’de 35delG mutasyonu GJB2 geninde en sık saptanan mutasyon olarak belirtilmiştir (7).

Bir diğer ‘gap junction’ proteini, connexin 30 (Cx30) connexin 26’nın bulunduğu aynı iç kulak komponentlerinde GJB6 geni tarafından eksprese edilerek üretilir ve bu iki proteinin fonksiyon olarak birbiriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (34). GJB6 geninin insan vücudunda işitme açısından önemi bu gendeki bir mutasyon; del(GJB6-D13S1830) geniş delesyonunun saptanması ile ortaya koyulmuştur (34). Connexin 30 geni 13q12 kromozomunda GJB2’nin yaklaşık 35-kb aşağı sarmalında lokalizedir. 342-kb boyutunda GJB6-D13S1830 delesyonu Castillo ve ark. tarafından 2002’de non-sendromik prelingual işitme kayıplı vakalarda tespit edilmiştir (74). Bu mutasyon İspanyollarda ikinci en sık prelingual sağırılığa sebep olan mutasyon olarak bildirilmiştir (74). Fransa’dan da bir vakada tespit edilen bu mutasyon

Hindistan, Çin, İran ve Ürdün gibi Asya ülkelerinde ve bizim ülkemizde de yaygın olarak tespit edilen bir mutasyon değildir (7).

SLC26A4 geni 7q22-31 kromozomu üzerinde bulunan, 21 eksondan oluşan ve yüksek hidrofobik özelliğe sahip 780 aminoasitten oluşan ‘pendrin’ proteininin eksprese edilmesinde görevlidir (25). Pendrin SLC26 ailesine üye bir anyon transportudur ve özellikle tiroid ve iç kulakta eksprese edilir. İç kulakta endolenfatik kanal ve kesede klor/bikarbonat alışverişinden sorumludur. Yapılan bir çalışmada SLC26A4 knockout farelerde pendrinin iç kulakta sıvı transferinde ve endokoklear potansiyel oluşumunda önemli rol aldığı gösterilmiştir (28). SLC26A4 genindeki mutasyon Pendred sendromuna (PS) neden olur. PS iç kulak anormallikleri ile seyreden sensörinöral işitme kaybı, hipotiroidizimli ya da hipotiroidizim olmaksızın guatr ve iyot organifikasyonunda parsiyel defekt ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. GJB2 genindeki mutasyona bağlı gelişen işitme kayıplarından sonra en sık hereditör işitme kaybı sebebi ve en sık gözlenen sendromik işitme kaybı sebebi PS’dir. Hastaların çoğunda prelingual işitme kaybı mevcuttur. Konjenital iç kulak anormallikleri geniş vestibüler aquaduktustan Mondini displazisine kadar geniş bir yelpazede olabilir. Bildirilen vakaların %50’sinden fazlasında guatr bulunmamakta ve eğer bulunursa genellikle 10 yaşından sonra multinodüler guatr şeklinde gözlenmektedir. SLC26A4 mutasyonları arasında kayıp (missense) mutasyonlar, çerçeve kayması (frame-shift) mutasyonlar, insersiyonlar ve delesyonlar gözlenir ve bugüne kadar farklı ülke ve etnik gruplar için SLC26A4 geni üzerinde 200’den fazla mutasyon bildirilmiştir (26).

Epigenetik, genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesindeki farklılıkları inceleyen bilim dalıdır (4). Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde bir mutasyon olmadan gen ifadesinde meydana gelen değişimlerdir. Epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA’nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Epigenetik mekanizmalar;

DNA metilasyonu, kovalent histon protein modifikasyonları ve RNA interferens (RNAi) şeklinde sıralanabilir (4). DNA metilasyonu en sıklıkla çalışılan epigenetik modifikasyonlardan biridir (35). DNA metilasyonu kromozal stabilitede, gen ekspresyon paternlerinin oluşturulmasında, uygun telomer boyutunun sağlanmasında ve kök hücre programlanmasında önemli bir rol oynar. Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışmada DNA metilasyonunun kanser ve diğer bazı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (54). CG dinükleotidlerinin hipometilasyonu daha önce susturulmuş ve down-regüle edilmiş birçok genin aktive olmasına yani over-eksprese olmasına neden olabilir ve kanserin patogenezinde epigenetik özellik olarak değerlendirilmelidir. Öteki taraftan promotör bölgede genin hipermetilasyonu ise metilasyon derecesine ve genin fonksiyonuna bağlı olarak yüzlerce genin susturulması yani down-regüle edilmesine sebep olabilir (4).

Daha önceki çalışmalar bahsedilen bu genlerin genetik yapısına ve fonksiyonel mutasyonlarına odaklanmışken sadece birkaç çalışma bu genlerde oluşabilecek epigenetik modifikasyonları incelemiştir (4). Epigenetik incelemeleri içeren çalışmalardan birinde SLC24A geni ve tiroid kanseri oluşumu ile ilgisi araştırılmıştır. Xing ve ark. normal ve tiroid kanseri hücre modelinde pendrin gen ekspresyonu ve metilasyon durumu ile ters ilişki olduğunu bildirmişlerdir (75). Lee ve ark. IL-4'ün pendrin gen ekspresyonuna iki farklı hücre kültüründe etki edip etmediğini çalışmışlar ve IL-4 ile tedavi sonrası pendrin geninde mRNA ekspresyonunun anlamlı şekilde yükseldiğini yani promotör bölgedeki CG dinükleotidlerinin metilasyonunun gen transkripsiyonunda pozitif veya negatif etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir (76). Bu çalışmaların aksine literatürde bazı derlemeler dışında bildiğimiz kadarıyla işitme kaybı ve epigenetik modifikasyonlar ile ilgili bilimsel çalışma bulunmayıp bizim çalışmamız prelingual işitme kayıplı çocuklarda GJB2, GJB6 ve SLC26A4 geni üzerinde metilasyon araştırılmasının yapıldığı ilk çalışmadır.

Bu çalışmada 3 ayrı genin; GJB2, GJB6, SLC24A genlerinin promotör bölgelerinde

CG dinükleotidlerinin metilasyon dereceleri araştırıldı ve bu metilasyon dereceleri kontrol grubunun aynı bölgelerindeki metilasyon düzeyleri ile karşılaştırıldı. Metilasyon değerleri yüzde değerleri olarak saptandı. Genin promotör bölgesinde CG nukleotidleri metillenmiş ise ve kontrol grubuna kıyasla bu düzey anlamlı yüksek ise o genin ifadesi baskılanır yani gen fonksiyon göremez. Bu çalışmadaki hasta gruplarında çalışılan genlerin önceki literatür bilgisine göre mutasyona uğradığı bilinmektedir. Araştırılmak istenilen bu mutasyonlara ilaveten metilasyon artışı ile genin fonksiyonunu tamamen yitirmiş olup olmadığını değerlendirmektir. Genin promotör bölgesinde gözlenen CG baz çiftlerinin metilasyon yüzdeleri araştırıldı ve kontrol grubunun aynı bölgedeki CG baz çifti metilasyon düzeyi ile karşılaştırıldı. GJB2 için 5, GJB6 için 3, SLCA24 için 6 adet CG baz çifti incelendi. GJB2'nin bütün bölgelerinde anlamlı bir ilişki saptanmamışken GJB6'nın 1. CG bölgesinde ve SLC26A4'ün 1. ve 4. CG bölgesindeki metilasyon yüzdelerinde hastalar ve kontrol grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.039$, $p=0.042$, $p=0.029$). SLC26A4'ün 1. CG bölgesindeki fark hipometilasyon yönünde anlamlı iken GJB6'nın 1. ve SLC26A4'ün 4. CG bölgesindeki fark hipermetilasyon yönünde anlamlı idi. Bu sonuçlar ışığında GJB2 geninde epigenetik modifikasyonlardan olan CG metillenmesinin, işitme kaybına neden olan daha önceden bilinen genetik mutasyonlara ilaveten işitmeyi azaltıcı yönde bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Öte yandan Connexin 30 geninin promotör bölgesinde ilk metilasyon bölgesinde ve Pendrin geninin promotör bölgesindeki dördüncü metilasyon bölgesinde genetik mutasyonlara ek olarak epigenetik etkileşimlerin de işitme kaybı açısından rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Hasta ve kontrol gruplarında SLC26A4 geninde birinci metilasyon bölgesindeki metillenme yüzdelerinin arasındaki anlamlı fark, kontrol grubunda yüksek olması nedeniyle hasta grubunda hipometilasyon yönünde yorumlandı. Anyon transportu olarak görev yapan bu proteinin belki de bir bölgesinde hipometilasyona bağlı genin yeniden ekspresyonu ile işitme

kaybının artabileceği sonucu çıkarıldı. Elektron mikroskobu ile hipometilasyona uğrayan ve fonksiyonu artan bölgenin tayini ile o bölgeye hedeflenmiş tedavi seçenekleri geliştirilerek işitme kaybının önlenmesine yönelik ileri çalışmalar yarar sağlayabilir.

Ayrıca pendrin geninin 6. CG metilasyon bölgesindeki metillenme yüzdelerine bakılacak olursa, bu bölge çalışılan 3 gendeki metilasyon yüzde ortalamaları arasında en yüksek orana sahip bölge olarak tespit edilmiştir. Daha fazla bireyle yapılacak ileri çalışmalarda bu bölgedeki epigenetik modifikasyonların etkisine yönelik araştırmalar yarar sağlayabilir.

Çalışmamızda hastaların anne ve babalarıyla ayrı ayrı ve annelerin babalarla olan istatistiksel ilişkisi de araştırılmış olup herhangi bir genin herhangi bir metilasyon bölgesinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde bir mutasyon olmadan gen ifadesinde meydana gelen değişimlerdir. Bu değişimler kalıtsaldır, sonraki kuşaklara aktarılabilir. Ancak; bu modifikasyonların hücre bölünmesi sırasında yavru hücreye nasıl aktarıldığı tam olarak anlaşılamamakla birlikte, kalıtılan epigenetik modifikasyonların kromatin yoluyla taşındığı düşünülmektedir. Çalışmamızda hastalarla anneleri ve hastalarla babaları arasında metilasyon yüzdeleri arasında anlamlı sonuçların olmamasının, işitme kaybına neden olan epigenetik modifikasyonların kalıtımla aktarılmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bunun tam olarak ortaya koyulabilmesi için denek sayısının çoğaltılarak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

İşitme kaybı günümüz teknolojisi ile doğumdan itibaren hızlıca tanısı konabilen ve kohlear implant gibi çözümlerle tedavi edilebilen ve aslında insan hayatı açısından bir duyu kaybının artık önlenemediği bir hastalıktır. Bu durumun çeşitli sebepleri olmakla birlikte genetik kayıplar prelingual işitme kayıplarının en sık nedenini oluşturur. Daha önceki çalışmalarda işitme kaybına neden olan genler ve bunlar üzerindeki mutasyonlar araştırılmış olup buna yönelik tanı ve tedavi yöntemleri denenmiştir. Epigenetik modifikasyonlar ise genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan gen ifadesindeki farklılıklardır. Bu çalışmamızda hasta gruplarında çalışılan genlerin (GJB2, GJB6, SLC26A4) önceki literatür bilgisine göre mutasyona uğradığı bilinmekte idi. Araştırılmak istenilen bu mutasyonlara ilaveten metilasyon artışı ile genin fonksiyonunu tamamen yitirmiş olup olmadığını değerlendirmektir. Çalışmamızda GJB6 ve SLC26A4 genlerinin bazı metilasyon bölgelerinde epigenetik faktörlerin etkili olabileceği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde saptandı. İşitme kaybı ve epigenetiklerin birbirleriyle etkileşim içinde olup olmadıklarını tam olarak anlayabilmek için bu bölgelere odaklanarak fazla sayıda denekle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Koç C, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi.1. baskı, Ankara, Öncü Basımevi, 2004: 63-71
2. Çelik O, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi 1. baskı, İstanbul, Turgut Yayıncılık, 2002: 57-70
3. Sataloff RT, Sataloff J. Hearing Loss New York: Marcel Dekker, Inc, 1992;122
4. Provenzano MJ, Domann FE. A role for epigenetics in hearing: Establishment and maintenance of auditory specific gene expression patterns. Hear Res. 2007;233(1-2):1-13
5. Wever E.G, Lawrence M, Smith K.R: The middle ear in sound conduction. Arch otolaryngol, 2003;48: 19-35
6. Esmer N, Akıner MN, Karasalihoğlu AR, Saatçi MR: Klinik odyoloji Özışık matbaacılık, 1995; 17-43
7. Cummings C.W, Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. 4. baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2007: 4469-4485
8. Tuncer Ü. İşitme kayıpları ve tedavisi. Doktor, 2005; 28: 86-88.
9. Morton N: Genetic epidemiology of hearing impairment, Ann NY Acad Sci 1991;630: 16
7. Grundfast KM, Sparsky NF: Hearing loss. In Bluestone CD et al., editors: Pediatric otolaryngology, ed 4, Philadelphia, Saunders, 2003: 306
10. Read AP:Waardenburg syndrome, J Med Genet., 1997, 34: 656
11. Rouleau G et al.: Alteration in a new gene encoding a putative membrane- organizing protein causes neurofibromatosis type 2, Nature,1993;363: 495
12. Admiral RJ et al.: Hearing impairment in Stickler syndrome, Adv Otorhinolaryngol 2002, 61: 216

13. Richards A et al.: Variation in the vitreous phenotype of Stickler syndrome can be caused by different amino acid substitutions in the X position of the type II collagen Gly-x-y triple helix, *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 1083
14. Marszalek B et al.: Clinical features, treatment and genetic background of Treacher Collins syndrome *J Appl Genet* 2002,43: 223
15. Petit C: Usher syndrome: from genetics to pathogenesis, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001, 2: 271
16. Ocal B et al.: Prevalance of idiopathic long QT syndrome in children with congenital deafness, *Pediatr Cardiol* 1997, 18: 401
17. Stinckens C et al.: Pendred syndrome redefined, *Adv otorhinolaryngol* 2002, 61: 131
18. Everett L et al.: Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS), *Nat Genet* 1997, 17: 411
19. Kashtan C: Familial hematuric syndromes Alport syndrome, thin glomerular basement membrane disease and Fechtner – Epstein syndromes, *Contib Nephrol* 2001, 136: 79
20. Harvey S et al.: The inner ear of dogs with X linked nephritis provides clues to the pathogenesis of hearing loss in X linked Alport syndrome, *Am J Pathol* 2001, 159: 1097
21. Plant K et al.: Detection of mutations in COL4A5 in patients with Alport syndrome, *Hum Mutat* 1999, 13: 124
22. Ensink RJ, Camp GV, Cremers CW: Mitokondrial inherited hearing loss, *Clin Otolaryngol* 1998, 23: 3
23. Li X, Friedman R: Nonsyndromic hereditary hearing loss, *Otolaryngol Clin North Am* 2002, 35: 275
24. Guilford P et al.: A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13 q, *Nat Genet* 1994, 6: 24

25. Kelsell D et al.: Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness, *Nature* 1997; 387: 80
26. Prasad S et al.: Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness- causing mutations (R32C and 645-648 del TAGA), *Hum Mutat* 2000; 16: 502
27. Jun A et al.: Temporal bone histopathology in connexin 26 related hearing loss, *Laryngoscope* 2000; 110-269
28. Choung Y, Moon S, Park H: Functional study of GJB2 in hereditary hearing loss, *Laryngoscope* 2002;112: 1667
29. Smith RJ, Robin NH: Genetic testing for deafness GJB2 and SLC26A4 as causes of deafness, *J Commun Disord* 2002; 35: 367-36
30. Green GE et al.: Performance of cochlear implant recipients with GJB2- related deafness, *Am J Med Genet* 2002;109: 167
31. Frei K., Szuhai K., Lucas T., Weipoltshammer K., Schofer C., Rabsebnner R., Baumgartner W., Raap A. K., Bittner R., Wachtler F. J., Kirchhofer K., : Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *European Journal of Human Genetics*, 2002; 427-432
32. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16: 6–21.
33. Morel JB, Mourrain P, Beclin C, Vaucheret H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2000;10: 1591–1594.
34. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775: 138–162.
35. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994;76: 567–576.

36. Vilain A, Bernardino J, Gerbault-Seureau M, Vogt N, Niveleau A, Lefrancois D, Malfoy B, Dutrillaux B. DNA methylation and chromosome instability in lymphoblastoid cell lines. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90: 93–101.
37. Wilkin DJ, Liberfarb R, Davis J, Levy HP, Cole WG, Francomano CA, Cohn DH. Rapid determination of COL2A1 mutations in individuals with Stickler syndrome: analysis of potential premature termination codons. *Am J Med Genet* 2000;94: 141–148.
38. Annunen S, Korkko J, Czarny M, Warman ML, Brunner HG, Kaariainen H, Mulliken JB, Tranebjaerg L, Brooks DG, Cox GF, Cruysberg JR, Curtis MA, Davenport SL, Friedrich CA, Kaitila I, Krawczynski MR, Latos-Bielenska A, Mukai S, Olsen BR, Shinno N, Somer M, Vikkula M, Zlotogora J, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Splicing mutations of 54-bp exons in the COL11A1 gene cause Marshall syndrome, but other mutations cause overlapping Marshall/Stickler phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999;65: 974–983.
39. Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2007;117: 659–671.
40. Bacolla A, Pradhan S, Roberts RJ, Wells RD. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *J Biol Chem* 1999;274: 33011–33019.
41. Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 2002;109: 801–806.
42. Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 2007;128: 721–733.
43. Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer--- concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1460–1461.

44. Boeke J, Ammerpohl O, Kegel S, Moehren U, Renkawitz R. The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 2000;275: 34963–34967.
45. Dong E, Guidotti A, Grayson DR, Costa E. Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 4676– 4681.
46. Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledest F, Fischer A, Viegas-Pequignot E. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 1993;2: 731–735.
47. Bacolla A, Pradhan S, Larson JE, Roberts RJ, Wells RD. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence. *J Biol Chem* 2001;276: 18605–18613.
48. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, Campos JM, Vaquero J, Isla A, Lassaletta L, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA. CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin Cancer Res* 2003;9: 5601–5606.
49. Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A. A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 1997;16: 256–259.
50. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 2004;118: 545–553.
51. Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 2007

52. Issa JP, Gharibyan V, Cortes J, Jelinek J, Morris G, Verstovsek S, Talpaz M, Garcia-Manero G, Kantarjian HM. Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol* 2005;23: 3948–3956.
53. Hellebrekers DM, Jair KW, Vire E, Eguchi S, Hoebbers NT, Fraga MF, Esteller M, Fuks F, Baylin SB, van Engeland M, Griffioen AW. Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2006;5: 467–475.
54. Yoo CB, Cheng JC, Jones PA. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* 2004;32: 910–912.
55. Gilbert J, Gore SD, Herman JG, Carducci MA. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2004;10: 4589–4596.
56. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999;21: 103–107.
57. Elcioglu N, Berry AC. Monozygotic twins discordant for the oculo-oto-radial syndrome (IVIC syndrome). *Genet Couns* 1997;8: 201–206.
58. Buschdorf JP, Stratling WH. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 2004;82: 135–143.
59. Stickler GB, Hughes W, Houchin P. Clinical features of hereditary progressive arthroophthalmopathy (Stickler syndrome): a survey. *Genet Med* 2001;3: 192–196.
60. Brouwer OF, Padberg GW, Ruys CJ, Brand R, de Laat JA, Grote JJ. Hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 1991;41: 1878–1881.
61. van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 2003;35: 315–317.

- 62.** Braegger C, Bottani A, Halle F, Giedion A, Leumann E, Seger R, Willi U, Schinzel A. Unknown syndrome: ischiadic hypoplasia, renal dysfunction, immunodeficiency, and a pattern of minor congenital anomalies. *J Med Genet* 1991;28: 56–59.
- 63.** Stacey M, Bennett MS, Hulten M. FISH analysis on spontaneously arising micronuclei in the ICF syndrome. *J Med Genet* 1995;32: 502–508.
- 64.** Best LG. Familial posterior helical ear pits and Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1991;40: 188–195.
- 65.** Daugbjerg P, Everberg G. A case of Beckwith-Wiedemann syndrome with conductive hearing loss. *Acta Paediatr Scand* 1984;73: 408–410.
- 66.** Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, Smith AC, Fei YL, Nishikawa J, Stockley TL, Best L, Chitayat D, Olney A, Ives E, Schneider A, Bestor TH, Li M, Sadowski P, Squire J. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2002;11: 1317–1325.
- 67.** Beisel KW, Rocha-Sanchez SM, Morris KA, Nie L, Feng F, Kachar B, Yamoah EN, Fritzsche B. Differential expression of KCNQ4 in inner hair cells and sensory neurons is the basis of progressive high-frequency hearing loss. *J Neurosci* 2005;25: 9285–9293.
- 68.** Rivas A, Francis HW. Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlqt1) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Otol Neurotol* 2005;26: 415–424.
- 69.** Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W. An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 2004;13: 247–255.
- 70.** Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, Oelschlager U, Lorenz B, Passarge E, Horsthemke B. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1997;61: 282–294.

71. Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, Dryja TP. Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 1991;353: 83–86.
72. Matsuda M, Keino H. Roles of beta-catenin in inner ear development in rat embryos. *Anat Embryol (Berl)* 2000;202: 39–48.
73. Bienz M, Clevers H. Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol* 2003;5: 179–182.
74. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*. 2002 Jan 24;346: 243-9
75. Xing M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW, Sidransky D. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003 May 1;63: 2312-5
76. Lee A, Nofziger C, Dossena S, Vanoni S, Diasio R, Paulmichl M. Methylation of the human pendrin promoter. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28: 397-406

EKLER

1. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Prelingual non-sendromik sensörinöral işitme kaybı bulunan hastalarda sağırılığa sebep olabilecek genetik mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonların varlığının araştırılması

Sayın Katılımcımız/Ebeveyn;

Araştırmamız Prelingual (doğuştan çok ileri derecede işitme kaybı –sağır- olan bireyler) ve Postlingual (Doğuştan işitmesi olan, konuşmayı öğrenen, işitebilen ve konuşabilen birey iken yaşamın ileriki dönemlerinde işitmelerini tamamen kaybeden) non-sendromik sensörinöral işitme kaybı bulunan hastalarda sağırılığa sebep olabilecek epigenetik modifikasyonları araştırmak amacıyla yapılacaktır. Bu amaçla, hastamız ve ebeveynlerinden alınacak olan kan serum örneği tıbbi biyoloji laboratuvarlarında incelenecek ve yeni bir mutasyonun veya bazı toplumlarda görülebilen mutasyonların hastamızda mevcut olup olmadığı ve ayrıca bazı genlerde promotör DNA metilasyonu hakkında araştırma yapılacaktır. Bu çalışmamız sonucunda ülkemizin çeşitli coğrafi bölgelerinde yaşayan, konuşma çağı öncesi veya sonrası sendromik hastalıkların eşlik etmediği sağırılığa sebep olabilecek genetik bozuklukların ve epigenetik modifikasyonların saptanmasına yardımcı olacaksınız.

S.B Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB-BBC Kliniğinde yürütmek üzere planladığımız bu çalışmada yer almanız isteğinize bağlıdır. Çalışmaya katılmayı reddetme veya çalışmanın herhangi bir aşamasında ayrılma hakkına sahipsiniz. Bu durum cezai durum veya sonraki tedavilerinizde herhangi bir olumsuzluk veya engel durumuna yol açmayacaktır.

Çalışmamıza katılmanız halinde alınan örnekler tıbbi biyoloji laboratuvarında incelenecek ve sonuçları hakkında bilgilendirileceksiniz. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar kimliğiniz bildirilmeden sadece bilimsel amaçlarla yayınlanacaktır. Bu olur formunun bir örneği size verildikten sonra çalışmaya başlanacaktır.

Bu çalışma için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Çalışmaya katılmak konusunda tamamen özgürsünüz. Çalışmaya katılıp katılmamanız size gösterilen tıbbi bakım ve özende değişikliğe yol açmayacaktır.

Çalışmamız hastanemiz etik kurulundan izin alınarak gerçekleştirilmektedir. Çalışmamız Prof. Dr. Tayyar Kalcıoğlu denetiminde Dr. Oğuz Kadir Eğilmez tarafından yürütülecektir. Herhangi bir nedenle Dr. Oğuz Kadir Eğilmez'e ait 05073447764 numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

Katılımınız için teşekkür ederiz.

Doktor:

Tarih:

İmza:

Çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul ediyorum. Yukardaki gönüllü bilgilendirme metnini okudum. Bunlar hakkında bana sözlü açıklama yapıldı. İstediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Prelingual ve postlingual non-sendromik sensörinöral işitme kaybı bulunan hastalarda sağırılığa sebep olabilecek genetik mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonların varlığının araştırılması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan);

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Hastanın Adı-Soyadı

Tel ve Adres:

İmza:

Doğum Tarihi:

Tarih:

Araştırmacı İsmi:

İmzası

Hastanın şuuru kapalı
veya anlamayacak durumda ise
hasta vasisinin adı soyad ve yakınlığı:

İmzası

Tanık Adı-Soyadı:

İmzası

2. ETİK KURUL ONAY FORMU

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU				
SAYI :		Tarih: 25.06.2013		
KONU : Etik Kurulu Kararı				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	TELEFON	216 570 91 90		
	FAKS	216 565 55 26		
	E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prelingual ve Postlingual Non-Sendromik Sensörinöral İşitme Kaybı Bulunan Hastalardaki Genetik Mutasyonların ve Epigenetik Modifikasyonların Araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. M. Tayyar Kalcıoğlu, Dr. Oğuz Kadir Eğilmez, Doç. Dr. Berna Demircan, Prof. Dr. Muhammet Tekin		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kulak Burun Boğaz – Baş Boyun Cerrahisi		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	DESTEKLEYİCİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	İlaç dışı klinik araştırma	☒		
	Retrospektif araştırma	☐		
	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: I/E	Tarih: 25.06.2013		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
KARAR FORMU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Mustafa İRAZ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Mustafa İRAZ	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Ayşe Serap KARADAĞ	Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Zafer ÇETİNKAYA	Tıbbi Mikrobiyoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Hasan Hüseyin EKER	Halk Sağlığı	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Fatih YAĞMUR	Adli Tıp Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Aişe Seda ARTIŞ	Temel Tıp Bilimleri Fizyoloji Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Kaya Hüsnü AKAN	Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Avukat Hüseyin YÜRÜK	İstanbul İl Genel Meclisi İdari Hukuk Komisyonu Başkanı	Bilge Danışmanlık Hukuk Müşaviri	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Saliha Şahin	İşçi		E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi