



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SENDROMİK OLMAYAN OTOZOMAL
RESESİF İŞİTME KAYIPLARINDAN
SORUMLU GENLERİN YENİ NESİL
DİZİLEME YAKLAŞIMI İLE ARAŞTIRILMASI**

Gamze ZEHİR KIRKBİR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

7.01.2025

Gamze ZEHİR KIRKBİR
(İmza)

İthaf

Doktora tezimi, oğlum Ege KIRKBİR'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince ilgisi, sabrı, teşviği ile gelişmemi ve bu yolda ilerlememi sağlayan; engin bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, sorun yaşadığım her noktada titiz ve anlayışlı yaklaşımıyla bana rehberlik eden, akademik anlamda fikirlerinden ve bana verdiği kıymetli bilgilerden hayatımın her noktasında faydalanacağım ve birlikte çalıştığım için şanslı olduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama dahil edilen ailelerin klinik değerlendirmelerini yaparak sağladığı değerli katkılarından dolayı; 26.08.2020 tarihinde Covid-19 nedeniyle kaybettiğimiz merhum Prof. Dr. Ömer Refik ÇAYLAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Kendisini sevgi ve rahmetle anıyorum.

Tez çalışmam süresince her fırsatta kapısını çalabildiğim, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Figen CELEP EYÜBOĞLU, Doç. Dr. Tuba DİNÇER, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ, Arş. Gör. Dr. İdris ER ve doktora tez izleme komitemde görev alarak katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet ALVER'e teşekkür ederim. Doç. Dr. Hatice Bengü YALDIZ ÇOBANOĞLU'na da ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü maddi manevi desteği benden esirgemeyen ve sevgilerini her an yanımda hissettiğim anneme, babama ve kardeşime; bana her türlü desteği veren ve her zaman yanımda olan eşim Fatih KIRKBİR'e ve oğlum Ege KIRKBİR'e varlıklarından dolayı şükranlarımı sunarım. Zorlu doktora eğitimim süresince her zaman bana destek olan kayınvalideme ayrıca teşekkür ederim.

Desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çokça ağladığım ve çokça güldüğüm anlarımda her zaman yanımda olan, aynı yolu yürüdüğüm, bana aile olan bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca YÖK 100/2000 Doktora Bursu ile bana maddi olarak destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na ve tez çalışmamı Prof. Dr. Ersan KALAY'ın yürütücülüğünde TDK-2022-10273 nolu BAP06 projesi ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Ayrıca Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne de çok teşekkür ederim.

Gamze ZEHİR KIRKBİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İşitme Fizyolojisi	3
2.2. İşitme Mekanizması	5
2.3. İşitme Kaybı ve Sınıflandırılması	6
2.4. İşitme Kayıplarının Genetiği	8
2.5. İşitme Kayıplarında Tedavi Yaklaşımları	17
2.6. Yeni Nesil Dizileme	20
2.6.1. Tüm Ekzom Dizileme	21
2.6.1.1. ACMG/AMP Kriterleri	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Çalışma Grubu	30
3.1.2. Kimyasallar	34
3.1.3. DNA Markırlar	34
3.1.4. Kitler ve Enzimler	34
3.1.5. Diğer Sarf Malzemeler	34
3.1.6. Cihazlar	35
3.1.7. Solüsyonlar	35

3.1.7.1. DNA İzolasyonu Solüsyonları	35
3.1.7.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonlar	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	38
3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme	38
3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Veri Analizi	39
3.2.3.1. Ham Veri ve Hizalama Kalitesinin Kontrolü	42
3.2.3.2. Okumaların Referans Genoma Hizalanması	42
3.2.3.3. Varyantların Çağrılması ve Anotasyonu	42
3.2.3.4. Varyasyonların GEMINI Veri Tabanına Göre Anote Edilmesi ve Kalıtım Kalıbına Göre Filtrelenmesi	43
3.2.4. İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Tespiti	43
3.2.5. İşitme Kaybı ile İlişkilendirilen Varyasyonların Doğrulanması ve Ailedeki Segregasyonunun Belirlenmesi	44
3.2.5.1. Varyasyonun Bulunduğu Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu	44
3.2.5.2. Varyasyonun Sanger Dizileme ile Doğrulanması	46
3.2.5.3. Varyasyonların <i>in silico</i> Analizleri	47
3.2.5.4. Haplotip Analizi	47
3.2.5.5. Bağlantı Analizi	50
4. BULGULAR	52
4.1. Tüm Ekzom Dizileme Veri Analizi	52
4.2. Ailelerdeki İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Tespiti	53
4.2.1. TR-15 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi	54
4.2.2. TR-37 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi	58
4.2.3. TR-33 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi	60
4.2.4. TR-59 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi	63
4.2.4.1. TR-59 Nolu Ailede <i>DLGAP2</i> Geni Üzerinde Tespit Edilen c.2554G>A Varyasyonunun Doğrulanması ve Segregasyonunun Belirlenmesi	64
4.2.5. TR-16 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi	69
4.2.5.1. TR-16_GPGY Nolu Ailede İşitme Kaybının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması	71
4.2.5.2. TR-16_ROK Nolu Ailede İşitme Kaybının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması	74

4.2.5.3. TR-16 Nolu Ailede Otozomal Dominant Kalıtım Kalıbına Göre Sorumlu Patolojinin Araştırılması	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	88
5.1. TR-15 Nolu Aile	88
5.2. TR-37 Nolu Aile	89
5.3. TR-33 Nolu Aile	90
5.4. TR-59 Nolu Aile	91
5.5. TR-16 Nolu Aile	93
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	97
7. KAYNAKLAR	98
EKLER	124
Ek 1. Etik Kurul Onayı-1	125
Ek 2. Etik Kurul Onayı-2	126
Ek 3. Tüm Ekzom Dizileme Hizmeti Alımı Teknik Şartnamesi-1	129
Ek 4. Tüm Ekzom Dizileme Hizmeti Alımı Teknik Şartnamesi-2	130
ÖZGEÇMİŞ	131

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. İşitme kayıplarının sınıflandırılması	7
Tablo 2. Sendromik işitme kayıpları ile ilişkilendirilmiş genler	9
Tablo 3. Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybından sorumlu genler	11
Tablo 4. Sendromik otozomal dominant işitme kaybından sorumlu genler	14
Tablo 5. Cinsiyete bağlı ve mitokondriyel kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu genler	17
Tablo 6. Ekzom yakalama kitleri ve hedeflenen bölgeleri	22
Tablo 7. ACMG tarafından varyasyonların patolojik olup olmama durumunu belirlemede kullanılacak kriterler oluşturulurken kullanılan veri tabanları	25
Tablo 8. ACMG tarafından varyasyonların patolojik olup olmama durumunu belirlemede kullanılacak kriterler oluşturulurken kullanılan <i>in silico</i> araçlar	26
Tablo 9. Patojenik varyantları sınıflandırmak için ACMG tarafından belirlenen kriterler	27
Tablo 10. Benign varyantları sınıflandırmak için ACMG tarafından belirlenen kriterler	28
Tablo 11. ACMG' ye göre dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri kombine etme kuralları	29
Tablo 12. Tüm ekzom dizilemeye tabi tutulan bireyler ve dizileme kitleri	39
Tablo 13. Varyasyonların Sanger dizilemesinde kullanılan primerler	45
Tablo 14. Haplotip analizi için kullanılan STR markırları ve SNP'ler	48
Tablo 15. Tüm ekzom dizileme ham verilerinin kalite ve hizalama değerleri	51
Tablo 16. TR-59 nolu ailede IV:1, IV:2 ve IV:4 numaralı bireylerin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen aday varyasyon	65
Tablo 17. TR-16_ROK nolu ailede V:11 numaralı bireyin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen aday varyasyonlar	73
Tablo 18. TR-16 nolu ailede filtrelemeler sonucunda tespit edilen varyasyonlar	77
Tablo 19. <i>PHTF2</i> geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunun içinde yer aldığı SNP tabanlı haplotip bloklarının popülasyon bazlı analizi	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Dış, orta ve iç kulağın görünümü	3
Şekil 2. Koklea kesiti ve korti organının yapısı	4
Şekil 3. İç ve dış tüylü hücrelerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	5
Şekil 4. Tüylü hücrelerde iyon homeostazı	6
Şekil 5. TR-15 nolu aile	30
Şekil 6. TR-37 nolu aile	31
Şekil 7. TR-33 nolu aile	31
Şekil 8. TR-59 nolu aile	32
Şekil 9. TR-16 nolu aile	33
Şekil 10. Tüm ekzom dizileme ile elde edilen verilerin Galaxy Europe Platformu kullanılarak varyasyon listesinin oluşturulması için kullanılan iş akışı	41
Şekil 11. TR-15 nolu ailede IV:7 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	55
Şekil 12. TBC1D24 üzerinde daha önce tanımlanan varyasyonlar ve TR-15 nolu ailede tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi	56
Şekil 13. TR-15 nolu ailede <i>TBC1D24</i> geni üzerinde tespit edilen c.889C>T varyasyonunun doğrulanması	57
Şekil 14. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi	57
Şekil 15. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun SIFT aracı ile analizi	58
Şekil 16. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi	58
Şekil 17. TR-37 nolu ailede VI:3 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	59
Şekil 18. TR-37 nolu ailede <i>GPSM2</i> geni üzerinde tespit edilen c.1093C>T varyasyonunun doğrulanması	60

Şekil 19.	TR-33 nolu ailede VI:2 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	61
Şekil 20.	TR-33 nolu ailede <i>EPS8L2</i> geni üzerinde tespit edilen c.1921delG varyasyonunun doğrulanması	62
Şekil 21.	<i>EPS8L2</i> üzerinde daha önce tanımlanan varyasyonlar ve TR-33 nolu ailede tespit edilen p.Ala641Profs*13 varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi	63
Şekil 22.	TR-59 nolu ailede IV:4 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	64
Şekil 23.	TR-59 nolu ailede IV:1, IV:2 ve IV:4 numaralı bireylerin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	65
Şekil 24.	TR-59 nolu ailede <i>DLGAP2</i> geni üzerinde tespit edilen c.2554G>A varyasyonunun doğrulanması	66
Şekil 25.	TR-59 nolu ailede haplotip analizi	67
Şekil 26.	<i>DLGAP2</i> proteini üzerindeki domainlerin şematik gösterimi ve tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi	68
Şekil 27.	<i>DLGAP2</i> üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi	68
Şekil 28.	<i>DLGAP2</i> üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun SIFT aracı ile analizi	68
Şekil 29.	<i>DLGAP2</i> üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi	69
Şekil 30.	TR-16 nolu ailede IV:3 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	70
Şekil 31.	TR-16_GPGY nolu ailede V:2 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	72
Şekil 32.	TR-16_GPGY nolu ailede <i>PCDH15</i> geni üzerinde tespit edilen c.4127C>A varyasyonunun doğrulanması	73
Şekil 33.	<i>PCDH15</i> üzerinde tespit edilen p.Ala1376Asp varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi	73

Şekil 34.	PCDH15 üzerinde tespit edilen p.Ala1376Asp varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi	74
Şekil 35.	TR-16_ROK nolu ailede V:11 numaralı bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi	75
Şekil 36.	TR-16 nolu ailede IV:3, IV:4, V:4, V:8, V:10, VI:1 ve VI:2 numaralı bireylerin analizleri sonucunda tespit edilen varyasyonların filtrelenmesi	76
Şekil 37.	TR-16 nolu ailede tüm ekzom dizileme ile tespit edilen varyasyonların PCR ile amplifikasyonu	77
Şekil 38.	TR-16 nolu ailede tüm ekzom dizileme ile tespit edilen varyasyonların Sanger dizileme ile doğrulanması	78
Şekil 39.	TR-16 nolu ailede tespit edilen varyasyonların ailedeki iştirme kaybı ile segregasyonu	79
Şekil 40.	TR-16 nolu ailede haplotip analizi	80
Şekil 41.	<i>PHTF2</i> geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunun içinde yer aldığı bölgenin SNP tabanlı LD analizi	82
Şekil 42.	EasyLINKAGE Plus v5.02 programı ile dominant kalıtım modele göre TR-16 nolu ailede 7. kromozom üzerinde elde edilen LOD skorun grafiksel görünümü	83
Şekil 43.	<i>PHTF2</i> proteini üzerindeki domainlerinin şematik gösterimi ve tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi	84
Şekil 44.	<i>PHTF2</i> üzerinde tespit edilen 714'ncü pozisyonundaki lösin amino asidinin çoklu hizalama ile analizi	85
Şekil 45.	<i>PHTF2</i> üzerinde tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi	85
Şekil 46.	<i>PHTF2</i> üzerinde tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi	85

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABR	Auditory Brainstem Response
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association for Molecular Pathology
CCDS	Consensus Coding Sequence
CNV	Copy Number Variation
CT	Computerized Tomography
dB	Desibel
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DFN	Nonsyndromic DeaFNess Locus
DFNA	Autosomal Dominant Nonsyndromic DeaFNess Locus
DFNB	Autosomal Recessive Nonsyndromic DeaFNess Locus
DFNX	X-linked Nonsyndromic DeaFNess Locus
DFNY	Y-linked Nonsyndromic DeaFNess Locus
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ExAC	Exome Aggregation Consortium
GENCODE	Encyclopedia of genes and gene variants project
gnomAD	The Genome Aggregation Database
HCl	Hidroklorik asit
HGMD	The Human Gene Mutation Database
IDT	Integrated DNA Technologies
In-del	İnsersiyon-delesyon
kb	Kilobaz
lncRNAs	Long non-coding RNAs
LOD	Logarithm of the odds
Mb	Megabaz
miRBase	The microRNA database
MGI	Mouse Genome Informatics
MRI	Magnetic resonance imaging
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man

PCR	Polymerase Chain Reaction
RefSeq	Reference Sequence Database
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
T/E	Tripsin/EDTA
Vega	The Vertebrate Genome Annotation Database

Simgeler

g	Gram
L	Litre
M	Molar
MW	Moleküler ağırlık
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
°C	Santigrad derece
∞	Sonsuz

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum Klorür
C₂H₄O₂	Glasiyel asetik asit
C₂H₅OH	Etil Alkol
C₄H₁₁NO₃	Tris baz
C₄H₁₂ClNO₃	Tris HCl
C₆H₁₂O₆	Glukoz
C₁₂H₂₀N₃Br	Etidyum bromür
HCl	Hidroklorik asit
H₂O	Su
KHCO₃	Potasyum Bikarbonat

NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂EDTA·2H₂O	EDTA disodyum dihidrat
Na₂HPO₄·2H₂O	Di-sodyum hidrojen fosfat



ÖZET

Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kayıplarından Sorumlu Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yaklaşımı ile Araştırılması

İşitme kaybı, tüm yaş gruplarını etkileyebilen en yaygın duyuşsal bozukluklardan biridir. Konjenital işitme kayıpları 1000 doğumda bir görülmektedir. İşitme kayıplarının yaklaşık %50'sinden fazlası genetik faktörlere, kalan kısmı ise çevresel faktörlere bağılı olarak ortaya çıkmaktadır. Genetik faktörlerin sorumlu olduğı işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini sendromik olmayan işitme kayıpları oluşturmaktadır. Sendromik olmayan doğumsal işitme kayıplarının yaklaşık %70-80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, yaklaşık %2'si X'e bağılı ve %1'den azı da mitokondriyel kalıtım göstermektedir. Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybından sorumlu 114 lokus tanımlanmış ve bu lokusların 23'ündeki sorumlu gen henüz bilinmemektedir. Sendromik olmayan otozomal dominant işitme kaybından sorumlu ise 82 lokus tanımlanmış ve bu lokusların 15'indeki sorumlu gen henüz bilinmemektedir. İşitme kaybının genetik etiyolojisini aydınlatma sürecine katkı sağlamayı amaçlayan bu tez çalışması kapsamında, dördü otozomal resesif (TR-15, TR-37, TR-33, TR-59) ve biri otozomal dominant (TR-16) kalıtım gösteren sensörinöral işitme kayıplı toplam beş ailede tüm ekzom dizileme yaklaşımı ile sorumlu genetik etiyoloji araştırıldı. TR-37 nolu ailede işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan *GPSM2* geni üzerinde daha önce rapor edilmiş olan c.1093C>T (p.Arg365*) varyasyonu homozigot olarak belirlendi. TR-15 ve TR-33 nolu ailelerde ise daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan sırasıyla *TBC1D24* ve *EPS8L2* genleri üzerinde sırasıyla c.889C>T (p.Arg297Cys) ve c.1921delG (p.Ala641Profs*13) olmak üzere iki yeni varyasyon homozigot olarak belirlendi. TR-59 ve TR-16 nolu ailelerde ise daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmemiş olan sırasıyla *DLGAP2* geni üzerinde homozigot c.2554G>A (p.Ala852Thr) varyasyonu ve *PHTF2* geni üzerinde heterozigot c.2141T>G (p.Leu714Arg) varyasyonu ailelerdeki genetik etiyolojiyi için en güçlü adaylar olarak belirlendi. Özetle, beş ailede sensörinöral işitme kaybının genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik olarak yürütölen bu tez çalışması kapsamında bir ailede bilinen bir varyasyon, iki ailede bilinen genler üzerinde iki yeni varyasyon tanımlanırken iki ailede işitme kaybı ile ilişkili olabilecek iki güçlü aday gen belirlendi.

Anahtar Kelimeler: İşitme kaybı, sendromik olmayan işitme kaybı, tüm ekzom dizileme

ABSTRACT

Investigation of Genes Responsible for Non-Syndromic Autosomal Recessive Hearing Loss with Next Generation Sequencing Approach

Hearing loss is one of the most common sensory disorders that can affect all age groups. Congenital hearing loss is seen in 1 in 1000 births. More than 50% of hearing loss is due to genetic factors, while the rest is due to environmental factors. Approximately 70% of the hearing loss caused by genetic factors is non-syndromic hearing loss. Approximately 70-80% of non-syndromic congenital hearing loss is autosomal recessive, 20% is autosomal dominant, approximately 2% is X-linked, and less than 1% is mitochondrial inherited. Up to date, 114 loci have been identified as responsible for non-syndromic autosomal recessive hearing loss, and the gene responsible for 23 of these loci is not yet known. Similarly, 82 loci have been identified as responsible for non-syndromic autosomal dominant hearing loss, and the gene responsible for 15 of these loci is not yet known. In this thesis study, which aims to contribute to the elucidation of the genetic etiology of hearing loss, the responsible genetic etiologies were investigated in a total of five families with sensorineural hearing loss, four of which were autosomal recessive (TR-15, TR-37, TR-33, TR-59) and one of which was autosomal dominant (TR-16). In family TR-37, the previously reported c.1093C>T (p.Arg365*) variation on the *GPSM2* gene, which has been associated with hearing loss, was determined as homozygous. In families TR-15 and TR-33, two new variations, c.889C>T (p.Arg297Cys) and c.1921delG (p.Ala641Profs*13), were determined as homozygous on the *TBC1D24* and *EPS8L2* genes, which have been previously associated with hearing loss, respectively. In families TR-59 and TR-16, the homozygous c.2554G>A (p.Ala852Thr) variation on the *DLGAP2* gene and the heterozygous c.2141T>G (p.Leu714Arg) variation on the *PHTF2* gene, which have not been previously associated with hearing loss, were determined as the strongest candidates for the genetic etiology in the families. In summary, within the scope of this thesis study conducted to elucidate the genetic etiology of sensorineural hearing loss in five families, a known variation was identified in one family, two new variations on known genes were identified in two families, and two strong candidate genes that may be associated with hearing loss were identified in two families.

Keywords: Hearing loss, non-syndromic hearing loss, whole exome sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Genetik hastalıklar, mutasyonların genetik materyali etkileme ve çevresel faktörlerden etkilenme durumuna göre; tek gen hastalıkları, kromozomal hastalıklar ve multifaktöriyel hastalıklar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (1). İşitme kaybı, genetik veya çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilen, kısmen ya da tamamen işitme yetersizliği olarak tanımlanan klinik ve genetik olarak heterojen bir duyuşal bozukluktur (2). İşitme kaybı yeni doğan her 1000 çocuktan birinde görölmektedir (3, 4). İşitme kaybı, konjenital veya doğum sonrası dönemde ortaya çıkabildiğı gibi, yalnızca bir kulağı ya da her iki kulağı birden de etkileyebilmektedir (3).

İşitme kayıplarının etiyoşojisinin önemli bir kısmından genetik faktörler sorumlu iken bir kısmında da enfeksiyon, travma, ototoksik ilaçlar, prematüre doğum, ilaç kullanımı, gürültü maruziyeti gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır (5-7). İşitme kayıpları; etiyoşojisine, başlama yaşına, etkilenen anatomik yapıya, fenotipik özelliğine, kalıtım kalıbına ve kayıp düzeyine göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmaktadır (7-9). Farklı bir patolojik bulgunun eşlik edip etmemesine bağı olarak işitme kayıpları sendromik ve sendromik olmayan işitme kaybı olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (7, 8). Genetik faktörlerin sorumlu olduğı işitme kayıplarının yaklaşık %70'ini sendromik olmayanlar, %30'unu ise sendromik işitme kayıpları oluşturmaktadır (3, 8).

Özgün fenotipik bulguları sayesinde sendromik işitme kayıplarında tanının konulması ve sorunlu genin belirlenmesi nispeten daha kolaydır. Bu sayede sendromik işitme kayıplarından sorumlu genlerinin neredeyse tamamı tanımlanmıştır. Buna karşın, sendromik olmayan işitme kayıplarındaki yüksek genetik heterojenite ve fenotipik benzerlik sorumlu genlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır (10).

Sendromik olmayan işitme kayıpları ile ilişkili olarak bu zamana kadar 205 lokus tanımlanmıştır. Bu lokuslardan 165'indeki sorumlu gen belirlenmiş, 40 lokustaki sorumlu gen ise halen daha bilinmemektedir (11, 12). İşitme kaybından sorumlu genlerin tanımlanması; hastalığın erken tanısı ve işitme kaybı düzeyine göre bireye uygun tedavi stratejisinin belirlenmesinde önem arz etmektedir. Şiddetli ve derin işitme kayıplarının tedavisinde tek alternatif olan koklear implant uygulamasında da genetik etiyoşojinin biliniyor olması tedavide büyük önem taşımaktadır (13). İlgili bireydeki genetik etiyoşojinin biliniyor olması ve bu etiyoşojinin koklear sinir ve sonrasını etkileyip etkilenmediğinin ortaya konulmuş olması koklear implant tedavisinin karar sürecinde yol gösterici olmaktadır

(13). Bu durum, işitme kaybından sorumlu genlerin tanımlanması ve tanımlanan genlerin işitme sisteminin hangi yapılarında ifade edildiğinin belirlenmesi gerektiğini göstermektedir.

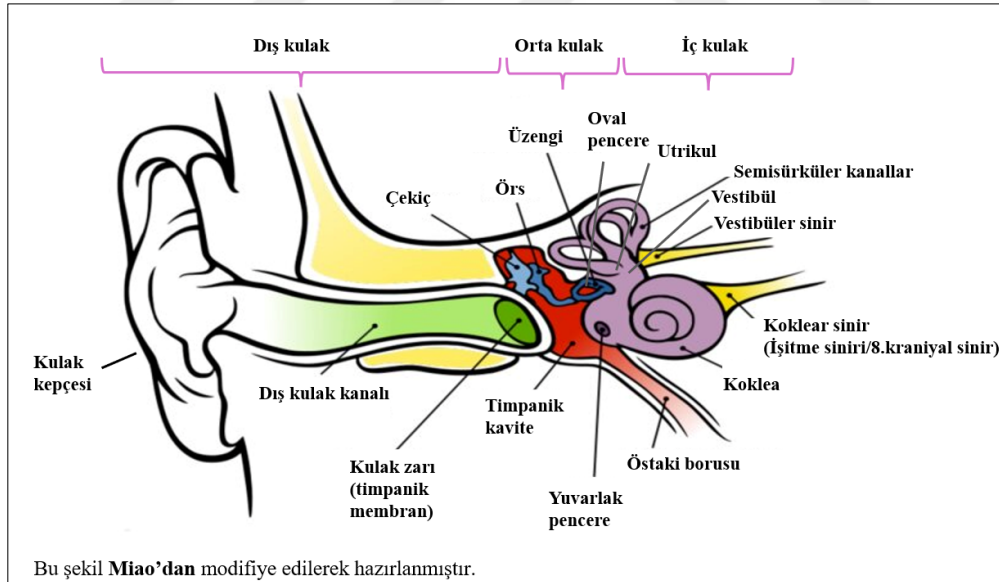
Bu noktadan hareketle, tez çalışması kapsamında, sendromik olmayan otozomal resesif sensorinöral işitme kayıplı bireylerin bulunduğu beş ailede tüm ekzom dizileme yöntemi ile genetik etiyojinin aydınlatılması amaçlanmaktadır. Bu yolla tanımlanabilecek yeni genler ile işitme kaybının moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve tedavi stratejisinin belirlenmesi sürecine katkı sağlanması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Fizyolojisi

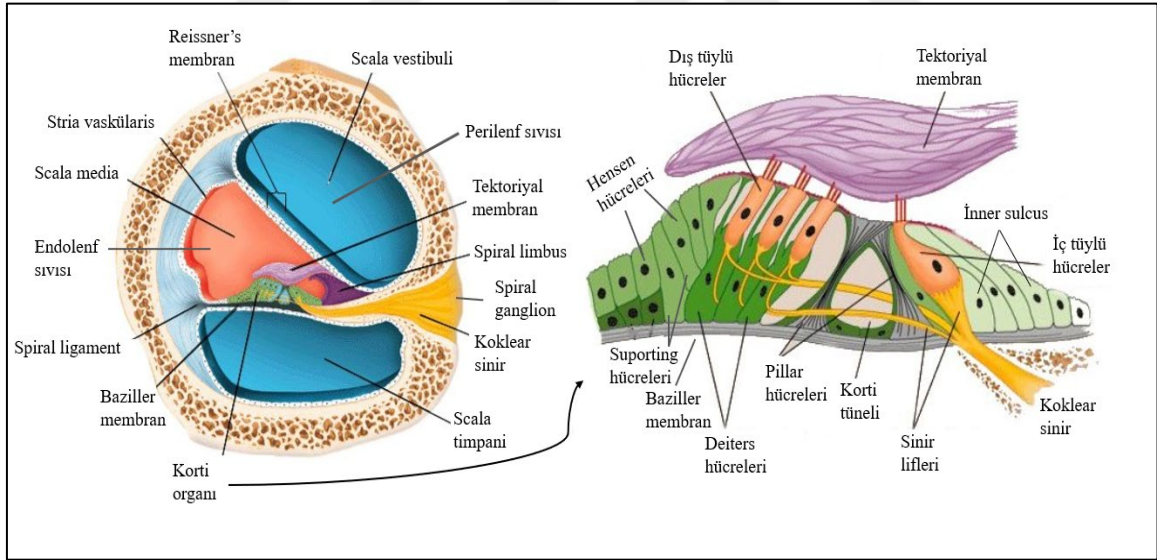
İşitme; dış kulak, orta kulak, iç kulak, koklear sinir (sekizinci kranial sinir/işitme siniri) ve beyinde işitmenin anlamlandırıldığı temporal lob olmak üzere beş anatomik yapı ile gerçekleşmektedir (14, 15). Dış kulak; kulak kepçesi, dış kulak kanalı ve kulak zarı (timpanik membran) olmak üzere üç kısımda değerlendirilmektedir (Şekil 1) (15, 16). Orta kulak; dış kısmını kulak zarının oluşturduğu dışarıdan içeri doğru sırası ile çekiç, örs ve üzengi adındaki üç kemikçikten, östaki borusundan ve oval pencereden oluşmaktadır (15, 16). İç kulak ise işitme sisteminin merkezi yapısı olan koklea ve labirent benzeri bir yapıya sahip olan temporal kemik üzerine yerleşmiş denge sisteminden sorumlu vestibül ve semisürküler kanallardan oluşmaktadır (16). Koklear sinir, spiral ganglionda bulunan nöronların aksonlarından oluşur ve iç kulaktan aldığı elektriksel sinyalleri temporal loba taşır. Temporal lob içinde yer alan işitsel korteks, iç kulak tarafından elektriksel sinyallere dönüştürülen sesin anlamlandırıldığı bölgedir (17-19).



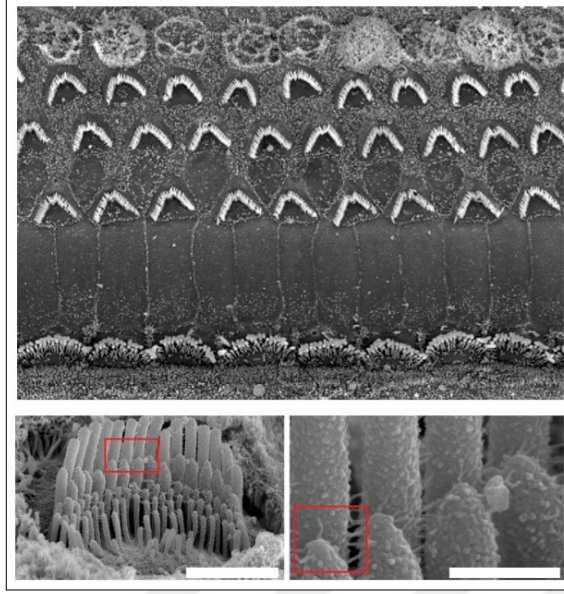
Şekil 1. Dış, orta ve iç kulağın görünümü (Miao'dan, (16))

Ses dalgalarının ürettiği mekanik hareketi elektriksel sinyallere dönüştüren ve işitme sisteminin merkezi yapısı olan koklea; baziller membran ve Reissner's membranın üç bölmeye ayırdığı içi sıvı ile dolu scala vestibüli (vestibüler boşluk), scala media (koklear kanal) ve scala timpani yapılarından oluşmaktadır (Şekil 2). Scala media, stria vaskülaris

tarafından salgılanan potasyum miktarı yüksek, sodyum miktarı düşük endolenf sıvısı ile doludur. Scala media kokleanın membran yapıdaki kanalı olup içerisinde mekanik hareketin elektriksel sinyallere dönüştürülmesinde rol oynayan korti organını barındırmaktadır. Korti organı; korti tüneli, iç ve dış tüylü hücreleri, destek (Supporting) hücreleri (Deiters, Henssens, Inner sulcus ve Pillar destek hücreleri), baziller membran ve tektoriyal membrandan oluşmaktadır. Baziller membranın tektoriyal membrana bakan tarafında tüylü hücreler ve destek hücreleri bulunmaktadır (Şekil 2) (20, 21). İç kısımda yer alan tüylü hücreler tek, dış kısımda yer alan tüylü hücreler ise üç sıra halinde dizilmiştir (Şekil 3). İç tüylü hücreler; koklear sinire ve temporal lobun parçası olan işitme korteksine sinyal ileten reseptör hücreleri olarak görev yapar. Dış tüylü hücreler ise hem seslerin algılanmasına katkı sağlayan sensör elemanlarına hem de sesin işitme seviyesini ve frekans seçiciliğini düzenleyen motor elemanlarına sahiptir. Karşılıklı olarak iç (tek sıra) ve dış (V şeklinde üç sıra) tüylü hücreler dışarıdan içeri doğru büyükten küçüğe doğru sıralanmış apikal bölgede yerleşik olan stereosilyalara sahiptir (Şekil 3) (22).



Şekil 2. Koklea kesiti ve korti organının yapısı (Audio Archive'den (20))



Şekil 3. İç ve dış tüylü hücrelerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Grillet'den, (22))

2.2. İşitme Mekanizması

İşitme, kulağın anatomik yapılarında gerçekleşen işlemler sonucunda elde edilen elektriksel sinyallerin koklear sinir ile beyin temporal lobunda bulunan işitsel kortekse aktarılması anlamlandırılması sürecidir (14, 15). İşitme, kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgalarının dış kulak kanalıyla amplifiye edilerek kulak zarına (timpanik membran) iletilmesi ile başlar (23). Kulak zarı gelen ses ile titreşir. Bu titreşim, orta kulakta bulunan çekiç, örs, üzengi kemikçiklerini hareket ettirir. Hareket eden kemikçiklerden üzengi ile oval pencereye titreşimler iletilir. Vestibül yardımı ile vestibüler kanaldaki perilenf sıvısının dalgalanmasına neden olur. Perilenf sıvısındaki dalgalanma hareketi koklear kanaldaki endolenfe yansıyarak, tektoriyal membranda titreşimlere neden olur. Tektoriyal membrandaki titreşimler iç ve dış tüylü hücreler üzerindeki stereosilyaların hareket etmesini sağlar. Stereosilyaların tepe uçlarındaki harekete duyarlı mekanik kanallar açılarak, hücre içerisine doğru endolenften potasyum iyonlarının geçişi gerçekleşir ve hücreler depolarize olur. Potasyum iyonlarının silya hücrelerinin içine girmesi, hücreyi depolarize eder ve bazolateral bölgedeki kalsiyum kanalları açılır. Kalsiyum kanallarının açılması, hücre içerisine kalsiyum iyonlarının girmesine neden olur (Şekil 4) (23). Kalsiyum iyonları, silya hücrelerine girerek bu hücrelerin bazal bölgelerindeki sinaptik veziküllerden nörotransmitterlerin salınımını tetikler. Bu nörotransmitterler, koklear siniri uyarak işitsel sinyallerin beyne iletilmesini sağlar (23).

konjenital veya doğum sonrası oluşabildiği gibi yalnızca bir kulağı da etkileyebilmektedir. İşitme kaybı; bireylerin konuşma yetisini, çevresel, bilişsel, sosyal ve duygusal gelişimini doğrudan etkileyebildiği için yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (3). İşitme kayıpları; etiyolojisine, başlama yaşına, etkilenen anatomik yapıya, fenotipik özelliğine, kalıtım kalıbına ve kayıp düzeyine göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmaktadır (Tablo 1) (7-9).

Tablo 1. İşitme kayıplarının sınıflandırılması.

Etiyolojisine Göre	Kaynak
▪ <i>Kalıtsal (genetik):</i> Tek bir gendeki varyasyon (monogenik) ya da iki farklı gen üzerindeki varyasyon (digenik) ile birlikte çevresel faktörlerin kombine etkisi ile oluşabilir. ▪ <i>Kalıtsal olmayan (non-genetik):</i> Travma, enfeksiyon ve ototoksik ilaç kullanımı, uzun süreli gürültüye maruziyet sonucu oluşabilir.	(7)
Başlama Yaşına Göre	
▪ <i>Konjenital</i> ▪ <i>Prelingual:</i> Dil Gelişimi Öncesi :0-2 yaş ▪ <i>Perilingual:</i> 2-6 yaş aralığı ▪ <i>Postlingual:</i> Dil Gelişimi Sonrası: 6 yaş ve üzeri	(9)
Etkilenen Anatomik Yapıya Göre	
▪ <i>İletim Tipi İşitme Kaybı:</i> Dış (kulak zarı perforasyonu ve orta kulakta oluşan bozukluklar (kemikçiklerde oluşan hasar, sıvı birikimi sonucu kalıcı olmayan hasarlar sonucu oluşur. ▪ <i>Sensörinöral İşitme Kaybı:</i> İç kulakta genellikle de koklea da oluşan bozukluklar, işitsel sinirdeki hasar gördüğünde veya sesi olması gerektiği gibi işleyemediğinde oluşur. ▪ <i>Karışık (Mikst) Tip İşitme Kaybı:</i> İletim tipi işitme kaybı ve sensörinal işitme kaybının aynı anda görülmesi durumunda oluşur	(7)
Fenotipik Özelliğine Göre	
▪ <i>Sendromik</i> ▪ <i>Sendromik Olmayan</i>	(7)
Kalıtım Kalıbına Göre	
▪ <i>Otozomal Resesif</i> ▪ <i>Otozomal Dominant</i> ▪ <i>Cinsiyete bağlı ve Mitokondriyel Kalıtım</i>	(7)
Kayıp Düzeyine Göre	
▪ <i>Hafif İşitme Kaybı:</i> 26-40 dB şiddetindeki sesleri işitmeme ▪ <i>Orta Derecede İşitme Kaybı:</i> 41-60 dB şiddetindeki sesleri işitmeme ▪ <i>Orta-Şiddetli İşitme Kaybı:</i> 61-80 dB şiddetindeki sesleri işitmeme ▪ <i>Şiddetli İşitme Kaybı:</i> 81-95 dB şiddetindeki sesleri işitmeme ▪ <i>Derin İşitme Kaybı:</i> 95 dB'den daha yüksek şiddetteki sesleri işitmeme	(7)

2.4. İşitme Kayıplarının Genetiği

İşitme kaybı yeni doğan her 1000 çocuktan birinde görülmektedir (3, 4). Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı güncel verilere göre dünya nüfusunun %5'inden fazlasına karşılık gelen yaklaşık 430 milyondan fazla bireyin işitme kayıplı olduğu ve bu sayının yaklaşık 34 milyonunun çocuk olduğu rapor edilmiştir (25).

İşitme kayıplarının etiyolojisinin önemli bir kısmından genetik faktörler sorumlu iken bir kısmında da enfeksiyon, travma, ototoksik ilaçlar, prematüre doğum, ilaç kullanımı, gürültü maruziyeti gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır (26). Doğumsal işitme kayıplarının %50'si genetik bir etiyolojiye bağlıdır. Bunların ise %30'u sendromik, %70'i sendromik olmayan işitme kayıplarıdır (27).

Sendromik işitme kayıplarında bir veya birden fazla doku ve organdaki patolojinin işitme kaybına eşlik ettiği görülmektedir (3, 7, 8). Sendromik olmayan işitme kaybında ise işitme kaybına eşlik eden ikinci bir patoloji veya anomali görülmemektedir (3, 8). Bununla birlikte, sendromik işitme kayıplarında gözlemlenen ilave bozuklukların bir kısmının belirlenebilmesi detaylı klinik değerlendirmeler gerektirmektedir (10). Bu nedenledir ki, işitme kayıpları ile ilişkilendirilen genlerin bir kısmı başlangıçta sendromik olmayan işitme kayıpları ile ilişkilendirilmişken sonrasında sendromik işitme kayıplarına neden oldukları gösterilmiştir (8). *DSPP*, *MYH9* ve *GPSM2* gibi genler bu duruma örnek verilebilmektedir (11). Bunun yanında, bir gendeki varyasyonların bir kısmı sendromik işitme kaybına neden olurken diğer bir kısmı sendromik olmayan işitme kayıplarına neden olabilmektedir (8). *MYO7A*, *TBC1D24*, *PCDH15* ve *EYA4* gibi genler buna örnekler olarak verilebilmektedir (11).

En sık görülen sendromik işitme kayıpları arasında Waardenburg sendromu (OMIM #193500), Alport sendromu (OMIM #203780), Usher sendromu (OMIM #276904), Pendred sendromu (OMIM #274600), Branchio-Oto-Renal sendromu (OMIM #113650), Mohr-Tranebjaerg sendromu (OMIM #304700) yer almaktadır (28). Bu sendromların klinik olarak ayrımlarının kolaylıkla yapılabilmesi ve tek gen kalıtımı göstermeleri sorumlu genlerin daha hızlı bir şekilde tanımlanabilmesini mümkün kılmaktadır (10). Sendromik işitme kayıplarından sorumlu 152 gen tanımlanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Sendromik işitme kayıpları ile ilişkilendirilmiş genler.

Gen adı	OMIM	Kalıtım Kalıbı	Gen adı	OMIM	Kalıtım Kalıbı
<i>AFG2A</i>	616577	OR	<i>ZNF469</i>	229200	OR
<i>CEP78</i>	617236	OR	<i>CACNA1D</i>	614896	OR
<i>ATP6V0A4</i>	602722	OR	<i>CD151</i>	609057	OR
<i>SLC29A3</i>	602782	OR	<i>FKBP14</i>	614557	OR
<i>ABHD12</i>	612674	OR	<i>GGPS1</i>	619518	OR
<i>DNAJC3</i>	616192	OR	<i>FGFR3</i>	610474	OR, OD
<i>EXOSC2</i>	617763	OR	<i>LRP2</i>	222448	OR
<i>DLX5</i>	183600	OD	<i>ERCC6</i>	133540	OR
<i>NMNAT1</i>	619260	OR	<i>SALL4</i>	147750	OD
<i>AFG2B *</i>	619616	OR	<i>PRORP</i>	619737	OR
<i>ERAL1</i>	617565	OR	<i>GPSM2</i>	604213	OR
<i>KITLG *</i>	619947	OR	<i>CLPP</i>	614129	OR
<i>PSMC1</i>	620071	OR	<i>NAGA</i>	609242	OR
<i>RAI1</i>	182290	OR	<i>USH1C *</i>	276904	OR
<i>CLRN1</i>	276902	OR	<i>MYO7A *</i>	276900	OR, OD
<i>COL4A4</i>	203780	OD	<i>CDH23 *</i>	601067	OR, OD
<i>KCNQ1</i>	220400	OR	<i>USH1G *</i>	606943	OR
<i>KCNE1</i>	612347	OR	<i>WHRN *</i>	607928	OR
<i>TWNK</i>	616138	OR	<i>SLC26A4 *</i>	274600	OR
<i>POLG</i>	157640	OD	<i>ESPN *</i>	618632	OR
<i>HSD17B4</i>	233400	OR	<i>BSND *</i>	602522	OR
<i>HARS2</i>	614926	OR	<i>IARS2</i>	616007	OR
<i>COL9A3</i>	620022	OR	<i>TCOF1</i>	154500	OD
<i>POLR1C</i>	248390	OR	<i>POLR1B</i>	618839	OD
<i>SNAI2</i>	193510	OR	<i>POLR1D</i>	613717	OR, OD
<i>EDN3</i>	613265	OR, OD	<i>PHYH</i>	266500	OR
<i>CIB2 *</i>	614869	OR	<i>GPR98</i>	605472	OR
<i>PNPT1 *</i>	614932	OR	<i>MYH14 *</i>	614369	OD
<i>COL9A1</i>	614134	OR	<i>DIAPH3</i>	609129	OD
<i>USH2A</i>	276901	OR	<i>EDN3</i>	613265	OR, OD
<i>ATP6V1B1</i>	267300	OR	<i>MEOX1</i>	214300	OD
<i>SLC4A11</i>	217400	OR	<i>POLR1C</i>	248390	OD
<i>SLITRK6</i>	221200	OR	<i>NF2</i>	101000	OD
<i>FOXC1</i>	602482	OD	<i>COL4A5</i>	301050	X'e Bağlı
<i>ATP1A3</i>	601338	OD	<i>SF3B2</i>	164210	OD
<i>ATP11A *</i>	620384	OD	<i>SALL1</i>	107480	OD
<i>TMEM43</i>	619832	OD	<i>SF3B4</i>	154400	OD
<i>SERPINF1</i>	613982	OR	<i>TMM8A</i>	304700	X'e Bağlı
<i>FOXL1</i>	620576	OD	<i>GATA3</i>	146255	OD
<i>SIX5</i>	610896	OD	<i>GJB1</i>	302800	X'e Bağlı
<i>SIX1 *</i>	608389	OD	<i>NLRP3</i>	191900	OD
<i>HOXA1</i>	601536	OR	<i>CCBE1</i>	235510	OR
<i>MIA3</i>	619269	OR	<i>ACTG1 *</i>	614583	OD
<i>NDP</i>	310600	X'e Bağlı	<i>FMN1</i>	(29)	OR
<i>CISD2</i>	604928	OR	<i>IHH</i>	(30)	OR
<i>ERCC8</i>	216400	OR	<i>SLC33A1</i>	(31)	OR
<i>PEX7</i>	215100	OR	<i>SEMA3E</i>	(32)	OD
<i>ALMS1</i>	203800	OR	<i>JAG1</i>	617992	OD
<i>KCNJ1</i>	241200	OR	<i>USH2C</i>	(33)	OR
<i>FGF3</i>	610706	OR	<i>VTN</i>	(34)	OD
<i>BCOR</i>	300166	X'e Bağlı	<i>MPZ</i>	607736	OD
<i>FAT4</i>	615546	OR	<i>MEPE</i>	(35)	OD

Tablo 2. (Devam)

Gen adı	OMIM	Kalıtım Kalıbı	Gen adı	OMIM	Kalıtım Kalıbı
<i>BCS1L</i>	124000	OR	<i>KARS1</i> *	619196	OR
	262000	OR		619147	OR
<i>PEX1</i>	234580	OR	<i>CLCNKB</i>	613090	OR
	601539	OR		607364	OR
<i>ACTB</i>	607371	OR	<i>PDZD7</i> *	605472	OR
	243310	OD		276901	OR
<i>COL4A3</i>	620536	X'e Bağlı	<i>DNMT1</i>	614116	OD
	104200	OD		604121	OD
<i>EDNRB</i>	277580	OD	<i>PRPS1</i>	301835	OR
	600501	OR		300661	X'e bağlı
<i>KCNJ10</i>	600791	OR	<i>LARS2</i>	615300	OR
	612780	OD		617021	OR
<i>PEX6</i>	616617	OR	<i>PCDH15</i> *	601067	OR, OD
	614863	OR, OD		602083	OR
<i>COL11A2</i> *	215150	OR	<i>COL9A2</i>	614284	OR
	184840	OD		108300	OR
<i>WFS1</i> *	222300	OR	<i>KMT2D</i>	620186	OD
	614296	OD		147920	OD
<i>SMARCA4</i>	614609	OD	<i>CHD7</i>	214800	OD
	620792	OD		612370	OD
<i>OPA1</i>	165500	OD	<i>COL2A1</i>	108300	OD
	125520	OD		132450	OD
<i>TWIST1</i>	101400	OD	<i>COL11A1</i> *	604841	OD
	617746	OD		154780	OD
<i>PTPN11</i>	163950	OD	<i>AQP4</i>	(36, 37)	
	151100	OD		148820	OR
<i>GDF6</i>	118100	OD	<i>PAX3</i>	122880	OD
	617898	OD		193500	OD
	193510	OD		615338	OR
<i>MITF</i>	617306	OR	<i>TBC1D24</i> *	220500	OR
	103500	OD		608105	OR
	166200	OD		113650	OD
<i>COL1A1</i>	166210	OD	<i>EYA1</i>	166780	OD
	259420	OD		602588	OD
	166220	OD	<i>GRHL2</i> *	616029	OR
	611584	OD	<i>CEP250</i> *	618358	OR
<i>SOX10</i>	609136	OD	<i>MYH9</i>	155100	OD
	613266	OD	<i>EYA4</i> *	605362	OD
<i>NDUFS4</i>	252010	OR	<i>USP53</i>	619658	OR
<i>PTPN14</i>	600791	OR	<i>TRRAP</i> *	618454	OD
<i>HOXA2</i>	612290	OR, OD	<i>DKC1</i>	301108	X'e bağlı
<i>NOP10</i>	620425	OR	<i>DIAPH1</i> *	124900	OD
<i>PEX26</i>		OR	<i>SLC19A2</i>	249270	OR
<i>PTRH2</i>	616263	OR			

(*) işareti, genin sendromik ve sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olduğunu belirtmektedir.

Sendromik olmayan doğumsal işitme kayıplarının yaklaşık %70-80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, yaklaşık %2'si X'e bağlı ve %1'den azı da mitokondriyel

kalıtım göstermektedir (27). Prelingual işitme kayıpları otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı ve mitokondriyel kalıtım gösterirken postlingual işitme kayıplarında genellikle otozomal dominant kalıtım görülmektedir (6, 38, 39).

İşitme kaybından sorumlu gen lokusları DFN (DeaFNess) olarak adlandırılmakta ve otozomal dominant olarak kalıtılanlar DFNA, otozomal resesif olarak kalıtılanlar DFNB, X'e bağlı olarak kalıtılanlar DFNX ve Y'ye bağlı olarak kalıtılanlar DFNY olarak adlandırılırken, keşif sırasına göre de numaralandırılmaktadır (10). Bu zamana kadar sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu 205 DFN lokusu tanımlanmış olmakla birlikte, 40 lokustaki sorumlu gen henüz bilinmemektedir. Sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu 91 gen otozomal resesif (Tablo 3), 67 gen otozomal dominant (Tablo 4), 7 gen X ve Y'ye bağlı, 9 gen mitokondriyel kalıtım kalıbı (Tablo 5) göstermektedir.

Tablo 3. Sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybından sorumlu genler.

Lokus Adı	Gen Adı	Görev/Fonksiyon	Kaynak
DFNB1A	<i>GJB2</i> **	İyon Homeostaz Proteinini-Hücreler arasında iyon ve molekül geçişi	(11)
DFNB1B	<i>GJB6</i> **	İyon Homeostaz Proteinini -Hücreler arasında iyon ve molekül geçişi	
DFNB2	<i>MYO7A</i> *, **	Motor Protein-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini	
DFNB3	<i>MYO15A</i>	Motor Protein-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor protein	
DFNB4	<i>SLC26A4</i> *	İyon Kanalı Proteinini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenleme	
DFNB5	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNB6	<i>TMIE</i>	Transmembran Protein-Stereosilyalarının uçlarında bulunan mekanoelektriksel transdüksiyon (MET) kompleksinin düzenlenmesi	
DFNB7/11	<i>TMC1</i> **	Transmembran Proteinini-Ses sinyallerinin algılanmasında ve dönüşümü	
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	Transmembran protein-İç kulakta ses iletiminde rol oynayan proteinlerin aktivasyonunda görev alır.	
DFNB9	<i>OTOF</i>	Nöral İletim Proteinini-Sinapslarda kalsiyum bağımlı nörotransmitter salınımını düzenleme	
DFNB12	<i>CDH23</i> *	Adezyon Proteinini-Kalsiyum bağımlı hücre adezyon proteinleri, stereosilya organizasyonu ve stabilizasyonu	
DFNB13	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNB14	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNB15/72/95	<i>GIPC3</i>	Adaptör protein-Tüylü hücrelerinin devamlılığı, hücreler arası sinyal iletimi	
DFNB16	<i>STRC</i>	Yapısal Protein- Stereosilyalarının doğru yapılanması, stereosilyaların arasındaki bağlantıların oluşumu	
DFNB17	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNB18A	<i>USH1C</i> *	Hücre İskeleti Proteinini-Stereosilyaların düzenlenmesi ve stabilizasyonu	
DFNB18B	<i>OTOG</i>	Ekstraselüler Matriks Proteinini-Kalsiyum seviyelerini düzenleme	
DFNB20	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNB21	<i>TECTA</i> **	Yapısal Protein-Tectoriyal membranda yapısal protein	
DFNB22	<i>OTOA</i>	Transmembran protein- Tüylü hücrelerin mekanik transdüksiyon sisteminde ve sesin elektriksel sinyallere dönüşümünü sağlayan stereosilyaların organizasyonu	
DFNB23	<i>PCDH15</i> *	Adezyon Proteinini- Stereosilyalarının normal gelişimi ve işlevi	
DFNB24	<i>RDX</i>	Hücre İskeleti Proteinini-Aktin organizasyonu	
DFNB25	<i>GRXCRI</i>	Hücre İskeleti Proteinini -Aktin organizasyonu	

Tablo 3. (Devam)

DFNB26	<i>GAB1</i>	Adaptör protein/sinyal iletim proteini-Tüylü hücreler ve destek hücrelerin gelişimi, için gerekli sinyal yollarının düzenlenmesi
DFNB27	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	Hücre İskeleti Proteini-Aktin filamentlerine bağlanarak hücre iskeletinin düzenlenmesi
DFNB29	<i>CLDN14</i>	Tight Junction- Endolenf ve perilenf sıvıları arasında iyon dengesini sağlayan sıkı bağlantılar
DFNB30	<i>MYO3A **</i>	Motor Proteinler-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor protein
DFNB31	<i>WHRN *</i>	Makromolekül organizasyonu
DFNB32/105	<i>CDC14A</i>	Hücre İskeleti Proteini-Tüylü hücrelerin gelişimi ve stereosilya organizasyonunda görev alır.
DFNB33	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB35	<i>ESRRB</i>	Transkripsiyon Faktörü-İç kulakta iyon dengesi ve hücre metabolizmasının düzenlenmesi
DFNB36	<i>ESPN *, **</i>	Hücre İskeleti Proteini-Tüylü hücrelerin gelişimi ve stereosilya organizasyonu
DFNB37	<i>MYO6 **</i>	Motor Proteini-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini
DFNB38	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB39	<i>HGF</i>	Sinyal İletim Proteini-Stereosilyaların gelişimi ve farklılaşmasını sağlama
DFNB40	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB42	<i>ILDR1</i>	Tight junction-Epitel bariyerin devamlılığı
DFNB44	<i>ADCY1</i>	İntegral Membran Proteini-Hücrel süreçlerde ve ikincil haberci cAMP üretimi
DFNB45	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB46	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB47	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB48	<i>CIB2 *</i>	Membran Proteini-Kalsiyum seviyerleri, MET alt birimi
DFNB49	<i>MARVELD2</i>	Tight junction-Sıkı bağlantılar ve epitel bariyer düzenleme
DFNB49/112	<i>BDP1</i>	Transkripsiyon faktörü
DFNB51	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB53	<i>COL11A2 *</i>	Ekstraselüler Matriks Proteini- İç kulaktaki kıkırdak yapıların gelişimi
DFNB55	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB59	<i>PJVK</i>	Nöral İletim Proteini-Ses sinyallerinin iletimi
DFNB60	<i>SLC22A4</i>	İyon Kanalı Proteini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenleme
DFNB61	<i>SLC26A5</i>	İyon Kanalı Proteini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenleme
DFNB62	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB63	<i>LRTOMT</i>	Transmembran proteini-İç kulaktaki yapıların post-translasyonel modifikasyonlarının gerçekleşmesi
DFNB65	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB66	<i>DCDC2</i>	Hücre İskeleti Proteini-Stereosilyaların yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruma
DFNB67	<i>LHFPL5</i>	Transmembran proteini-Stereosilyaların organizasyonunda ve mekanik ses sinyallerinin elektriksel sinyallere dönüştürülmesi
DFNB68	<i>SIPR2</i>	Periferik membran proteini
DFNB70	<i>PNPT1</i>	Mitokondriyel Protein
DFNB71	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB73	<i>BSND *</i>	İyon Kanalı Proteini-Klorür iyonlarının taşınması ve hücrel iyon dengesinin sağlanması
DFNB74	<i>MSRB3</i>	Enzimatik protein-İç kulakta oksidatif stresin yönetilmesinde ve hücrelerin korunması
DFNB76	<i>SYNE4</i>	Hücre İskeleti Proteini-İç kulakta bulunan tüylü hücrelerinin düzgün bir şekilde şekillenmesi ve korunması
DFNB77	<i>LOXHD1</i>	Yapısal Protein- İç kulaktaki tüylü hücrelerinin fonksiyonu
DFNB79	<i>TPRN</i>	Hücre İskeleti Proteini-Hem iç hem de dış tüylü hücrelerin stereosilyaların gelişimi
DFNB80	<i>Bilinmiyor</i>	

(11)

Tablo 3. (Devam)

DFNB81	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB83	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB84A	<i>PTPRQ</i> **	İntegral membran proteini- hücrel sinyal yollarını düzenleme
DFNB84B	<i>OTOGL</i>	Ekstraselülmatriks proteini
DFNB85	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB86	<i>TBC1D24</i> *, **	Nöral iletim proteini- Koklear sinir, spiral ganglionun yapısı ve işlevi; sinaptik iletişim sinyalleşmesi
DFNB88	<i>ELMOD3</i>	GTPase-activating protein (GAP)-aktin iskeletinin dinamiği, algılanması, stereosilya morfolojisi
DFNB89	<i>KARS1</i> *	Mitokondriyel Protein
DFNB90	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB91	<i>SERPINB6</i>	Proteaz inhibitörü -Oksidatif strese karşı koruma sağlayarak iç kulak hücrelerini devamlılığı
DFNB93	<i>CABP2</i>	İyon kanalı düzenleyici ve nöral iletim proteini- kalsiyum iyonları ile etkileşerek hücrel sinyal iletimini modüle eder
DFNB94	<i>NARS2</i>	Mitokondriyel Protein
DFNB96	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNB97	<i>MET</i>	Mekanoelektriksel transdüksiyon kanalı proteini-Tüylü hücrelerin depolarizasyonunu ve elektriksel sinyallerin sinir hücrelerine iletilmesi
DFNB98	<i>TSPEAR</i>	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu
DFNB99	<i>TMEM132E</i>	Transmembran proteini-İç kulaktaki tüylü hücreler ve sinaptik iletişim sinyalleşmesi
DFNB100	<i>PP1P5K2</i>	Hücre içi metabolik dengenin korunması ve hücrel stres yanıtlarının düzenlenmesi
DFNB101	<i>GRXCR2</i>	Hücrel homeostazın sağlanması
DFNB102	<i>EPS8</i>	Hücre İskeleti Proteini-Stereosilyaların büyüme, farklılaşması ve hareketliliği
DFNB103	<i>CLIC5</i>	Hücre İskeleti Proteini-Aktin filamentlerinin organizasyonu
DFNB104	<i>RIPOR2</i> **	Hücre içi düzenleyici protein- Mekanoelektriksel transdüksiyon süreci ve hücre içi yapıların düzenlenmesi
DFNB106	<i>EPS8L2</i>	Hücre İskeleti Proteini-Stereosilyaların büyüme, farklılaşması ve hareketliliği
DFNB107	<i>WBP2</i>	Östrojen ve progesteron reseptörlerinin (ESR1 ve PGR) transkripsiyonel koaktivatörü-postsinaptik iskele proteinlerinin düzenlenmesi
DFNB108	<i>ROR1</i>	Transmembran proteinin-Nöral gelişim, hücre migrasyonu ve differansiasyon süreçleri
DFNB109	<i>ESRP1</i>	Nükleer protein-Tüylü hücresi farklılaşması ve koklear epitelyumdaki genlerin alternatif splicing ile kırılması ve ekspresyonunun düzenlenmesi
DFNB110	<i>COCH</i>	Yapısal protein-Spiral ganglion ve sinir liflerinde
DFNB111	<i>MPZL2</i>	Tüylü hücrelerinin yapısal stabilitesi
DFNB113	<i>CEACAM16</i> **	Yapısal protein-Tectoriyal membran bileşeni
DFNB114	<i>GRAP</i>	İntegral membran proteini-Sinyal iletimi, hücre farklılaşması ve doku onarımı gibi süreçlerde görev alır.
DFNB115	<i>SPNS2</i>	Nöral iletim proteini-Sinir hücrelerinin etkileşimini ve büyümesini düzenleyerek, sinirsel iletimi destekler.
DFNB116	<i>CLDN9</i>	Tight Junction protein
DFNB117	<i>CLRN2</i>	Transmembran protein-İşitme ve denge işlevlerinde önemli olan hücrel süreçlerin modüle edilmesi
DFNB118	<i>GDF6</i>	Membran proteini-Koklea ve vestibüler sistem yapılarının gelişimi
DFNB119	<i>AFG2B</i> *	Hücrel stres durumlarında, hasar görmüş veya hatalı katlanmış proteinlerin yıkımı

(11)

Tablo 3. (Devam)

DFNB120	<i>MINAR2</i>	Membran proteini-Mekanik sinyalleri elektriksel sinyallere dönüştürülmesi	
DFNB121	<i>GPR156</i>	Membran protein-Hücrel sinyalleşmesi, hücre polaritesi	
DFNB122	<i>TMTC4</i>	Transmembran protein-Sinaptik vezikül füzyonu, protein katlanması ve protein translokasyonu	
DFNB123	<i>STX4</i>	Membran proteini-Veziküler taşıma, hücreler arası iletişim ve nöronal sinyalleşme	
DFNB124	<i>PKHD1L1</i>	Membran proteini-Hücrel polarite, silya fonksiyonu	
DFNB125	<i>GAS2</i>	Hücre İskeleti Proteini-Aktin filamentlerine bağlanarak hücre iskeletinin düzenlenmesi	(11)
	<i>CEMP</i>	Regülatör protein-ECM'in düzenlenmesi	
	<i>USH1G *</i>	Hücre iskeleti proteini-Stereosilyaların düzenlenmesi ve stabilizasyonu ve retinadaki fotoreseptör hücrelerin gelişimi	
	<i>LRP5</i>	Transmembran proteini-İç kulağın gelişimi sırasında hücre farklılaşması, proliferasyonu	
	<i>GOSR2</i>	Periferik membran proteini	
	<i>CEP250</i>	Hücre iskeleti proteini-Stereosilya organizasyonu	(40)
	<i>MAP3K1</i>		(41)
	<i>IKZF2</i>	Transkripsiyon faktörü	(42)
	<i>THBS1</i>		
(*) işareti, genin sendromik ve sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olduğunu belirtmektedir.			
(* *) işareti genin hem otozomal resesif hem de otozomal dominant sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğunu belirtmektedir.			

Tablo 4. Sendromik olmayan otozomal dominant işitme kaybından sorumlu genler.

Lokus Adı	Gen Adı	Görev/Fonksiyon	Kaynak
DFNA1	<i>DIAPH1 *</i>	Hücre İskeleti Proteini-Stereosilyalardaki aktin polimerizasyonunu	
DFNA2A	<i>KCNQ4</i>	İyon Kanalı Proteini-Potasyum iyonlarının hücreler arasında geçişi	
DFNA2B	<i>GJB3</i>	İyon Homeostaz Proteini-Hücreler arasında iyon ve molekül geçişi	
DFNA3A	<i>GJB2 **</i>	İyon Homeostaz Proteini-Hücreler arasında iyon ve molekül geçişi	
DFNA3B	<i>GJB6 *</i>	İyon Homeostaz Proteini-Hücreler arasında iyon ve molekül geçişi	
DFNA4A	<i>MYH14</i>	Motor Protein-Hücre hareketliliği ve hücre polaritesi düzenlenmesi	
DFNA4B	<i>CEACAM16 **</i>	Yapısal protein-Tectoriyal membran bileşeni	
DFNA5	<i>GSDME</i>	Makromolekül Organizasyonu-Piroptosis ile ilişkili olarak iç kulaktaki hücrelerin hayatta kalması ve işlevselliği	
DFNA6/14/38	<i>WFS1 *</i>	Kalsiyum homeostazı, protein katlanması ve hücredeki stres yanıtları	(11)
DFNA7	<i>LMX1A</i>	Transkripsiyon faktörü	
DFNA8/12	<i>TECTA **</i>	Tectoriyal membranda yapısal protein	
DFNA9	<i>COCH</i>	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu	
DFNA10	<i>EYA4*</i>	Transkripsiyon Faktörü	
DFNA11	<i>MYO7A **</i>	Motor Protein-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini	
DFNA13	<i>COL11A2*</i>	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu	
DFNA15	<i>POU4F3</i>	Transkripsiyon Faktörü-Korti organındaki hücrelerin devamlılığı için gerekli olan genlerin transkripsiyonu	
DFNA16	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNA18	<i>Bilinmiyor</i>		

Tablo 4. (Devam)

DFNA20/26	<i>ACTG1</i>	Hücre İskeleti Proteini-Aktin organizasyonu
DFNA21	<i>RIPOR2</i> **	Hücre içi düzenleyici protein-Mekanoelektriksel transdüksiyon süreci ve hücre içi yapıların düzenlenmesi
DFNA22	<i>MYO6</i> **	Motor Proteini-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini
DFNA23	<i>SIX1</i>	Transkripsiyon Faktörü
DFNA24	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA25	<i>SLC17A8</i>	İyon Kanalı Proteini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenlemede görev alır.
DFNA27	<i>REST</i>	Transkripsiyon Faktörü
DFNA28	<i>GRHL2</i>	Transkripsiyon Faktörü
DFNA30	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA32	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA33	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA34	<i>NLRP3</i>	İç kulakta inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde görev alır.
DFNA36	<i>TMC1</i> **	Transmembran Proteini-Ses sinyallerinin algılanmasında ve dönüşümü
DFNA37	<i>COL11A1</i>	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu
DFNA39	<i>DSPP</i> *	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu, kalsiyum düzenlenmesi
DFNA40	<i>CRYM</i>	İyon homeostaz proteini-Kalsiyum homeostazının düzenlenmesi ve hücrel morfogenez
DFNA41	<i>P2RX2</i>	İyon Kanalı Proteini-Kalsiyum, sodyum ve potasyum iyonlarının düzenlenmesi ve çeşitli hücrel yanıtlar
DFNA43	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA44	<i>CCDC50</i>	Hücrel organizasyon ve hücre iskeleti ile ilgili bazı biyolojik süreçler
DFNA47	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA48	<i>MYO1A</i>	Motor Protein-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini
DFNA49	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA50	<i>MIR96</i>	Koklea ve vestibüler sistemdeki genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi
DFNA51	<i>TJP2</i>	Tight junction-İyon geçişini düzenleme ve hücreler arası bağlantıları sağlama
DFNA53	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA54	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA56	<i>TNC</i>	Ekstraselüler Matriks Proteini-Sinaptik plastisite ve nöronal rejenerasyon
DFNA57	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA58	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA59	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA60	<i>Bilinmiyor</i>	
DFNA64	<i>SMAC/DIABLO</i>	Mitokondriyel protein-Koklea ve vestibüler sistemde, hücrelerin hasar sonrası ölümü ve doku onarımı
DFNA65	<i>TBC1D24</i> *, **	Nöral iletim proteini-Koklear sinir, spiral ganglionun yapısı ve işlevi; sinaptik iletişim sinyalleşmesi
DFNA66	<i>CD164</i>	Transmembran protein-İç kulakta özellikle hasar sonrası doku onarımı, hücreler arası etkileşimler veya hücrel organizasyon
DFNA67	<i>OSBPL2</i>	Transmembran proteini-İç kulaktaki lipid metabolizmasını düzenlenmesi
DFNA68	<i>HOMER2</i>	Post sinaptik iskele proteini-sinaptik plastisitede
DFNA69	<i>KITLG</i>	Membran proteini-Hücrel gelişim, inflamasyon ve doku onarımı
DFNA70	<i>MCM2</i>	DNA replikasyonu ve hücre döngüsünün düzenlenmesi
DFNA71	<i>DMXL2</i>	Transkripsiyon faktörü
DFNA72	<i>SLC44A4</i>	İyon Kanalı Proteini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenleme

(11)

Tablo 4. (Devam)

DFNA73	<i>PTPRQ</i> **	İntegral membran proteini- hücresel sinyal yollarını düzenleme	
DFNA74	<i>PDE1C</i>	Ca ²⁺ iyonlarına bağımlı olarak aktive olur ve cAMP/cGMP seviyelerini düşürerek, hücredeki sinyal yollarını modüle etme	
DFNA75	<i>TRRAP</i> *	Co-aktivator protein-Transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek, iç kulaktaki çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleme	
DFNA76	<i>PLS1</i>	Hücre İskeleti Proteini-Aktin organizasyonu	
DFNA77	<i>ABCC1</i>	İyon Homeostaz Proteini	
DFNA78	<i>SLC12A2</i>	İyon Kanalı Proteini-Sıvı dengesini ve iyon taşınımını düzenleme	
DFNA79	<i>SCD5</i>	Hücre metabolizma ve oksidatif stres dengesinin düzenlenmesi	
DFNA80	<i>GREB1L</i>	Embriyonik süreçte hücre farklılaşması ve düzenlenmesi	
DFNA81	<i>ELMOD3</i>	Transmembran protein-Hücresel sinyalleşme ve stereosilyaların büyüme, farklılaşması ve hareketliliği	(11)
DFNA82	<i>ATP2B2</i>	İyon kanalı proteini-Hücresel kalsiyum homeostazını düzenlenmesi	
DFNA83	<i>MAP1B</i>	Hücre iskeleti proteini-Mikrotübül organizasyonu ve nöronal farklılaşma	
DFNA84	<i>ATP11A</i>	Kalsiyum iyonlarının taşınımı	
DFNA85	<i>USP48</i>		
DFNA86	<i>THOC1</i>		
DFNA87	<i>PI4KB</i>	Embriyonik süreçte iç kulak gelişimi	
DFNA88	<i>EPHA10</i>	Nöral iletim proteini-İç kulaktaki tüylü hücreler ve sinaptik iletişim sinyalleşmesi	
DFNA89	<i>ATOH1</i>	Transkripsiyon faktörü	
DFNA90	<i>MYO3A</i> **	Motor Proteinler-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor protein	(43)
	<i>GJA1</i>		(11)
	<i>ESPN</i> **	Hücre İskeleti Proteini-Stereosilyaların düzenlenmesi	(44)
	<i>MYO1C</i>	Motor Protein-Stereosilyalarda yapısal ve fonksiyonel motor proteini	(45)
	<i>TMTC2</i>	Transmembran protein-İşitme ve denge işlevlerinde önemli olan hücresel süreçleri modüle etme	(46)
	<i>IFNLR1</i>		(11)
	<i>NCOA3</i>	Regülatör protein-İşitme hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması için gerekli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi	(47)

(*) işareti, genin sendromik ve sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu olduğunu belirtmektedir.

(* *) işareti genin hem otozomal resesif hem de otozomal dominant sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğunu belirtmektedir.

Tablo 5. Cinsiyete bağılı ve mitokondriyel kalıtılan sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu genler.

Lokus Adı	Gen Adı	Görev/Fonksiyon	Kaynak
DFNX1	<i>PRPS1*</i>	Hücrel enerji metabolizması ve nükleotid sentezi	
DFNX2	<i>POU3F4</i>	Transkripsiyon faktörü	
DFNX3	<i>Bilinmiyor</i>		
DFNX4	<i>SMPX</i>	Aktin filamentleriyle ilişkili bir protein olarak hücrel iskeletin düzenlenmesi	(11)
DFNX5	<i>AIFM1</i>	İç kulaktaki tüylü hücreler ve spiral ganglion nöronların oksidatif strese karşı korunması	
DFNX6	<i>COL4A6</i>	Ekstraselüler matriks proteini-Hücrel gelişim ve ECM organizasyonu	
DFNX7	<i>GPRASP2</i>	Transmembran proteini-Hücrel sinyalleşme	
DFNY1	<i>Bilinmiyor</i>		(11)
DFNY2	<i>TBL1Y</i>		
-	<i>MT-CO1</i>		
-	<i>MT-TS1</i>		
-	<i>MT-ND1</i>		
-	<i>MT-RNR1</i>		
-	<i>MT-TL1</i>	Mitokondriyel Protein	(11)
-	<i>MT-TS2</i>		
-	<i>MT-TK</i>		
-	<i>MT-TH</i>		
-	<i>MT-TI</i>		

Sendromik olmayan işitme kayıplarında genetik heterojenite ve etnik köken özgülüğüne rağmen fenotipik benzerliklerin olmaması, sorumlu genlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ancak, yeni nesil dizileme teknolojilerinin yaygınlaşması, bu zorluğun aşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (48, 49).

2.5. İşitme Kayıplarında Tedavi Yaklaşımları

Beyin plastisitesi (nöroplastisite); deneyimlere, çevresel etkilere ve öğrenmeye bağılı olarak beyin yapısal ve işlevsel değişikliklere adaptasyon yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Beyin plastisitesi bebeklik ve erken çocukluk döneminde oldukça yüksektir (50). Beyin plastisitesi işitsel kortekste ve diğer duyuşal bölgelerde meydana gelen adaptasyonlarla bağlantılıdır (50). İşitme gelişimi ile ilgili plastisite beyin erken dönemde duyuşal girdilere göre şekillenmesini içermekte ve özellikle beyin plastisitesinde olduğu gibi yaşamın erken dönemlerinde (0-3,5 yaş) maksimum seviyede gerçekleşmektedir (51, 52). İşitme gelişimi ile ilgili plastisite ile dil ve iletişim becerilerinin geliştirilmesine yönelik tedavilerin en etkili olduğu kritik dönem 0-3.5 yaş arasında kalan dönemdir (51, 52). Bu dönemde işitsel sinyallere etkin bir şekilde yanıt verme gerçekleşir; işitsel/sözel terapi,

işitme cihazları veya koklear implantlar gibi uygun işitsel uyarılar dil ve konuşma gelişimini desteklemek için hayati öneme sahip olup koklear implant gibi tedaviler kritik dönem içerisinde uygulandığında, işitsel sinirlerin uyarılmasını ve işitsel kapasitenin korunmasını sağlayarak dil gelişiminde önemli ilerlemeler kaydedebilmektedir (51).

Kritik dönemde tedavi ile ilgili yapılan araştırmalar, üç buçuk yaşına kadar işitme cihazı veya koklear implant kullanan çocukların, konuşma gelişiminde büyük ilerleme kaydettiğini; özellikle daha erken dönem olan 6-12 ay içerisinde müdahale edilen çocuklarda sonuçların daha da etkili olduğunu bildirmiştir (51-53). Bu nedenle, işitme kaybının, işitme ile ilgili gelişim hızının en yüksek olduğu kritik dönem sonlanmadan tanımlanması ve gerekli tedavinin bu dönem içerisinde verilmesi gerekmektedir (52). Bu durum dikkate alınarak birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de 2008 yılından itibaren “*Ulusal Yenidoğan İşitme Tarama Programı*” uygulanmaya başlamıştır. Bu program ile doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde bebeklere işitme tarama testi yapılması; ilk taramada risk saptanan bebeklerin ileri teşhis ve tedavi merkezlerine yönlendirilmesi ve daha sonrasında da ilk üç ay içinde kesin tanı konularak, altı ay içinde rehabilitasyon yöntemleri, işitme cihazı ya da koklear implant ile tedaviye başlanması hedeflenmektedir (54).

Konjenital işitme kaybının rehabilitasyonunda, tedavinin etkinliğini hastanın yaşı belirlerken, tedavinin çeşidini ise işitme kaybının tipi ve düzeyi belirlemektedir (55-57). Hafif ve orta/orta-şiddetli (26-80 dB) düzeyde işitme kaybı olan bebeklerde ilk iki yıl içindeki dil gelişimine yönelik rehabilitasyon programları dil ve iletişim becerilerinin geliştirilmesinde etkili olmaktadır. Ancak rehabilitasyonun geç kalması durumunda ilave olarak işitme cihazı da kullanılması gerekmektedir (55, 56, 58). Şiddetli ve derin işitme kayıplarında (>81 dB) rehabilitasyon ve işitme cihazı kullanımı ile istenilen düzeyde başarı elde edilememekte (55, 56, 58); koklear implant uygulaması olarak adlandırılan koklea ile koklea öncesini by-pass ederek ses titreşimlerini doğrudan koklear sinire ileten işitme protezlerinin kullanımı gerekmektedir (13, 59-61). Bununla birlikte, koklear implant her koşulda istenen katkıyı sağlamamaktadır. Koklear implant tedavisinin başarısını belirleyen en önemli faktörlerden birini, işitme kaybının altında yatan genetik etiyoloji ve etkilenen anatomik yapı oluşturmaktadır (62, 63). Koklear sinirin fonksiyonunun bozulması durumunda koklear implant tedavisi beklenen katkıyı sağlamamaktadır. Bu nedenle, koklear implant yapılacak şiddetli ve derin işitme kayıplı hastalarda koklear sinirin işlevsel olduğunun gösterilmesi gerekmektedir (13, 62, 64). Koklear sinirin işlevsel olduğunun

gösterilmesi için ABR (Auditory Brainstem Response); yapısal olarak sinirin hasar görüp görmediğini belirlemek içinde MRI (Magnetic resonance imaging) ve CT (Computerized Tomography) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, şiddetli ve derin işitme kayıplarında ABR ile koklear sinirin işlevsel olup olmadığını göstermek her zaman mümkün olmamaktadır (13, 65, 66). ABR testi, işitsel kortekse giden elektriksel sinyalin; koklear sinirin distal kısmı (dalga I), koklear sinirin proksimal kısmı (dalga II), koklear çekirdekler (dalga III), üst oliver kompleksi (dalga IV), lateral lemnisküs (dalga V), medial genikülat çekirdek (dalga VI) ve alt kollikulus (dalga VII) bölgelerindeki elektriksel aktivitenin dalga olarak kaydedilip değerlendirilmesi sürecidir (67). Bu dalgalardan dalga V beyin sapının üst kısmındaki işitsel yolların tamamlayıcı bir göstergesidir ve beyin sapındaki işitsel yolun son aşamasını temsil etmektedir (67). Dalga V, ABR testi sırasında en belirgin şekilde görülen dalga olup, işitsel yolların genellikle doğru işlediğini ve sesin beyin sapından işitsel kortekse (dalga VI ve VII) iletilildiğini gösterir. Dalga V' in alınabilmesi için koklear sinirin belirli bir derecede işlev göstermesi gerekmektedir (67). Şiddetli ve derin işitme kaybı olan bireylerde koklear sinirdeki gelişimsel ya da yapısal bir bozukluk nedeniyle beyin sapına yeterli sinyal iletilmemekte, bu sinyaller beyin sapında işlenememekte ve bu da dalga V oluşmamasına neden olmaktadır (67). Bu durum koklear sinirin işlevsel olup olmadığını göstermenin her zaman mümkün olmayacağını; koklear implantasyonun karar verme sürecini ve implant başarısını doğrudan etkilemektedir (68). Bu noktada, ilgili bireydeki genetik etiyolojinin biliniyor olması ve bu etiyolojinin koklear siniri etkileyip etkilenmediğinin ortaya konulmuş olması koklear implant tedavisinin karar sürecinde yol gösterici olmaktadır (13).

Bugüne kadar işitme kaybı ile ilişkilendirilen genlerin iç kulakta ifade edildiği yerlerin belirlenmesine öncelik verilmiş (60, 63, 64, 69) ve koklear sinirin ve spiral ganglionun yapısı ve işleviyle ilgili olan *CDH23*, *DIAPH3*, *PCDH15*, *AIFM1*, *TBC1D24* ve *TMPRSS3* genlerinde patolojik varyasyon taşıyan bireylerde koklear implant tedavisinin etkinliğinin düşük olduğu rapor edilmiştir (8, 60, 69-71). Buna karşın, koklea içindeki korti organında ifade edilen ve eksikliğinde koklear yapının bozulduğu *GJB2*, *SLC26A4*, *MYH9* ve *MYO15A*, *OPA1*, *TMCI*, *OTOF* genlerinin eksikliğine bağlı gelişen işitme kayıplarında uygulanan koklear implant tedavilerinde ise önemli kazanımların elde edildiği rapor edilmiştir (60, 63, 72-78). Bu durum, işitme kaybından sorumlu genlerin tanımlanması ve tanımlanan genlerin hangi dokularda ifade edildiğinin belirlenmesi gerektiğini göstermektedir.

2.6. Yeni Nesil Dizileme

Sanger ve ark. (79) tarafından ilk kez 1977 yılında di-deoksi nükleotid ile zincir sonlanması prensibine dayalı dizileme yönteminin keşfedilmesiyle birlikte başlayan DNA dizi analizi, genetik tanı ve araştırmalarda kullanılan en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Mullis ve ark. (80) tarafından 1985 yılında keşfedilen PCR (Polymerase Chain Reaction: Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sayesinde ise DNA dizi analizinin kullanımı yaygınlaşmıştır. İnsan Genom Projesinin 2003 yılında duyurulan ilk sonuçları Sanger dizileme (birinci nesil dizileme) ile elde edilmiştir (81-83). Bunun yanında Sanger yöntemiyle DNA dizi analizi, günümüzde altın standart olarak kabul edilse de okuma uzunluğunun kısa olması, analiz süresi, maliyeti, sadece belirli gen veya bölgeyi dizilemesi, kopya sayısı değişikliklerini tespit edememe gibi önemli sınırlılıkları mevcuttur ve bu sınırlılıklar yeni nesil dizileme sayesinde büyük oranda ortadan kalkmıştır (84, 85).

2006 yılından bugüne kadar geçen sürede sürekli gelişen yeni nesil dizileme teknolojisinin; birbirine paralel milyonlarca kısa DNA fragmanını (100-300 bp) okuyabilmesi, yüksek miktarda okuma verisi elde edebilmesi, hızlı ve düşük maliyette olması, tüm genom, tüm ekzom veya transkriptom seviyesinde dizileme yapabilmesi, nadir varyantları veya düşük frekanslı varyasyonları, yapısal varyantları tespit edebilmesi sebebi ile Sanger dizilemeden doğan ihtiyacı karşılamış ve ikinci nesil dizileme olarak tanımlanmıştır (81-83). Milyonlarca farklı dizileme reaksiyonunun paralel olarak gerçekleştiği, klonal olarak çoğaltılmış DNA moleküllerinin kısa okumalarla kitlesel dizilenmesi bu yöntemin temel özelliğidir (85, 86).

Tüm bu avantajların yanında ikinci nesil dizilemede genellikle kısa okuma uzunluklarının olması (Illumina, Ion Torrent); büyük delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar, translokasyonlar ve karmaşık tekrar bölgelerinin analizindeki zorluklar gibi sınırlılıkları mevcuttur. Bu sınırlılıklar, yaklaşık 10 kb'ye kadar okumalar yapabilen ve üçüncü nesil dizileme teknolojisi olarak adlandırılan yaklaşımlarla ortadan kaldırılmıştır. DNA'yı amplifiye etmeden gerçekleştirilebilen üçüncü nesil dizileme, genomda tekrarlayan bölgelerin dizilenmesinde ve translokasyon, delesyon, duplikasyon, inversiyon gibi büyük yapısal değişikliklerin belirlenmesinde etkili olmuştur (84-86).

2.6.1. Tüm Ekzom Dizileme

İkinci nesil dizileme teknolojisi ile tüm genom dizilenebilirken tüm ekzom ve gen paneline yönelik hedefli dizilemeler de yapılmaktadır (85, 86). Tüm ekzom dizileme yöntemi Ng ve ark. (87) tarafından 2009 yılında genomun tüm protein kodlayan bölgelerini dizilemek amacı ile geliştirdikleri hedefli dizileme prensibine dayalı bir yöntemdir (87). Yaklaşık 3,2 milyar baz çiftinden oluşan insan genomunun yaklaşık %1,5'lik kısmını protein kodlayan diziler oluşturmaktadır ve hastalığa neden olduğu bilinen varyasyonların yaklaşık %85'i bu kodlayan dizileri etkilemektedir (87-89). Tüm ekzom dizileme, ekonomik ve yüksek verimli bir yöntem olarak, genomdaki 20 000'den fazla genin tüm ekzonlarını ve ekzon-intron bağlantı bölgelerini eş zamanlı analiz etme olanağı tanımaktadır (87, 88). Tüm ekzom dizileme; hedef bölgelerin yakalanması ve zenginleştirilmesi (target capture and enrichment) ve dizilenmesi (Read) olarak iki basamakta gerçekleşmektedir. Capture basamağında sonikasyon gibi fiziksel yöntemler ya da enzimatik yöntemler ile DNA rastgele veya belirli bölgelerden kesilerek fragmente edilir. Fragmentasyonun ardından DNA fragmanlarına dizileme işlemi sırasında tanımlanmalarını sağlayan adaptör dizileri eklenir. Bu adaptörler, dizileme platformuna özgü olup dizileme platformlarında DNA dizilerinin okunması için gereklidir. Adaptör bağlanmış DNA fragmanları, PCR ile çoğaltılır. Zenginleştirme aşamasında hedef bölgelere özgü tasarlanmış prob dizileri kullanılarak ekzon bölgeleri hedeflenir ve problemlerin hedef kütüphane fragmanları ile hibridizasyonu gerçekleştirilir. Hibridizasyon işleminden sonra manyetik boncuklar ile hedef kütüphane parçalarının seçimi ve seçilen parçaların saflaştırma ve yıkama işlemleri gerçekleştirilir (90, 91). Kütüphane oluşturma ve zenginleştirme aşamasında tüm ekzonlar, bilinen hastalıklarla ilişkilendirilen genlerin (gen paneli) dizilenmesi gibi istenilen hedef bölgeye özgü farklı firmalar tarafından üretilen ticari kütüphane oluşturma ve zenginleştirme kitleri bulunmaktadır. Bu kitler klinik ekzom dizileme, tüm ekzom dizileme ve hastalıkla ilişkili bilinen gen panellerine yönelik olarak tasarlanmış şekilde amaca hizmet etmektedir. Bu kitler Integrated DNA Technologies (92), Twist Biosciences (93), MGI Tech (94), Roche NimbleGen (95), Agilent Technologies (96), Illumina (97) firmaları tarafından geliştirilmiş ve her firmanın ürettiği kitin tasarımı, kapsama bölgesi, içerdikleri prob alanı ve performansları birbirlerinden farklılık göstermektedir (Tablo 6) (90, 91).

Tablo 6. Ekzom yakalama kitleri ve hedeflenen bölgeleri.

Kit Adı-Referans Veri Tabanları	Hedef (Mb)	Prob	Gen	Ekzon	Derinlik	Kaynak
Agilent Technologies						
SureSelect Clinical Research Exome V2 (2017) -Disease-associated regions from OMIM, HGMD, ClinVar, and ACMG	63.7	71	1099	-	%99 $\geq 20X$	(98)
SureSelect Focused Exome (2016) -Disease-associated regions from HGMD, OMIM and ClinVar	12	-	-	-	%98 $\geq 20X$	(99)
SureSelect All Exon V4 (2011) -Coding regions from CCDS, RefSeq, and GENCODE v6, miRBase v17, TCGA v6, and UCSC known genes	51	-	20 965	334378	%98 $\geq 20X$	(100)
SureSelect All Exon V4 + UTRs (2011) -Coding regions and 5' and 3' UTR sequences from CCDS, RefSeq, and GENCODE v6, regions from miRBase v17, TCGA v6, and UCSC known genes	71	-	20 965	335765	%98 $\geq 20X$	(100)
SureSelect All Exon V5 (2012) -Coding regions from Refseq, GENCODE, UCSC, TCGA, CCDS, and miRBase	50	-	21 522	357999	%99 $\geq 20X$	(101)
SureSelect All Exon V5 + UTRs (2012) -Coding regions and 5' and 3' UTR sequences from Refseq, GENCODE, UCSC, TCGA, CCDS, and miRBase	74	-	21 522	359555	%98 $\geq 20X$	(101)
SureSelect Human All Exon V6 (2016) Coding regions from RefSeq, CCDS, GENCODE, HGMD, and OMIM	60	~20 M	~21 000	-	%98 $\geq 50X$	(96)
SureSelect Human All Exon V6+UTR r2 (2021) -Coding regions and 5' and 3' UTR sequences from RefSeq, GENCODE, CCDS, and UCSC known genes, and miRNAs and lncRNA sequences	91	~21 M	~20 000	-	%98 $\geq 50X$	(96)

Tablo 6. (Devam)

Roche NimbleGen						
SeqCap EZ Exome V3 (2018)						
-Coding regions from RefSeq RefGene CDS, CCDS, and miRBase v14 databases, plus coverage of 97% Vega, 97% Gencode, and 99% Ensembl	64	-	~20 000	-	-	(102)
SeqCap EZ Exome V3+UTR (2018)						
-Coding sequences from RefSeq RefGene, CCDS, and miRBase v14, plus coverage of 97% Vega, 97% Gencode, and 99% Ensembl and UTRs from RefSeq RefGene table from UCSC GRCh37/hg19 March 2012 and Ensembl (GRCh37 v64)	92	-	~20 000	-	-	(102)
Illumina						
Nextera Rapid Capture Exome (2013)						
-12,158 targeted exonic regions with start and stop chromosome locations in GRCh37/hg19	37		~20 000	212158	%80 ≥ 10X	(103)
TruSeq DNA Exome V1.2 (2017)						
-Coding regions from RefSeq, CCDS, and Ensembl	45		~21 000	214405	%85 ≥ 10X	(104)
Twist Biosciences						
Human Core Exome Panel						
-Protein coding genes from CCDS	33	~3 M	~18 000	-	%99.3 ≥ 20X	(105)
Exome 2.0						
-RefSeq, CCDS, GenCode, Clinvar, ACMG73	36.5		~19 000		%99 ≥ 20X	(106)
Comprehensive Exome Panel (2020)						
-Protein coding genes from RefSeq, CCDS, and GENCODE	36.8	-	-	226179	%99 ≥ 20X	(107)
IDT (Integrated DNA Technologies)						
Exome Research Panel v2.0 (2020)						
-Coding sequences from RefSeq 109	39	~4 M	19 433		%99 ≥ 20X	(92)
MGI Tech						
Easy Exome Capture V5						
-CCDS, GENCODE, RefSeq, miRBase, and MGI Clinical Database	69	-	~20 000		%99 ≥ 20X	(108)

Kütüphane oluşturma ve zenginleştirme aşamasından sonra fragmanların okumaları çeşitli firmalar tarafından geliştirilmiş olan platform ile gerçekleştirilir. Okuma için Illumina Platformları (NovaSeq, HiSeq, MiSeq), Thermo Fisher Scientific (Ion Torrent Proton, Ion S5), BGI Genomics (DNBSEQ/MGISEQ), Pacific Biosciences (PacBio) ve Oxford Nanopore Technologies (ONT) gibi platformlar kullanılmaktadır (90, 109). Platform, DNA fragmanlarını baz baz okuyarak diziler oluşturur ve bu okumalar sonucunda belirli okuma uzunluklarına sahip çok sayıda DNA dizilimi elde edilir. Elde edilen okumaların referans genomu hizalanması (110), varyant çağırma (111) ve varyasyonların ileri düzeyde filtrelenmesi (110) gibi biyoenformatik analizler çeşitli araçlar kullanılarak gerçekleştirilir (87, 88).

2.6.1.1. ACMG/AMP Kriterleri

Dizileme verilerinin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen varyantların sınıflandırılması, yorumlanması, patolojik olup olmadığının belirlenebilmesi; hastanın klinik faydasını en üst düzeye çıkarmak ve olası zararları en aza indirmek adına doğruluk ve tutarlılık ihtiyacı gerektiren önemli bir süreçtir (112). Gelişen dizileme teknikleri, hızla artan sayıda yeni hastalık geninde yeni varyantların tespitinin artmasına yol açmış ve genetik varyantların klinik yorumlanmasında bir standardizasyon ihtiyacı doğurmuştur. Bu doğrultuda 2013 yılında ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) ve AMP (Association for Molecular Pathology) çalışma grupları tarafından; kanıta dayalı olarak, dizileme sonuçlarından elde edilen varyantları sınıflandırmak ve ortak terminolojinin kullanımını sağlamak amacı ile uluslararası kriter kılavuzu oluşturulmuştur (112). ACMG kriterleri; uzman görüşü, ampirik veriler ve genetik varyantların klinik önemini belirlemek için çeşitli veri tabanlarını ve biyoinformatik tahmin araçlarını kullanarak değerlendirme yapmaktadır. Bu süreçte, popülasyon veri tabanları varyantların popülasyon frekanslarını; hastalık veri tabanları varyantların klinik sınıflandırmasını ve hastalık ilişkisini; dizileme veri tabanları biyolojik ve referans dizilere erişim sağlayarak, varyantların genetik, popülasyon, fonksiyonel ve klinik özelliklerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (Tablo 7). Bu veri tabanları ile varyantların türüne bağlı olarak proteinin yapısına/fonksiyonuna, evrimsel korunumuna ve etkileşim ağlarına göre patolojik olup olmama durumunu belirlemek için Tablo 8’de belirtilen *in silico* tahmin araçları kullanılmaktadır (112).

Tablo 7. ACMG tarafından varyasyonların patolojik olup olmama durumunu belirlemede kullanılacak kriterler oluşturulurken kullanılan veri tabanları.

Veri Tabanı	Adres/Uzantı	Kullanım Amacı
Popülasyon Veri Tabanları		
The Exome Aggregation Consortium (ExAC)	http://exac.broadinstitute.org	Varyantların popülasyon frekanslarını belirlemek için kullanılmaktadır.
Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS	
1000 Genomes	http://browser.1000genomes.org	
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	SNP ve yapısal varyantların, popülasyon frekansı bilgilerini ve klinik özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır.
dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	
Hastalık Veri Tabanları		
ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Hastalığın fenotipik özelliği, ilişkili genleri, etiyolojisi, kalıtım modeli hakkında bilgiler sunmaktadır.
OMIM	http://www.omim.org	
Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org	Varyantların adlandırılması, bulunduğu bölge, fonksiyonel etkisi, klinik yorumlaması için kullanılmaktadır.
Locus/Disease/Ethnic/Other-Specific Databases	http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html http://www.lovd.nl	Varyantların adlandırılması, bulunduğu bölge, fonksiyonel etkisi, klinik yorumlaması, varyantların depolanması ve varyantların klinik olarak anlamlandırılması için kullanılmaktadır.
DECIPHER	http://decipher.sanger.ac.uk	Varyantların depolanması ve varyantların klinik olarak anlamlandırılması için kullanılmaktadır.
Dizileme Veri Tabanları		
NCBI-Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Birçok organizmanın genomik bilgilerini içeren, genomların yapısını, fonksiyonlarını ve evrimsel ilişkilerini incelemek için gerekli araçları sunmaktadır.
RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg	
MitoMap	http://www.mitomap.org/MITOMAP	Mitokondriyal DNA (mtDNA) varyasyonlarını analiz etmek, sınıflandırmak ve bireylerin mitokondriyal DNA’ında bulunan varyasyonlara dayanarak filogenetik ilişkilerini ve coğrafi dağılımlarını anlamak için kullanılmaktadır.

Tablo 8. ACMG tarafından varyasyonların patolojik olup olmama durumunu belirlemede kullanılacak kriterler oluşturulurken kullanılan *in silico* araçlar.

Araç adı	Adres/Uzantı	Temeli/Prensibi
Yanlış Anlamli Varyantların Tahmin Programları		
ConSurf	http://consurf.tau.ac.il	Evrimsel korunum
FATHMM	http://fathmm.biocompute.org.uk	Evrimsel korunum
MutationAssessor	http://mutationassessor.org	Evrimsel korunum
PANTHER	http://www.pantherdb.org/tools/csnpscore	Evrimsel korunum
PhD-SNP	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Evrimsel korunum
SIFT	http://sift.jcvi.org	Evrimsel korunum
SNPs&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	Protein yapısı/fonksiyonu
Align GVGD	http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
MAPP	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
MutPred	http://mutpred.mutdb.org	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php	Protein yapısı/fonksiyonu ve evrimsel korunum
Condel	http://bg.upf.edu/condel/home	SIFT, PolyPhen-2 ve MutationAssessor'un birleşimi
CADD	http://cadd.gs.washington.edu	İnsanlarda sabit ya da neredeyse sabit hale gelmiş türe özgü allellerin anotasyonlarını, simüle edilmiş varyantlarla karşılaştırır.
nsSNPAnalyzer	http://snpanalyzer.uthsc.edu	Çoklu dizi hizalaması ve protein yapısının analizi
Kesip ekleme (splicing) Bölgesi Tahmin Programları		
GeneSplicer	http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer	Markov modelleri
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF	Pozisyona bağlı bölge
MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/	Maksimum entropi prensibi
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2	Etkileşim ağırları
NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Etkileşim ağırları
Nükleotit Korunmuşluğu Tahmin Programları		
GERP	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html	Nükleotit korunmuşluk tahmin programları
PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	
PhyloP	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	

ACMG tarafından varyantların patolojik olup olmama durumlarını değerlendirmek için kullanılan veri tabanları (Tablo 7) ve *in silico* tahmin programları (Tablo 8) ile değerlendirilen kriterler doğrultusunda varyantlar; patojeniteye dair çok güçlü (PVS1), güçlü

(PS1–4), orta (PM1–6), destekleyici (PP1–5); benign etkiyi tek başına destekleyen (BA1), güçlü (BS1–4), destekleyici (BP1–6) ve önemi belirsiz olarak Tablo 9 ve Tablo 10’da belirtilen kanıtlar ile kategorize edilmiştir (112).

Tablo 9. Patojenik varyantları sınıflandırmak için ACMG tarafından belirlenen kriterler.

Patojeniteye Dair Çok Güçlü Kanıtlar
PVS1: Fonksiyon kaybının (LOF), hastalığın bilinen bir mekanizması olduğu bilinen genlerde null varyant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion)
Patojeniteye Dair Güçlü Kanıtlar
PS1: Nükleotit değişikliğinden bağımsız olarak, daha önce rapor edilmiş bir patojenik varyantla aynı amino asit değişikliği
PS2: Hastalığı olan ve aile öyküsü olmayan bir hastada <i>de novo</i> varyant (anne ve babalık doğrulanmalı)
PS3: Gen veya gen ürünü üzerinde hasar verici bir etkiyi destekleyen <i>in vitro</i> veya <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmalar
PS4: Etkilenen bireylerde varyantın prevelansı, kontrollerdeki prevelansa kıyasla önemli ölçüde artması
Patojeniteye Dair Orta Derecede Kanıtlar
PM1: Varyantın hot-spotta ve/veya iyi bilinen kritik fonksiyonel domainde yer alması
PM2: Exome Sequencing Project, 1000 Genomes veya ExAC veri tabanlarında bulunmaması (veya hastalık resesif ise düşük allel frekansı)
PM3: Resesif hastalıklar için başka bir patojenik varyantla trans halinde tespit edilme
PM4: Tekrar olmayan bir bölgedeki çerçeve içi insersiyon/delesyon veya dur kodonu kaybı (stop-loss) varyantları nedeniyle protein uzunluğu değişikliği
PM5: Daha önce patojenik olduğu bilinen yanlış anlamlı bir varyantın görüldüğü amino asit kalıntısında yeni bir yanlış anlamlı varyantın görülmesi
PM6: <i>De novo</i> olduğu varsayılmakta, ancak annelik ve babalık doğrulanmamıştır.
Patojeniteye Dair Destekleyici Kanıtlar
PP1: Hastalığa neden olduğu kesin olarak bilinen bir gendeki varyantın birden çok etkilenmiş bireyin bulunduğu ailede ko-segregasyonu/hastalıkla birlikte kümelenme
PP2: Yanlış anlamlı varyant oranı düşük olan ve yanlış anlamlı varyantlarının hastalığın yaygın bir mekanizması olduğu bir gendeki yanlış anlamlı varyant
PP3: <i>In silico</i> tahmin araçları tarafından yıkıcı etkinin desteklenmesi
PP4: Hastanın fenotipi veya aile öyküsü tek bir genetik nedene sahip bir hastalık için oldukça spesifik
PP5: Güvenilir bir kaynak yakın zamanda varyantı patojenik olarak rapor etmiş ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapması için yeterli kanıt mevcut değilse

Tablo 10. Benign varyantları sınıflandırmak için ACMG tarafından belirlenen kriterler.

Benign Etkiyi Tek Başına Destekleyen Kanıtlar
BA1: Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, veya Exome Aggregation Consortium'da allel frekansı $>5\%$
Benign Etkiyi Güçlü Destekleyen Kanıtlar
BS1: Allel frekansı hastalık için beklenenden daha yüksek
BS2: Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans beklenen çekinik bozukluk için homozigot, dominant bozukluk için heterozigot veya X'e bağlı bozukluk için hemizigot gözlemlenmesi
BS3: İyi tasarlanmış <i>in vitro</i> veya <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmalar, proteinin fonksiyonu veya splaying üzerinde zararlı bir etki göstermemektedir.
BS4: Etkilenmiş aile üyelerinde segregasyon eksikliği
Benign Etkiyi Destekleyici Kanıtlar
BP1: Kırpma (Truncating) varyantların hastalığa neden olduğu bilinen bir gendeki yanlış anlamlı varyant
BP2: Tam penetransa sahip dominant bir gen/hastalık için patojenik bir varyant ile trans olarak gözlemlenmesi veya herhangi bir kalıtım paternine sahip patojenik bir varyant ile cis olarak gözlemlenmesi
BP3: Bilinen bir fonksiyonu olmayan tekrar bölgesindeki çerçeve içi delesyon/insersiyon
BP4: Birden fazla <i>in silico</i> tahmin aracının gen veya gen ürünü üzerinde herhangi bir etkinin olmadığını göstermesi
BP5: Varyantın, hastalık için alternatif bir moleküler temele sahip bir vakada bulunması
BP6: Güvenilir bir kaynak yakın zamanda varyantı benign olarak rapor etmiş ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapması için yeterli kanıt mevcut değilse
BP7: Splaying tahmin algoritmalarının, splaying konsensus dizisini veya yeni bir splaying bölgesi oluşturulmasını etkilemeyeceğini tahmin ettiği ve nükleotidin yüksek oranda korunmadığı bir sinonim varyant

Varyantların patojenik (Tablo 9) veya benign (Tablo 10) olarak sınıflandırılması için belirlenen kriterler doğrultusunda her bir varyant Tablo 11'de belirtilen kriterleri kombine etme kurallarına göre birleştirilerek sınıflandırılır. Varyantlar kombine etme kurallarına göre patojenik (P), muhtemel patojenik (LP), benign (B), muhtemel benign (LB) ve önemi belirsiz (VUS) olarak belirtilen beş alt gruba ayrılmaktadır (Tablo 11).

Tablo 11. ACMG'ye göre dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri kombine etme kuralları.

Patojenik (Pathogenic-P)
1. Çok güçlü (PVS1) ve a. ≥ 1 Güçlü (PS1-PS4) veya b. ≥ 2 Orta (PM1-PM6) veya c. 1 Orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya d. ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) 2. ≥ 2 Güçlü (PS1-PS4) veya 3. 1 Güçlü (PS1-PS4) ve a. ≥ 3 Orta (PM1-PM6) veya b. 2 Orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya c. 1 Orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Muhtemel Patojenik (Likely Pathogenic-LP)
1. 1 Çok Güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya 2. 1 Güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 3. 1 Güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya 4. ≥ 3 Orta (PM1-PM6) veya 5. 2 Orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya 6. 1 Orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Benign (Benign-B)
1. 1 Tek Başına Benign Kriter (BA1) veya 2. ≥ 2 Güçlü (BS1-BS4)
Muhtemel benign (Likely Benign-LB)
1. 1 Güçlü (BS1-BS4) ve 1 Destekleyici (BP1-BP7) veya 2. ≥ 2 Destekleyici (BP1-BP7)
Önemi Belirsiz (VUS: variants of uncertain significance)
(i) Yukarıdaki kriterlerle örtüşmeyen farklı kriter (ii) Benign ve patojenik kriterlerinin çelişmesi

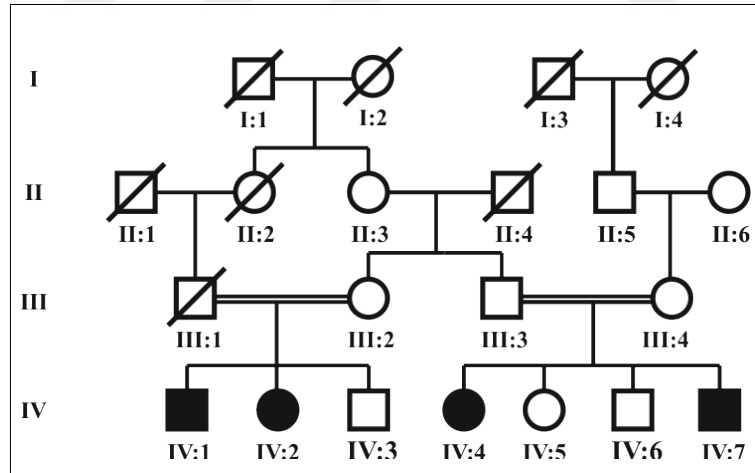
Tüm bu bilgiler ışığında tez çalışması kapsamında sendromik olmayan otozomal resesif sensorinöral işitme kayıplı bireylerin bulunduğu beş ailede yeni nesil dizileme yaklaşımı ile genetik etiyojinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu yolla tanımlanabilecek yeni genler ile işitme kaybının moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve tedavi stratejisinin belirlenmesi sürecine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

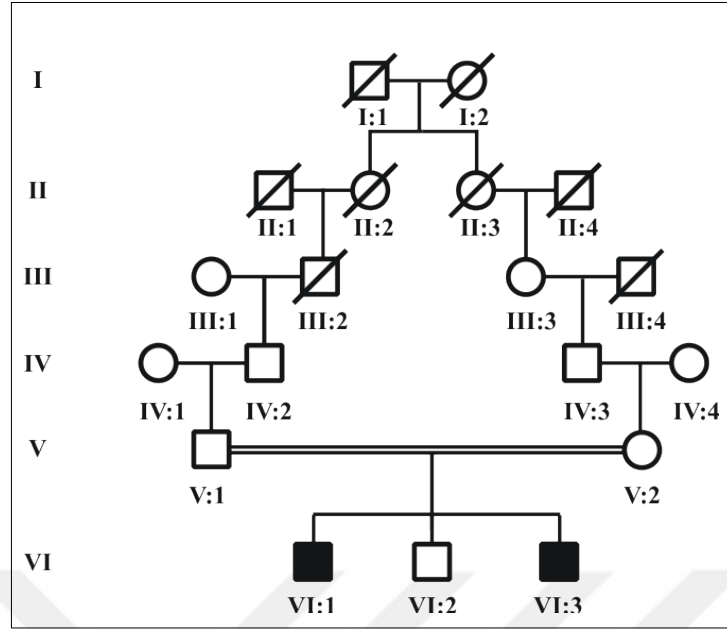
3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

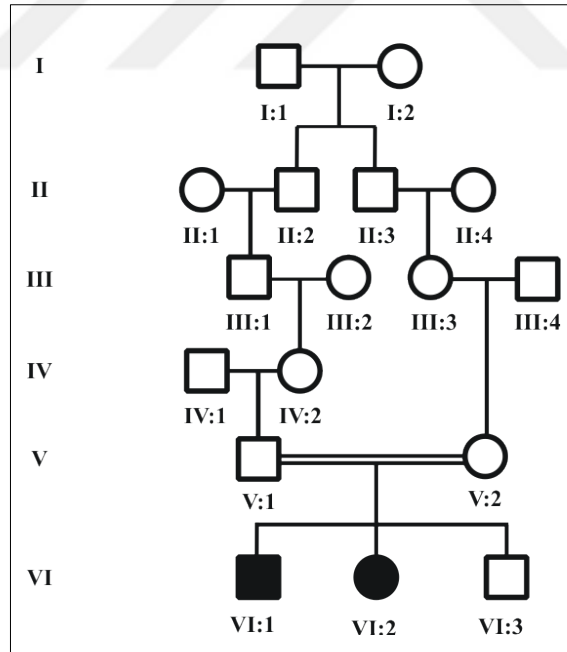
Bu çalışma; sensörinöral işitme kayıplarının genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı arasında 1997'den bu yana süregelen iş birliği kapsamında yürütülen çalışmaların devam niteliğinde gerçekleştirildi. Tez kapsamında sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybı tanısı konulmuş en az iki etkilenmiş bireyin bulunduğu daha önce yürütülen çalışmalar kapsamında *GJB2* (113), *TMC1* (114), *TMPRSS3* (115), *USH1G* (116), *MYO15A* (117), *LRTOMT* (118), *LHFPL5* (119), *ESRRB* (120), *PJVK* (121) ve *OTOG* (122) genlerinde mutasyon olmadığı gösterilmiş olan TR-15 (Şekil 5), TR-37 (Şekil 6), TR-33 (Şekil 7), TR-59 (Şekil 8) ve TR-16 (Şekil 9) nolu beş ailedeki genetik etiyoloji araştırıldı. Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 2002/6 protokol numarası (Ek 1) ve 2022/88 protokol numarası (Ek 2) ile onaylanmıştır.



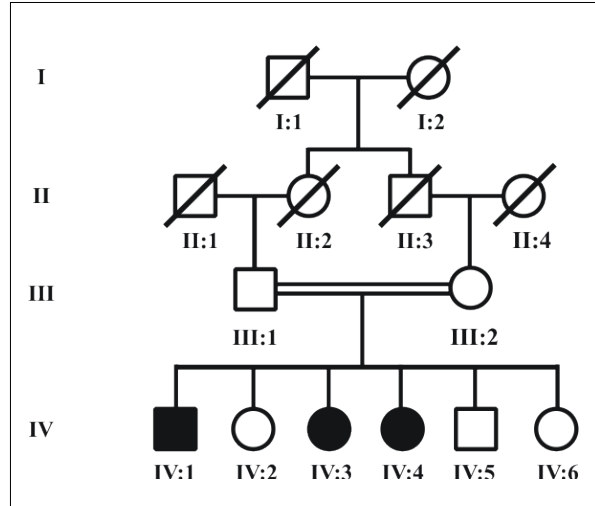
Şekil 5. TR-15 nolu aile. Daireler dişi, kareler erkek, içi dolu daireler etkilenmiş dişi, içi dolu kareler etkilenmiş erkek, üzeri çizilmiş olan daire ve kareler ölmüş bireyleri göstermektedir. Çift çizgi akraba evliliğini gösterirken her bir bireyin numarası ilgili bireyin altında verilmektedir. Kuşak numaraları ise aile ağacının sol tarafında gösterildi.



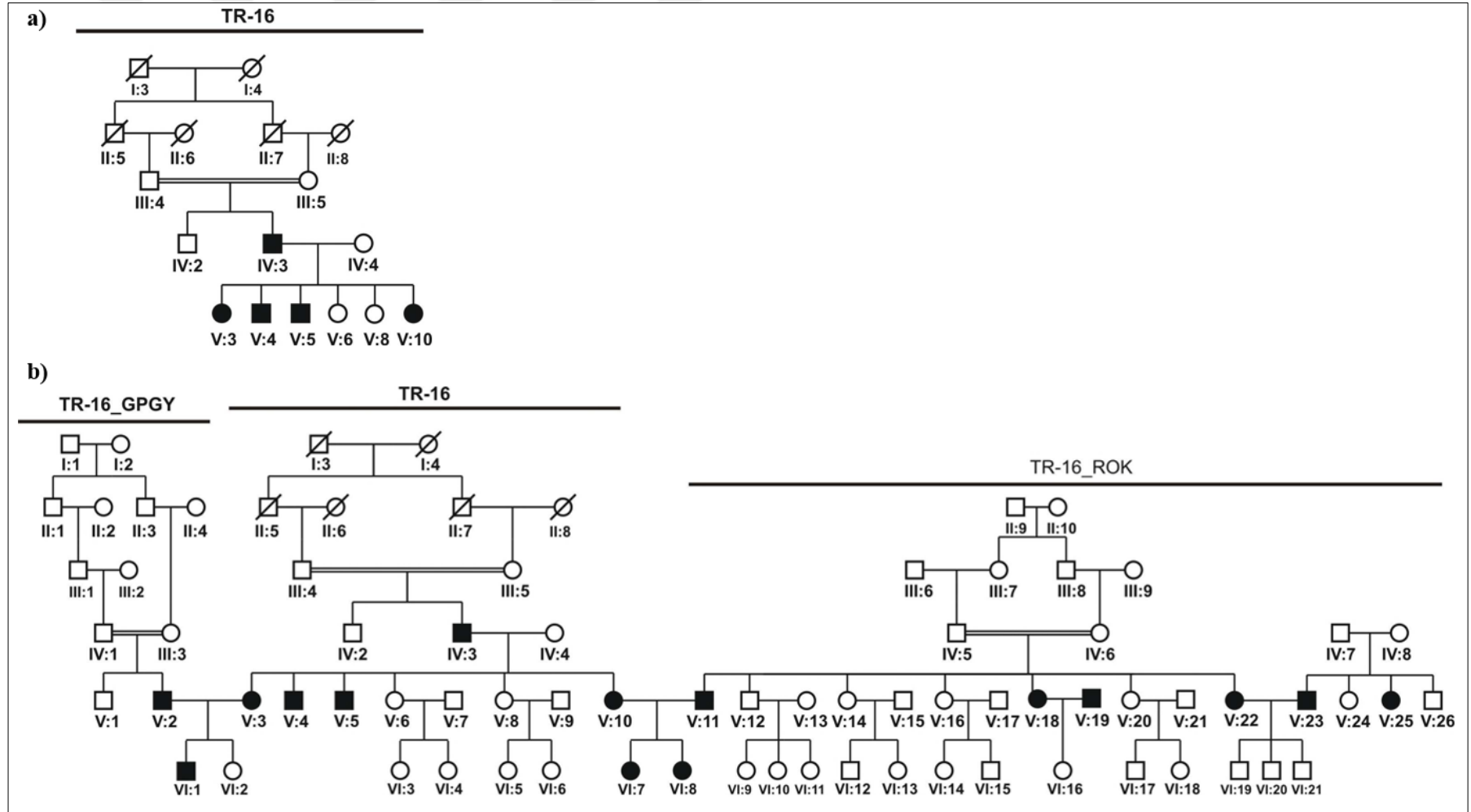
Şekil 6. TR-37 nolu aile. Daireler dişi, kareler erkek, içi dolu kareler etkilenmiş erkek, üzeri çizilmiş olan daire ve kareler ölmüş bireyleri göstermektedir. Çift çizgi akraba evliliğini gösterirken her bir bireyin numarası ilgili bireyin altında verilmektedir. Kuşak numaraları ise aile ağacının sol tarafında gösterildi.



Şekil 7. TR-33 nolu aile. Daireler dişi, kareler erkek, içi dolu daireler etkilenmiş dişi ve içi dolu kareler etkilenmiş erkek bireyleri göstermektedir. Çift çizgi akraba evliliğini gösterirken her bir bireyin numarası ilgili bireyin altında verilmektedir. Kuşak numaraları ise aile ağacının sol tarafında gösterildi.



Şekil 8. TR-59 nolu aile. Daireler dişi, kareler erkek, içi dolu daireler etkilenmiş dişi, içi dolu kareler etkilenmiş erkek, üzeri çizilmiş olan daire ve kareler ölmüş bireyleri göstermektedir. Çift çizgi akraba evliliğini gösterirken her bir bireyin numarası ilgili bireyin altında verilmektedir. Kuşak numaraları ise aile ağacının sol tarafında gösterildi.



Şekil 9. TR-16 nolu aile. **a)** TR-16 nolu ailenin çalışmaya dahil edildiği ilk aile ağacı, **b)** TR-16 nolu ailenin güncellenmiş aile ağacı. Daireler dişi, kareler erkek, içi dolu daireler etkilenmiş dişi, içi dolu kareler etkilenmiş erkek, üzeri çizilmiş olan daire ve kareler ölmüş bireyleri göstermektedir. Çift çizgi akraba evliliğini gösterirken her bir bireyin numarası ilgili bireyin altında verilmektedir. Kuşak numaraları ise aile ağacının sol tarafında gösterildi.

3.1.2. Kimyasallar

Agaroz	Lonza, 50004
Deoksinükleotit trifosfat (dNTPs)	NEB, N0446S
EDTA disodyum dihidrat ($\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromür ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$)	Sigma, E-7637
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	AppliChem, A 8075,1000
Glasiyel asetik asit ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Merck, 1.00056.2500
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Merck, 910TA654681
Orange G	Sigma, O-1625
Oligonükleotit primer	Macrogen
Potasyum bikarbonat (KHCO_3)	AppliChem, A2375.1000
Proteinaz K	Promega, V3021
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Tris-Baz ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Sigma, T6791
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Sigma, 93363

3.1.3. DNA markırlar

100 bp plus DNA ladder	Thermo, SM0321
------------------------	----------------

3.1.4. Kitler ve Enzimler

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo, 4337455
PCR Clean-up Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel, 740609.50
POP-7™ Polymer	App. Biosystems, 4352759
GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase	Promega, M7808
GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard	Applied Biosystems, 4322682

3.1.5. Diğer Sarf Malzemeler

Falkon tüp (50 mL)	Thermo, 339652
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 mL)	Greiner bio-one, 616201
Pipet ucu (1 - 200 µL)	Axygene, 301-02-301
Pipet ucu (1000 µL)	Axygene, 21418430
Pipet ucu (10 µL)	İsolab, I.00501001901

3.1.6. Cihazlar

Bulaşık makinesi	Bosch, Almanya
Buzdolabı (4 °C)	Bosch, Almanya
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch, Almanya
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Genetik analizör cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	OHAUS, ABD
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Nanodrop® 2000 UV-Vis Spektrofotometre	Thermo, ABD
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf 5804R, Almanya
Thermal cycler	Techne TC512, İngiltere
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
-80 °C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.1.7. Solüsyonlar

3.1.7.1. DNA İzolasyonu Solüsyonları

Eritrosit Lizis Tamponu (ELB) (10X) (pH 7.4)

155 mM	NH ₄ Cl
10 mM	KHCO ₃
0.5 M	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

82.9 g NH₄Cl, 10 g KHCO₃ ve 20 mL 0,5 M Na₂EDTA ddH₂O'da çözülerek pH 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

Nuclei Lizis Tamponu (NLB) (pH 8.2)

10 mM	Tris-Base
400 mM	NaCl
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 g Tris-Base, 23.4 g NaCl ve 0.74 g Na₂EDTA ddH₂O'da çözülerek pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M	Tris-HCl
1 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 g Tris-HCl, 0.011 g CaCl₂ ddH₂O'da çözülerek pH 8.0'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/mL)

Hazırlanışı:

100 mg liyofilize haldeki Proteinaz K, 10 mL Proteinaz K seyreltme tamponunda son konsantrasyon 10 mg/mL olacak şekilde buz üzerinde çözülerek hazırlandı. Proteinaz K çözeltisi 600 µL olacak şekilde 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

%10'luk (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Solüsyonu

Hazırlanışı:

10 g SDS ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak 68°C'de ısıtılarak çözüldü. Oda ısısında saklandı.

Sodyum Klorür (6 M)

Hazırlanışı:

58.4 g NaCl ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak çözüldü. Oda ısısında saklandı.

0.1 M Na₂EDTA (pH 8.0)

Hazırlanışı:

37,22 g Na₂EDTA ddH₂O'da çözülerek 10 M'lık NaOH ile pH 8.0'e ayarlanarak son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

1 M Tris-HCl (pH 7.4)

Hazırlanışı:

157.6 g Tris-HCl ddH₂O'da çözülerek pH 7.4'ye ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

TE Tamponu (pH 7.5)

10 mM	Tris-HCl
1 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

0.394 g Tris-HCl, 0.093 g Na₂EDTA ddH₂O'da çözülerek pH 7.5'e ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 250 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

3.1.7.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonlar

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50X, 1 L)

800 mL ddH₂O üzerine 242 g Tris-baz (Mw: 121.14 g/mol), 100 mL 0.5 M EDTA (pH:8.0) ve 57.1 mL glasiyal asetik asit eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda Tris-baz çözünene kadar karıştırıldı. Sonrasında pH 8.5'e ayarlandı ve son hacmi ddH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Etidyum Bromür (1 mL)

10 mL steril ddH₂O'de 0.1 g etidyum bromür çözüldü. Kullanılmak üzere ışıktan korunmasını sağlayacak renkli bir plastik kap içinde muhafaza edildi.

Orange G DNA Yükleme Tamponu (10X, 25 mL)

20 mL ddH₂O'da 10 g süktroz çözüldü ve üzerine 0.05 g Orange G çözüldükten sonra hacim 25 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Tez çalışmasına dahil edilen TR-16 nolu ailenin Gönüllü Onam Formu'nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden IV:2, V:2, VI:1, VI:2, V:11, VI:7 ve VI:8 numaralı bireylerinden 8-10 mL EDTA'lı periferik kan örneği alındı. Periferik kan örneklerinden tuzla çöktürme (salting-out) yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi (123). Özetle; EDTA'lı periferik kan 50 mL'lik falkon tüplere alındı ve üzerine 40 mL eritrosit lizis tamponu ilave edilip çalkalanarak eritrositlerin parçalanması sağlandı. 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra pellet üzerine 4 mL nükleer lizis tamponu ve 125 µL Proteinaz K (10 mg/mL) eklenerek homojen hale gelene kadar çalkalandı. Sonrasında süspansiyon üzerine %10'luk 425 µL SDS eklenerek hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Etüvden çıkartılan tüpler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra üzerlerine 1,4 mL 6 M NaCl eklenerek 15 sn hızlı bir şekilde çalkalandı. İyice çalkalanan tüpler 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı ve ikinci kez 4500 rpm'de 15 dk daha santrifüj edilerek süpernatant tekrar temiz bir tüpe alındı. Temiz tüpe alınan süpernatantın üzerine iki katı kadar %96'luk soğuk etil alkol eklendi. Tüpler nazikçe alt üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı ve presipite olan DNA pipet ucuyla 1,5 mL'lik vidalı kapaklı tüpe alınarak üzerine 500 µL %70'lik etil alkol eklendi ve alt-üst edilerek santrifüjde 45 sn çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Hızlı santrifüj işlemi tekrarlandı ve tüpte kalan etil alkol pipet ucu ile alındı. Alkol uçana kadar tüpün kapağı açık tutularak kurumaya bırakıldı. Alkol uçtukten sonra DNA'nın üzerine 500 µL TE tamponu eklenerek çözülmesi için önce oda sıcaklığında sonra +4 °C de bekletildi. Etiketlenerek Anabilim Dalımızın DNA arşivinde muhafaza edildi.

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı DNA arşivinde muhafaza edilen örneklerinin Nanodrop® 2000 UV-Vis spektrofotometre'de DNA konsantrasyonları ölçüldü ve her bir örnek için 100 ng/µL ve 25 ng/µL konsantrasyonda çalışma solüsyonu hazırlandı.

3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme

Ekzom dizileme için çalışmaya dahil edilen TR-15, TR-37, TR-33, TR-59 ve TR-16 nolu beş ailenin dizilmeye tabi tutulmak üzere belirlenen her bir bireyine ait 2-5 µg genomik DNA örneği, hizmet alımı yapılan *NGST Sağlık Hizmetleri Araştırma Geliştirme Danışmanlık Tic. Ltd. Şirketi* ve *MSM Ürün ve Hizmet Şirketleri*'ne gönderilmek üzere 100

ng/ μ L olacak şekilde hazırlandı. Dizileme işlemi tarafımızca belirlenen teknik şartname doğrultusunda (Ek 3, Ek 4) gerçekleştirildi.

Tüm ekzom dizileme için her bir aileden bir bireyin dizilenerek sorumlu varyasyonun belirlenmesi, bir birey üzerinden sorumlu varyasyonun belirlenememesi durumunda ise aileden ilave bireylerin dizilenerek sürece dahil edilmesi yaklaşımı kullanıldı. Bu yaklaşım çerçevesinde çalışmada 12'si IDT-xGen Exome Research Panel V2.0 kiti (92) (Şekil 8) kullanılarak MGI-DNBSEQ-T7 platformunda ve beşi Agilent SureSelect Human All Exon V6 +UTR r2 kiti (96, 124) (Şekil 8) kullanılarak Illumina-NovaSeq 6000 platformunda “paired-end” tüm ekzom dizileme işlemi gerçekleştirildi (Tablo 12). Elde edilen okumalar dizileme hizmeti satın alınan firma tarafından fastq formatına dönüştürülerek tarafımıza iletildi.

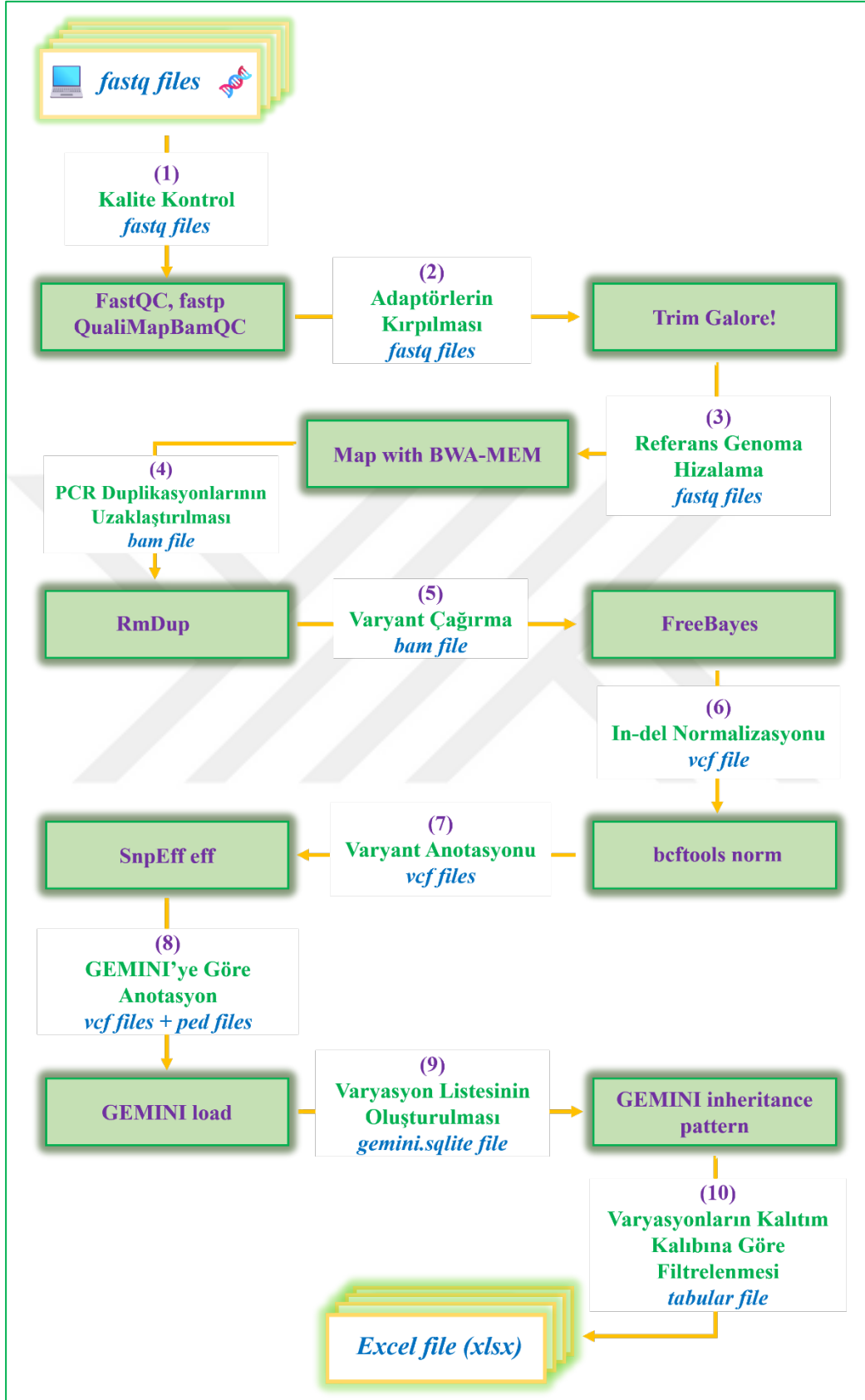
Tablo 12. Tüm ekzom dizilemeye tabi tutulan bireyler ve dizileme kitleri.

Aile	xGen Exome Research Panel V2.0	SureSelect Human All Exon V6 +UTR r2
TR-15	IV:7	
TR-37	VI:3	
TR-33	VI:2	
TR-59	IV:1, IV:2, IV:4	
TR-16	IV:3, IV:4, V:4, V:8, V:10, VI:1	V:2, V:11, VI:2, VI:7 ve VI:8

3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Veri Analizi

Ekzom dizileme ile elde edilen verilerin biyoenformatik analizleri “*Galaxy Europe Platformu* (<https://usegalaxy.eu>)” üzerinden gerçekleştirildi. *Galaxy Europe Platformu*; RNA-seq, WGS, WES, metagenomik analizler, filogenetik analizler, protein yapısı ve fonksiyonu ile ilgili biyoenformatik analizler yapılmasına imkân sunan açık erişimli “*Galaxy Platformu*”nun Avrupa sunucusudur. Sunucu, araştırmacıların kodlama bilgisine ihtiyaç duymadan; kalite kontrolü, tercih edilen bir referans genoma hizalama, varyant çağırma, anotasyon, diferansiyel ekspresyon analizi gibi işlemlerde kullanılmak üzere geliştirilmiş FastQC, Cutadapt, TrimGalore, RNA-STAR, HISAT2, Bowtie2, Salmon, FeatureCounts, DESeq2, BWA-MEM, FreeBayes, DeepVariant, SnpEff Eff ve GEMINI gibi çok sayıda aracı grafik arayüzünde sunan web tabanlı bir platformdur. Platform; her bir işlem için

alanında kabul görmüş ve yaygın olarak kullanılan farklı araçlara bünyesinde yer vererek araştırmacının ihtiyacına göre iş akışları oluşturmaya fırsat veren esnekliğe sahip olup oluşturulan iş akışlarını kayıt altında tutarak çalışmalarda tekrarlanabilirlik sağlamaktadır. Ayrıca, analizin ilgili aşamalarında dbSNP, ClinVar, OMIM, KEGG, Pfam, Ensembl, ESP, 1000G, CADD, PolyPhen2, SIFT, ENCODE, UCSC Human Genom Browser, COSMIC, GnomAD, GERP, FitCons, VISTA ve HPRD gibi farklı veri bankalarını otomatik olarak kullanmaktadır. Platform kullanılan araçların yeni versiyonlarının geliştirilmesine paralel olarak güncellenmektedir. Bu çalışma kapsamında değerlendirilen işitme kayıplı ailelerdeki sorumlu genetik varyasyonu belirlemeye yönelik olarak elde edilen ekzom dizileme verilerinin analizi Galaxy Europe Platformu üzerinde belirlediğimiz iş akışı kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi (Şekil 10) (125, 126).



Şekil 10. Tüm ekzom dizileme ile elde edilen verilerin Galaxy Europe Platformu kullanılarak varyasyon listesinin oluşturulması için kullanılan iş akışı

3.2.3.1. Ham Veri ve Hizalama Kalitesinin Kontrolü

Ekzom dizileme ile elde edilen verilerin kalite kontrolünü yapmak üzere öncelikle her bir bireyin iki yönlü okuma verileri fastq formatında Galaxy Europe Platformu'na yüklendi. Ekzom dizileme hizmetinin teknik şartnamede belirtilen %90 ve üzerinde Q30 kalitesinde ve 100x sekans derinliği ile dizilenip dizilenmediği, kitin kapsamı, toplam okuma sayısı, dizilenen bölgelerin okuma derinlikleri, iki yönlü (paired-end) okumaların eşleşip eşleşmediği ve okumaların referans genomu ne düzeyde hizalandığı *QualiMap BamQC (Galaxy Version 2.3+galaxy0)* aracı kullanılarak kontrol edildi (127). Okumaların Q20-Q30 değerleri *fastp fast all-in-one preprocessing for fastq files (Galaxy Version 0.23.4+galaxy1)* aracı ile analiz edildi (128). Dizileme hizmetinin teknik şartnamede belirtilen Q30 kalitesinde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği (kalite skor grafikleri (phred score)), GC içeriği ve adaptör içerip içermediği *FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.74+galaxy0)* aracı ile kontrol edildi (129). Dizileme için kütüphane oluşturma aşamasında kullanılan adaptör dizileri ilgili firmadan istendi. Adaptör içeren okumalardaki belirlenen adaptörler *Trim Galore! Quality and adapter trimmer of reads (Galaxy Version 0.6.7+galaxy0)* aracı ile iki yönlü okumalardan kırıldı (130).

3.2.3.2. Okumaların Referans Genoma Hizalanması

Adaptörleri uzaklaştırılan iki yönlü (paired endd) fastq okuma verileri *Map with BWA-MEM (Burrows-Wheeler Aligner-Galaxy Version 0.7.18)* aracı ile birleştirilerek UCSC Human GRCh37/hg19 referans genomuna hizalandı (110, 131). Kütüphane hazırlanması aşamasının DNA parçalarının PCR ile amplifikasyonu sırasında oluşan PCR duplikasyonları, iki yönlü okumalarda uç birleşmesi yapılamayan parçalar ve genomu hizalanamayan okumalar *RmDup (Galaxy Version 2.0.1)* aracı ile kırıldı (132, 133). Daha sonra elde edilen dizilerdeki in-del'ler *bcftools norm (Galaxy Version 1.15.1+galaxy4)* aracı kullanılarak sola hizalandı ve normalize edildi (132, 134).

3.2.3.3. Varyantların Çağrılması ve Anotasyonu

Referans genomu hizalanan bam formatındaki okumalarda bulunan varyasyonların çağrılma işlemi *FreeBayes (Galaxy Version 1.3.6+galaxy0)* aracı ile gerçekleştirilerek vcf (variant caller format) formatında dosyalar elde edildi (132, 135). Bu aşamada tek bir birey üzerinden sorumlu varyasyonun belirlenmesi beklenen ailelerde tek bireyin varyantları çağrılırken; birden fazla bireyin dizilendiği ailelerde bireylerin genotiplerini ayrı ayrı sütunlarda belirtilecek şekilde çağrılan tüm varyantlar program üzerinden birleştirilerek tek

bir dosya haline getirildi. Sonrasında, varyasyonların hangi kromozomda yer aldığı, kromozom üzerindeki başlangıç ve bitiş pozisyonları, varyasyonun yerleşim yeri ve türü, varyasyonun her bir bireydeki genotip bilgisinin olacağı anotasyon işlemi *SnpEff eff (Galaxy Version 4.3+T.galaxy2)* aracı kullanılarak yapıldı (136, 137).

3.2.3.4. Varyasyonların GEMINI Veri Tabanına Göre Anote Edilmesi ve Kalıtım Kalıbına Göre Filtrelenmesi

Varyasyon listesinin kalıtım kalıbına göre filtrelenebilmesi için öncelikle her aileden dizilemeye tabi tutulan bireye/bireylere ait aile ağacı bilgilerini içeren ped formatındaki dosyalar oluşturularak Galaxy Europe Platformu'na yüklendi. Daha sonra *SnpEff Eff* aracı ile elde edilen vcf dosyaları ve analizi yapılacak her bir ailenin ped dosyası *GEMINI Load (Galaxy Version 0.20.1+galaxy2)* aracı ile GEMINI platformuna yüklendi. GEMINI platformu; dbSNP, ClinVar, OMIM, KEGG, Pfam, Ensembl, ESP, 1000G, CADD, PolyPhen2, SIFT, ENCODE, UCSC, COSMIC, Gerp, FitCons, VISTA ve HPRD veri tabanlarını kullanarak dizilerde belirlenen varyasyonların anotasyonunu gerçekleştirdi (138). Anote edilerek oluşturulan varyasyon listesi *GEMINI inheritance pattern (Galaxy Version 0.20.1)* aracı ile ailedeki kalıtım kalıbına göre analiz edildi (138). Her bir aileden dizilenen bireyde/bireylerde kalıtım kalıbına göre elde edilen varyasyonların ileri düzeyde filtrelenebilmesi için tabular formatındaki dosya excel formatına dönüştürülerek filtreleme için hazır hale getirildi.

3.2.4. İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Tespiti

Ailedeki kalıtım kalıbına göre, excel formatında elde edilen varyasyon listesindeki varyasyonların ileri düzeyde filtrelenmesinde, sorumlu patolojinin işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş bir gen üzerinde veya yeni bir gen üzerinde olma durumuna göre iki farklı strateji kullanıldı. En son basamakta filtrelenen (aday olarak seçilen) varyant hastalığı açıklamaya aday olarak değerlendirildi.

i. gnomAD v2.1.1 (139) veri tabanındaki sağlıklı popülasyondaki bir bireyde homozigot olarak görülmüş olma homozigot kalıtım görülen ailelerde belirlenen homozigot varyasyonların dışlanması için, sağlıklı popülasyondaki bir bireyde heterozigot olarak görülmüş olma dominant kalıtım görülen ailelerde belirlenen heterozigot varyasyonların dışlanması için kriter olarak belirlendi. Bu çerçevede, otozomal resesif kalıtım gösteren ailelerde belirlenen varyasyonlardan, gnomAD v2.1.1 veri tabanındaki sağlıklı popülasyonda homozigot olarak görülmemiş olan varyasyonlar filtrelendi. Otozomal

dominant kalıtım gösteren ailede ise gnomAD veri tabanındaki sağlıklı popülasyonda bir bireyde dahi heterozigot görülmemiş olan varyasyonlar filtrelendi.

ii. Patolojik etki potansiyeli düşük olan intronik ve sinonim varyasyonlar dışlanırken protein fonksiyonunu ve ekspresyonunu etkileme potansiyeline sahip olan missense, nonsense, frameshift, splicing bölge varyantları ve UTR varyantları filtrelendi.

iii. Ailedeki sorumlu varyasyonun işitme kaybı ile daha önceden ilişkilendirilmiş bir gen üzerinde aranması durumunda; ClinVar veri tabanının işitme kaybı fenotipi ile ilişkilendirdiği ve ClinVar veri tabanında olmayıp literatür taraması ile oluşturduğumuz işitme kaybı ile ilişkilendirilen gen listesindeki genler (Tablo 2-5) üzerindeki varyasyonlar filtrelenerek diğer genler üzerinde kalan varyasyonlar dışlandı. Ailedeki sorumlu varyasyonun yeni bir gen üzerinde aranması durumunda ise bu basamak atlanarak dördüncü basamaktan filtreleme işlemine devam edildi.

iv. Varyantların anotasyonu gerçekleştirilirken GEMINI aracının gnomAD veri tabanının güncel sürümlerindeki (v4.1.0) veriyi kullanmadığı için filtrelenen varyasyonlar gnomAD'in güncel versiyonunda (gnomAD v.4.1.0) kontrol edilerek birinci basamaktaki kriterler kullanılarak filtreleme gerçekleştirildi.

v. Tespit edilen varyasyonların okumaların doğru mu yoksa okuma hatası mı olduğu IGV (Integrative Genomics Viewer) programı üzerinden bam formatındaki dosyalarda kontrol edildi (140, 141). Varyasyonlar arasında homozigot olarak ifade edilen bir bazın %80 ve üzeri bir oranda okunması (baz kalitesi $\geq$ Q20) doğru okuma olarak kabul edildi, %20'nin altındaki okumalar ise hatalı okuma olarak kabul edildi ve dışlandı (142, 143).

vi. Filtrelenen aday varyasyonlar Sanger dizileme ile doğrulanırken ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu kontrol edildi. Ailedeki işitme kaybı ile kalıtılmayan varyasyonlar dışlanırken işitme kaybı ile segrege olan varyasyonlar işitme kaybından sorumlu varyasyon olarak değerlendirildi.

3.2.5. İşitme Kaybı ile İlişkilendirilen Varyasyonların Doğrulanması ve Ailedeki Segregasyonunun Belirlenmesi

3.2.5.1. Varyasyonun Bulunduğu Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu

İşitme kaybından sorumlu olabileceği tespit edilen varyasyonların doğrulanması ve ailedeki segregasyonunun gösterilebilmesi için her bir ailede tespit edilen varyasyonun

bulunduğu bölgeye özgü primerler “Primer3” programı kullanılarak dizayn edildi (Tablo 13) (144).

Tablo 13. Varyasyonların Sanger dizileme ile doğrulanması için kullanılan primerler.

Gen Adı ve Ekzon	Pr no	Primer dizisi (5'-3')	Primer adı	Ürün uzunluğu (bp)
<i>TBC1D24_Ekzon2</i>	1970	tctttgacgtcttctggtgg	TBC1D24_Ex2_F1	290
	1971	cgacctacctcttctgcttcac	TBC1D24_Ex2_R1	
<i>GPSM2_Ekzon10</i>	1968	accaagttaatgtgtccaggataatc	GPSM2_Int9-Int10_F1	736
	1969	aaagaacaataccatcaccattcc	GPSM2_Int9-Int10_R1	
<i>EPS8L2_Ekzon19</i>	1999	gaacaagacggtagaggggtg	EPS8L2_Ex18_Int19_F1	535
	2000	gcacacttcttcagctcctc	EPS8L2_Ex20_R1	
<i>WHRN_Ekzon1</i>	2062	ctgcggttactgtctgcca	WHRN_F1_Amp_Seq	498
	2063	ggccagggaattgtcgttgac	WHRN_R1_Amp_Seq	
<i>DLGAP2_Ekzon12</i>	2172	gctaccatctgtcttcttccc	DLGAP2_Int11_Ex12_F2	398
	2173	agccttccatctcttctgtctc	DLGAP2_Int11_Ex12_R2	
<i>PHTF2_Ekzon19</i>	2182	agcttaaggacagaaattggag	PHTF2_Int18_Ex19_F1	458
	2183	gtgcatgtgagggtaaaatggg	PHTF2_Int18_Ex19_R1	
<i>EIF4A1</i>	2343	aggcactcgagttatccaatgg	EIF4A1_c.-20C>A_F_v2	437
	2344	cctcgtaacagacctcgac	EIF4A1_c.-20C>A_R_v2	
<i>PCDH15_Ekzon30</i>	2295	tgagacttctgactcagctgtg	PCDH15_c.4142C>A_F	432
	2296	ttacaacgcaaagccatgttac	PCDH15_c.4142C>A_R	
<i>SHROOM1_Ekzon4</i>	2176	tacctagactgggactacgtgc	SHROOM1_Ex4_F1	532
	2177	gaccacacgatccagctttc	SHROOM1_Ex4_R1	
<i>BAZ2A_Ekzon6</i>	2178	tttagcttggtccagggtgacttaca	BAZ2A_Int5_Ex6_F1	500
	2179	gctgacatccttattgtctggg	BAZ2A_Int5_Ex6_R1	

Varyasyon bulunan bölgelerin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler kullanılarak PCR reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X (µL)</u>
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer	5
MgCl ₂ (25 Mm)	1.5
Dntp karışımı (10 Mm)	1
Pr F (10 pmol/µL)	1
Pr R (10 pmol/µL)	1
GoTaq® DNA Polymerase (5u/ µL)	0.1
Gdna (25 ng/µL)	3
<u>Dh₂O</u>	<u>12.4</u>
Toplam	25

<u>PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	94	6 dk	
Denatürasyon	94	30 s	
Bağlanma	55-60	45 s	} 35-37 Döngü
Sentez	72	45 s	
Son sentez	72	6 dk	
Bekleme	10	∞	

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen 46mplikonlar %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Her bir birey için elde edilen 46mplikonlar MN PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel Cat No:740609.50) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda temizlendi.

3.2.5.2. Varyasyonun Sanger Dizileme ile Doğrulanması

Tespit edilen varyasyonun doğruluğu ve ailedeki segregasyonu Sanger dizileme ile belirlendi. Sanger dizileme reaksiyonu amplifikasyon primerleri (Tablo 13) ile BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti (Thermo, Cat No:4337455) kullanılarak aşağıda belirtilen karışım ve koşullarda gerçekleştirildi.

<u>Sanger Dizileme Reaksiyonu</u>	<u>1X (µL)</u>
Big Dye	1
Big Dye Buffer	1.5
Pr F (10 pmol/µL)	0.32
Kalıp PCR ürünü	-
<u>Dh₂O</u>	<u>2.18</u>
Toplam	10

<u>Sanger Dizileme Reaksiyon Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	96	2 dk	
Denatürasyon	96	15 s	
Bağlanma	50	15 s	} 25 Döngü
Sentez	60	2 dk	
Son sentez	10	5 dk	

Sanger dizileme için yapılan PCR sonunda elde edilen ürünler Sephadex G-50 boncukları kullanılarak temizlendi ve 3130 Genetik Analizör (ABI) cihazına yüklendi. Elde edilen okumalar ilgili genin referans dizisi ile karşılaştırıldı. Sanger dizileme ile doğrulanan varyasyonların ailedeki segregasyonu aile ağacı üzerinde gösterildi.

3.2.5.3. Varyasyonların *in silico* Analizleri

Sanger dizileme ile doğrulanan varyasyonlar arasından ailede işitme kaybı ile kalıtılan yanlış anlamlı varyasyonların patolojik olup olmadığını belirlemeye yönelik çoklu hizalama analizleri ile amino asitlerin omurgalıları arasındaki korunmuşluğu (145) ve PolyPhen2 (146), SIFT (147), Mutation Taster (148), AlphaMissense (149) gibi *in silico* araçlar ile patojeniteleri analiz edildi. Varyasyonlar Türk popülasyonundan 557 bireyin tüm genom dizileme sonuçlarından elde edilen varyasyonların bulunduğu Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portalı'nda (Türkiye Genom Projesi-TÜSEB) (Erişim Tarihi: 30 Ocak 2025) (150) kontrol edildi. Her bir ailede tespit edilen aday varyantlar ACMG varyant sınıflandırma kriterleri doğrultusunda patojenik (P), muhtemel patojenik (LP); benign (B), muhtemel benign (LB) ve klinik önemi bilinmeyen (VUS) olarak belirtilen beş kategoriden birine dahil edildi (Tablo 11) (112).

3.2.5.4. Haplotip Analizi

TR-59 ve TR-16 nolu ailelerde işitme kaybından sorumlu olabileceği belirlenen varyasyonun bulunduğu sırasıyla 8p23.1-23.3 ve 7q11.23-21.11 kromozomal bölgelerinin işitme kaybı ile birlikte kalıtılıp kalıtılmadığının gösterilebilmesi için UCSC Genome Browser on Human (GRCh37/hg19) (131) kullanılarak, bölgeye karşılık gelen informatif STR markırları ve SNP'ler belirlendi (Tablo 14).

Tablo 14. Haplotip analizi için kullanılan STR markırları ve SNP'ler.

Markır	Primer no	Ürün Uzunluk (bp)	İleri (5' – 3')	Geri (5' – 3')
D8S504	C8-06	193-203	tgtaaaacgacggccagtactgggtcacgagga	catgccattttccag
D8S264	C8-07	121-145	tgtaaaacgacggccagtacatctgcgtcgtttcata	ccaacacctgagtcagcata
D8S201	C8-08	170-274	tgtaaaacgacggccagtgggtaacacgggtgaacca	atcagaccaataaccccagg
D8S1781	C8-09	214-272	tgtaaaacgacggccagtactgggggctaacctt	tttgaatcgtgtcagca
D8S1824	C8-10	226-248	tgtaaaacgacggccagtaagtgtcttcgaggtcc	tgaaaattgtatcctacctgag
D8S1798	C8-11	145-165	tgtaaaacgacggccagttttgtggagtttatnctctg	tgcaccagtatgtatctaagtga
D8S1742	C8-12	130-150	tgtaaaacgacggccagtccccaccaagacaca	ctcaaggatatgaaggga
D8S1706	C8-13	257-281	tgtaaaacgacggccagttagacagcgacatgcag	ggaaaaatcacaatagaattac
D7S1870	C7-04	108-132	tgtaaaacgacggccagttcactcaggaagtggc	tggtgatgtgtttactacg
D7S2518	C7-05	139-159	tgtaaaacgacggccagttttgataaaaacaagcaaaag	caaaactagcatctggga
D7S2455	C7-06	172-211	tgtaaaacgacggccagtcttgagcctgggagtacgagac	tcagaaattgcaccaagtgtca
D7S2204	C7-07	217-269	tgtaaaacgacggccagttcatgacaaaacagaaattaagt	agtaaatggaattgctgttacc
D7S2443	C7-08	137-157	tgtaaaacgacggccagtaataagggtttcattttatcc	cttatgtcattttatgtttaatca
rs2906362	2223	600	ttcttctatcttctccggccc	
	2224		actgtctcccaacatctagagg	
rs116847950	2225	498	tggttaattcactgctttggtatgc	
	2226		agtttcttacttgcctcaattgg	
rs755544	2229	593	aagtggctggaaggtatttggc	
rs755542	2230		tgggccactgataaccaagc	

Belirlenen her bir STR markırının amplifikasyonunda kullanılacak primer çiftlerinden ileri primerin 5' ucuna universal M13 (-21) primer dizisi (5' tgtaaaacgacggccagt 3') eklendi (Tablo 14). Her bir primer çifti ile ön PCR ve işaretleme PCR olmak üzere ardışık iki PCR gerçekleştirildi.

<u>Ön PCR Karışımı</u>	<u>1X (µL)</u>
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer	5
MgCl ₂ (25 Mm)	1.5
Dntp karışımı (10 Mm)	1
Pr F (10 pmol/µL)	1
Pr R (10 pmol/µL)	1
GoTaq® DNA Polymerase (5u/ µL)	0.1
Gdna (12.5 ng/µL)	4
<u>Dh₂O</u>	<u>11.4</u>
Toplam	25

<u>Ön PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	94	6 dk	} 36 Döngü
Denatürasyon	94	30 s	
Bağlanma	56	40 s	
Sentez	72	40 s	
Son sentez	72	6 dk	
Bekleme	10	∞	

Ön PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Ön PCR sonucu elde edilen 49mplikonlar işaretleme PCR'ı için kalıp olarak kullanıldı. İşaretleme PCR'ında ön PCR'dan elde edilen ürünler kalıp olarak kullanılırken ileri primer olarak FAM™ (mavi) floresan boyanın takılı olduğu M13 (-21) primeri, geri primer olarak ise ön PCR'da kullanılan geri primer kullanıldı. İşaretleme PCR'ı için yapılan bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı.

<u>İşaretleme Reaksiyonu</u>	<u>1X (µL)</u>
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer	2
MgCl ₂ (25 Mm)	0.6
Dntp karışımı (10 Mm)	0.2
M13 (-21) Pr F (10 pmol/µL)	0.1
Pr R (10 pmol/µL)	0.1
GoTaq® DNA Polymerase (5u/ µL)	0.02
PCR ürünü	2
<u>Dh₂O</u>	<u>4.98</u>
Toplam	25

<u>İşaretleme Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	94	1 dk	} 11 Döngü
Denatürasyon	94	30 s	
Bağlanma	56	30 s	
Sentez	72	30 s	
Son sentez	72	1 dk	
Bekleme	10	∞	

İşaretleme reaksiyonundan elde edilen PCR ürünlerinden 5 µL alınarak üzerine 6,6 µL Hi-Di™ Formamid ve 0,4 µL GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard markır klenerek 10 µL'lik karışım elde edildi. Hazırlanan karışı kapiller elektroforez işlemi için 3130 Genetik Analizör (ABI) cihazında yürütüldü. Kapiller elektroforez işlemi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar, GeneMapper® v4.1 & Data Collection v3.1 programı kullanılarak analiz edilerek çalışılan STR markırlarının genotipleri belirlenerek ilgili bölgelerin haplotipleri oluşturuldu.

3.2.5.5. Bağlantı Analizi

Genetik bağlantı, iki lokusun genetik olarak birbirine yakın olmasını ve birlikte kalıtılma durumunu ifade etmektedir (151). İki genetik lokusun birbirine yakın olması bu iki lokusun birbiri ile bağlantılı olduğunu, birbirine uzak ise birlikte kalıtılmadıklarını yani bağlantılı olmadığını ifade etmektedir. Lokusların birlikte ya da bağımsız kalıtılmaları crossing-over ile düzenlenmektedir (151, 152). Crossing-over sonucu oluşan rekombinasyon ile genetik çeşitlilik ortaya çıkmaktadır. Mayoz sırasında crossing-over olma olasılığı rekombinasyon sıklığı olan θ değeri ile ifade edilmekte ve bu değer 0 ise ($\theta=0$) rekombinasyon olmadığını, 0-0,5 arasında ise rekombinasyon olduğunu ifade etmektedir. $\theta=0$ olduğunda iki bölgenin birbiriyle bağlantılı olduğu anlamına gelmektedir (151, 152). Bağlantı analizi, hastalıkla ilişkili genlerin yerini belirlemek, aile üyelerinin genetik verileri üzerinden, genetik belirteçlerin (SNP, STR) bir hastalık ile birlikte nasıl aktarıldığını analiz etmek için ve θ değerinin istatistiksel analizi için kullanılan bir yöntemdir. Bağlantı analizi, LOD (Logarithm of Odds) bağlantı saptanması olasılığının bağlantı gözlenmemesi olasılığına oranının logaritmik değeridir ve bu değer istatistiksel olarak değerlendirilmektedir. LOD skorun 3 ve üzeri olması bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilirken, 2 ve altında kalan değerler bağlantı olmadığını taşımaktadır. LOD skor analizi, iki noktalı (two-point) ve çok noktalı (multi-point) olarak yapılabilmektedir. İki noktalı analizde bir genetik belirteç ve bir hastalıkla ilişkili bölge arasındaki bağlantı araştırılmaktadır. Çok noktalı analizde ise birden fazla genetik belirteç kullanarak, birden fazla genetik lokus arasındaki ilişki incelenir (151, 152). Bağlantı analizinde parametrik (model bağımlı-kalıtım kalıbı biliniyor) ve parametrik olmayan yaklaşımlar (Mendelyen kalıtımın yetersiz kaldığı durumlar) kullanılarak yaygın olarak Allegro (153), Merlin (154), GeneHunter (155), SimWalk (156), FastLink (157) ve SuperLink (158) gibi programlar kullanılmaktadır. Bu programlar EasyLinkage (159) arayüzü ile çalıştırılarak istatistiksel

analizler yapılabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da EasyLINKAGE Plus v5.02 programı üzerinden model bağımlı parametrik yaklaşım ile LOD skor hesaplandı.



4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında TR-15, TR-37, TR-33, TR-59 ve TR-16 nolu beş ailede (Şekil 5-9) işitme kaybından sorumlu varyasyonların tüm ekzom dizileme yaklaşımı ile tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda TR-15, TR-37 ve TR-33 nolu ailelerde birer bireyde, TR-59 nolu ailede üç bireyde ve TR-16 nolu ailede 11 bireyde olmak üzere toplam 17 bireyde tüm ekzom dizileme gerçekleştirildi (Tablo 15). Yürütülen çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen işlemler aşağıda sırasıyla verildi.

4.1. Tüm Ekzom Dizileme Veri Analizi

Belirtilen teknik şartnameler (Ek 3, Ek 4) doğrultusunda gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ile ilk aşamada IDT xGen Exome Research Panel V2.0 kiti ile bir bireye ait iki yönlü (paired end) okuma için okuma başına yaklaşık 14 GB; Agilent SureSelect Human All Exon V6 +UTR r2 kiti ile gerçekleştirilen dizilemede yaklaşık 20 GB fastq verisi elde edildi. Tüm ekzom dizilemesi gerçekleştirilen her bir bireyin dizileme verileri Galaxy Europe Platformu'na yüklenerek ham verilerin ve hizalama kalitesinin kontrolü için analizler gerçekleştirildi. Analizler sonucunda IDT-xGen Exome Research Panel V2.0 kiti ile elde edilen okumalarda adaptör içeriği tespit edildi ve bu adaptörler çıkartıldı. Agilent SureSelect Human All Exon V6 +UTR r2 kiti ile dizilenen örneklerde adaptör içeriği yüklenici firma tarafından kırıldığı için tespit edilmedi. İki dizilemede de kitin kapsamı (genomun yüzde kaçına karşılık geldiği %), okunan toplam baz sayısı (bp) ve toplam okuma sayısı değerleri belirlendi. İki dizilemenin de Phred skorlarının 36-39 arasında olduğu; okumaların Q20 ve Q30 değerlerinin %90 üzeri olduğu, okumaların %40-60 aralığında GC içeriğine sahip olduğu tespit edildi. Her iki dizilemenin de %95'inin 50X ve üzeri derinlikte gerçekleştirildiği tespit edildi (Tablo 15).

Tablo 15. Tüm ekzom dizileme ham verilerinin kalite ve hizalama değerleri.

IDT xGen Exome Research Panel V2.0							
Aile	Birey	Phred Score	Kit Kapsam	Toplam okuma	Toplam baz (bp)	% Q30	% GC
TR-15	IV:7	37		64,070,884	5,715,738,018	94.3	52.2
TR-37	VI:3	37		68,063,087	6,110,921,780	95.7	50.9
TR-33	VI:2	37		72,037,700	6,659,558,579	96.9	50.5
TR-59	IV:1	37		71,869,085	6,528,808,589	96.4	48.1
	IV:2	36		86,152,922	7,927,595,311	96.0	47.5
	IV:4	36	%1.36	86,160,616	7,986,947,859	96.9	50.7
TR-16	IV:3	36		85,156,839	7,861,603,881	96.8	50.4
	IV:4	36		97,027,396	8,943,079,760	95.7	47.4
	V:4	36		103,575,983	9,544,028,878	96.0	47.8
	V:8	36		107,009,551	9,884,325,516	95.8	47.5
	V:10	36		58,341,186	5,035,043,754	95.2	49.5
	VI:1	36		108,933,139	9,997,096,225	95.9	47.6
Agilent SureSelect Human All Exon V6 +UTR r2							
Aile	Birey	Phred Score	Kit Kapsam	Toplam okuma	Toplam baz (bp)	% Q30	% GC
TR-16	V:2	39		109,207,948	16,490,400,148	95.6	48.6
	V:11	39		94,405,276	14,255,196,676	95.4	49.1
	VI:2	39	%2.82	101,510,976	15,328,157,376	95.5	48.9
	VI:7	39		105,203,374	15,885,709,474	95.4	49.0
	VI:8	39		100,208,674	15,131,509,774	95.7	48.3

4.2. Ailelerdeki İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Tespiti

Galaxy Europe Platformu kullanılarak her bir aile için oluşturulan varyasyon listeleri filtrelenildi ve tespit edilen aday varyasyonlar ACMG varyant sınıflandırma kriterlerine göre değerlendirildi.

Ekzom dizilemede, yalnızca protein kodlayan genlerin ekzonlarını hedefleyen kısa okuma dizilerinin olması ve kopya sayısı değişikliklerinin de (Copy Number Variation: CNV) büyük bir kısmının kodlamayan bölgelerde meydana gelmesinden dolayı, bu varyantların tespit edilmesinin sınırlamaları vardır. Ekzom dizileme ile kısa okuma uzunlukların hedeflenmesi, okuma derinliğindeki heterojenlik, genomda tekrarlayan

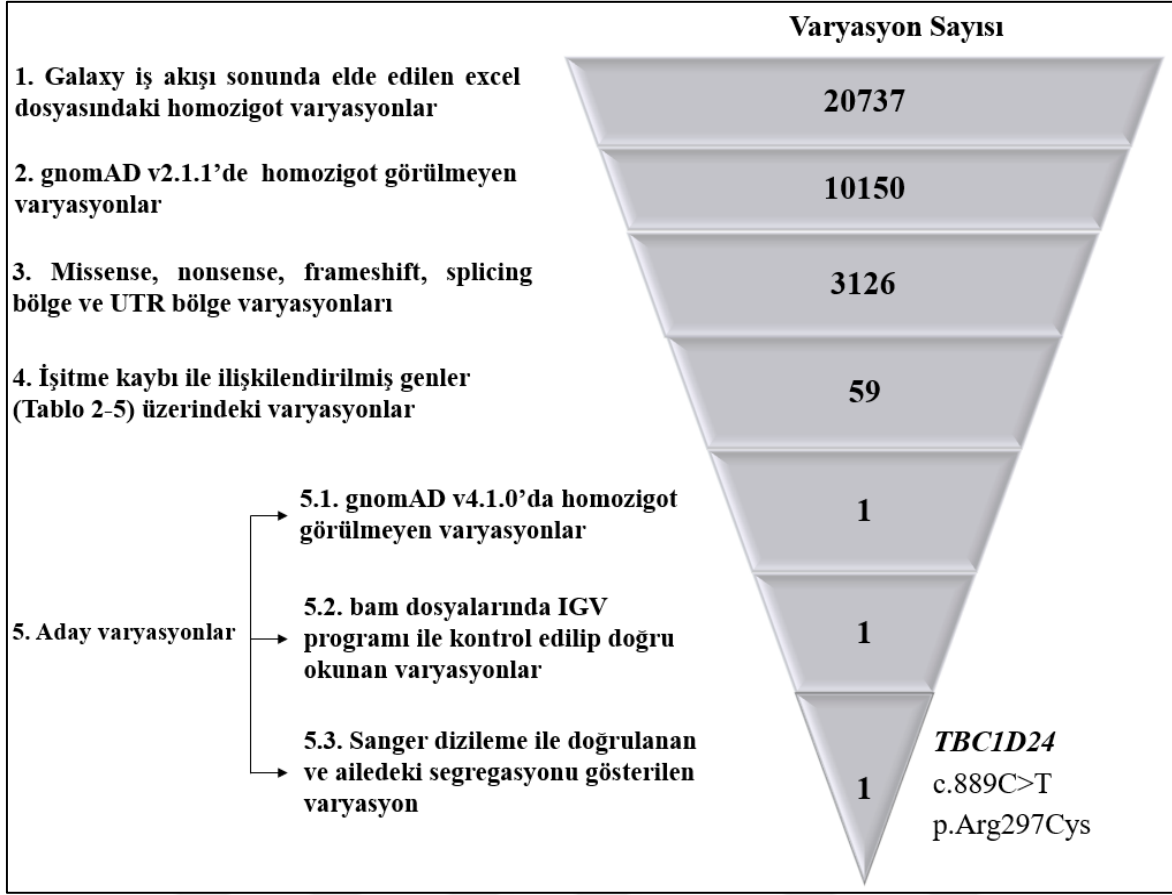
bölgelerin olması ve bu bölgelerin dizileme sırasında yanlış hizalanması CNV tespitini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple tez çalışmasında elde edilen ekzom verileri ile kopya sayısı değişiklikleri incelenemedi (84, 85, 160-163).

Bu çerçevede her bir ailede elde edilen bulgular bağımsız başlıklar altında aşağıda sunuldu.

4.2.1. TR-15 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi

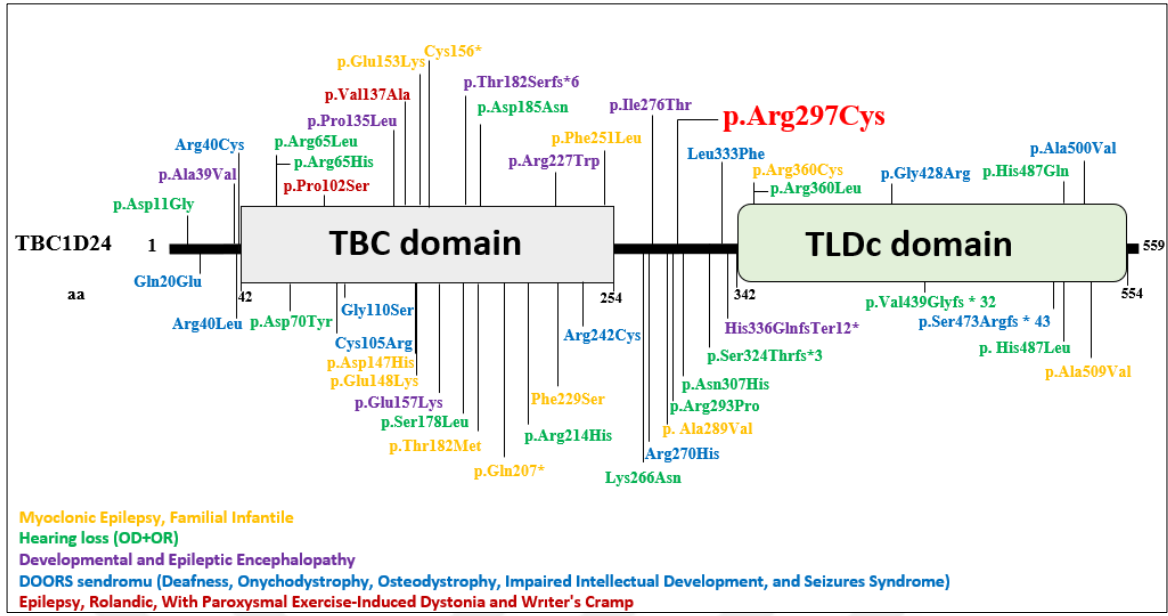
Sensörinöral işitme kaybı tanısı konulmuş dört etkilenmiş bireyin bulunduğu TR-15 nolu ailedeki (Şekil 5) III:1 ile III:2 numaralı sağlıklı bireyler arasındaki akraba evlilikleri ve bu evliliklerden işitme engelli ve sağlıklı çocukların dünyaya gelmiş olmaları dikkate alınarak ailedeki işitme kaybının otozomal resesif kalıtıldığı kanaatine varıldı. Ailedeki sorumlu varyasyonun belirlenebilmesi için IV:7 numaralı etkilenmiş birey ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Elde edilen ekzom verileri, Galaxy Europe Platformu iş akışı kullanılarak analiz edildi (Şekil 10). Analizler sonucunda otozomal resesif kalıtım kalıbına göre homozigot olarak kalıtılan 20737 varyasyon belirlendi. Tarafımızca oluşturulan filtreleme stratejisi (Şekil 11) kullanılarak belirlenen 20737 varyasyon ileri filtrelemeye tabi tutuldu.

Filtreleme sonucunda; daha önce sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı (DFNB86) (164), otozomal dominant işitme kaybı (DFNA65) (165) ile işitme kaybının eşlik ettiği “Developmental and Epileptic Encephalopathy (OMIM #615338)” (166), “Deafness, Onychodystrophy, Osteodystrophy, Impaired Intellectual Development, and Seizures Syndrome-DOORS syndrome (OMIM #220500)” (167) ve etmediği “Epilepsy, Rolandic, With Paroxysmal Exercise-Induced Dystonia and Writer’s Cramp (OMIM #608105)” (168), “Myoclonic Epilepsy, Familial Infantile (OMIM #605021)” (169) çeşitli sendromlarla ilişkilendirilmiş olan *TBC1D24* (NM_001199107) geni üzerinde yeni bir varyasyon (c.889C>T) tespit edildi (Şekil 11-12).



Şekil 11. TR-15 nolu ailede IV:7 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi.

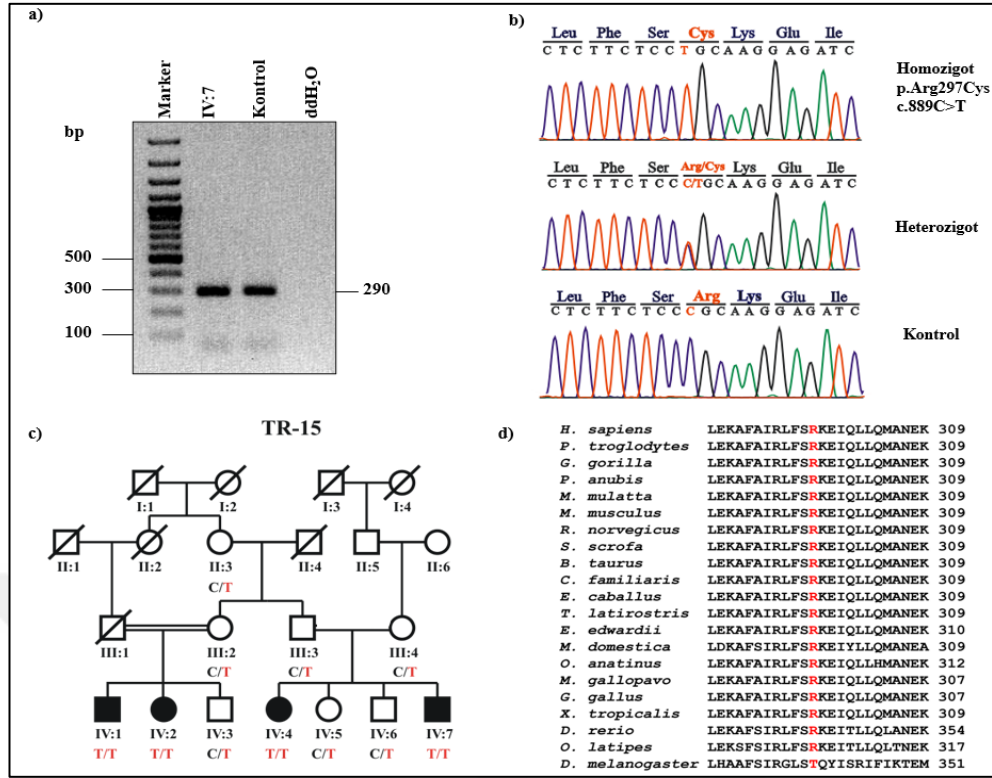
TBC1D24 geni üzerinde tespit edilen c.889C>T varyasyonu, 559 amino asitlik proteinin TBC (170) ve TLDc (171) domainleri arasında lokalize olan 297'nci pozisyonundaki pozitif yüklü arjinin amino asidinin polar, yüksüz bir amino asit olan sisteine dönüşmesine (p.Arg297Cys) neden olmaktadır (Şekil 12).



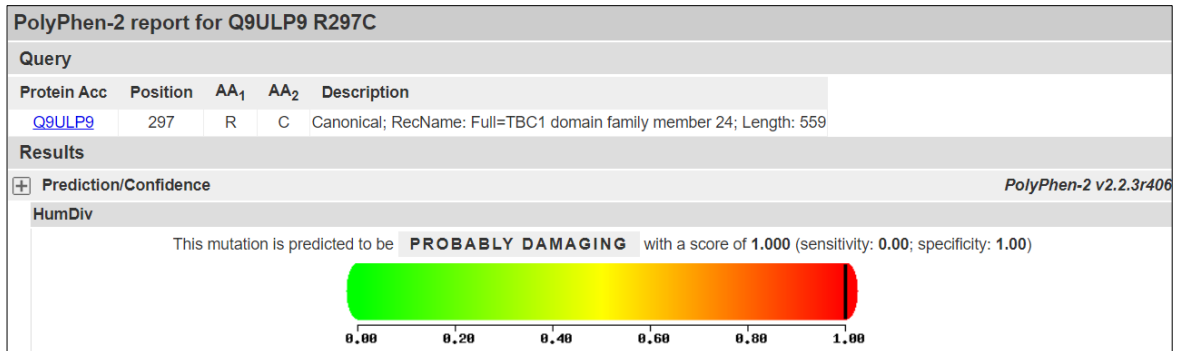
Şekil 12. TBC1D24 üzerinde daha önce tanımlanan varyasyonlar ve TR-15 nolu ailede tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi

TBC1D24 geni üzerinde tespit edilen ve gnomAD v4.1.0 veri tabanında allel frekansı 0.000004339 olan c.889C>T varyasyonunun ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 13a-c).

TBC1D24 üzerinde sisteine dönüştüğü tespit edilen 297'nci pozisyonundaki arjinin amino asidinin patolojik olup olmadığını belirlemeye yönelik yürütülen çoklu hizalama analizi sonucunda bu varyasyonun omurgalıları arasında korunmuş olduğu görüldü (Şekil 13d). Belirlen p.Arg297Cys varyasyonunun PolyPhen-2 (Şekil 14), SIFT (Şekil 15) ve Mutation Taster (Şekil 16) ile yapılan *in silico* analizler sonucunda patolojik olabileceği görüldü.



Şekil 13. TR-15 nolu ailede *TBC1D24* geni üzerinde tespit edilen c.889C>T varyasyonunun doğrulanması. **a)** Varyasyonun bulunduğu 290 bp'lik bölgenin Pr.1970 ve Pr.1971 nolu primerler ile amplifikasyonu. (Size marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder-SM0321), **b)** c.889C>T varyasyonun Sanger dizileme ile doğrulanması, **c)** c.889C>T varyasyonunun ailedeki ışıme kaybı ile kalıtımının gösterilmesi, **d)** TBC1D24 üzerinde değişim tespit edilen 297'nci pozisyonadaki arjinin amino asidinin çoklu hizalama ile analizi. 297'nci pozisyonadaki arjinin amino asidi kırmızı ile renklendirildi.



Şekil 14. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi

SIFT version 5.1.1, SIFT database release February 27, 2012

Coordinates	Codons	Ensembl Transcript ID	RefSeq Transcript ID	Known Transcript ID	CCDS Transcript ID	Ensembl Protein ID	RefSeq Protein ID
16,2547037-2547038,1,C/T	CGC-tGC	ENST00000434757	NM_001199107	uc002cql.2		ENSP00000390106	NP_001186036

Known Protein ID	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP Type	Prediction	Score	Median Info	# Seqs at position	User Comment
Q9ULP9	R297C	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0.02	2.77	34	

Şekil 15. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun SIFT aracı ile analizi



mutationit@sting

Prediction disease causing

Model: simple_aae, prob: 0.9999999993391 (explain)

Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr16:2547038C>TN/A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	TBC1D24
Ensembl transcript ID	ENST00000567020
Genbank transcript ID	NM_001199107
UniProt peptide	Q9ULP9
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.889C>T cDNA.1029C>T g.21892C>T
AA changes	R297C Score: 180 explain score(s)

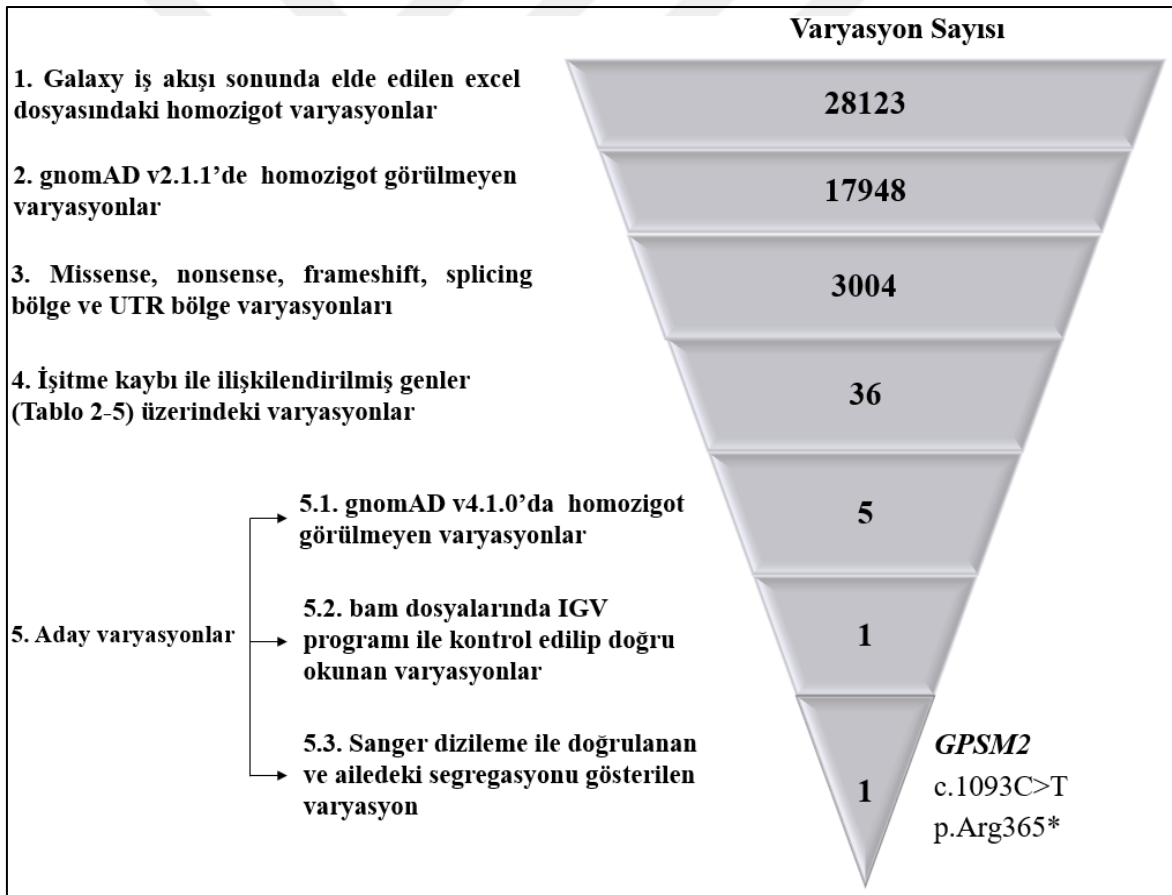
Şekil 16. TBC1D24 üzerinde tespit edilen p.Arg297Cys varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi

TR-15 nolu ailede *TBC1D24* geni üzerinde tespit edilen c.889C>T (p.Arg297Cys) varyasyonu Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portal'ında yer almadığı görüldü. Ayrıca, AlphaMissense verilerinde varyasyonun patojenite skorunun 0.5192 olduğu ve belirsiz "ambiguous" olarak sınıflandırıldığı tespit edildi.

4.2.2. TR-37 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi

Sensörinöral işitme kaybı tanısı almış iki etkilenmiş bireyin bulunduğu TR-37 nolu ailede (Şekil 6) V:1 ile V:2 numaralı sağlıklı bireyler arasındaki akraba evliliği ve bu evlilikten hasta ve sağlıklı çocukların dünyaya gelmiş olması dikkate alınarak ailedeki işitme kaybının otozomal resesif kalıtıldığı değerlendirildi. Ailede işitme kaybından sorumlu

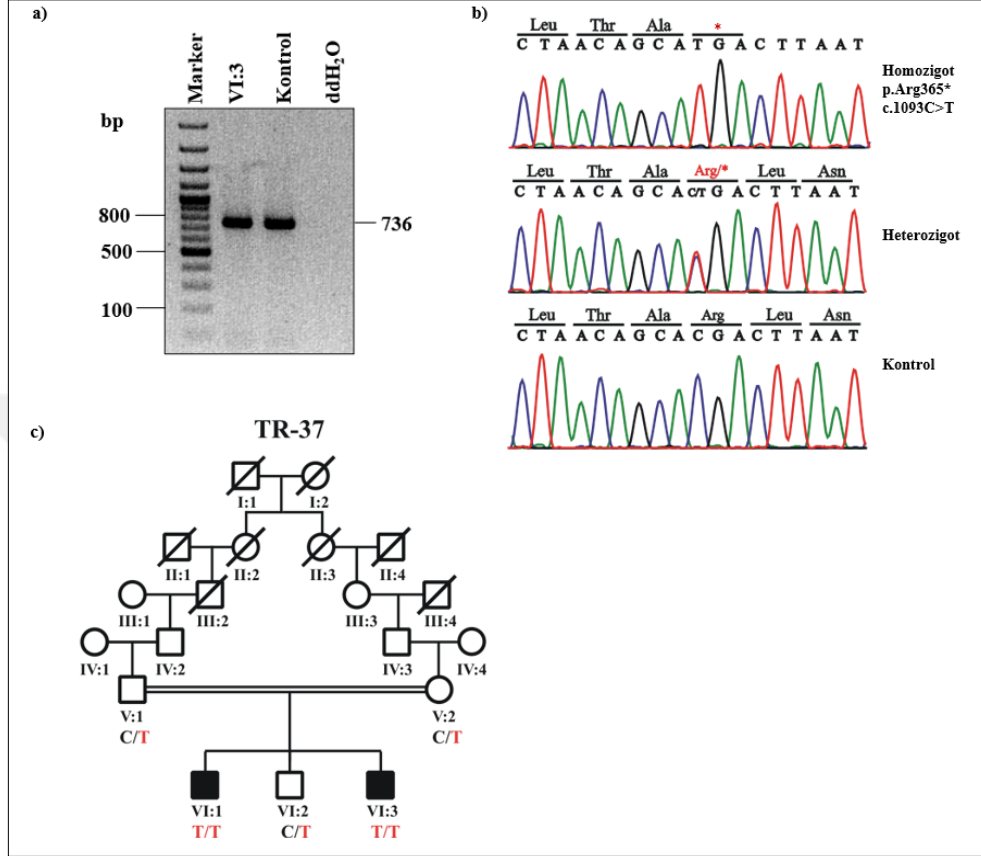
varyasyonun belirlenebilmesi için VI:3 numaralı birey tüm ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Elde edilen ekzom verileri, Galaxy Europe Platformu iş akışı (Şekil 10) kullanılarak analiz edildi. Analiz sonucunda ailedeki VI:3 numaralı bireyde homozigot olarak kalıtılan 28123 varyasyon belirlendi. Tarafımızca belirlenen filtreleme stratejisi kullanılarak bu varyasyonlar filtrelemeye tabi tutuldu (Şekil 17). Filtreleme sonucunda, daha önce DFNB83 lokusu üzerinden sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olup sonrasında işitme kaybının da eşlik ettiği kısmi korpus kallozum agenezi gibi çeşitli merkezi sinir sistemi anomalileri ile karakterize Chudley–McCullough Sendromu (OMIM #604213) ile ilişkilendirilen *GPSM2* (NM_001321038.1) (172, 173) geni üzerinde, Chudley–McCullough Sendromu (OMIM #604213) tansı konulan dizigotik iki kardeşle rapor edilmiş olan c.1093C>T (p.Arg365*) varyasyonu tespit edildi (174) (Şekil 18).



Şekil 17. TR-37 nolu ailede VI:3 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Ekzom dizileme ile *GPSM2* geni üzerinde tespit edilen c.1093C>T varyasyonunun bulunduğu bölge ailedeki tüm bireylerde PCR ile amplifiye edildi (Şekil 18a). Elde edilen

amplikonlar Sanger dizileme ile dizilenecek tespit edilen varyasyon doğrulanırken (Şekil 18b) bu varyasyonun ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 18c).



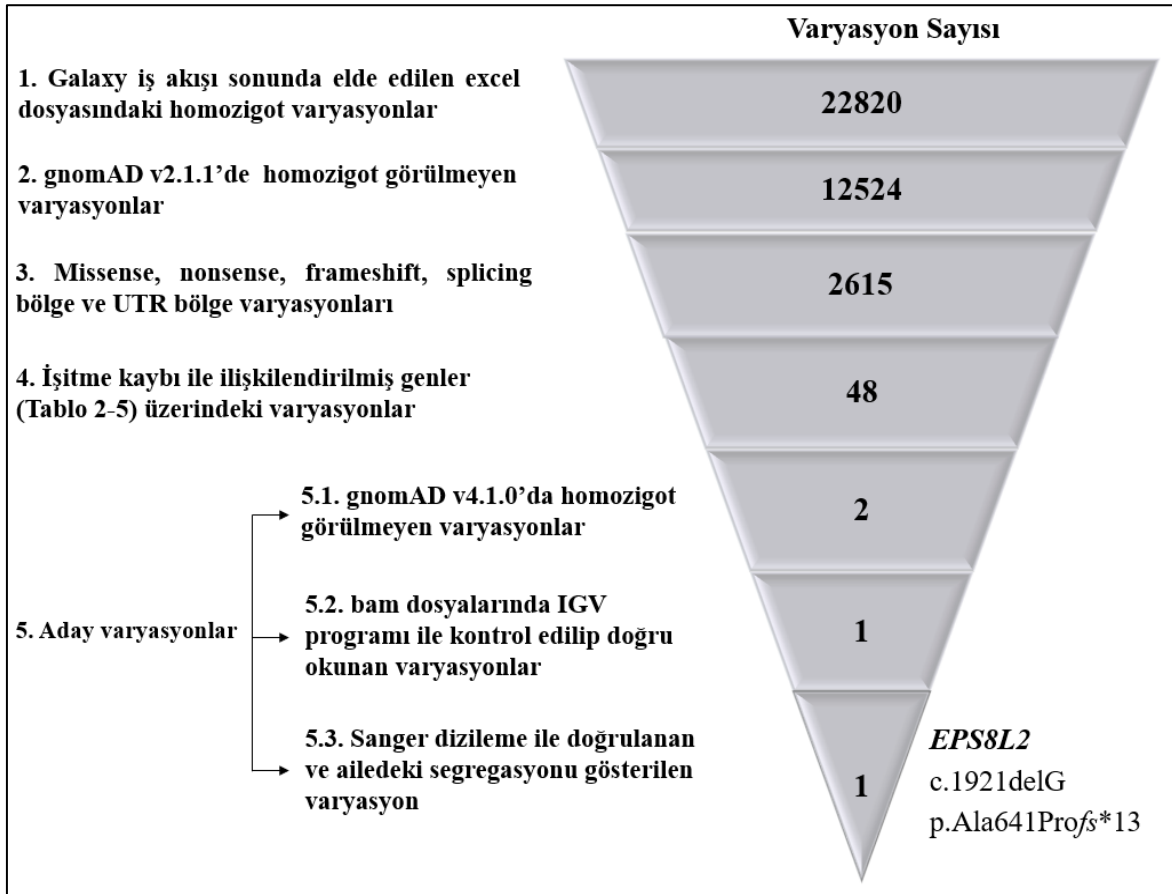
Şekil 18. TR-37 nolu ailede *GPSM2* geni üzerinde tespit edilen c.1093C>T varyasyonunun doğrulanması. **a)** Varyasyonun bulunduğu 736 bp’lik bölgenin Pr.1968 ve Pr.1969 nolu primerler ile amplifikasyonu. (Size marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder-SM0321), **b)** c.1093C>T varyasyonun Sanger dizileme ile doğrulanması, **c)** c.1093C>T varyasyonunun ailedeki işitme kaybı ile kalıtımının gösterilmesi

TR-37 nolu ailede *GPSM2* geni üzerinde tespit edilen c.1093C>T (p.Arg365*) varyasyonun Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portal’ında yer almadığı görüldü.

4.2.3. TR-33 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi

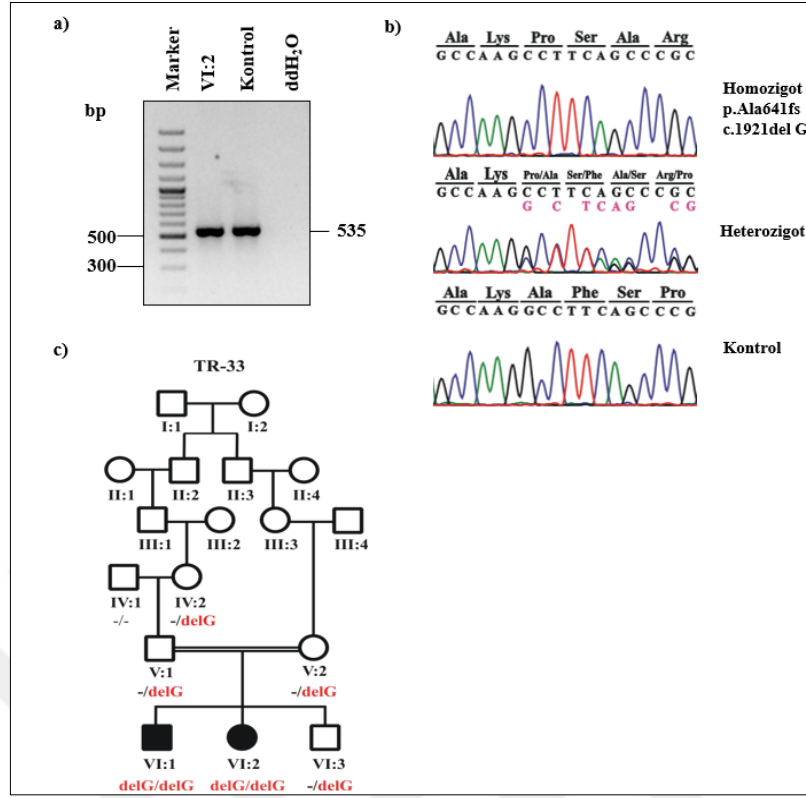
Sensörinöral işitme kaybı tanısı almış iki etkilenmiş bireyin bulunduğu TR-33 nolu ailede (Şekil 7) V:1 ile V:2 numaralı sağlıklı bireyler arasındaki akraba evliliği ve bu evlilikten hasta ve sağlıklı çocukların dünyaya gelmiş olması dikkate alınarak ailedeki işitme kaybının otozomal resesif kalıtıldığı değerlendirildi. Ailedeki sorumlu varyasyonun belirlemek üzere VI:2 numaralı birey tüm ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Elde edilen ekzom verileri, Galaxy Europe Platformu iş akışı (Şekil 10) kullanılarak analiz edildi. Analizler

sonucunda VI:2 numaralı bireyde homozigot olarak kalıtılan 22820 varyasyon tespit edildi. Belirlenen varyasyonların filtrelemesi sonucunda DFNB106 lokusunda sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan *EPS8L2* (NM_022772.3) geni (175) üzerinde bir nükleotitlik yeni bir delesyon (c.1921delG) tespit edildi (Şekil 19). Proteinin okuma çerçevesi incelendiğinde tespit edilen bu delesyonun, gen üzerinde daha önce tanımlanan iki varyasyon gibi (175, 176) protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Ala641Profs*13) neden olduğu görüldü (Şekil 20a).



Şekil 19. TR-33 nolu ailede VI:2 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Ekzom dizileme ile *EPS8L2* geni üzerinde tespit edilen c.1921delG varyasyonunun bulunduğu bölge PCR ile amplifiye edildi (Şekil 20a). Elde edilen ampikonlar Sanger dizileme ile dizilenerek tespit edilen varyasyon doğrulanırken (Şekil 20b) varyasyonun ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 20c).



Şekil 20. TR-33 nolu ailede *EPS8L2* geni üzerinde tespit edilen c.1921delG varyasyonunun doğrulanması. **a)** Varyasyonun bulunduğu 535 bp’lik bölgenin Pr.1999 ve Pr.2000 nolu primerler ile amplifikasyonu. (Size marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder-SM0321), **b)** c.1921delG varyasyonunun Sanger dizileme ile doğrulanması, **c)** c.1921delG varyasyonunun ailedeki işitme kaybı ile kalıtımının gösterilmesi

EPS8L2 (Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2) proteini 715 amino asitten oluşmaktadır ve başka bir izoformu bulunmamaktadır. Pfam aracı kullanılarak yapılan analiz sonucunda EPS8L2 proteini üzerinde bir adet PTB (Phosphotyrosine-Binding domain); bir adet SH3 (Src homology domain 3) ve bir adet SAM (Sterile alpha motif) domaini olduğu belirlendi. Ailede tespit edilen varyasyonun ise proteinin SAM domaininin bir kısmından sonrasının delesyonuna neden olduğu görüldü (Şekil 21).

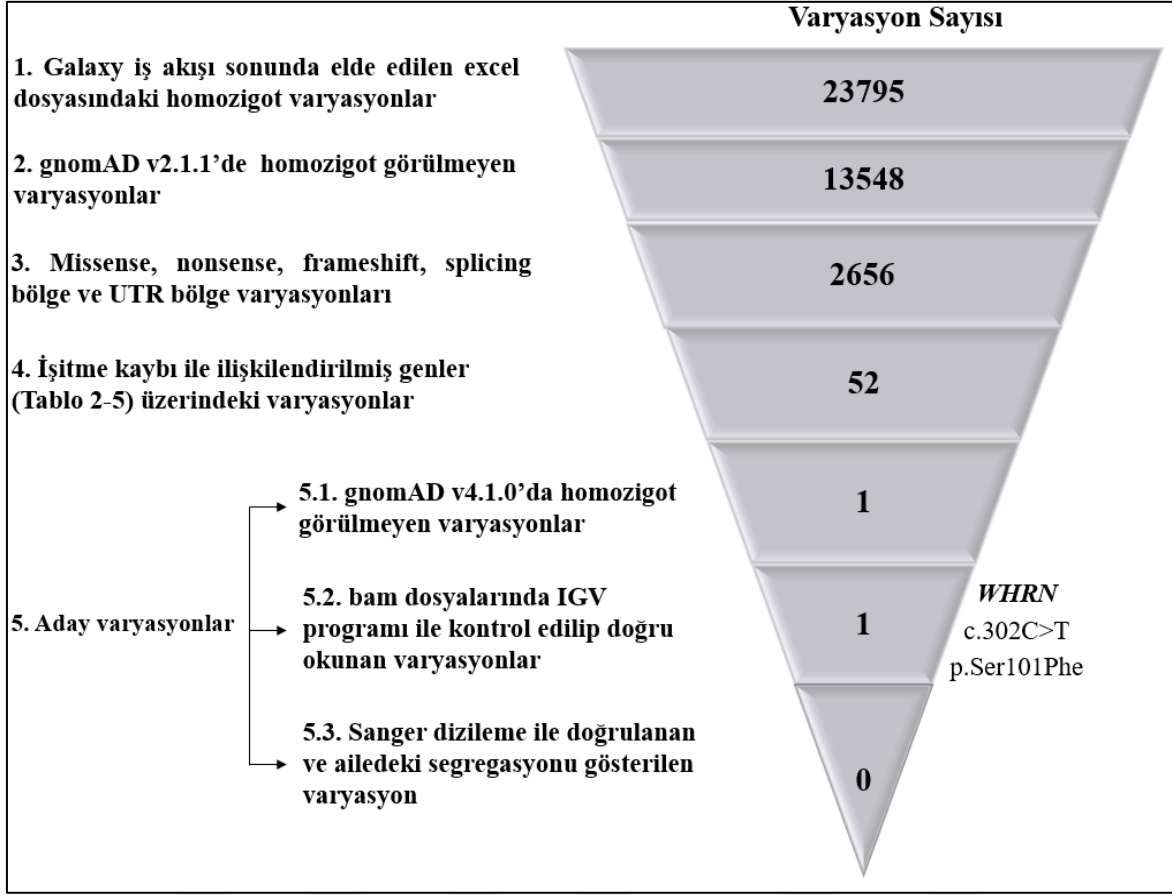


Şekil 21. EPS8L2 üzerinde daha önce tanımlanan varyasyonlar ve TR-33 nolu ailede tespit edilen p.Ala641Profs*13 varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi.

TR-33 nolu ailede *EPS8L2* geni üzerinde tespit edilen c.1921delG (p.Ala641Profs*13) varyasyonunun Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portal’ında yer almadığı görüldü.

4.2.4. TR-59 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi

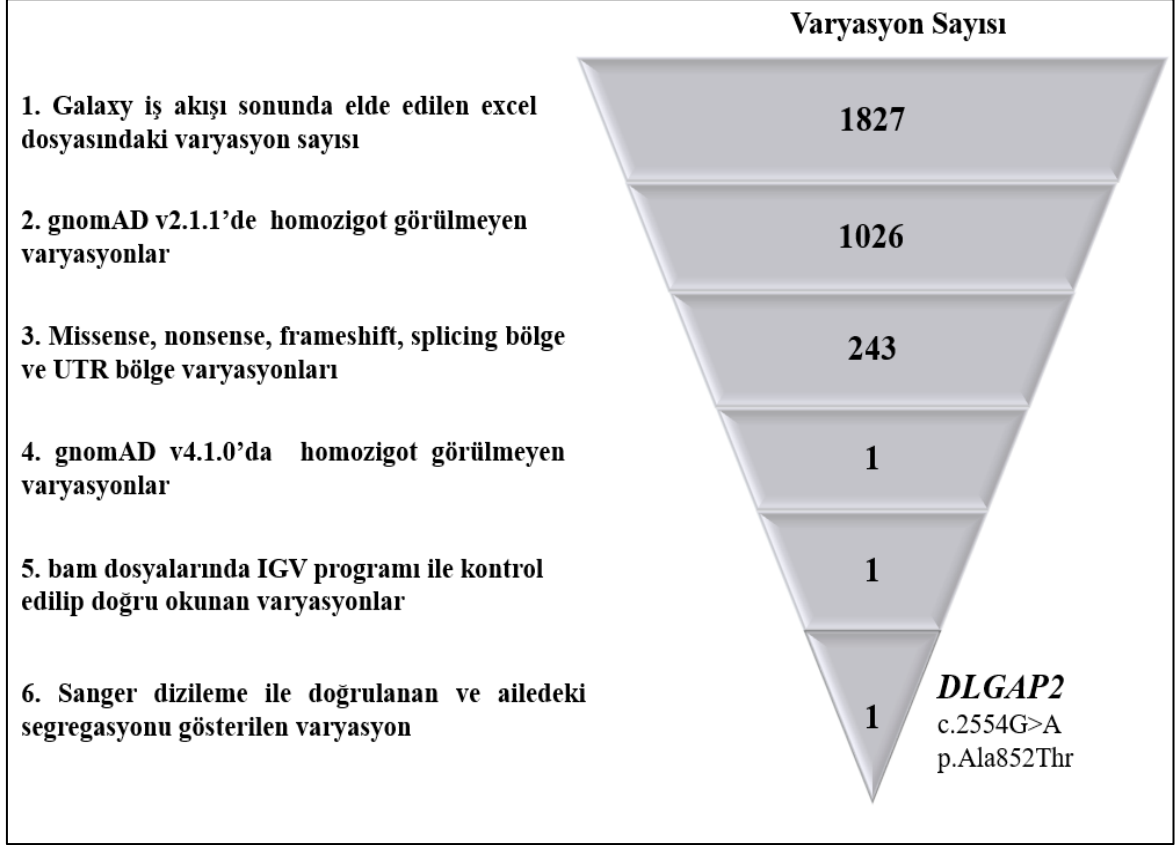
Sensörinöral işitme kaybı tanısı almış üç etkilenmiş bireyin bulunduğu TR-59 nolu ailede (Şekil 8) III:1 ve III:2 numaralı sağlıklı bireyler arasındaki akraba evliliği ve bu evlilikten hasta ve sağlıklı çocukların dünyaya gelmiş olması dikkate alınarak ailedeki işitme kaybının otozomal resesif kalıtıldığı değerlendirildi. Ailede sorumlu varyasyonun belirlenebilmesi için IV:4 numaralı birey ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Elde edilen ekzom verileri Galaxy Europe Platformu iş akışı (Şekil 10) kullanılarak analiz edildi. Analizler sonucunda otozomal resesif kalıtım kalıbına göre IV:4 numaralı bireyde homozigot olarak kalıtılan 23795 varyasyon tespit edildi. Ailedeki sorumlu varyasyonu işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş genler üzerinde aramaya yönelik olarak uygulanan filtreleme sonucundan *WHRN* (DFNB31 lokusu) geni (177, 178) üzerinde c.302C>T (p.Ser101Phe) varyasyonuna ulaşıldı (Şekil 22).



Şekil 22. TR-59 nolu ailede IV:4 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Tespit edilen varyasyonun gnomAD v4.1.0 (Erişim Tarihi: 22 Ekim 2024) veri tabanında minör alele frekansının 0.0000006214 olması ve homozigot olarak görülmemiş olması dikkate alınarak varyasyonun ailedeki işitme kaybından sorumlu olabileceği değerlendirildi. Sanger dizileme sonucunda okumanın doğru olduğu görülürken, varyasyonun ailedeki iki etkilenmiş bireyinde (IV:1 ve IV: 3) heterozigot olduğu görüldü. Bu sonuç, *WHRN* geni üzerinde tespit edilen c.302C>T varyasyonunu dışlarken ailedeki işitme kaybından sorumlu varyasyonun yeni bir gen üzerinde olabileceği şeklinde değerlendirildi. Ailedeki işitme kaybından sorumlu varyasyonu yeni bir gen üzerinde aramak üzere biri etkilenmiş (IV:1) ve diğeri sağlıklı (IV:2) olmak üzere iki birey daha tüm ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Ailedeki üç bireyin (IV:4, IV:1, IV:2) tüm ekzom dizileme verileri Galaxy Europe Platform'unda analiz edildi (Şekil 10). Etkilenmiş iki kardeşle homozigot (IV:1 ve IV:4) ve sağlıklı kardeşle (IV:2) aynı homozigotluğu taşımayan toplam 1827 varyasyon belirlendi. Yeni gen tanımlamaya yönelik olarak oluşturulan filtreleme stratejisi (Şekil 23) uygulandığında 1826 varyasyon dışlandı ve ailedeki işitme kaybının

etiyojisini tanımlamaya yönelik aday olabilecek *DLGAP2* geni üzerindeki tek bir varyasyona ulaşıldı (Tablo 16).



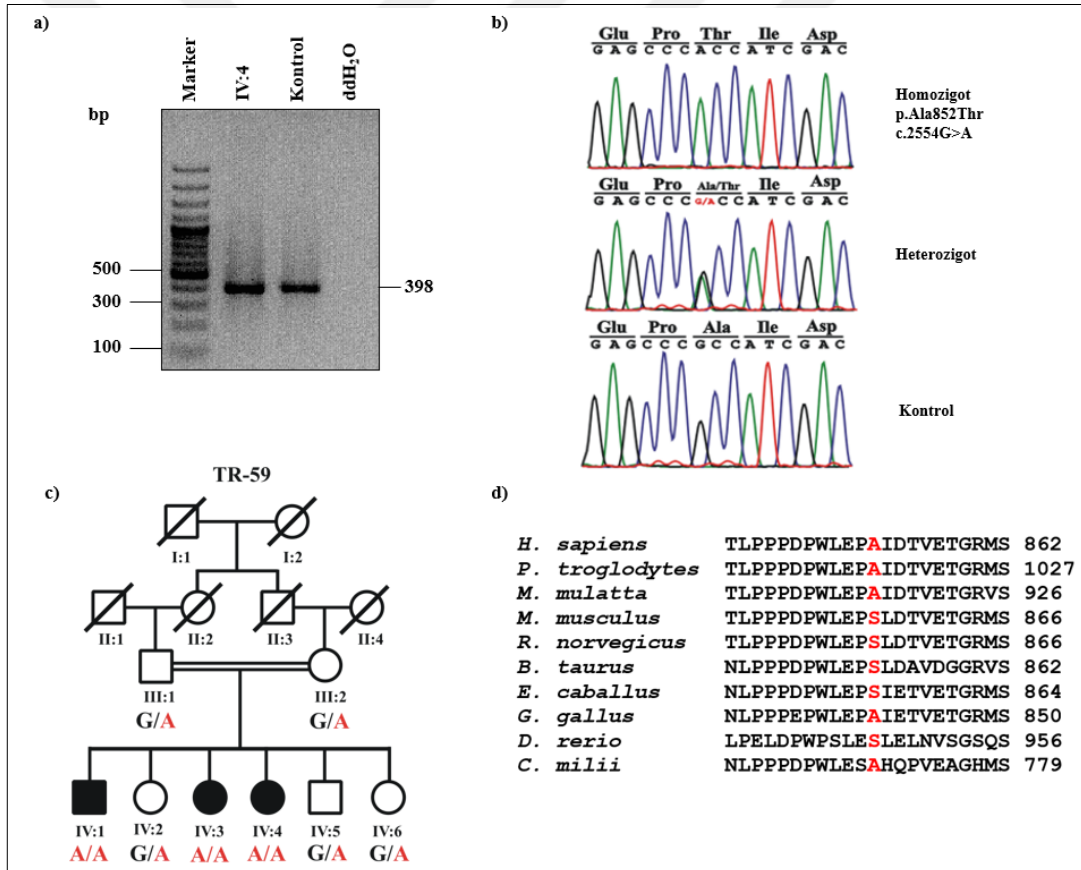
Şekil 23. TR-59 nolu ailede IV:1, IV:2 ve IV:4 numaralı bireylerin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Tablo 16. TR-59 nolu ailede IV:1, IV:2 ve IV:4 numaralı bireylerin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen aday varyasyon.

Kromozom	Gen İsmi	Transkript	DNA Değişimi	Amino asit Değişimi	Varyasyon Türü
chr8p23.3	<i>DLGAP2</i>	NM_001346810.2	c.2554G>A	p.Ala852Thr	Missense

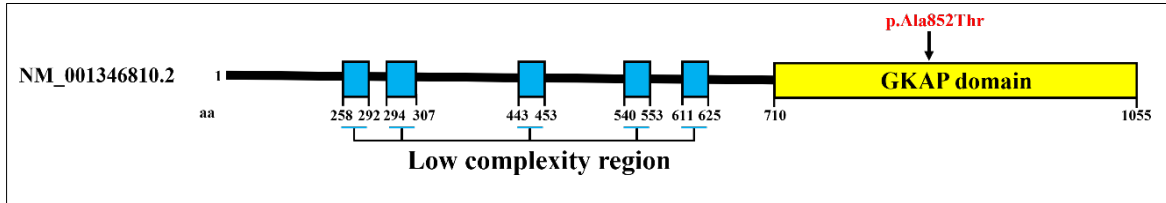
4.2.4.1. TR-59 Nolu Ailede *DLGAP2* Geni Üzerinde Tespit Edilen c.2554G>A Varyasyonunun Doğrulanması ve Segregasyonunun Belirlenmesi

TR-59 nolu ailede *DLGAP2* (NM_001346810.2) geni üzerinde tespit edilen c.2554G>A (rs781504764) varyasyonunun doğrulanmasına yönelik olarak varyasyonun yer aldığı gen bölgesi tüm aile bireylerinde PCR ile amplifiye edildi (Şekil 24a). Elde edilen ampliconlar Sanger yöntemi ile dizilendi (Şekil 24b) ve varyasyonun ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 24c). Farklı türlerdeki *DLGAP2* ortologları çoklu hizalama ile analiz edildiğinde 852'nci pozisyonundaki alanin amino asidinin omurgalıların tamamında korunmadığı, alanin amino asidi yerine serin amino asidinin geldiği görüldü (Şekil 24d).



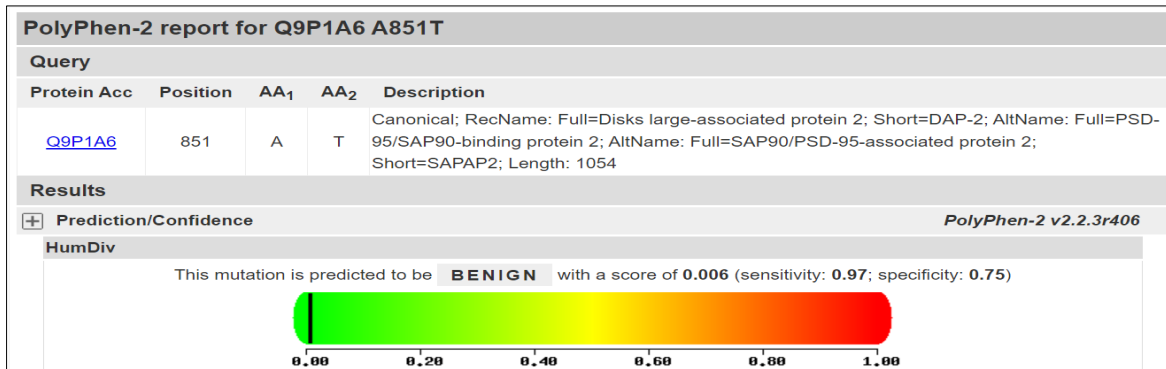
Şekil 24. TR-59 nolu ailede *DLGAP2* geni üzerinde tespit edilen c.2554G>A varyasyonunun doğrulanması. **a)** Varyasyonun bulunduğu 398 bp'lik bölgenin Pr.2172 ve Pr.2173 nolu primerler ile amplifikasyonu (Size marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder-SM0321), **b)** c.2554G>A varyasyonunun Sanger dizileme ile doğrulanması, **c)** c.2554G>A varyasyonunun ailedeki işitme kaybı ile kalıtımının gösterilmesi, **d)** *DLGAP2* üzerinde değişim tespit edilen 852'nci pozisyonundaki alanin amino asidinin (kırmızı ile renklendirildi) çoklu hizalama ile analizi.

DLGAP2 geni 1055 amino asitlik DLGAP2 (Discs Large-Associated Protein 2) proteini kodlamaktadır ve protein üzerindeki domainleri belirlemeye yönelik olan Pfam aracına göre protein üzerinde bir adet GKAP (Guanylate-kinase-associated protein) domaini bulunmaktadır. Ailede tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonu proteinin GKAP domaini üzerinde yer almaktadır (Şekil 26).



Şekil 26. DLGAP2 proteini üzerindeki domainlerin şematik gösterimi ve tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi

DLGAP2 üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun patolojik etkisini belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda PolyPhen-2 (Şekil 27) ve SIFT (Şekil 28) araçları p.Ala852Thr değişimini benign, Mutation Taster (Şekil 29) ise polimorfizm olarak değerlendirdi.

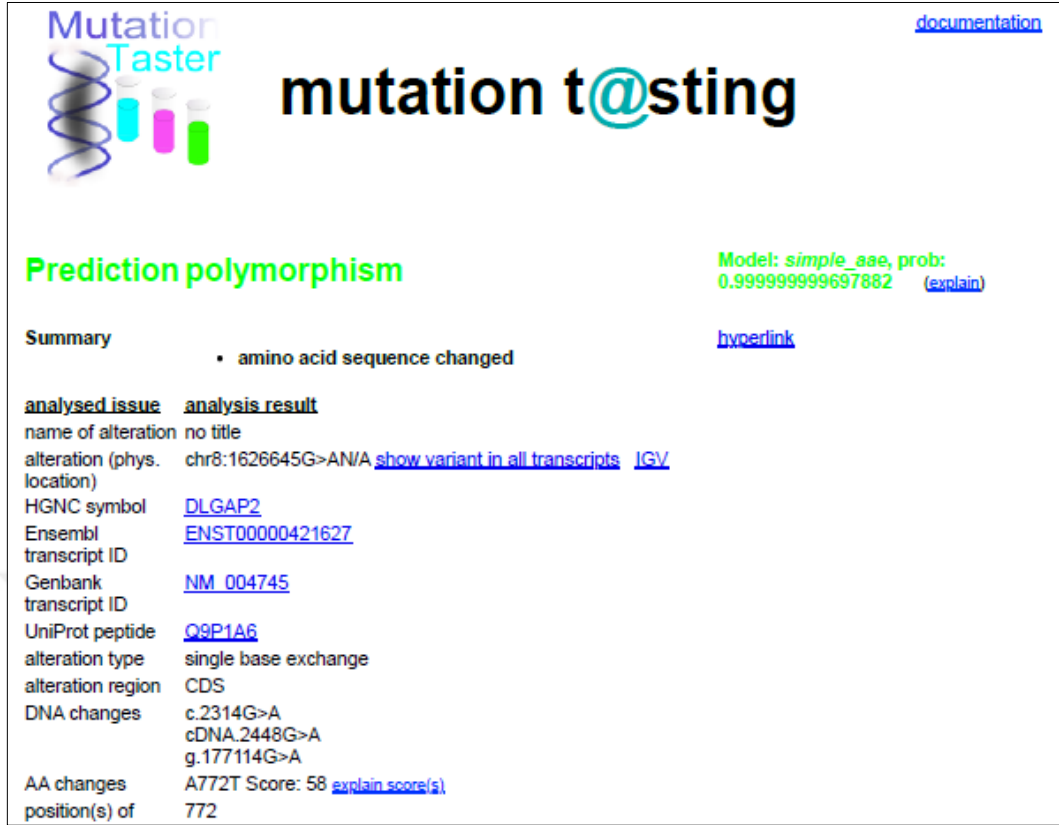


Şekil 27. DLGAP2 üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi

SNP	ORGANISM/BUILD	CHR	COORDINATE	REF ALLELE	ALT ALLELE	AMINO ACID CHANGE	GENE NAME	GENE ID	TRANSCRIPT ID
rs781504764	Not found								

PROTEIN ID	REGION	SIFT SCORE	SIFT MEDIAN	NO OF SEQS AT POSITION	SIFT PREDICTION	AVG ALLELE FREQ	EAS ALLELE FREQ	AMR ALLELE FREQ	AFR ALLELE FREQ	EUR ALLELE FREQ	SAS ALLELE FREQ
------------	--------	------------	-------------	------------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Şekil 28. DLGAP2 üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun SIFT aracı ile analizi

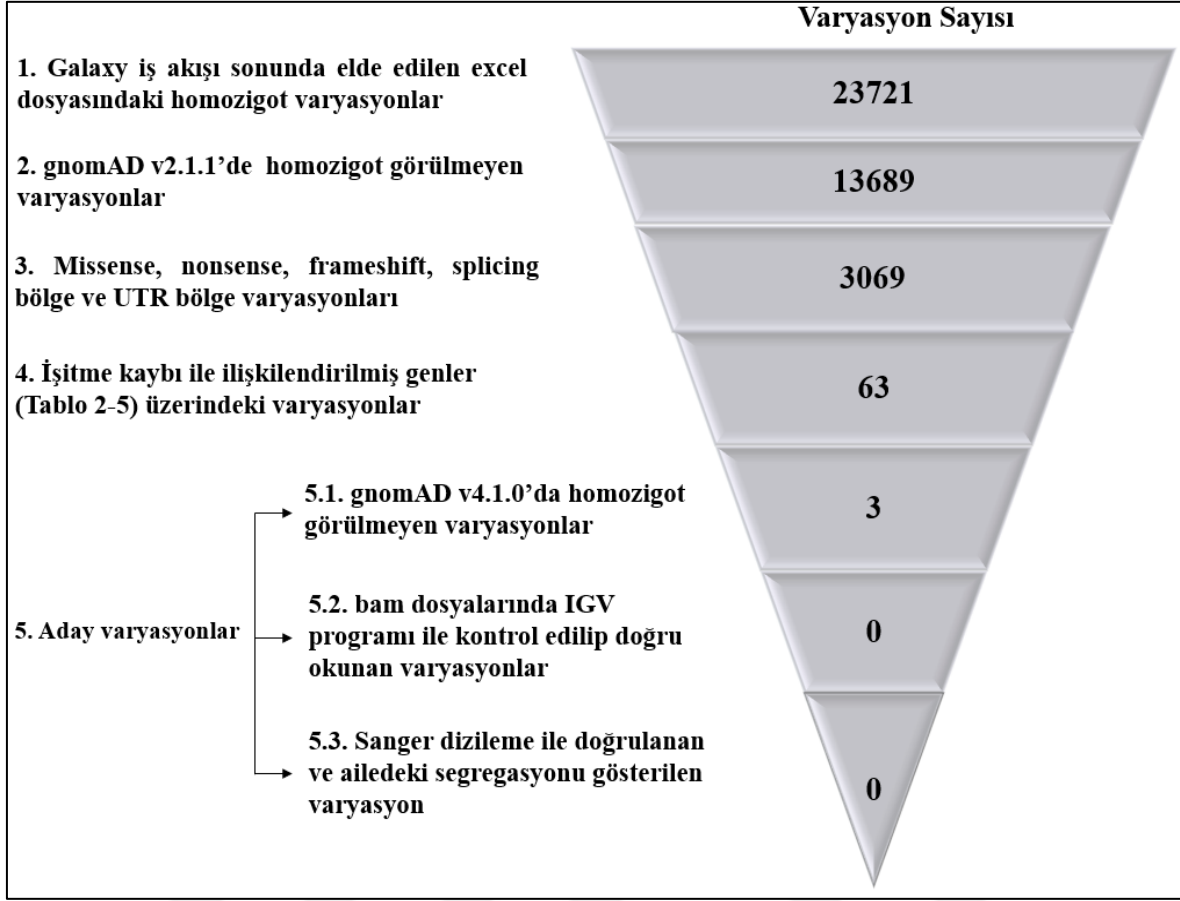


Şekil 29. DLGAP2 üzerinde tespit edilen p.Ala852Thr varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi

Bununla birlikte, c.2554G>A (p.Ala852Thr) varyasyonun Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portal’ında yer almadığı görüldü.

4.2.5. TR-16 Nolu Ailede İşitme Kaybından Sorumlu Varyasyonun Belirlenmesi

TR-16 nolu ailede (Şekil 9a) III:4 ve III:5 numaralı bireylerin akraba evliliğinden bir sağlıklı (IV:2) ve bir etkilenmiş bireyin (IV:3) dünyaya gelmiş olması dikkate alındığında ailedeki işitme kaybının otozomal resesif kalıtıldığı kanaatine varıldı. Bu çerçevede, ailedeki sorumlu varyasyonun belirlenebilmesi için IV:3 numaralı birey tüm ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Elde edilen ekzom verileri, Galaxy Europe Platformu iş akışı (Şekil 10) kullanılarak analiz edildi. Analizler sonucunda IV:3 numaralı bireyde 23721 homozigot varyasyon belirlendi. Otozomal resesif kalıtım kalıbına göre yapılan filtreleme sonucunda daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş genlerden herhangi birinde patolojik olabilecek bir varyasyon tespit edilemedi (Şekil 30).



Şekil 30. TR-16 nolu ailede IV:3 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Bu durum, ailedeki işitme kaybından sorumlu varyasyonun yeni bir gen üzerinde olabileceği şeklinde değerlendirildi. Bu aşamaya geçmeden önce, aile ile yeniden iletişime geçildi ve yapılan görüşmelerde, ailede yeni evliliklerin olduğu ve bir kısmı işitme engelli olan yeni bireylerin doğduğu öğrenildi. Alınan yeni bilgiler ışığında aile ağacı güncellendi (Şekil 9b). Güncellenen ailedeki evlilikler dikkate alınarak aile ağacı TR-16_GPGY, TR-16 ve TR-16_ROK olmak üzere üç alt aile olarak değerlendirildi (Şekil 9b). Güncellenen aile ağacında; aralarında akrabalık tarif edilmeyen ve işitme engelli olan V:2 ve V:3 numaralı bireylerin evliliğinden dünyaya gelen iki çocuktan VI:2 numaralı bireyin sağlıklı olması, V:2 numaralı bireyin sağlıklı olan anne (IV:1) ile babası (III:3) arasında akrabalığın olması V:2 numaralı bireydeki işitme kaybının otozomal resesif olduğunu işaret ederken bu durumun TR-16 nolu ailedeki işitme kaybının otozomal dominant olarak kalıtıldığını desteklediği görüldü. Bununla birlikte, ailenin TR-16_ROK kısmının bir üyesi olan V:11 numaralı bireyin anne babasının akraba evliliği yapmış olması ve kendisi gibi iki kardeşinin (V:18,

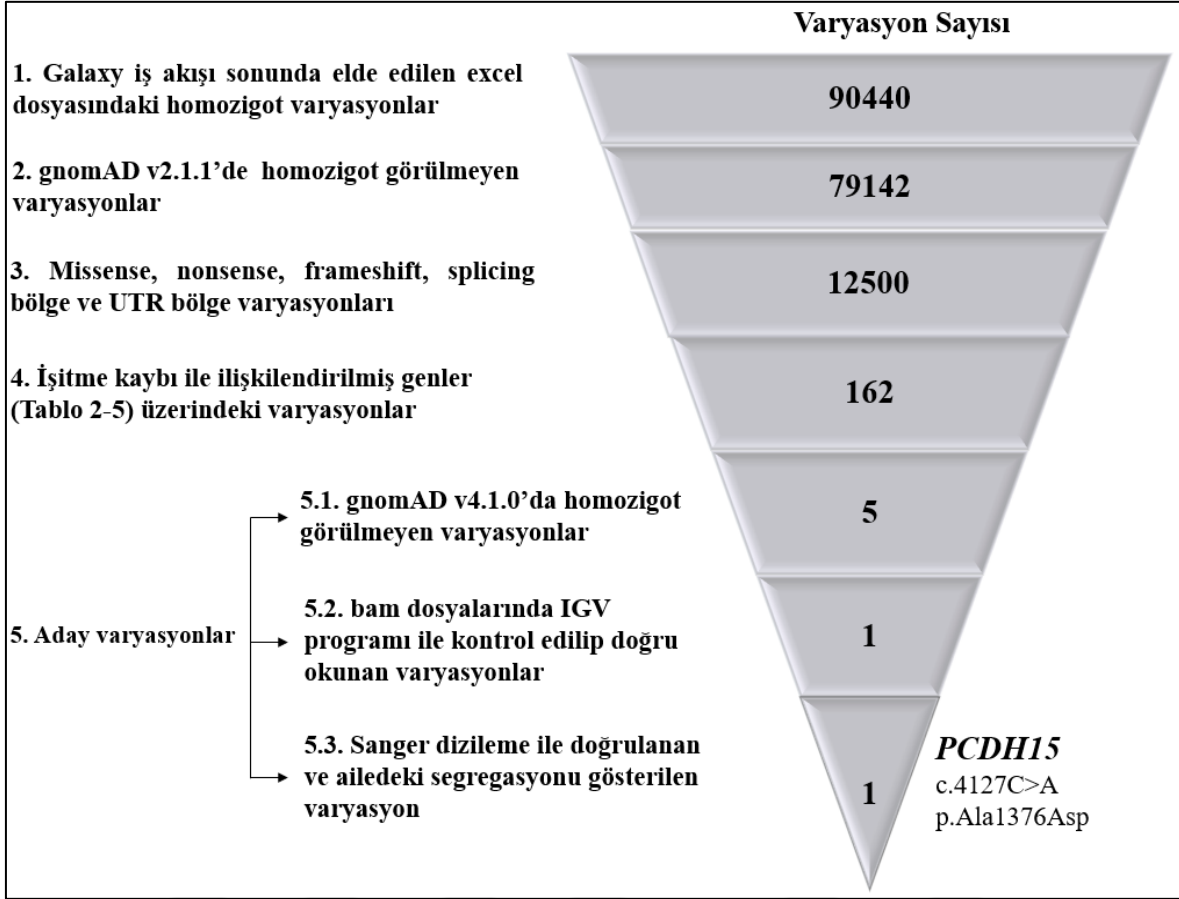
V:22) daha işitme engelli olması bu bireydeki işitme kaybının da otozomal resesif kalıtmı olabileceğini desteklediği görüldü. Bu durumda, ailedeki VI:7 ve VI:8 numaralı bireylerde görülen işitme kaybı fenotipinin, işitme engelli olan V:11 numaralı babadan bağımsız olarak, TR-16 nolu ailedeki dominant etkinin sonucu olduğu şeklinde değerlendirildi.

Bu koşullarda, ailedeki etkilenmiş bireylerdeki genetik etiyolojiyi belirlemeye yönelik olarak IV:3 numaralı bireye ilave olarak, IV:4, V:2, V:4, V:8, V:10, V:11, VI:1, VI:2, VI:7 ve VI:8 numaralı bireyler de tüm ekzom dizilemeye tabi tutuldu. Bu veriler kullanılarak aşağıda verilen yaklaşım ile TR-16 nolu ailedeki işitme kaybından sorumlu gen ve patoloji araştırıldı.

- i. İlk aşamada VI:1 numaralı etkilenmiş bireyin, babasından (V:2) bağımsız olarak, annesinden (V:3) kalıtılan dominant etkili bir varyasyon sonucu işitme kayıplı olduğunu ortaya koymak üzere V:2 numaralı birey otozomal resesif kalıtım kalıbına göre analiz edildi.
- ii. İkinci aşamada VI:7 ve VI:8 numaralı etkilenmiş bireylerin, babalarından (V:11) bağımsız olarak, annelerinden (V:10) kalıtılan dominant etkili bir varyasyon sonucu işitme kayıplı olduğunu göstermek için V:11 numaralı birey otozomal resesif kalıtım kalıbına göre analiz edildi.
- iii. TR-16 nolu ailedeki otozomal dominant kalıtılan işitme kaybından sorumlu olabilecek varyasyon, fenotipin oraya çıkışında V:2 ve V:11 numaralı bireylerin olası etkisi dışında tutulacak şekilde araştırıldı.

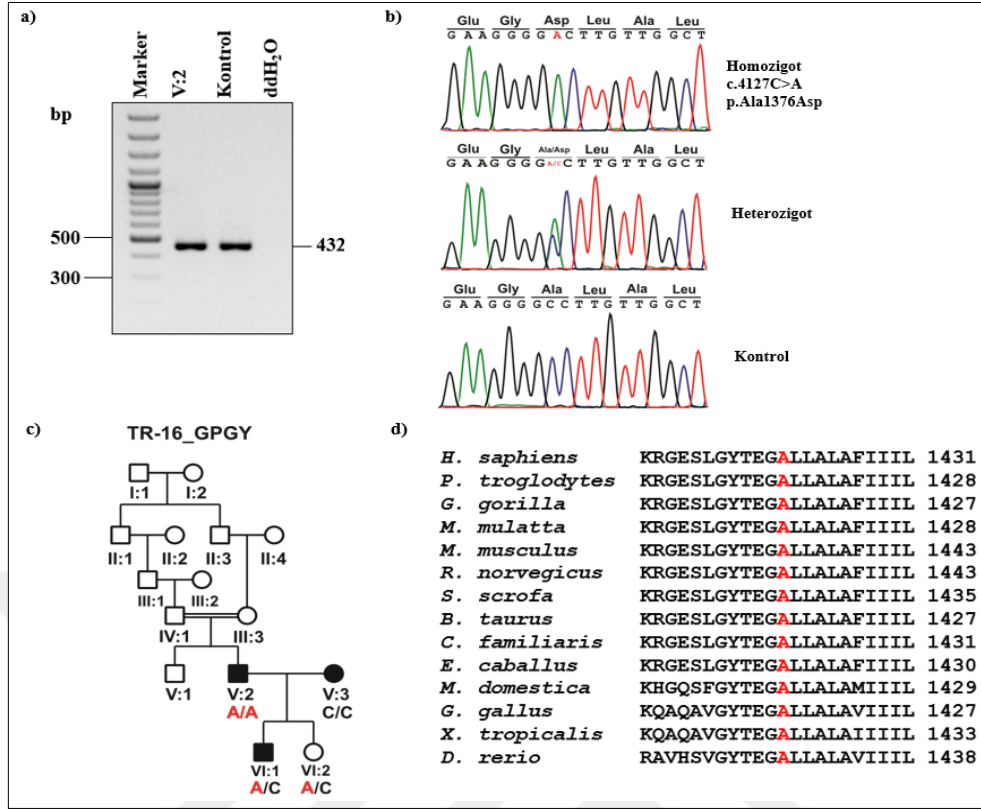
4.2.5.1. TR-16_GPGY Nolu Ailede İşitme Kaybının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

TR-16_GPGY nolu ailedeki V:2 numaralı bireyin ekzom verileri Galaxy Europe Platformu'nda otozomal resesif kalıtım kalıbına göre analiz edildi (Şekil 10). Analizler sonucunda V:2 numaralı bireyde homozigot olarak kalıtılan 90440 varyasyon. İlk aşamada otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkili genlerde olabilecek bir mutasyonu belirlemeye yönelik olarak filtreleme işlemi uygulandı ve sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı (DFNB23) ve Usher Sendromu (USH1F) (179, 180) ile ilişkilendirilmiş olan *PCDH15* (NM_033056.3) geni üzerinde daha önce Seco ve ark. (181) tarafından iki işitme engelli bir bireyde birleşik heterozigot olarak rapor edilmiş olan c.4127C>A/p.Ala1376Asp (rs752371584) varyasyonu homozigot olarak tespit edildi (Şekil 31).

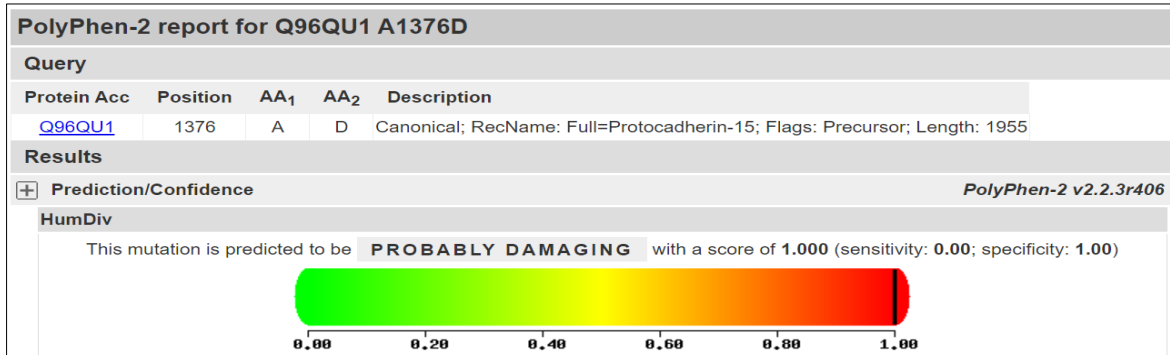


Şekil 31. TR-16_GPGY nolu ailede V:2 numaralı etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

Ekzom dizileme ile *PCDH15* geni üzerinde tespit edilen c.4127C>A varyasyonunun bulunduğu bölge, DNA örneği mevcut olan aile bireylerinde PCR ile amplifiye edildi (Şekil 32a) ve Sanger dizileme ile doğrulandı (Şekil 32b). Böylece ekzom verileri doğrulanırken varyasyonun V:2 numaralı bireyde homozigot ve biri etkilenmiş (VI:1) diğeri sağlıklı (VI:2) iki çocuğunda heterozigot olduğu görüldü ve varyasyonun TR-16_GPGY nolu ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 32c). *PCDH15* geni üzerinde tespit edilen c.4127C>A varyasyonu proteinin 1376'ncı pozisyondaki alanin amino asidini aspartik asite dönüştürmektedir. Farklı türlerdeki *PCDH15* ortologları çoklu hizalama ile analiz edildiğinde 1376'ncı pozisyonundaki alanin amino asidinin tüm omurgalılarda korunmuş olduğu görüldü (Şekil 32d). *PCDH15* üzerinde aspartik asit amino asidine dönüştüğü tespit edilen 1376'nci pozisyondaki alanin amino asidinin, PolyPhen-2 (Şekil 33), Mutation Taster (Şekil 34) ile yapılan *in silico* analiz sonucunda patolojik olabileceği görüldü.



Şekil 32. TR-16_GPGY nolu ailede *PCDH15* geni üzerinde tespit edilen c.4127C>A varyasyonunun doğrulanması. **a)** Varyasyonun bulunduğu 432 bp'lik bölgenin Pr.2295 ve Pr.2296 nolu primerler ile amplifikasyonu. (Size marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder-SM0321), **b)** c.4127C>A varyasyonun Sanger dizileme ile doğrulanması, **c)** c.4127C>A varyasyonunun ailedeki ışıtmte kaybı ile kalıtımının gösterilmesi, **d)** *PCDH15* üzerinde değişim tespit edilen 1376'ncı pozisyonundaki alanin amino asidinin (kırmızı ile renklendirildi) çoklu hizalama ile analizi.



Şekil 33. *PCDH15* üzerinde tespit edilen p.Alal376Asp varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi



Şekil 34. PCDH15 üzerinde tespit edilen p.Ala1376Asp varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi

TR-16_GPGY nolu ailede *PCDH15* geni üzerinde tespit edilen c.4127C>A (p.Ala1376Asp) varyasyonuna Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portalı'nda rastlanmadı. AlphaMissense verilerinde, varyasyonun patojenite skorunun 0.9936 olduğu ve patojenik sınıfında yer aldığı tespit edildi. Bu bulgular sonucunda ailedeki VI:1 numaralı etkilenmiş bireydeki işitme kaybının babadan (V:2) bağımsız olarak anneden (V:3) dominant olarak kalıtıldığı kanaatine varıldı.

4.2.5.2. TR-16_ROK Nolu Ailede İşitme Kaybının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

TR-16_ROK nolu ailedeki sorumlu varyasyonun araştırılmasında V:11 numaralı bireyin ekzom verileri, Galaxy Europe Platform'unda otozomal resesif kalıtım kalıbına göre analiz edildi (Şekil 10). Analizler sonucunda 84481 varyasyon bireyde homozigot olarak tespit edildi. Tespit edilen varyasyonlar arasında filtreleme stratejisine göre daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş beş genin 3' UTR bölgesinde olacak şekilde beş varyasyon tespit edilirken kodlayan bölgelerde bir varyasyona rastlanmadı (Tablo 17).



Şekil 35. TR-16_ROK nolu ailede V:11 numaralı bireyde tespit edilen homozigot varyasyonların filtrelenmesi

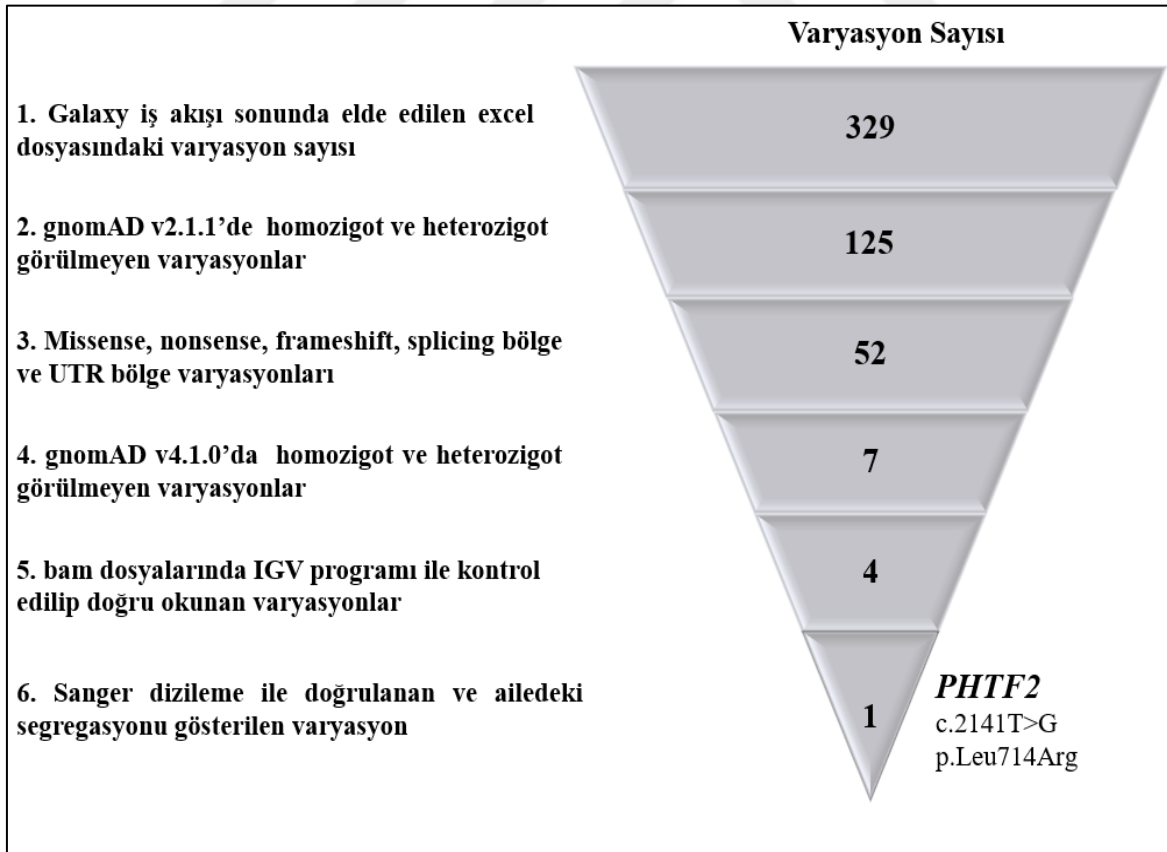
Tablo 17. TR-16_ROK nolu ailede V:11 numaralı bireyin biyoenformatik analizleri sonucunda tespit edilen aday varyasyonlar.

Kromozom	Gen İsmi	Transkript	DNA Değişimi	Varyasyon Türü	Okuma Derinlikleri
Chr1	<i>PTPN14</i>	NM_005401.4	c.*6160G>T	3' UTR	2
Chr6	<i>CLIC5</i>	NM_001114086.1	c.*2556delT	3' UTR	2
Chr12	<i>KITLG</i>	NM_000899.4	c.*4421C>A	3' UTR	2
Chr18	<i>AQP4</i>	NM_001317384.1	c.*1801G>C	3' UTR	280
Chr18	<i>AQP4</i>	NM_001317384.1	c.*575delGinsAA	3' UTR	150

Bu aşamada TR-16_ROK nolu ailedeki diğer bireyler çalışmaya katılmayı kabul etmedikleri için ailede genetik etiyolojinin aydınlatılmasına yönelik ileri bir çalışma yürütülemedi. TR-16 nolu ailedeki dominant kalıtım kalıbına göre yapılacak analizde V:11 numaralı bireyin olası etkisi dışlanamadığı için bu bireyin çocukları olan VI:7 ve VI:8 numaralı etkilenmiş bireyler hariç tutularak ekzom verileri analiz edildi.

4.2.5.3. TR-16 Nolu Ailede Otozomal Dominant Kalıtım Kalıbına Göre Sorumlu Patolojinin Araştırılması

İlk aşamada, V:2 numaralı birey *PCDH15* ile ilişkilendirildiği ve V:11 numaralı bireydeki sorumlu genetik etiyoloji belirlenemediği için V:11 numaralı birey ve etkilenmiş iki çocuğu (VI:7 ve VI:8) hariç tutularak TR-16 nolu ailede (Şekil 10) toplam yedi bireye (IV:3, IV:4, V:4, V:8, V:10, VI:1 ve VI:2) ait ekzom verileri kullanılarak otozomal dominant kalıtım kalıbına göre analiz gerçekleştirildi. Analiz sonucunda etkilenmiş bireylerde heterozigot olup sağlıklı bireylerde görülmeyen 329 varyasyon tespit edildi. Bu varyasyonlardan; gnomAD veri tabanında heterozigot ve homozigot olarak görülenler, intronik, sinonim olanlar ve yanlış okumalar dışlandı. Filtreleme piramidinin 7. basamağı sonunda *SHROOM1* (NM_001172700.1), *PHTF2* (NM_001395272.1), *BAZ2A* (NM_013449.3) ve *EIF4A1* (NM_013449.3) genleri üzerindeki olmak üzere üçü kodlayan diziyi etkileyen, biri kodlamayan bölgede olmak üzere dört varyasyona ulaşıldı (Şekil 36) (Tablo 18).

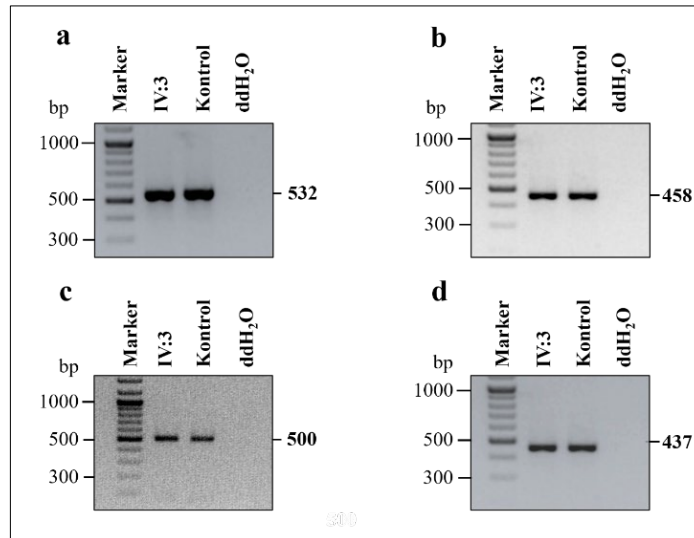


Şekil 36. TR-16 nolu ailede IV:3, IV:4, V:4, V:8, V:10, VI:1 ve VI:2 numaralı bireylerin analizleri sonucunda tespit edilen varyasyonların filtrelenmesi

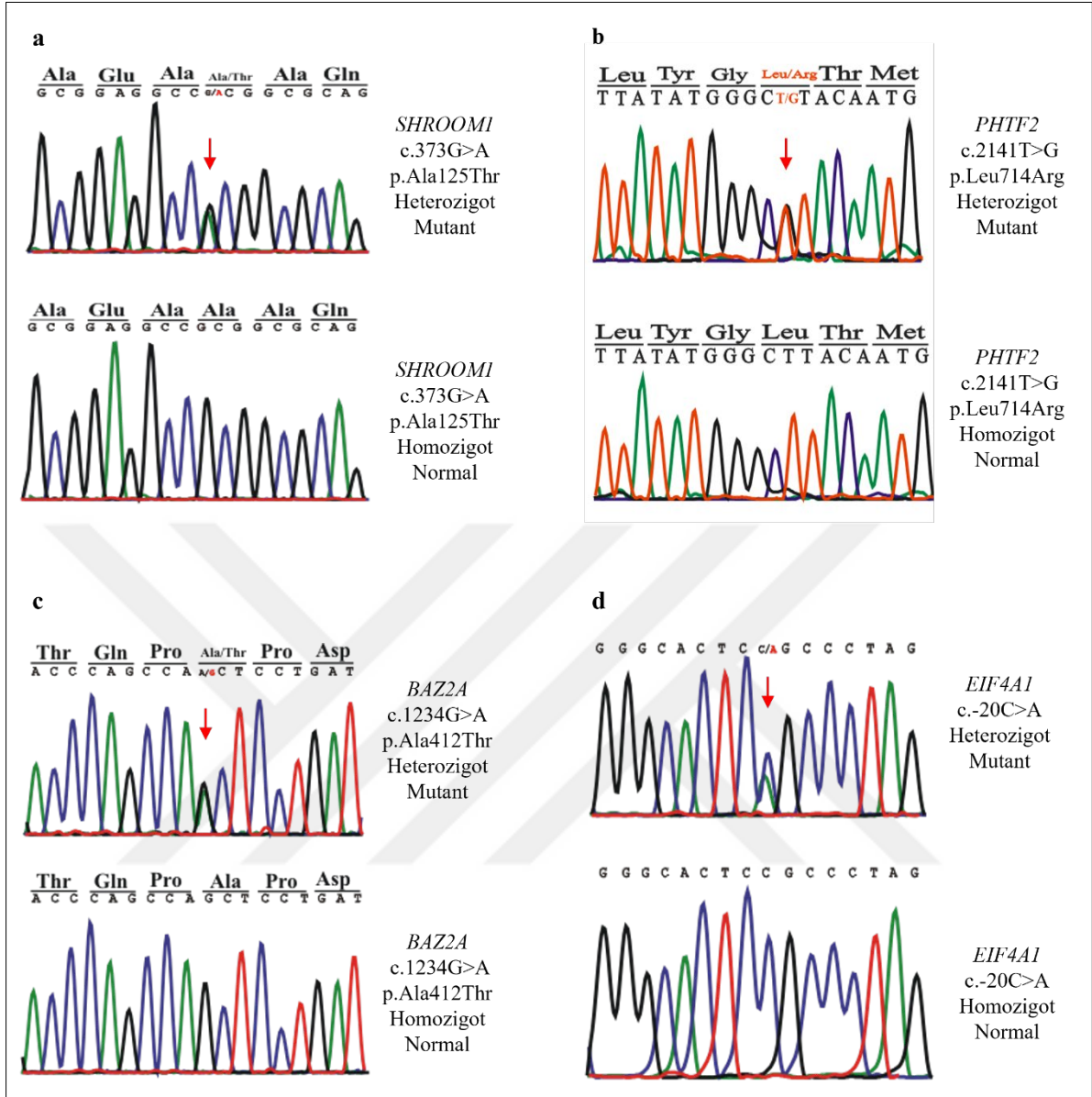
Tablo 18. TR-16 nolu ailede filtrelemeler sonucunda tespit edilen varyasyonlar.

Kromozom	Gen İsmi	Transkript	DNA Değişimi	Amino asit Değişimi	Varyasyon Türü
chr5q31.1	<i>SHROOM1</i>	NM_001172700.1	c.373G>A	p.Ala125Thr	Missense
chr7p21.11	<i>PHTF2</i>	NM_001395272.1	c.2141T>G	p.Leu714Arg	Missense
chr12q13.3	<i>BAZ2A</i>	NM_013449.3	c.1234G>A	p.Ala412Thr	Missense
chr17p13.1	<i>EIF4A1</i>	NM_013449.3	c.-20C>A	-	5'UTR

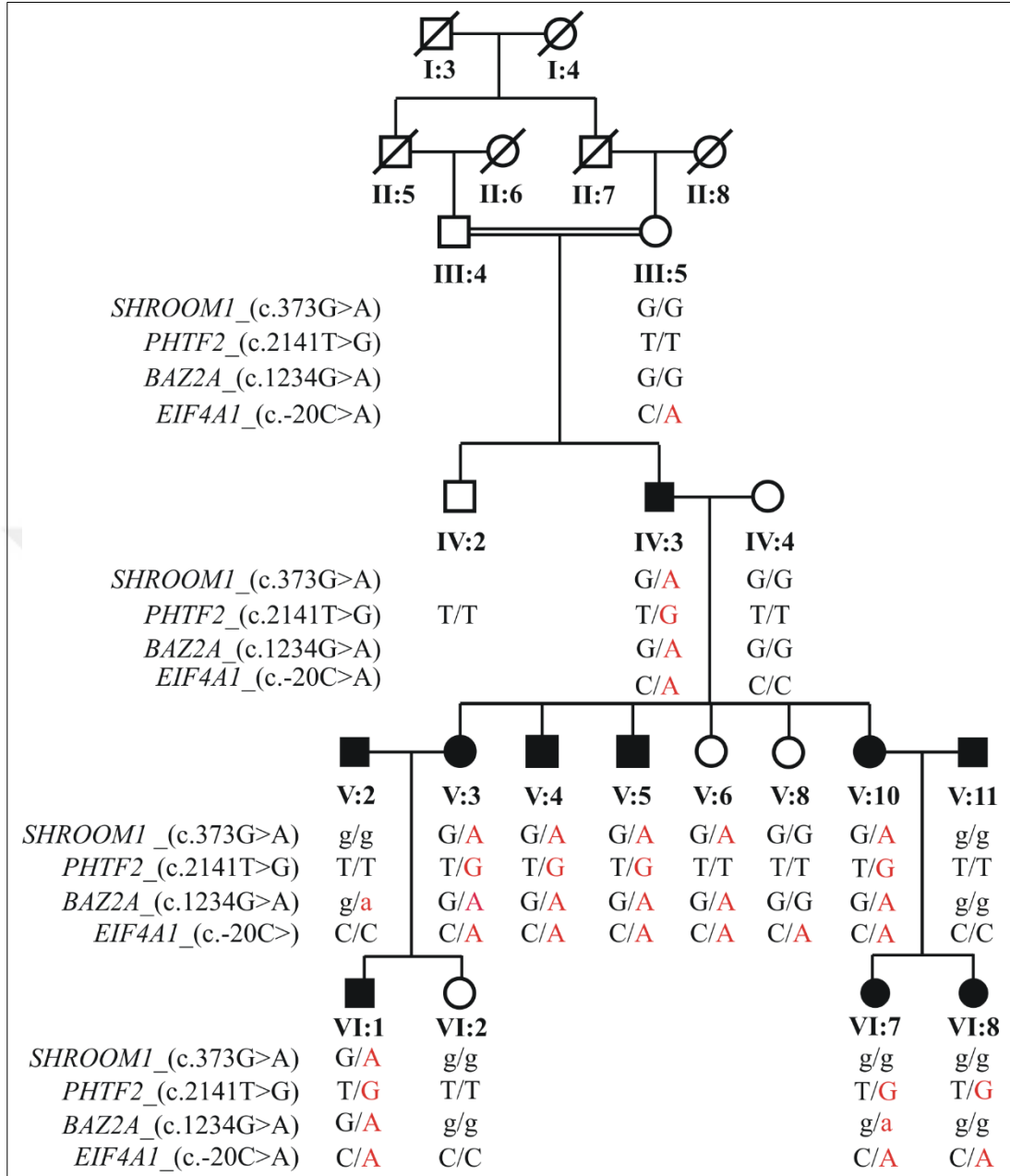
Tüm ekzom dizileme ile IV:3, IV:4, V:4, V:8, V:10, VI:1 ve VI:2 numaralı toplam yedi bireyin biyoenformatik analizi sonucunda *SHROOM1*, *PHTF2*, *BAZ2A* ve *EIF4A1* genleri üzerinde tespit edilen varyasyonların doğrulanması ve ailedeki segregasyonunun belirlenmesi için bulundukları bölgeler PCR ile amplifiye edildi (Şekil 37). Tüm varyasyonlar Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı (Şekil 38). Dizileme sonucunda test edilen dört varyasyon içinde okumanın doğru olduğu, bunlardan yalnızca *PHTF2* geni üzerindeki varyasyonun VI:7 ve VI: 8 numaralı etkilenmiş bireyler de dahil olmak üzere ailedeki işitme kaybı ile birlikte kalıtıldığı görüldü. Buna karşın *SHROOM1*, *BAZ2A* ve *EIF4A1* genleri üzerinde tespit edilmiş olan varyasyonların ailedeki III:5 ve V:6 numaralı sağlıklı bireylerden en az birinde heterozigot olarak kalıtıldığı tespit edildi (Şekil 39).



Şekil 37. TR-16 nolu ailede tüm ekzom dizileme ile tespit edilen varyasyonların PCR ile amplifikasyonu. **a)** *SHROOM1* üzerinde tanımlanan c.373G>A, **b)** *PHTF2* üzerinde tanımlanan c.2141T>G, **c)** *BAZ2A* üzerinde tanımlanan c.1234G>A ve **d)** *EIF4A1* üzerinde tanımlanan c.-20C>A varyasyonların bulunduğu bölgelerin amplifikasyonu. bp: baz çifti, Marker: Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder.



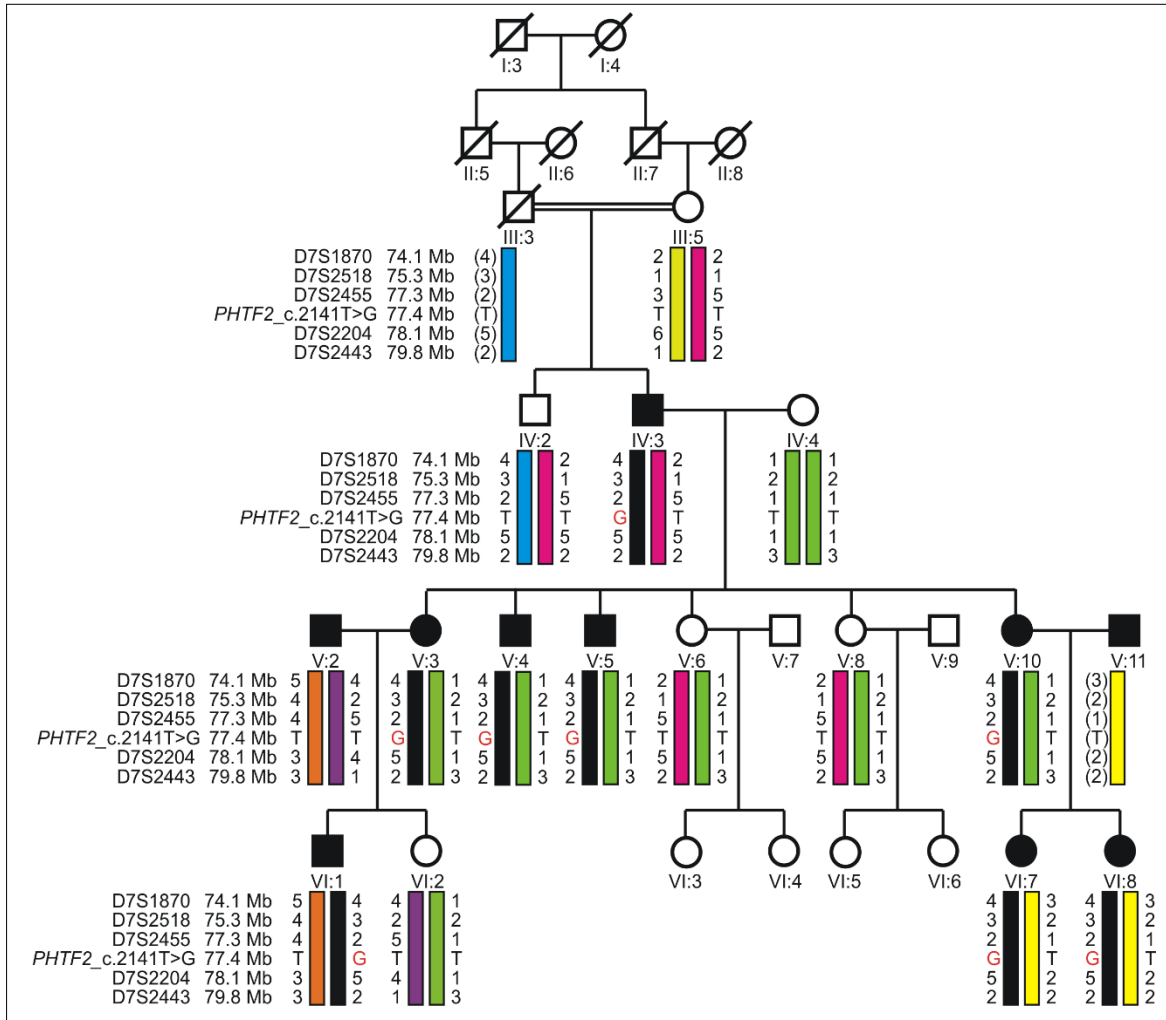
Şekil 38. TR-16 nolu ailede tüm ekzom dizileme ile tespit edilen varyasyonların Sanger dizileme ile doğrulanması. **a)** *SHROOM1* üzerinde tanımlanan c.373G>A, **b)** *PHTF2* üzerinde tanımlanan c.2141T>G, **c)** *BAZ2A* üzerinde tanımlanan c.1234G>A ve **d)** *EIF4A1* üzerinde tanımlanan c.-20C>A varyasyonların bulunduğu bölgelerin dizi kromatogramları.



Şekil 39. TR-16 nolu ailede tespit edilen varyasyonların ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu. Küçük harflerle gösterin genotipler tüm ekzom dizileme verilerinden alındı.

Ailede *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen varyasyonun lokalize olduğu kromozomal bölgenin de ailedeki işitme kaybı ile kalıtılıp kalıtılmadığını belirlemek üzere STR markırları ile gerçekleştirilen haplotip analizi sonucunda; c.2141T>G varyasyonunun da içinde yer aldığı 7q11.23-21.11 kromozom lokusundaki 5.7 Mb'dan daha geniş bir bölgenin ailedeki işitme kaybıyla birlikte kalıtıldığı görüldü (Şekil 40). Ayrıca, sağlıklı olan IV:2 ile işitme engelli olan IV:3 numaralı kardeşlerin, III:4 numaralı babalarından aynı kromozomu almış

olmalarına rağmen yalnızca etkilenmiş kardeşin (IV:3) c.2141T>G varyasyonunu taşıdığı görüldü. Bu durumun, TR-16 nolu ailede *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunu *de novo* olduğunu gösterirken, ailede IV:3 numaralı bireyden önce işitme kaybı fenotipinin görülmemesi nedeniyle de açıklık getirmektedir.



Şekil 40. TR-16 nolu ailede haplotip analizi. TR-16 nolu ailede 7q11.23-21.11 kromozom bölgesindeki D7S1870 ve D7S2443 markırları arasında kalan bölgenin haplotipi ve c.2141T>G varyasyonunun işitme kaybı ile segregasyonu.

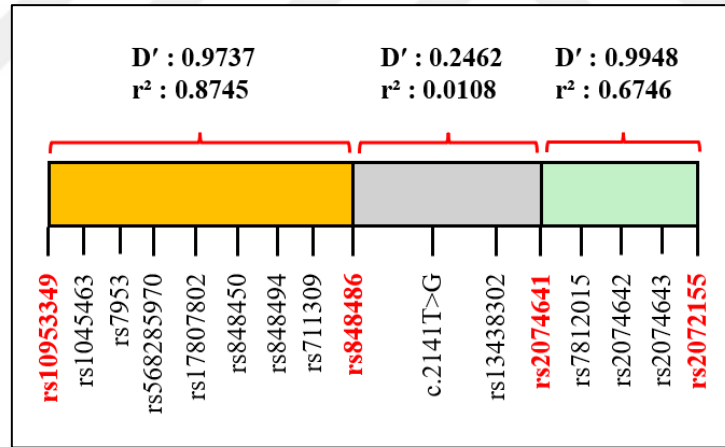
Ancak, III:4 numaralı babaya ait DNA örneği olmadığı için söz konusu bölgenin haplotipi babada tespit edilememiştir. Bu nedenle, varyasyonun yaygın görülen bir haplotip üzerinde oluşmuş olma ve varyant olan ve olmayan aynı haplotipin babada birlikte bulunma olasılığı dışlanamamıştır. Bu olasılığı sorgulamak üzere ekzom dizileme verilerindeki 20 SNP'ye ait bilgiler kullanılarak c.2141T>G varyasyonunun da içinde kaldığı rs10953349 - rs17809600 SNP'lerinin arasındaki 427,765 baz çifti uzunluğundaki kromozomal bölgenin haplotipi

oluşturuldu. Oluşturulan haplotipin görülme frekansı “LDhap (National Institutes Of Health/ LDlink/ LDhap)” aracı ile hesaplandı (182). *PHTF2* geni üzerinde tanımladığımız varyasyon ile kalıtılan bu haplotipin bir blok olarak herhangi bir popülasyonda olmadığı görüldü. Bölge daha da küçültüldüğünde rs848486 - rs2072155 SNP’leri arasında kalan 210,431 baz çiftlik bölgede görülen haplotipin de herhangi bir popülasyonda görülmediği tespit edildi (Tablo 19). Bu durum, *PHTF2* geni üzerinde tanımlamış olduğumuz c.2141T>G varyasyonunun bağlantı dengesi gösteren iki haplotip bloğunun bir araya gelmesi ile oluşan yeni bir haplotip üzerinde olduğunu düşündürmüştür. Bu olasılık, SNP’ler arasındaki bağlantı dengesizliği (D' , r^2) hesaplamasında “GRCh38/hg38-1000G Ph3 Vars” verilerini kullanan “LDpair” aracı kullanılarak hesaplandı (182).

Tablo 19. *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunun içinde yer aldığı SNP tabanlı haplotip bloklarının frekanslarının popülasyon bazlı analizi.

Chromosome Position (GRCh37)	RS Number	Haplotype		Allele Frequencies (1000 Genome)
		Mutant	Population Specific Haplotype and Frequencies (1000 Genome)	
chr7:77402746	rs10953349	A	A	A=0.622, G=0.378
chr7:77423152	rs1045463	C	C	C=0.806, T=0.194
chr7:77423574	rs7953	G	G	A=0.567, G=0.433
chr7:77.457.059	rs568285970	C	C C C	C=1.0, T=0.0
chr7:77.469.486	rs17807802	C	C C C	C=0.809, T=0.191
chr7:77.523.035	rs3779352	A	A A A	A=0.867, G=0.133
chr7:77.529.884	rs848450	C	C C C	C=0.79, T=0.21
chr7:77.531.113	rs78163487	T	T T T	T=0.861, C=0.139
chr7:77.537.964	rs848494	A	A A A	A=0.763, G=0.237
chr7:77.539.744	rs711309	A	A A A	G=0.576, A=0.424
chr7:77.552.127	rs848486	A	A A A A	A=0.603, G=0.397
chr7:77.583.117	<i>PHTF2 (c.2141T>G)</i>			
chr7:77.648.671	rs13438302	G	G G G G	G=0.588, C=0.412
chr7:77.756.580	rs2074641	C	C C C C C	C=0.786, T=0.213
chr7:77.756.724	rs7812015	T	T T T T T	T=0.786, C=0.214
chr7:77.756.849	rs2074642	T	T T T T T T T	T=0.786, C=0.214
chr7:77.756.865	rs2074643	T	T T T T T T T	T=0.929, C=0.07
chr7:77.762.457	rs2072155	T	T T T T T T T	C=0.715, T=0.285
chr7:77.764.253	rs1465221	G	G G G G	G=0.727, A=0.273
chr7:77.764.591	rs767682	A	A A A A	A=0.819, C=0.181
chr7:77.830.410	rs17809600	C	C C C C	C=0.792, A=0.208
All Populations		0	0.0821 0.1715 0 0 0 0 0.0455 0 0	
AFR (African)		0	0.0272 0.0492 0 0 0 0 0.0144 0 0	
AMR Ad Mixed American		0	0.1081 0.2363 0 0 0 0 0.0677 0 0	
EAS (East Asian)		0	0.0724 0.1548 0 0 0 0 0.1339 0 0	
EUR (European)		0	0.1392 0.2942 0 0 0 0 0 0 0	
SAS (South Asian)		0	0.0971 0.182 0 0 0 0 0.0215 0 0	

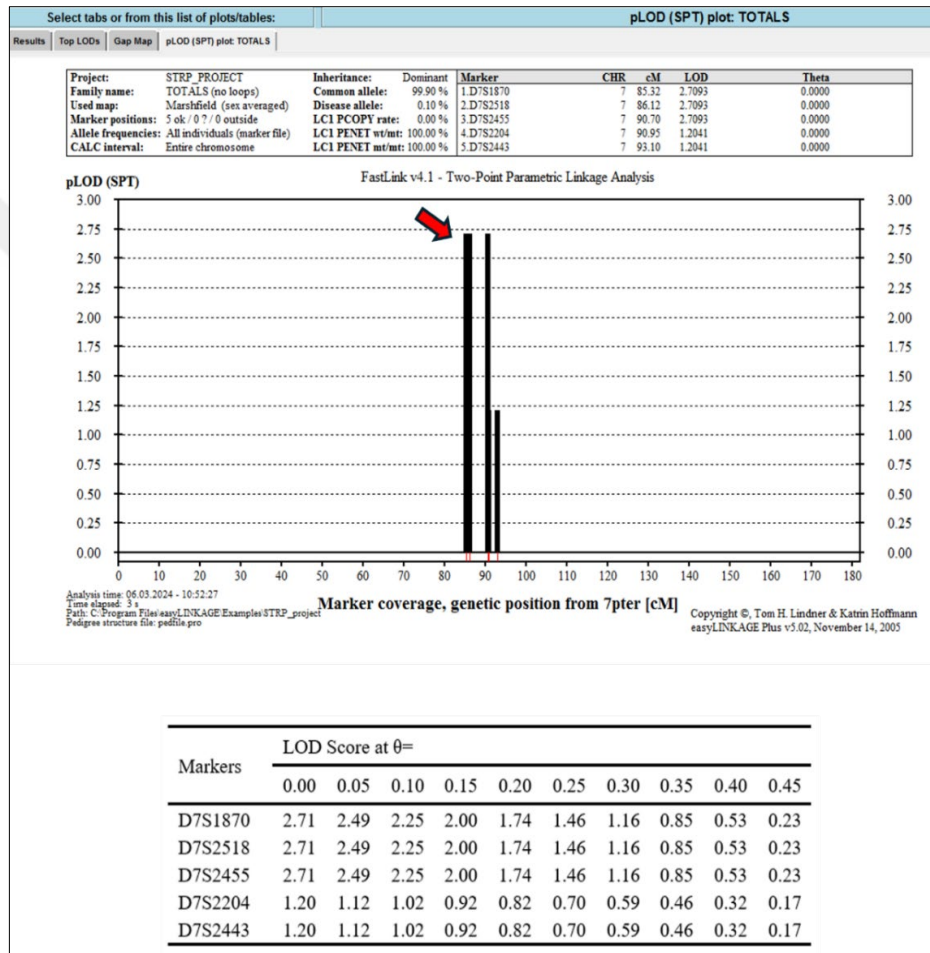
Bu doğrultuda *PHTF2* geni üzerinde tanımlamış olduğumuz c.2141T>G varyasyonunun içinde yar aldığı haplotipi belirlemede kullanılan SNP'ler kullanıldı. Bağlantı dengesizliği hesaplamalarında rs10953349 - rs848486, rs848486 - rs2074641 ve rs2074641 - rs2072155 numaralı SNP çiftleri kullanıldı. *PHTF2* geni üzerinde tanımlamış olduğumuz c.2141T>G varyasyonunun 5' tarafında yer alan rs10953349 ile rs848486 numaralı SNP'ler arasında kalan bölgenin tam bağlantı dengesizliğinde olduğu görüldü (D' : 0.9737, r^2 : 0.8745). Aynı şekilde c.2141T>G varyasyonunun 3' tarafında yerleşik olan rs2074641 ile rs2072155 numaralı SNP'ler arasındaki haplotip dağılımı da kendi içinde değerlendirildi. Bu iki SNP'nin bağlantı dengesizliğinde olduğunu gösterir şekilde aralarında yüksek düzeyde korelasyon görüldü (D' : 0.9948, r^2 : 0.6746). Buna karşın, c.2141T>G varyasyonunun 5' tarafındaki bloğun 3' ucundaki rs848486 numaralı SNP ile c.2141T>G varyasyonunun 3' tarafındaki bloğun 5' ucundaki rs2074641 numaralı SNP'nin birlikte kalıtılma olasılıklarının zayıf olduğunu gösteren çok düşük düzeyde korelasyon hesaplandı (D' : 0.2462, r^2 : 0.0108).



Şekil 41. *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunun içinde yer aldığı bölgenin SNP tabanlı LD analizi.

Bu hesaplamalar, TR-16 nolu ailede *PHTF2* geni üzerinde tanımlamış olduğumuz c.2141T>G varyasyonunun birlikte kalıtıldığı haplotip bloğunun yaygın bir haplotip olmadığını göstermektedir. Elde edilen bu bulgular ise sağlıklı babadan aynı haplotip bloğunu alan iki kardeşten c.2141T>G varyasyonunu taşıyan IV:3 numaralı bireyin işitme engelli olmasına rağmen bu varyasyonu bulundurmayan IV:2 numaralı bireyin sağlıklı olması c.2141T>G varyasyonunun *de novo* olduğunu desteklemektedir.

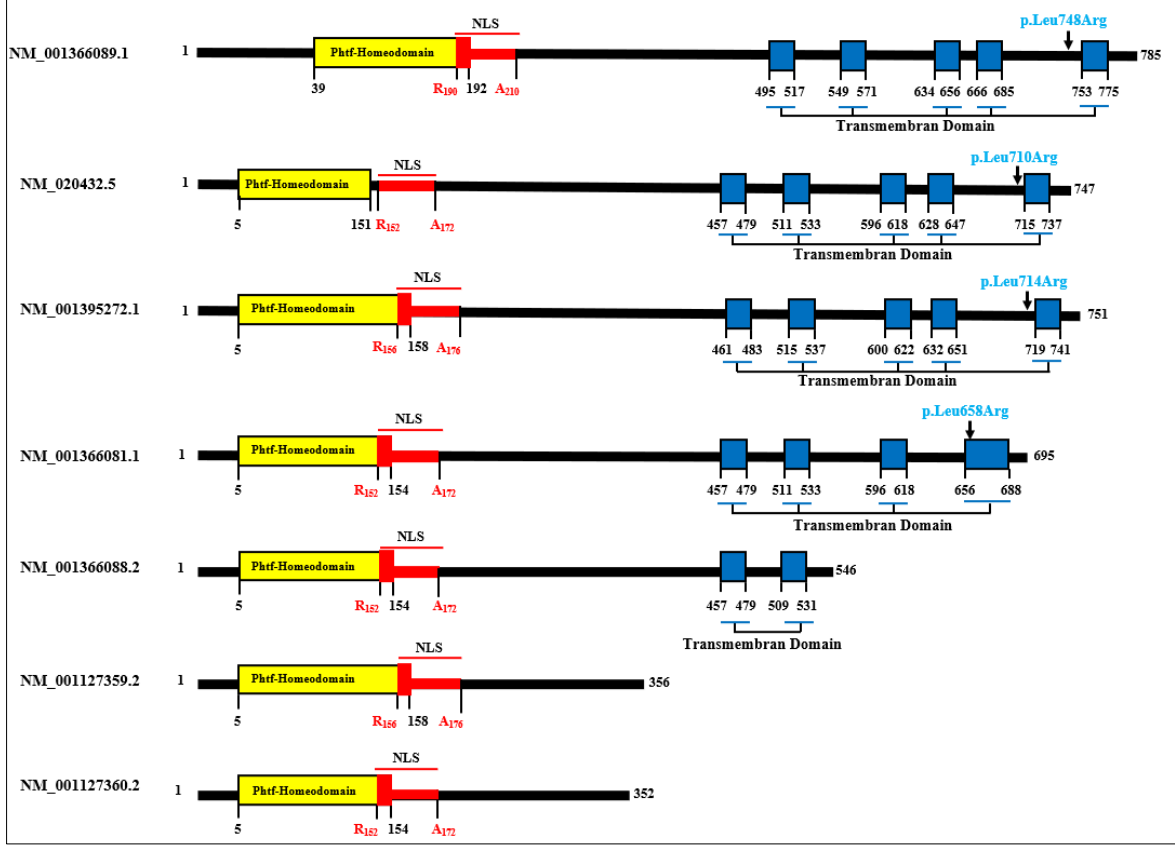
Ayrıca, TR-16 nolu ailede işitme kaybıyla kalıtılan kritik bölge için STR markır verileri kullanılarak EasyLINKAGE Plus v5.02 programı ile fenotipin ilk görüldüğü birey olan IV:3 numaralı birey ve sonrasındaki kuşaklar dahil edilerek, fenotipin tam penetrans gösterdiği varsayılarak otozomal dominant kalıtım kalıbına göre LOD skor analizi gerçekleştirildi. D7S1870-D7S2455 arasında kalan bölge için maksimum LOD skor kritik eşiğe yakın olacak şekilde 2.71 olarak hesaplandı (Şekil 42).



Şekil 42. EasyLINKAGE Plus v5.02 programı ile dominant kalıtım modele göre TR-16 nolu ailede 7. kromozom üzerinde elde edilen LOD skorun grafiksel görünümü. Kırmızı ok: LOD skorun 2.71 olarak görüldüğü bölge.

PHTF2 (Putative Homeodomain Transcription Factor 2) geni (ENSG00000006576.17) 7q11.23 kromozom lokusunda yer almaktadır ve tanımlanmış yedi izoformu bulunmaktadır (Şekil 43). *PHTF2* geninin kanonikal transkripti (ENST00000422959.8, NM_001395272.1) 751 amino asitlik bir protein kodlamaktadır ve üzerinde bir adet Phtf-Homeo domaini, beş adet transmembran domaini ve bir adet çekirdek

lokalizasyon sinyali dizisi bulunmaktadır (183-185). Gen üzerinde tanımladığımız c.2141T>G varyasyonu kanonikal transkript tarafından kodlanan proteinin beşinciye yakın olacak şekilde dördüncü ile beşinci transmembran domain arasında yer alan 714'ncü pozisyondaki lösin amino asidini arjinin amino asidine dönüştürmektedir ve proteinin 714'ncü pozisyondaki lösin amino asidi omurgalılar arasında korunmuştur (Şekil 44).

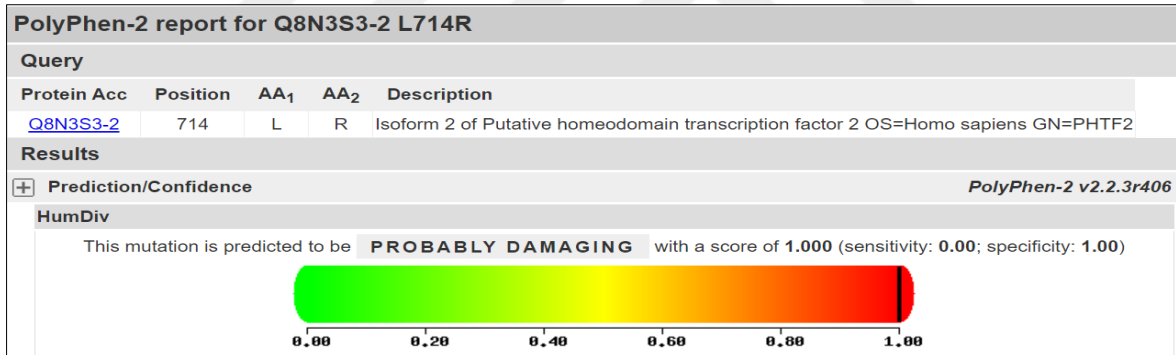


Şekil 43. PHTF2 proteini üzerindeki domainlerinin şematik gösterimi ve tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun protein üzerindeki yerleşimi, NLS: Çekirdek lokalizasyon sinyali.

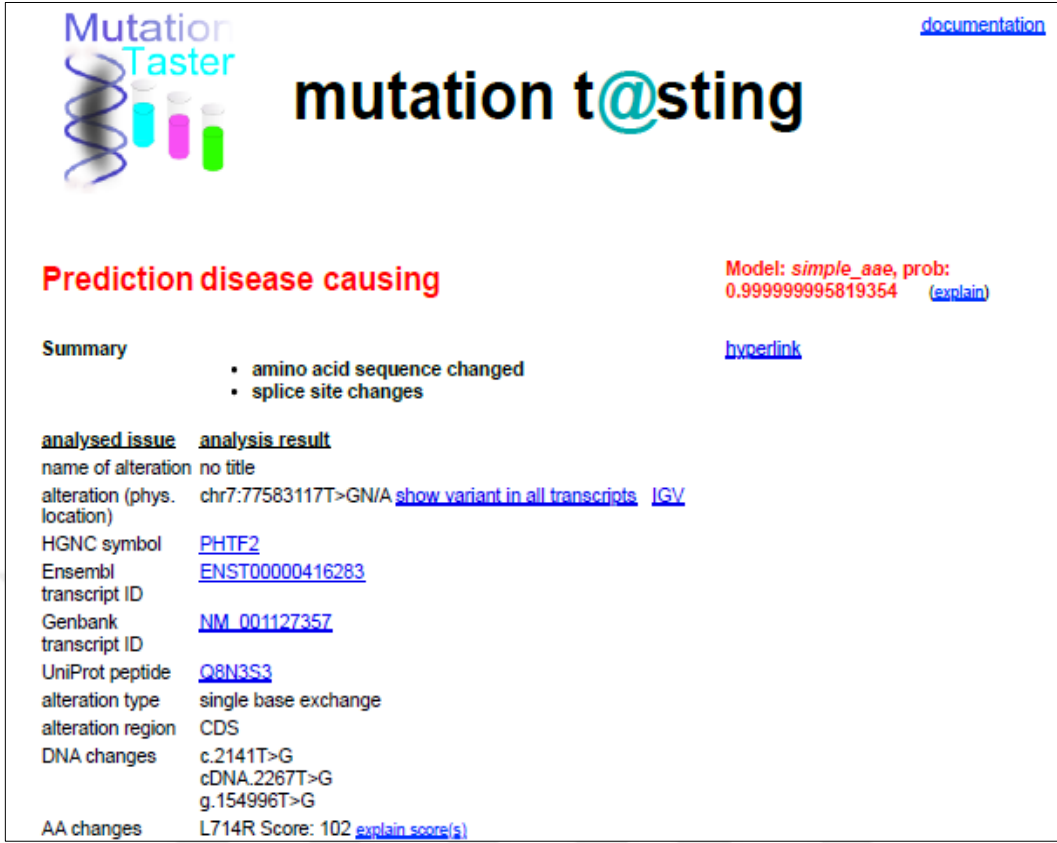
<i>H. sapiens</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	724
<i>M. mulatta</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	726
<i>M. musculus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>R. norvegicus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>B. taurus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	756
<i>C. familiaris</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	724
<i>G. gallus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	729
<i>X. tropicalis</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	730
<i>M. furo</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>C. griseus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>M. auratus</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>N. galili</i>	KELDSPFRLYGLTMNPLLYNIT	720
<i>N. scutatus</i>	KELDNPFRLYGLTMNPLLYNIT	729

Şekil 44. PHTF2 üzerinde tespit edilen 714'ncü pozisyonundaki lösin amino asidinin çoklu hizalama ile analizi. 714'ncü pozisyonundaki lösin amino asidi kırmızı ile renklendirildi.

PHTF2 üzerinde tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun patojenik etkisini belirlemeye yönelik olarak PolyPhen-2 (Şekil 45) ve Mutation Taster (Şekil 46) araçları kullanılarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda değişimin sırası ile “probably damaging” ve “prediction disease causing” olarak değerlendirildiği görüldü.



Şekil 45. PHTF2 üzerinde tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun PolyPhen-2 aracı ile analizi



Şekil 46. PHTF2 üzerinde tespit edilen p.Leu714Arg varyasyonunun Mutation Taster aracı ile analizi

TR-16 nolu ailede *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G (p.Leu714Arg) varyasyonunun Türkiye Genom Projesi Veri Paylaşım Portalı'nda yer almadığı görüldü. AlphaMissense verilerinde varyasyonun patojenite skorunun 0.9928 olduğu ve patojenik sınıfında yer aldığı tespit edildi.

Özetle, TR-16 nolu ailede yapılan çalışmalar sonucunda; TR-16_GPGY nolu ailenin (Şekil 9b) V:2 numaralı bireyi otozomal resesif kalıtım kalıbına göre analiz edildiğinde sorumlu varyasyonun bilinen bir gen üzerinde olması, VI:2 numaralı bireyin sağlıklı olması ve haplotip analiziyle biyolojik babasının V:2 numaralı birey olduğunun gösterilmesi, TR-16 nolu ailedeki sorumlu patolojinin otozomal dominant kalıtıldığını ve ailede işitme kaybından sorumlu genin *PHTF2* olduğunu desteklemektedir. Buna ilave olarak; TR-16 nolu aile (Şekil 9b); TR-16_ROK nolu ailedeki V:11 numaralı işitme engelli bireyin ve etkilenmiş kızlarının (VI:7-VI:8) olası etkileri dışlanacak şekilde otozomal dominant kalıtım kalıbına göre analiz edildiğinde de olası etkileri dahil edildiğinde de ailedeki sorumlu varyasyonun *PHTF2* geni üzerindeki c.2141T>G olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu durum, VI:7

ve VI:8 numaralı bireylerin işitme kaybı olmasındaki sorumlu patolojinin *PHTF2* geni üzerindeki varyasyon olduğunu göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında TR-16_GPGY ve TR-16_ROK ailelerinden bağımsız olarak TR-16 ailesindeki sorumlu patolojinin *PHTF2* geni üzerinde tanımlanan varyasyon olduğu sonucuna ulaşıldı.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında sendromik olmayan otozomal resesif sensorinöral işitme kaybı tanısı konulmuş, aralarında akrabalık bulunmayan TR-15, TR-37, TR-33, TR-59 ve TR-16 nolu beş ailede tüm ekzom dizileme yöntemi ile işitme kaybından sorumlu patoloji araştırıldı. Her bir aile kendi içinde değerlendirildi.

5.1. TR-15 Nolu Aile

Otozomal resesif işitme kayıplı bireylerin bulunduğu TR-15 nolu ailede bir birey üzerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ve biyoenformatik analizi sonucunda daha önce sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı (DFNB86) (164), sendromik olmayan otozomal dominant işitme kaybı (DFNA65) (165) ve sendromik işitme kaybı (186) ile ilişkilendirilmiş olan *TBC1D24* geni tarafından kodlanan proteinin 297'nci pozisyonundaki pozitif yüklü yan gruba sahip olan arjinin amino asidinin polar ancak yüksüz yan gruba sahip sisteine dönüşmesine neden olan yeni bir varyasyon p.Arg297Cys (c.889C>T) tespit edildi (Şekil 11). Yaklaşık 20'li yaşların başında ilk belirtilerini gösteren otozomal dominant sendromik olmayan progresif işitme kaybına neden olan TBC1D24 üzerindeki p.Ser178Leu varyasyonunu taşıyan knock-in fare modelinde işitsel sinir ileti hızının ve şiddetinin azaldığı hafif işitme kaybı rapor edilmiştir (187).

TBC1D24'nin *Drosophila* ortoloğu olan *Skywalker* (SKY)-*TBC1D24* geni tarafından kodlanan proteinin TBC domaininin kristalize yapısının analizi sonucunda domain üzerinde K71, R72, K75, R79, K203, K277, R281 ve R335 amino asitleri ile çevrili bir katyonik cep bulunmaktadır. Tüm TBC1D24 aile üyelerinde korunmuş olan bu cep, 3, 4 ve 5. pozisyonlarından fosforillenmiş fosfoinositler (PI(4,5)P2 ve PI(3,4,5)P3) için bağlanma bölgesi sağlamaktadır. Bu cep yapısına katılan K75, R79, K277, R281, R335, G336 ve T339 amino asitleri ise IP3 ile çoklu etkileşime girmektedir (188). TR-15 nolu ailede TBC1D24 üzerinde değişim tespit ettiğimiz R297 pozisyonu da IP3 bağlanma cebi içinde yer almaktadır ve Sky proteininin IP3 ile etkileşime giren T339 pozisyonuna karşılık gelmektedir (170). İnsandaki R297 pozisyonunda yer alan amino asit kalıntısının *Drosophila*'da korunmamış olması bir sorun olarak görünse de insan TBC1D24 proteini üzerindeki S296, R297 ve K298 amino asit kalıntılarının IP3 bağlanma bölgesinde olduğu ve bu motif üzerinden IP3 ile en yüksek bağlanma enerjisine sahip olan amino asit kalıntısının ise R297 olduğu gösterilmiştir (170). Diğer taraftan, Sky proteini üzerindeki H145, E187, C193, V215, W253, M268 ve G310 pozisyonlarındaki amino asitlerin insan

TBC1D24 proteininde karşılığı olan sırasıyla C105 (DOORS syndrome (OMIM #220500)), D147 (Myoclonic Epilepsy, Familial Infantile (OMIM #605021)), E153 (Myoclonic Epilepsy, Familial Infantile (OMIM #605021)), S178 (Otozomal dominant sendromik olmayan işitme kaybı), R214 (Otozomal resesif sendromik olmayan işitme kaybı), F229 (Myoclonic Epilepsy, Familial Infantile (OMIM #605021)) ve R270 (DOORS syndrome (OMIM #220500)) pozisyonlarındaki amino asitleri korunmamış olmalarına rağmen bu amino asitlerin değişimlerinin hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir (170) (Şekil 12). Ayrıca, insanda sendromik olmayan otozomal dominant progresif işitme kaybına neden olan p.Ser178Leu yanlış anlamlı varyasyonu farelerde ifade edildiğinde hafif işitme kaybına neden olmaktadır (187). Bu veriler TR-15 nolu ailede tanımlanmış olduğumuz varyasyonun etkilediği R297 pozisyonunun, TBC1D24 proteinin fonksiyonu için kritik öneme sahip olabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte TR-15 nolu ailede tespit edilen varyasyonun ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu (Şekil 13c), omurgalılarda korunmuş olması (Şekil 13d), gnomAD veri tabanında ve Türk popülasyonuna ait veri tabanında homozigot olarak görülmemesi işitme kaybından sorumlu olabileceğini desteklemektedir. Diğer taraftan, *in silico* tahmin araçlarına göre p.Arg297Cys değişiminin patolojik olarak değerlendirilmesi (Şekil 14-16) bu varyasyonun patolojik olduğu yönünde ilave kanıt sunmaktadır.

TR-15 nolu ailede tanımlanan varyasyonun patolojik olduğunu göstermeye yönelik ulaşılan veriler; genetik varyasyonların patojenite değerlendirme kılavuzu olan ACMG kriterlerinden patojeniteyi destekleyen PM1, PM2 PP1 ve PP3 kriterlerini (Tablo 9) karşılayarak muhtemel patojenik (LP) kategorisine girdiğini göstermektedir (Tablo 11).

5.2. TR-37 Nolu Aile

Otozomal resesif sensörinöral işitme kayıplı bireylerin bulunduğu TR-37 nolu ailede bir birey üzerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ve biyoenformatik analizler sonucunda; ilk aşamada sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı ile ilişkilendirilen ancak sonrasında Chudley–McCullough sendromuna (OMIM #604213) neden olduğu gösterilen *GPSM2* (DFNB82) geni üzerinde dizigotik iki kardeşle homozigot olarak rapor edilmiş olan c.1093C>T varyasyonu tespit edildi (174) (Şekil 17). *GPSM2* üzerinde tespit edilen c.1093C>T varyasyonu 684 amino asitten oluşan proteinin 365’nci pozisyonunda erken sonlanma kodonu (p.Arg365*) oluşturmaktadır (Şekil 18b). *GPSM2*, işitsel ve vestibüler tüylü hücrelerinin aktin açısından zengin stereosilyalarının uzamasında, nöronal büyüme, nöronal progenitör hücre bölünmesinde görev almaktadır (173, 189). *GPSM2*

üzerinde rapor edilen varyasyonların iç kulakta stereosilya uzamasını engelleyerek işitme kaybına ve korpus kallozum agenezisine neden olmaktadır (173, 189).

GPSM2 üzerinde tespit edilen c.1093C>T varyasyonunun; daha önce otozomal resesif kalıtmımlı sensörinöral işitme kaybının eşlik ettiği Chudley-McCullough sendromlu bir ailedeki iki bireyde gösterilmiş olması, ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu (Şekil 18c), erken sonlanma kodonu oluşturması (Şekil 18b), gnomAD ve Türk popülasyonuna ait veri tabanında homozigot olarak görülmemiş olması ailedeki işitme kaybından sorumlu patoloji olabileceğini desteklemektedir.

TR-37 nolu ailede tanımlanan varyasyonun patolojik olduğunu göstermeye yönelik ulaşılan veriler genetik varyasyonların patojenite değerlendirme kılavuzu olan ACMG kriterlerinden patojeniteyi destekleyen PVS1, PM2, PM4 ve PP1 kriterlerini (Tablo 9) karşılayarak patojenik (P) kategorisine (Tablo 11) girmektedir.

5.3. TR-33 Nolu Aile

Sensörinöral otozomal resesif işitme kayıplı bireylerin bulunduğu TR-33 nolu ailede bir birey üzerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ve biyoenformatik analizler sonucunda daha önce iki ailede sendromik olmayan otozomal resesif işitme kaybı (DFNB106) ile ilişkilendirilmiş olan *EPS8L2* geni üzerinde (176) bir nükleotitik yeni bir delesyon (c.1921delG) tespit edildi (Şekil 19). Tespit edilen bu delesyon, gen üzerinde daha önce tanımlanan iki varyasyon gibi protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Ala641Profs*13) neden olmaktadır (Şekil 20). *EPS8L2* proteini üzerinde 51-181'nci amino asitleri arasında PTB (Phosphotyrosine-Binding Domain), 500-540'nci amino asitleri arasında SH3 (Src Homology 3 Domains) ve 621-682'nci amino asitleri arasında SAM (Steril Alpha Motif) olmak üzere üç farklı domain bulunmaktadır (185). Gen üzerinde daha önce tanımlanmış olan iki varyasyon proteinin PTB ile SH3 domainleri arasında yer almaktadır ve SH3 ile SAM domainlerinin delesyonuna neden olmaktadır (Şekil 21). Bu çalışma kapsamında TR-33 nolu ailede tanımlanmış olan varyasyon ise SAM domaininin bir kısmını da kapsayacak şekilde N-terminalin delesyonuna neden olmaktadır. Bu durum *EPS8L2* proteini üzerindeki N-terminale yakın yerleşimli olan SAM domaininin protein fonksiyonu için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

EPS8L2 iç kulaktaki tüylü hücrelerin mekanosensör olan stereosilyalarının uç kısımlarında lokalizedir (190). *EPS8L2* knock-out farelerin işitme engelli doğdukları, bu

farelerin iç ve dış tüylü hücrelerin stereosilyalardaki aktin dinamiklerinin bozduğu ve silyaların uzayamadığı gösterilmiştir (190).

EPS8L2 geninin daha önce sendromik olmayan işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olması, gen üzerinde tespit edilen c.1921delG varyasyonunun ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu (Şekil 20c), *EPS8L2* tarafından kodlanan protein üzerindeki p.Ala641Profs*13 varyasyonunun gnomAD veri tabanında homozigot olarak görülmemesi ve Türk popülasyonuna ait veri tabanında bulunmaması ailedeki işitme kaybından sorumlu olabileceğini desteklemektedir.

TR-33 nolu ailede tanımlanan varyasyonun patolojik olduğunu göstermeye yönelik ulaşılan veriler; ACMG kriterlerinden PVS1, PM1 PM2 ve PP1 kriterlerini (Tablo 9) karşılayarak varyasyonu patojenik (P) kategorisinde değerlendirmektedir (Tablo 11).

5.4. TR-59 Nolu Aile

Otozomal resesif sensörinöral işitme kayıplı bireylerin bulunduğu TR-59 nolu ailedeki üç birey üzerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ve biyoenformatik analizler sonucunda belirlenen varyasyonlar arasından intronik ve sinonim olanlar ile gnomAD veri tabanında homozigot görülenler dışlandıktan sonra, *DLGAP2* geni üzerindeki c.2554G>A (p.Ala852Thr) varyasyonunun ailedeki işitme kaybıyla kalıtıldığı tespit edildi (Şekil 24, Şekil 25).

DLGAP2 ilk olarak epilepsi ve mental retardasyon görülen bir ailedeki fenotip ile kalıtılan 8p23 kromozom bölgesinin araştırılması ile karakterize edildi (191). Ekzom dizileme ve kopya sayısı değişikliği analiz yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar ile *DLGAP2*'nin otizm ve şizofreni gibi nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili olabileceği gösterildi (192-197). *DLGAP2*'nin sinaps oluşumundaki rolünü ve davranış üzerine etkisini araştırmaya yönelik geliştirilen *Dlgap2*^{-/-} farelerde davranış değerlendirmesi yapmak üzere 68-77 dB şiddetinde ses kullanılarak irkilme testi yapılmış ve *Dlgap2*^{-/-} ile normal fare arasında bir fark gösterilememiştir (198, 199). Ancak, irkilme testi işitme bozukluklarının belirlenmesinde düşük hassasiyete sahip bir test olarak değerlendirilmektedir (200). Bu nedenle *Dlgap2*^{-/-} farelerin irkilme testinde normal farelerle aynı tepkiyi vermesi *DLGAP2*'nin TR-59 nolu ailedeki işitme kaybı için aday olma durumunu ortadan kaldırmamaktadır.

DLGAP2, post-sinaptik yoğunluğun bir bileşeni olup DLGAP (Discs Large Associated Proteins) ailesinin bir üyesidir. DLGAP protein ailesinin DLGAP 1-5 olmak üzere beş üyesi bilinmektedir ve bunlardan DLGAP1, DLGAP2, DLGAP3 ve DLGAP4 post-sinaptik yoğunluğun bileşenlerinden olan nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili olan DLG (Disc Large Protein) ve SHANK proteinleri ile etkileşmektedir (201).

TBC1D24, *WBP2*, *HOMER*, *TRRAP*, *DIAPH3*, *WFS1*, *AFG2B* ve *GABBR2* genleri üzerinde tanımlanan varyasyonlar nörogelişimsel bozukluklar ve/veya işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Bu genlerden *TBC1D24*, *WBP2*, *TRRAP*, *DIAPH1* üzerinde rapor edilen varyasyonların bir kısmı sendromik olmayan işitme kaybına (202-207) neden olurken bir kısmı işitme kaybının eşlik ettiği nörolojik sendromlara (164, 166, 208-210) neden olmaktadır. Bununla birlikte hem sendromik hem de sendromik olmayan işitme kaybına neden olan *TBC1D24*, *TRRAP* ve *DIAPH1* genleri üzerinde rapor edilen varyasyonlardan bir kısmı ise yalnızca nörogelişimsel bozukluklara (168, 209, 211-215) neden olmaktadır. Bu genlerden *TBC1D24*, *HOMER* ve *WBP2* tarafından kodlanan protein, DLGAP2 gibi postsinaptik yoğunluk bölgesinde lokalize olmaktadır (206, 207, 216). Özetle, post sinaptik bölgede yer alan bazı proteinlerin varyasyonlarının bir kısmı veya yokluğu nörogelişimsel hastalıklarla ilişki olurken bazı varyasyonlarının sendromik olmayan işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olması; yokluğu farelerde nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmiş olan DLGAP2'nin yanlış anlamlı varyasyonlarının sendromik olmayan işitme kaybına da neden olabileceğine bir kanıt olarak değerlendirilmektedir.

İç kulağa yönelik gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında ise DLGAP2'nin tüylü hücrelerde ifade edildiği (217) ve yeni doğan farelerin vestibüler epitel tüylü hücrelerinde de az da olsa ifade edildiği gösterilmiştir (218). Bu durumda TR-59 nolu ailedeki işitme kaybı ile kalıtılan varyasyonun ailedeki işitme kaybında sorumlu olabileceğine yönelik destekleyici kanıt sunmaktadır.

DLGAP2 üzerinde tespit edilen homozigot c.2554G>A varyasyonunun ailedeki işitme kaybı ile segregasyonu (Şekil 24b-c), varyasyonun bulunduğu 4.94 Mb'lık bölgenin etkilenmiş bireylerde homozigot kalıtılması (Şekil 25), bu varyasyonun ailedeki işitme kaybından sorumlu olabileceğini desteklemektedir. Buna karşın, PolyPhen, SIFT ve Mutation Taster araçları DLGAP2 üzerinde tanımlanan varyasyonu patolojik olarak değerlendirmemektedir (Şekil 27-29). Ancak, PolyPhen ve SIFT araçlarının sensitivitesi sırasıyla %68 ve %69 olup, spesifitesi %16 ve %13'tür ve amino asit değişimlerinde

etkilenen amino asit kalıntısının korunmuşluk düzeyi daha güvenilir bir değerlendirme sunmaktadır (219). Ancak, DLGAP2 tarafından kodlanan protein üzerindeki değişime uğrayan 852'nci pozisyonundaki alanin amino asidinin omurgalıların tamamında korunmamış olması (Şekil 24d), organizmanın çevresel değişimlere uyum sağlamasına olanak tanıyan bir özellik olabilir ve genetik drift veya nötr evrimsel süreçlerle evrimleşmiş olabilir. Alanin amino asidinin değişikliği domain üzerinde olduğu için bu amino asit değişikliği kritik fonksiyonel değişikliğe neden olabilir. Bununla birlikte Pleiotropik etki ile organizmanın biyolojik işlevlerinde bozulmaya yol açabilir ve patolojik sonuçlarda doğurabilir. *DLGAP2* geni üzerinde tanımlanan varyasyonun gnomAD veri tabanında homozigot olarak görülmemesi ve Türk popülasyonuna ait veri tabanında bulunmaması, ailede tanımladığımız varyasyonun ailedeki işitme kaybından sorumlu olabileceği yönündeki çıkarımı güçlendirmektedir.

Özetle, TR-59 nolu ailede tanımlanan varyasyon ACMG kriterlerinden PM1, PM2, PP1 ve BP4 kriterlerini (Tablo 9) karşılayarak önemi belirsiz (VUS) kategorisinde (Tablo 11) değerlendirilmektedir. Sonucun *DLGAP2* knock-out farelerde yapılacak ABR testi ve fonksiyonel çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

5.5. TR-16 Nolu Aile

Otozomal dominant sensörinöral işitme kaybı görülen TR-16 nolu ailede 11 birey üzerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme ve biyoenformatik analizler sonucunda daha önce herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş olan *PHTF2* geni üzerinde amino asit değişimine neden olan *de novo* c.2141T>G varyasyonu tespit edildi (Şekil 36, Şekil 40, Şekil 41, Tablo 19). *PHTF2* (*Putative Homeodomain Transcription Factor 2*) proteini 751 amino asitten oluşan bir aday transkripsiyon faktörüdür ve tanımlanmış yedi izoformu bulunmaktadır (Şekil 43). Doku düzeyinde yapılan çalışmalar kapsamında *PHTF2*'nin en fazla iskelet kasında ve daha düşük düzeyde beyinde ifade edildiği gösterilmiştir (220). İç kulağa yönelik gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında ise *PHTF2*'nin iç ve dış tüylü hücreler ile utricle yapısında ifade edildiği gösterilmiştir (218, 221). *In silico* analizler ile *PHTF2* üzerinde bir Phtf-Homeo domain, beş transmembran domain ve çekirdek lokalizasyon sinyal dizisinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 43) (220, 222).

Çeşitli kanser türlerinde biyo-belirteç tanımlama, mutasyon tarama amaçlı gerçekleştirilen yüksek çıktılı dizileme çalışmalarında (223, 224) ve veri tabanlarından alınan gen ekspresyon sonuçları kullanılarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda

(225-227) PHTF2'nin tümör gelişimi ile ilgili olabileceği önerilmiş olmakla birlikte fonksiyonu hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, protein-protein etkileşim verilerinin paylaşıldığı BioGRID veri tabanında PHTF2 proteininin büyük ölçek afinite yakalama (Affinity Capture) - Kütle Spektrometresi (MS) yaklaşımı ile 16 farklı proteinle (LYPD3, GPR156, BTRC, DHRS2, ELAVL1, FBXW11, KIAA1429, OSBPL3, OSBPL6, PHTF1, STXBP1, STXBP2, TRIM25, TTYH1, VAPA, SPPL3) etkileştiği rapor edilmiştir (228). Bu proteinlerden ise GPR156 (OMIM #620551), FBXW11 (OMIM #618914), STXBP1 (OMIM #612164) ve STXBP2 (OMIM #613101) olmak üzere dördü bir hastalıkla ilişkilendirilmiş olup bunlardan GPR156 (229, 230) ve STXBP2 (231) işitme kaybı ile ilişkilidir. Bu durum *PHTF2*'yi işitme kaybı için güçlü bir aday olarak ön plana çıkartmaktadır.

PHTF2 ile etkileşen bu proteinlerden GPR156, spesifik olarak, işitsel epiteldeki tüylü hücrelerde ifade edilmektedir (217, 218). GPR156, G-protein eşlikli bir reseptör olup transkripsiyon faktörü olan EMX2 tarafından kontrol edilerek G α i üzerinden kokleadaki tüylü hücrelerin oryantasyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (232). EMX2 ve G α i proteinlerinin her ikisi de tüylü hücrelerin polaritesi için kritik öneme sahiptir ve eksikliklerinde stereosilyaların oryantasyonu bozulmaktadır (232, 233). *GPR156*'nın fonksiyon kaybına neden olan varyasyonları ise sendromik olmayan konjenital otozomal resesif işitme kaybına neden olmaktadır (229, 230).

PHTF2 ile etkileşimi rapor edilen ikinci protein olan STXBP2 (Munc18-2) ise işitsel epiteldeki tüylü hücrelerde ifade edilmekle birlikte (217, 218) fonksiyonunu araştırmaya yönelik olarak hücre hatlarında yürütülen çalışmalar kapsamında salgı keseciklerinin zarında ve plazma zarında lokalize olduğu gösterilmiştir (234). STXBP2, kalsiyum varlığına bağlı olarak membran füzyonunda ve ekzositozda görev alan SYNTAXIN 3 proteini ile etkileşmektedir (235). STXBP2'nin yokluğunda, hücre apikalindeki kargo trafiği bozulmakta, apikalde lokalize olması gereken proteinler hücre içinde dağılarak hücre polaritesi bozulmaktadır (236). Hücre polaritesi için gerekli olan STXBP2'nin fonksiyon kaybı varyasyonları, hastaların bir kısmında sensörinöral işitme kaybının da rapor edildiği *Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Tip 5'e* (OMIM #613101) neden olmaktadır (231, 237, 238).

PHTF2 ile etkileşen GPR156'nın iç kulakta mekanosensör epitel üzerindeki tüylü hücrelerin polaritesini düzenlerken, STXBP2'nin de hücre polaritesinde görev alması

PHTF2'nin de tüylü hücrelerin polaritesinin düzenlenmesinde görev alabileceğini işaret etmektedir. PHTF2 ile etkileşimi rapor edilen proteinlerden OSBPL3 (ORP3) (239), STXBP1 (240), TTYH1 (241) ve VAPA (VAP33) (242) proteinlerinin de hücre polaritesi ile ilişkili olması ise bu çıkarımı desteklemektedir. PHTF2 ile etkileştiği rapor edilen GPR156 ve STXBP2 proteinleri yeni doğan farelerin mekanosensör epitel tüylü hücrelerde ifade edilmektedir (217, 218, 221). Bu durum, PHTF2'nin işitme için önemini ortaya koyarken TR-16 nolu ailedeki işitme kaybı ile kalıtılan varyasyonun ailedeki işitme kaybından sorumlu olabileceğine yönelik ilave kanıt sunmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında; *PHTF2* geni üzerinde tespit edilen c.2141T>G varyasyonunun *de novo* olması ve varyasyonun içinde yer aldığı 5.7 Mb'den daha geniş bir bölgenin ailedeki işitme kaybıyla segregasyonu (Şekil 40), ailede bağlantı analizi ile hesaplanan max LOD skorun 2.71 olması (Şekil 42), 714'ncü pozisyonundaki lösin amino asidinin tüm omurgalılarda korunmuş olması (Şekil 44), *in silico* araçlarla yapılan analizler sonucunda patolojik olarak değerlendirilmesi (Şekil 45-46), iç kulakta tüylü hücrelerde ifade edildiğinin gösterilmiş olması ve etkileştiği iki proteinin de işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olması ailede sorumlu varyasyonun olabileceğini desteklemektedir.

Genetik varyasyonların patojenite değerlendirme kılavuzu olan ACMG kriterlerine göre *PHTF2* geni üzerinde tanımladığımız varyasyon; patojeniteyi destekleyen PS2, PM2, PP1 ve PP3 kriterlerini (Tablo 9) karşılayarak muhtemel patojenik (P) kategorisine (Tablo 11) girmektedir. Bu durum *PHTF2*'yi otozomal dominant sensörinöral işitme kaybı için yeni bir gen olarak ön plana çıkartmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında dördü otozomal resesif ve biri otozomal dominant kalıtım gösteren beş ailedeki sendromik olmayan işitme kaybından sorumlu genetik etiyoloji tüm ekzom dizileme yaklaşımı ile araştırıldı. Geline aşamada, TR-37 nolu ailede daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan *GPSM2* geni üzerinde bilinen bir varyasyon (c.1093C>T; p.Arg365*), TR-15 ve TR-33 nolu ailelerde daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan sırasıyla *TBC1D24* geni üzerinde c.889C>T (p.Arg297Cys) ve *EPS8L2* geni üzerinde c.1921delG (p.Ala641Profs*13) olmak üzere işitme kaybından sorumlu olabilecek iki yeni varyasyon tespit edildi. TR-59 ve TR-16 nolu ailelerde ise sırasıyla daha önce işitme kaybı ile ilişkilendirilmemiş olan *DLGAP2* geni üzerindeki c.2554G>A (p.Ala852Thr) varyasyonunun ve *PHTF2* geni üzerindeki c.2141T>G (p.Leu714Arg) varyasyonunun bu ailelerdeki en güçlü aday varyasyon olarak belirlendi.

Böylelikle, insan genom projesinin devamı olarak yürütülen genlerin hastalıklarla ilişkilendirilmesi kapsamında bu çalışmamız ile iki genin daha hastalık ilişkisinin kurulmasında yönelik önemli bir mesafe kaydedilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışma kapsamında sendromik olmayan işitme kaybı olarak değerlendirilen beş aile incelendi. Bu ailelerden ikisinde, sorumlu varyasyon, daha önce sendromik işitme kayıpları ile ilişkilendirilmiş olan genler üzerinde tespit edildi. Bu durum, işitme kaybının genetik etiyolojisini araştırmaya yönelik çalışmalarda işitme testlerinin ötesinde bir klinik değerlendirmenin yapılmasının gerekliliği ön plana çıkmıştır.
2. Çalışmaya dahil edilen beş aileden yalnızca birinde daha önceden işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş olan bir varyasyonun tespit edilmiş olması; kendi toplumumuzun işitme kaybından sorumlu patolojik varyasyonlarının yeterli düzeyde bilinmiyor olduğu ve ilave çalışmalarla bu eksiğin giderilmesinin gerekliliği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.
3. Yeni nesil dizileme teknolojileri genetik hastalıklardan sorumlu olabilecek varyasyonların belirlenmesi sürecinde önemli bir hız kazandırmıştır. Ancak, bu yaklaşımın daha etkin kullanılabilmesi için tanımlanan varyasyonların patolojik etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalara önem verilmesi gerekmektedir.
4. Sendromik veya sendromik olmayan işitme kayıpları ile ilgili olarak 350'nin üzerinde gen biliniyor olmasına rağmen çalışmaya dahil edilen beş aileden ikisinde bilinen genler üzerinde patolojik olabilecek bir varyasyona rastlanmamış olup işitme kaybının genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik ilave çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2015). Thompson & Thompson genetics in medicine. Sekizinci baskı. Elsevier, Philadelphia; Sayfa 1-2.
2. Nance WE (2003). The genetics of deafness. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 9(2): 109-119.
3. Morton N (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. Annals of the New York Academy of Sciences 630: 16-31.
4. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE (1993). Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. American Journal of Medical Genetics 46: 486-491.
5. Yavuz E, Sağsözlü S (2018). Yenidoğanda işitme taramasının izlenmesi. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 6: 620-630.
6. Petit C, Levilliers J, Hardelin J-P (2001). Molecular genetics of hearing loss. Annual Review of Genetics 35: 589-645.
7. Tekin M, Arnos KS, Pandya A (2001). Advances in hereditary deafness. Lancet 358: 1082-1090.
8. GeneReviews®[Internet] (2024). Genetic hearing loss overview [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>. [Accessed 15 Haziran 2024].
9. Choe G, Lim JW, Chun YJ, Han JH, Kim BJ, Choi BY (2024). Clinical characteristics and hearing loss etiology of cochlear implantees undergoing surgery in their teens, 20s, and 30s. Eur Arch Otorhinolaryngol 281: 5169-5177.
10. Vona B, Nanda I, Hofrichter MA, Shehata-Dieler W, Haaf T (2015). Non-syndromic hearing loss gene identification: a brief history and glimpse into the future. Mol Cell Probes 29: 260-270.
11. Hereditary Hearing Loss Homepage (2024). Hearing loss homepage [online]. Available from: <https://hereditaryhearingloss.org/>. [Accessed 25 Aralık 2024].
12. National Center for Biotechnology Information-PubMed Central (2024). Pubmed [online]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Accessed 22 Aralık 2024].

13. Dazert S, Thomas JP, Loth A, Zahnert T, Stöver T (2020). Cochlear implantation: diagnosis, indications, and auditory rehabilitation results. *Deutsches Ärzteblatt International* 117: 690-700.
14. Erdogan AA (2015). Hearing loss and approaches to hearing loss in elderly. *The Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care (TJFMPC)* 10: 25-33.
15. Musiek FE, Baran JA (2018). The auditory system: Anatomy, physiology, and clinical correlates. İkinci baskı. Plural Publishing. Canada; Sayfa: 1-87.
16. Miao W, Li J, Tang M, Xian J, Li W, Liu Z, Liu S, Sabel B, Wang Z, He H (2013). Altered white matter integrity in adolescents with prelingual deafness: a high-resolution tract-based spatial statistics imaging study. *American Journal of Neuroradiology* 34: 1264-1270.
17. Kelley MW (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 837-849.
18. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP (2001). Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35: 589-646.
19. Kelley MW (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 7: 837-849.
20. Audio Archive (2024). Koklea ve korti organının yapısı [online]. Available from: <https://audioarchive1.blogspot.com/2020/12/periferik-isitme-sistemi.html>. [Accessed 28 Kasım 2024].
21. Dror AA, Avraham KB (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68: 293-308.
22. Grillet N (2022). High-resolution imaging of the mouse-hair-cell hair bundle by scanning electron microscopy. *STAR Protoc* 3: 101213.
23. Carlson BM (2019). Special senses—vision and hearing. *The Human Body* 3: 177-207.
24. Grunert SC, Bodi I, Odening KE (2017). Possible mechanisms for sensorineural hearing loss and deafness in patients with propionic acidemia. *Orphanet J Rare Dis* 12: 30.

25. World Health Organization (2024). Deafness and hearing loss [online]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>. [Accessed 22 Haziran 2024].
26. Morton CC, Nance WE (2006). Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 354: 2151-2164.
27. Sheffield AM, Smith RJH (2019). The epidemiology of deafness. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9: a033258.
28. StatPearls [Internet] (2018). Syndromic sensorineural hearing loss [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526088/>. [Accessed 22 Haziran 2024].
29. Dimitrov BI, Voet T, De Smet L, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Debeer P (2010). Genomic rearrangements of the GREM1-FMN1 locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani--Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly. *J Med Genet* 47: 569-574.
30. Tsukahara M, Azuno Y, Kajii T (1989). Type A1 brachydactyly, dwarfism, ptosis, mixed partial hearing loss, microcephaly, and mental retardation. *Am J Med Genet* 33: 7-9.
31. Horvath R, Freisinger P, Rubio R, Merl T, Bax R, Mayr JA, Shawan, Muller-Hocker J, Pongratz D, Moller LB, Horn N, Jaksch M (2005). Congenital cataract, muscular hypotonia, developmental delay and sensorineural hearing loss associated with a defect in copper metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28: 479-492.
32. Lalani SR, Safiullah AM, Molinari LM, Fernbach SD, Martin DM, Belmont JW (2004). SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *J Med Genet* 41: e94.
33. Reiners J, van Wijk E, Marker T, Zimmermann U, Jurgens K, te Brinke H, Overlack N, Roepman R, Knipper M, Kremer H, Wolfrum U (2005). Scaffold protein harmonin (USH1C) provides molecular links between Usher syndrome type 1 and type 2. *Hum Mol Genet* 14: 3933-3943.
34. Wonkam A, Manyisa N, Bope CD, Dandara C, Chimusa ER (2021). Whole exome sequencing reveals pathogenic variants in MYO3A, MYO15A and COL9A3 and differential frequencies in ancestral alleles in hearing impairment genes among individuals from Cameroon. *Hum Mol Genet* 29: 3729-3743.

35. Schrauwen I, Valgaeren H, Tomas-Roca L, Sommen M, Altunoglu U, Wesdorp M, Beyens M, Fransen E, Nasir A, Vandeweyer G, Schepers A, Rahmoun M, van Beusekom E, Huentelman MJ, Offeciers E, Dhooghe I, Huber A, Van de Heyning P, Zanetti D, De Leenheer EMR, Gilissen C, Hoischen A, Cremers CW, Verbist B, de Brouwer APM, Padberg GW, Pennings R, Kayserili H, Kremer H, Van Camp G, van Bokhoven H (2019). Variants affecting diverse domains of MEPE are associated with two distinct bone disorders, a craniofacial bone defect and otosclerosis. *Genet Med* 21: 1199-1208.
36. Nicchia GP, Ficarella R, Rossi A, Giangreco I, Nicolotti O, Carotti A, Pisani F, Estivill X, Gasparini P, Svelto M, Frigeri A (2011). D184E mutation in aquaporin-4 gene impairs water permeability and links to deafness. *Neuroscience* 197: 80-88.
37. Eckhard A, Gleiser C, Arnold H, Rask-Andersen H, Kumagami H, Muller M, Hirt B, Lowenheim H (2012). Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Mol Aspects Med* 33: 612-637.
38. Alshuaib WB, Al-Kandari JM, Hasan SM (2015). Classification of hearing loss. *Update On Hearing Loss* 4: 29-37.
39. Finsterer J, Fellingner J (2005). Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 69: 621-647.
40. Faridi R, Yousaf R, Inagaki S, Olszewski R, Gu S, Morell RJ, Wilson E, Xia Y, Qaiser TA, Rashid M, Fenollar-Ferrer C, Hoa M, Riazuddin S, Friedman TB (2024). Deafness DFNB128 Associated with a Recessive Variant of Human MAP3K1 Recapitulates Hearing Loss of Map3k1-Deficient Mice. *Genes (Basel)* 15: 845.
41. Velde HM, Vaseghi-Shanjani M, Smits JJ, Ramakrishnan G, Oostrik J, Wesdorp M, Astuti G, Yntema HG, Hoefsloot L, Lanting CP, Huynen MA, Lehman A, Turvey SE, Consortium D, Pennings RJE, Kremer H (2024). Exome variant prioritization in a large cohort of hearing-impaired individuals indicates IKZF2 to be associated with non-syndromic hearing loss and guides future research of unsolved cases. *Hum Genet* 143: 1379-1399.
42. Bharadwaj T, Acharya A, Khan FU, Khan S, Ullah I, Schrauwen I, Ahmad W, Leal SM (2024). THBS1 is a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment gene. *BMC Med Genomics* 17: 291.

43. Liu XZ, Xia XJ, Adams J, Chen ZY, Welch KO, Tekin M, Ouyang XM, Kristiansen A, Pandya A, Balkany T, Arnos KS, Nance WE (2001). Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum Mol Genet* 10: 2945-2951.
44. Donaudy F, Zheng L, Ficarella R, Ballana E, Carella M, Melchionda S, Estivill X, Bartles JR, Gasparini P (2006). Espin gene (ESPN) mutations associated with autosomal dominant hearing loss cause defects in microvillar elongation or organisation. *J Med Genet* 43: 157-161.
45. Zadro C, Alemanno MS, Bellacchio E, Ficarella R, Donaudy F, Melchionda S, Zelante L, Rabionet R, Hilgert N, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Carella M (2009). Are MYO1C and MYO1F associated with hearing loss? *Biochim Biophys Acta* 1792: 27-32.
46. Runge CL, Indap A, Zhou Y, Kent JW, Jr., King E, Erbe CB, Cole R, Littrell J, Merath K, James R, Ruschendorf F, Kerschner JE, Marth G, Hubner N, Goring HH, Friedland DR, Kwok WM, Olivier M (2016). Association of TMTC2 with human nonsyndromic sensorineural hearing loss. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 142: 866-872.
47. Salazar-Silva R, Dantas VLG, Alves LU, Batissoco AC, Oiticica J, Lawrence EA, Kawafi A, Yang Y, Nicastro FS, Novaes BC, Hammond C, Kague E, Mingroni-Netto RC (2021). NCOA3 identified as a new candidate to explain autosomal dominant progressive hearing loss. *Hum Mol Genet* 29: 3691-3705.
48. Zhou Y, Tariq M, He S, Abdullah U, Zhang J, Baig SM (2020). Whole exome sequencing identified mutations causing hearing loss in five consanguineous Pakistani families. *BMC Medical Genetics* 21: 1-8.
49. Liu Y, Tan M, Cai L, Lv L, Chen Q, Chen W, Yang H, Xu Y (2022). Genetic profiles of non-syndromic severe-profound hearing loss in Chinese Hans by whole-exome sequencing. *Gene*: 146258.
50. Marzola P, Melzer T, Pavesi E, Gil-Mohapel J, Brocardo PS (2023). Exploring the role of neuroplasticity in development, aging, and neurodegeneration. *Brain Sciences* 13: 1610.
51. Persic D, Thomas ME, Pelekanos V, Ryugo DK, Takesian AE, Krumbholz K, Pyott SJ (2020). Regulation of auditory plasticity during critical periods and following hearing loss. *Hearing Research* 397: 107976.

52. Sharma A, Campbell J (2011). A sensitive period for cochlear implantation in deaf children. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 24: 151-153.
53. Sharma A, Dorman MF, Spahr AJ (2002). A sensitive period for the development of the central auditory system in children with cochlear implants: implications for age of implantation. *Ear and hearing* 23: 532-539.
54. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (2023). Yenidoğan işitme tarama programı [online]. Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler/ulusal-isitme-tarama-programi?format=html>. [Accessed 1 Ocak 2023].
55. Tait M, Nikolopoulos T, Lutman M (2007). Age at implantation and development of vocal and auditory preverbal skills in implanted deaf children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71: 603-610.
56. Tomblin JB, Oleson JJ, Ambrose SE, Walker E, Moeller MP (2014). The influence of hearing aids on the speech and language development of children with hearing loss. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 140: 403-409.
57. Yoshinaga-Itano C, Sedey AL, Coulter DK, Mehl AL (1998). Language of early-and later-identified children with hearing loss. *Pediatrics* 102: 1161-1171.
58. Kennedy CR, McCann DC, Campbell MJ, Law CM, Mullee M, Petrou S, Watkin P, Worsfold S, Yuen HM, Stevenson J (2006). Language ability after early detection of permanent childhood hearing impairment. *New England Journal of Medicine* 354: 2131-2141.
59. Stöver T, Diensthuber M (2011). Molecular biology of hearing. *GMS Current Topics In Otorhinolaryngology, Head And Neck Surgery* 10: 1-15.
60. Thorpe RK, Smith RJ (2020). Future directions for screening and treatment in congenital hearing loss. *Precision Clinical Medicine* 3: 175-186.
61. Copeland BJ, Pillsbury HC (2004). Cochlear implantation for the treatment of deafness. *Annu Rev Med* 55: 157-167.
62. Sinnathuray AR, Toner JG, Geddis A, Clarke-Lytle J, Patterson CC, Hughes AE (2004). Auditory perception and speech discrimination after cochlear implantation in patients with connexin 26 (GJB2) gene-related deafness. *Otology & Neurotology* 25: 930-934.

63. Raphael Y, Altschuler RA (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin* 60: 397-422.
64. Collin RW, Kalay E, Tariq M, Peters T, van der Zwaag B, Venselaar H, Oostrik J, Lee K, Ahmed ZM, Çaylan R (2008). Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *The American Journal of Human Genetics* 82: 125-138.
65. Kabatova Z, Profant M, Simkova L, Groma M, Nechojdomova D (2009). Cochlear implantation in malformed inner ear. *Bratislavske Lekarske Listy* 110: 609-613.
66. Kim AH, Kileny PR, Arts HA, El-Kashlan HK, Telian SA, Zwolan TA (2008). Role of electrically evoked auditory brainstem response in cochlear implantation of children with inner ear malformations. *Otology & Neurotology* 29: 626-634.
67. StatPearls [Internet] (2023). Auditory brainstem response [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564321/>. [Accessed 20 May 2024].
68. Usami Si, Nishio Sy, Moteki H, Miyagawa M, Yoshimura H (2020). Cochlear implantation from the perspective of genetic background. *The Anatomical Record* 303: 563-593.
69. Miyagawa M, Nishio S-y, Ikeda T, Fukushima K, Usami S-i (2013). Massively parallel DNA sequencing successfully identifies new causative mutations in deafness genes in patients with cochlear implantation and EAS. *PLoS One* 8: e75793.
70. Wu C-C, Lin Y-H, Liu T-C, Lin K-N, Yang W-S, Hsu C-J, Chen P-L, Wu C-M (2015). Identifying children with poor cochlear implantation outcomes using massively parallel sequencing. *Medicine* 94: e107394.
71. Corvino V, Apisa P, Malesci R, Laria C, Auletta G, Franzé A (2018). X-linked sensorineural hearing loss: a literature review. *Current Genomics* 19: 327-338.
72. Connell SS, Angeli SI, Suarez H, Hodges AV, Balkany TJ, Liu XZ (2007). Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 137: 596-602.
73. Popov TM, Stancheva I, Kachakova DL, Rangachev J, Konov D, Varbanova S, Mitev VI, Kaneva RP, Popova DP (2014). Auditory outcome after cochlear implantation in patients

with congenital nonsyndromic hearing loss: influence of the GJB2 status. *Otology & Neurotology* 35: 1361-1365.

74. Wu C-M, Ko H-C, Tsou Y-T, Lin Y-H, Lin J-L, Chen C-K, Chen P-L, Wu C-C (2015). Long-term cochlear implant outcomes in children with GJB2 and SLC26A4 mutations. *PloS One* 10: e0138575.

75. Miyagawa M, Nishio S-y, Hattori M, Moteki H, Kobayashi Y, Sato H, Watanabe T, Naito Y, Oshikawa C, Usami S-i (2015). Mutations in the MYO15A Gene are a significant cause of nonsyndromic hearing loss: massively parallel DNA sequencing–based analysis. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 124: 158-168.

76. Xia H, Huang X, Guo Y, Hu P, He G, Deng X, Xu H, Yang Z, Deng H (2015). Identification of a novel MYO15A mutation in a Chinese family with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS One* 10: e0136306.

77. Pecci A, Verver EJ, Schlegel N, Canzi P, Boccio CM, Platokouki H, Krause E, Benazzo M, Topsakal V, Greinacher A (2014). Cochlear implantation is safe and effective in patients with MYH9-related disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9: 1-9.

78. Pecci A, Ma X, Savoia A, Adelstein RS (2018). MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene* 664: 152-167.

79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

80. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

81. Atik T, Bademci G, Diaz-Horta O, Blanton SH, Tekin M (2015). Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. *Genet Res (Camb)* 97: e4.

82. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 59: 5-15.

83. Yan D, Tekin M, Blanton SH, Liu XZ (2013). Next-generation sequencing in genetic hearing loss. *Genet Test Mol Biomarkers* 17: 581-587.

84. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20: 490-497.

85. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12: 745-755.
86. Duman D, Tekin M (2012). Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 2213-2236.
87. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461: 272-276.
88. Makalowski W (2001). The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol* 48: 587-598.
89. Majewski J, Schwartzenuber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N (2011). What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580-589.
90. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, Malonia SK (2023). Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. *Biology (Basel)* 12: 997.
91. University of California, Santa Cruz
Genome Browser (2023). Genome Browser exome probekit [online]. Available from: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?db=hg19&hgta_group=map&hgta_track=exomeProbesets&hgta_table=nexterrapidcapture_expandexome_targetedregions&hgta_doSchema=describe+table+schema. [Accessed 1 Ocak 2023].
92. Integrated DNA Technologies (2023). IDT-xGen™ Exome Hybridization [online]. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/products/next-generation-sequencing/workflow/xgen-ngs-hybridization-capture/pre-designed-hyb-cap-panels/exome-hyb-panel-v2>. [Accessed 1 Ocak 2023].
93. Twist Bioscience (2024). TWiST [online]. Available from: <https://www.twistbioscience.com/>. [Accessed 1 Ocak 2024].
94. MGI Tech (2024). MGI [online]. Available from: <https://en.mgi-tech.com/>. [Accessed 1 Ocak 2024].

95. Roche (2024). Hybridization-based target enrichment [online]. Available from: <https://sequencing.roche.com/global/en/products/product-category/hybridization-based-target-enrichment.html>. [Accessed 1 Ocak 2024].
96. Agilent: Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics (2024). Agilent sure select [online]. Available from: <https://www.agilent.com/en/product/next-generation-sequencing/ngs-assays-panels>. [Accessed 1 Ocak 2024].
97. Illumina (2024). Targeted sequencing:exome sequencing [online]. Available from: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html>. [Accessed 1 Ocak 2024].
98. Agilent: Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics (2024). Sureselect1 [online]. Available from: [https://www.agilent.com/cs/library/brochures/SureSelect%20CREV2%20Brochure%205991-7572EN%204.9%20\(Single%20Page\).pdf](https://www.agilent.com/cs/library/brochures/SureSelect%20CREV2%20Brochure%205991-7572EN%204.9%20(Single%20Page).pdf). [Accessed 10 Haziran 2024].
99. Agilent: Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics (2024). Sureselect2 [online]. Available from: <https://hpst.cz/sites/default/files/oldfiles/focused-exome-datasheet-5991-5202en.pdf>. [Accessed 10 Haziran 2024].
100. Agilent: Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics (2024). Sureselect3 [online]. Available from: https://www.agilent.com/cs/library/flyers/public/5990-9857en_lo.pdf. [Accessed 10 Haziran 2024].
101. Agilent: Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics (2024). Sureselect4 [online]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/AllExondatasheet-5990-9857EN.pdf>. [Accessed 10 Haziran 2024].
102. Roche (2024). Roche [online]. Available from: <https://www.pubcompare.ai/product/mDHiCZIBPBHhf-iFt00J/>. [Accessed 10 Haziran 2024].
103. Illumina (2024). Nextera rapid capture exome kit [online]. Available from: https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera-rapid-capture-exome-kit/downloads.html. [Accessed 10 Haziran 2024].

104. Illumina (2024). Illumina truseq [online]. Available from: <https://support.illumina.com/downloads/truseq-dna-exome-product-files.html>. [Accessed 10 Haziran 2024].
105. Twist Bioscience (2024). Twist human core exome [online]. Available from: <https://www.twistbioscience.com/products/ngs/fixed-panels/human-core-exome>. [Accessed 10 Haziran 2024].
106. Twist Bioscience (2024). Twist exome 2.0 [online]. Available from: <https://www.twistbioscience.com/products/ngs/fixed-panels/exome2>. [Accessed 10 Haziran 2024].
107. Twist Bioscience (2024). Twist comprehensive exome kit [online]. Available from: <https://www.twistbioscience.com/resources/product-sheet/twist-comprehensive-exome>. [Accessed 10 Haziran 2024].
108. MGI Tech (2024). MGIEasy exome capture V5 probe set [online]. Available from: https://jp.mgi-tech.com/products/reagents_info/id/10. [Accessed 10 Haziran 2024].
109. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, Shi L (2011). Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. Expert review of molecular diagnostics 11: 333-343.
110. Li H, Durbin R (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 26: 589-595.
111. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M (2010). The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research 20: 1297-1303.
112. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 17: 405-424.

113. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A (2005). GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res* 203: 88-93.
114. Kalay E, Karaguzel A, Caylan R, Heister A, Cremers FP, Cremers CW, Brunner HG, de Brouwer AP, Kremer H (2005). Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 26: 591.
115. Wattenhofer M, Sahin-Calapoglu N, Andreassen D, Kalay E, Caylan R, Braillard B, Fowler-Jaeger N, Reymond A, Rossier BC, Karaguzel A, Antonarakis SE (2005). A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. *Hum Genet* 117: 528-535.
116. Fuster-Garcia C, Garcia-Bohorquez B, Rodriguez-Munoz A, Aller E, Jaijo T, Millan JM, Garcia-Garcia G (2021). Usher Syndrome: Genetics of a Human Ciliopathy. *Int J Mol Sci* 22.
117. Kalay E, Uzumcu A, Krieger E, Caylan R, Uyguner O, Ulubil-Emiroglu M, Erdol H, Kayserili H, Hafiz G, Baserer N, Heister AJ, Hennies HC, Nurnberg P, Basaran S, Brunner HG, Cremers CW, Karaguzel A, Wollnik B, Kremer H (2007). MYO15A (DFNB3) mutations in Turkish hearing loss families and functional modeling of a novel motor domain mutation. *Am J Med Genet A* 143A: 2382-2389.
118. Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RW, Riazuddin S, Hmani-Aifa M, Venselaar H, Kavar MN, Tlili A, van der Zwaag B, Khan SY, Ayadi L, Riazuddin SA, Morell RJ, Griffith AJ, Charfedine I, Caylan R, Oostrik J, Karaguzel A, Ghorbel A, Riazuddin S, Friedman TB, Ayadi H, Kremer H (2008). Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nat Genet* 40: 1335-1340.
119. Kalay E, Li Y, Uzumcu A, Uyguner O, Collin RW, Caylan R, Ulubil-Emiroglu M, Kersten FF, Hafiz G, van Wijk E, Kayserili H, Rohmann E, Wagenstaller J, Hoefsloot LH, Strom TM, Nurnberg G, Baserer N, den Hollander AI, Cremers FP, Cremers CW, Becker C, Brunner HG, Nurnberg P, Karaguzel A, Basaran S, Kubisch C, Kremer H, Wollnik B (2006). Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 27: 633-639.

120. Weber ML, Hsin HY, Kalay E, Brozkova DS, Shimizu T, Bayram M, Deeley K, Kuchler EC, Forella J, Ruff TD, Trombetta VM, Sencak RC, Hummel M, Briseno-Ruiz J, Revu SK, Granjeiro JM, Antunes LS, Antunes LA, Abreu FV, Costa MC, Tannure PN, Koruyucu M, Patir A, Poletta FA, Mereb JC, Castilla EE, Orioli IM, Marazita ML, Ouyang H, Jayaraman T, Seymen F, Vieira AR (2014). Role of estrogen related receptor beta (ESRRB) in DFN35B hearing impairment and dental decay. *BMC Med Genet* 15: 81.
121. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S, den Hollander AI, Birinci Y, Lichtner P, Strom TM, Toraman B, Hoefsloot LH, Cremers CW, Brunner HG, Cremers FP, Karaguzel A, Kremer H (2007). Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 28: 718-723.
122. Schraders M, Ruiz-Palmero L, Kalay E, Oostrik J, del Castillo FJ, Sezgin O, Beynon AJ, Strom TM, Pennings RJ, Zazo Seco C, Oonk AM, Kunst HP, Dominguez-Ruiz M, Garcia-Arumi AM, del Campo M, Villamar M, Hoefsloot LH, Moreno F, Admiraal RJ, del Castillo I, Kremer H (2012). Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *Am J Hum Genet* 91: 883-889.
123. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
124. The High-Throughput Genomics (2024). HTG exome enrichment [online]. Available from: <https://uofuhealth.utah.edu/huntsman/shared-resources/gcb/htg/library-prep/exome-enrichment>. [Accessed 10 Haziran 2024].
125. Galaxy Europe (2024). Galaxy Europe [online]. Available from: (<https://usegalaxy.eu/>). [Accessed 22 Kasım 2024].
126. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 19: Unit 19 10: 1-21.
127. Garcia-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Gotz S, Tarazona S, Dopazo J, Meyer TF, Conesa A (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics* 28: 2678-2679.
128. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34: i884-i890.

129. Fast Quality Control (2024). Fastqc [online]. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. [Accessed 22 Haziran 2024].
130. Trim Galore! (2024). Trim Galore [online]. Available from: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. [Accessed 22 Haziran 2024].
131. University of California, Santa Cruz
Genome Browser (2024). genome browser [online]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/>. [Accessed 31 Aralık 2024].
132. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
133. Ebbert MT, Wadsworth ME, Staley LA, Hoyt KL, Pickett B, Miller J, Duce J, Alzheimer's Disease Neuroimaging I, Kauwe JS, Ridge PG (2016). Evaluating the necessity of PCR duplicate removal from next-generation sequencing data and a comparison of approaches. *BMC Bioinformatics* 17: 239.
134. Binary Call Format Norm Tool (2024). Bcftools norm [online]. Available from: <https://bio.tools/bcftools>. [Accessed 22 Haziran 2024].
135. FreeBayes (2024). Freebayes tool [online]. Available from: <https://bio.tools/freebayes>. [Accessed 22 Haziran 2024].
136. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 25: 4-7.
137. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6: 80-92.
138. Paila U, Chapman BA, Kirchner R, Quinlan AR (2013). GEMINI: integrative exploration of genetic variation and genome annotations. *PLoS Comput Biol* 9: e1003153.
139. The Genome Aggregation Database (gnomAD™) (2025). gnomAD [online]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>. [Accessed 30 Ocak 2025].

140. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29: 24-26.
141. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14: 178-192.
142. Coonrod EM, Durtschi JD, Margraf RL, Voelkerding KV (2013). Developing genome and exome sequencing for candidate gene identification in inherited disorders: an integrated technical and bioinformatics approach. *Arch Pathol Lab Med* 137: 415-433.
143. Neuman JA, Isakov O, Shomron N (2013). Analysis of insertion-deletion from deep-sequencing data: software evaluation for optimal detection. *Brief Bioinform* 14: 46-55.
144. Primer3web (2023). Primer3 [online]. Available from: <https://primer3.ut.ee/>. [Accessed 31 Aralık 2023].
145. National Center for Biotechnology Information (2023). NCBI-COBALT [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>. [Accessed 22 Aralık 2023].
146. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7: Unit7 20.
147. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 40: W452-457.
148. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations (2024). <https://www.mutationtaster.org/> [online]. [Accessed 20.12.2024].
149. Cheng J, Novati G, Pan J, Bycroft C, Zemgulyte A, Applebaum T, Pritzel A, Wong LH, Zielinski M, Sargeant T, Schneider RG, Senior AW, Jumper J, Hassabis D, Kohli P, Avsec Z (2023). Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science* 381: eadg7492.
150. Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) (2025). TÜSEB-Türkiye [online]. Available from: <https://tgd.tuseb.gov.tr/tr/>. [Accessed 30 Ocak 2025].
151. Ott J, Wang J, Leal SM (2015). Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 16: 275-284.

152. Akarsu AN, Lüleci G (2002). Gen Haritalaması: Ne Demek, Haritalar Nasıl Oluşturuluyor, Neler İçeriyor, Nasıl Yorumlanıyor? Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Sayfa: 29-39.
153. Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML, Kong A (2000). Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25: 12-13.
154. Rampsaud E, Scott WK, Hauser ER, Speer MC (2005). Potential for expanded power in linkage studies using the ALLEGRO and MERLIN software programs. *J Med Genet* 42: e68.
155. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58: 1347-1363.
156. Sobel E, Lange K (1996). Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58: 1323-1337.
157. Fast Probabilistic Record Linkage with Missing Data (2024). Fastlink [online]. Available from: <https://softlib.rice.edu/fastlink.html>. [Accessed 22 Haziran 2024].
158. SuperLink 1.3 – Genetic Linkage Analysis (2024). Superlink [online]. Available from: <https://mybiosoftware.com/superlink-1-7-genetic-linkage-analysis.html>. [Accessed 22 Haziran 2024].
159. Hoffmann K, Lindner TH (2005). easyLINKAGE-Plus--automated linkage analyses using large-scale SNP data. *Bioinformatics* 21: 3565-3567.
160. Royer-Bertrand B, Cisarova K, Niel-Butschi F, Mittaz-Crettol L, Fodstad H, Superti-Furga A (2021). CNV detection from exome sequencing data in routine diagnostics of rare genetic disorders: opportunities and limitations. *Genes (Basel)* 12: 1427.
161. Hong CS, Singh LN, Mullikin JC, Biesecker LG (2016). Assessing the reproducibility of exome copy number variations predictions. *Genome Med* 8: 82.
162. Koboldt DC (2020). Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Med* 12: 91.
163. Burdick KJ, Cogan JD, Rives LC, Robertson AK, Koziura ME, Brokamp E, Duncan L, Hannig V, Pfotenhauer J, Vanzo R, Paul MS, Bican A, Morgan T, Duis J, Newman JH,

Hamid R, Phillips JA, 3rd, Undiagnosed Diseases N (2020). Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A* 182: 1400-1406.

164. Rehman AU, Santos-Cortez RL, Morell RJ, Drummond MC, Ito T, Lee K, Khan AA, Basra MA, Wasif N, Ayub M, Ali RA, Raza SI, University of Washington Center for Mendelian G, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad M, Riazuddin S, Billington N, Khan SN, Friedman PL, Griffith AJ, Ahmad W, Riazuddin S, Leal SM, Friedman TB (2014). Mutations in TBC1D24, a gene associated with epilepsy, also cause nonsyndromic deafness DFNB86. *Am J Hum Genet* 94: 144-152.

165. Zhang L, Hu L, Chai Y, Pang X, Yang T, Wu H (2014). A dominant mutation in the stereocilia-expressing gene TBC1D24 is a probable cause for nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 35: 814-818.

166. Strazisar BG, Neubauer D, Paro Panjan D, Writzl K (2015). Early-onset epileptic encephalopathy with hearing loss in two siblings with TBC1D24 recessive mutations. *Eur J Paediatr Neurol* 19: 251-256.

167. Campeau PM, Kasperaviciute D, Lu JT, Burrage LC, Kim C, Hori M, Powell BR, Stewart F, Felix TM, van den Ende J, Wisniewska M, Kayserili H, Rump P, Nampoothiri S, Aftimos S, Mey A, Nair LD, Begleiter ML, De Bie I, Meenakshi G, Murray ML, Repetto GM, Golabi M, Blair E, Male A, Giuliano F, Kariminejad A, Newman WG, Bhaskar SS, Dickerson JE, Kerr B, Banka S, Giltay JC, Wieczorek D, Tostevin A, Wiszniewska J, Cheung SW, Hennekam RC, Gibbs RA, Lee BH, Sisodiya SM (2014). The genetic basis of DOORS syndrome: an exome-sequencing study. *Lancet Neurol* 13: 44-58.

168. Zimmern V, Riant F, Roze E, Ranza E, Lehmann-Horn F, de Bellescize J, Ville D, Lesca G, Korff CM (2019). Infantile-onset paroxysmal movement disorder and episodic ataxia associated with a TBC1D24 mutation. *Neuropediatrics* 50: 308-312.

169. Falace A, Filipello F, La Padula V, Vanni N, Madia F, De Pietri Tonelli D, de Falco FA, Striano P, Dagna Bricarelli F, Minetti C, Benfenati F, Fassio A, Zara F (2010). TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 87: 365-370.

170. Ozieblo D, Leja ML, Lazniewski M, Sarosiak A, Tacikowska G, Kochanek K, Plewczynski D, Skarzynski H, Oldak M (2021). TBC1D24 emerges as an important contributor to progressive postlingual dominant hearing loss. *Sci Rep* 11: 10300.

171. Finelli MJ, Oliver PL (2017). TLDC proteins: new players in the oxidative stress response and neurological disease. *Mamm Genome* 28: 395-406.
172. Shahin H, Walsh T, Rayyan AA, Lee MK, Higgins J, Dickel D, Lewis K, Thompson J, Baker C, Nord AS, Stray S, Gurwitz D, Avraham KB, King MC, Kanaan M (2010). Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Eur J Hum Genet* 18: 407-413.
173. Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, Lee MK, Thornton AM, Roeb W, Abu Rayyan A, Loulus S, Avraham KB, King MC, Kanaan M (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am J Hum Genet* 87: 90-94.
174. Koenigstein K, Gramsch C, Kolodziej M, Neubauer BA, Weber A, Lechner S, Hahn A (2016). Chudley-McCullough Syndrome: variable clinical picture in twins with a novel GPSM2 mutation. *Neuropediatrics* 47: 197-201.
175. Dahmani M, Ammar-Khodja F, Bonnet C, Lefevre GM, Hardelin JP, Ibrahim H, Mallek Z, Petit C (2015). EPS8L2 is a new causal gene for childhood onset autosomal recessive progressive hearing loss. *Orphanet J Rare Dis* 10: 96.
176. Wang R, Han S, Khan A, Zhang X (2017). Molecular analysis of twelve Pakistani families with nonsyndromic or syndromic hearing loss. *Genet Test Mol Biomarkers* 21: 316-321.
177. Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, Naboulsi M, Paronnaud J, Lemaître A, Megarbane A, Loiselet J, Weil D, Lathrop M, Petit C (2002). DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur J Hum Genet* 10: 210-212.
178. Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD (2003). Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet* 34: 421-428.
179. Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER (2003). PCDH15 is

expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet* 12: 3215-3223.

180. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER (2001). Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet* 69: 25-34.

181. Zazo Seco C, Wesdorp M, Feenstra I, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Lelieveld SH, Castelein S, Gilissen C, de Wijs IJ, Admiraal RJ, Pennings RJ, Kunst HP, van de Kamp JM, Tamminga S, Houweling AC, Plomp AS, Maas SM, de Koning Gans PA, Kant SG, de Geus CM, Frints SG, Vanhoutte EK, van Dooren MF, van den Boogaard MH, Scheffer H, Nelen M, Kremer H, Hoefsloot L, Schraders M, Yntema HG (2017). The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in The Netherlands. *Eur J Hum Genet* 25: 308-314.

182. Myers TA, Chanock SJ, Machiela MJ (2020). LDlinkR: An R package for rapidly calculating linkage disequilibrium statistics in diverse populations. *Front Genet* 11: 157.

183. Nuclear Localization Signal (2024). cNLS Mapper [online]. Available from: https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi. [Accessed 10 Aralık 2024].

184. Nigg EA (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779-787.

185. Simple Modular Architecture Research Tool (2024). SMART [online]. Available from: <http://smart.embl-heidelberg.de/>. [Accessed 20 Ekim 2024].

186. Ngoh A, Bras J, Guerreiro R, McTague A, Ng J, Meyer E, Chong WK, Boyd S, MacLellan L, Kirkpatrick M, Kurian MA (2017). TBC1D24 mutations in a sibship with multifocal polymyoclonus. *Tremor Other Hyperkinet Mov* 7: 452.

187. Chen P, Hou S, Li G, Lin Y, Lu J, Song L, Li GL, Pang X, Wu H, Yang T (2025). The p. S178L mutation in Tbc1d24 disrupts endosome-mediated synaptic vesicle trafficking of cochlear hair cells and leads to hearing impairment in mice. *Clin Genet* 107: 67-77.

188. Fischer B, Luthy K, Paesmans J, De Koninck C, Maes I, Swerts J, Kuenen S, Uytterhoeven V, Verstreken P, Versees W (2016). Skywalker-TBC1D24 has a lipid-binding pocket mutated in epilepsy and required for synaptic function. *Nat Struct Mol Biol* 23: 965-973.

189. Mauriac SA, Hien YE, Bird JE, Carvalho SD, Peyroutou R, Lee SC, Moreau MM, Blanc JM, Geyser A, Medina C, Thoumine O, Beer-Hammer S, Friedman TB, Ruttiger L, Forge A, Nurnberg B, Sans N, Montcouquiol M (2017). Defective Gpsm2/Galpha(i3) signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat Commun* 8: 14907.
190. Furness DN, Johnson SL, Manor U, Ruttiger L, Tocchetti A, Offenhauser N, Olt J, Goodyear RJ, Vijayakumar S, Dai Y, Hackney CM, Franz C, Di Fiore PP, Masetto S, Jones SM, Knipper M, Holley MC, Richardson GP, Kachar B, Marcotti W (2013). Progressive hearing loss and gradual deterioration of sensory hair bundles in the ears of mice lacking the actin-binding protein Eps8L2. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 13898-13903.
191. Ranta S, Zhang Y, Ross B, Takkunen E, Hirvasniemi A, de la Chapelle A, Gilliam TC, Lehesjoki AE (2000). Positional cloning and characterisation of the human DLGAP2 gene and its exclusion in progressive epilepsy with mental retardation. *Eur J Hum Genet* 8: 381-384.
192. Chien WH, Gau SS, Liao HM, Chiu YN, Wu YY, Huang YS, Tsai WC, Tsai HM, Chen CH (2013). Deep exon resequencing of DLGAP2 as a candidate gene of autism spectrum disorders. *Mol Autism* 4: 26.
193. Li JM, Lu CL, Cheng MC, Luu SU, Hsu SH, Hu TM, Tsai HY, Chen CH (2014). Role of the DLGAP2 gene encoding the SAP90/PSD-95-associated protein 2 in schizophrenia. *PLoS One* 9: e85373.
194. Shi S, Lin S, Chen B, Zhou Y (2017). Isolated chromosome 8p23.2-pter deletion: Novel evidence for developmental delay, intellectual disability, microcephaly and neurobehavioral disorders. *Mol Med Rep* 16: 6837-6845.
195. Sagar A, Pinto D, Najjar F, Guter SJ, Macmillan C, Cook EH (2017). De novo unbalanced translocation (4p duplication/8p deletion) in a patient with autism, OCD, and overgrowth syndrome. *Am J Med Genet A* 173: 1656-1662.
196. Catusi I, Garzo M, Capra AP, Briuglia S, Baldo C, Canevini MP, Cantone R, Elia F, Forzano F, Galesi O, Grosso E, Malacarne M, Peron A, Romano C, Saccani M, Larizza L, Recalcati MP (2021). 8p23.2-pter Microdeletions: seven new cases narrowing the candidate region and review of the literature. *Genes (Basel)* 12: 652.

197. Chien WH, Gau SS, Wu YY, Huang YS, Fang JS, Chen YJ, Soong WT, Chiu YN, Chen CH (2010). Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. *Clin Genet* 78: 449-456.
198. Jiang-Xie LF, Liao HM, Chen CH, Chen YT, Ho SY, Lu DH, Lee LJ, Liou HH, Fu WM, Gau SS (2014). Autism-associated gene *Dlgap2* mutant mice demonstrate exacerbated aggressive behaviors and orbitofrontal cortex deficits. *Mol Autism* 5: 32.
199. Hsieh MY, Tuan LH, Chang HC, Wang YC, Chen CH, Shy HT, Lee LJ, Gau SS (2023). Altered synaptic protein expression, aberrant spine morphology, and impaired spatial memory in *Dlgap2* mutant mice, a genetic model of autism spectrum disorder. *Cereb Cortex* 33: 4779-4793.
200. Lauer AM, Behrens D, Klump G (2017). Acoustic startle modification as a tool for evaluating auditory function of the mouse: Progress, pitfalls, and potential. *Neurosci Biobehav Rev* 77: 194-208.
201. Rasmussen AH, Rasmussen HB, Silahtaroglu A (2017). The *DLGAP* family: neuronal expression, function and role in brain disorders. *Mol Brain* 10: 43.
202. Ali RA, Rehman AU, Khan SN, Husnain T, Riazuddin S, Friedman TB, Ahmed ZM, Riazuddin S (2012). *DFNB86*, a novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus on chromosome 16p13.3. *Clin Genet* 81: 498-500.
203. Bakhchane A, Charif M, Salime S, Boulouiz R, Nahili H, Roky R, Lenaers G, Barakat A (2015). Recessive *TBC1D24* mutations are frequent in Moroccan non-syndromic hearing loss pedigrees. *PLoS One* 10: e0138072.
204. Xia W, Hu J, Ma J, Huang J, Wang X, Jiang N, Zhang J, Ma Z, Ma D (2019). Novel *TRRAP* mutation causes autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 96: 300-308.
205. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welch PL, Leon PE, King MC (1997). Nonsyndromic deafness *DFNA1* associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 278: 1315-1318.
206. Buniello A, Ingham NJ, Lewis MA, Huma AC, Martinez-Vega R, Varela-Nieto I, Vizcay-Barrena G, Fleck RA, Houston O, Bardhan T, Johnson SL, White JK, Yuan H,

Marcotti W, Steel KP (2016). Wbp2 is required for normal glutamatergic synapses in the cochlea and is crucial for hearing. *EMBO Mol Med* 8: 191-207.

207. Lachgar M, Morin M, Villamar M, Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA (2021). A novel truncating mutation in HOMER2 causes nonsyndromic progressive DFNA68 hearing loss in a Spanish family. *Genes (Basel)* 12: 411.

208. Zhang N, Hou M, Ma S, Liu Y, Wei W, Chen Z (2021). Novel variants in TBC1D24 associated with epilepsy and deafness: Report of two cases. *Int J Dev Neurosci* 81: 98-105.

209. Cogne B, Ehresmann S, Beauregard-Lacroix E, Rousseau J, Besnard T, Garcia T, Petrovski S, Avni S, McWalter K, Blackburn PR, Sanders SJ, Uguen K, Harris J, Cohen JS, Blyth M, Lehman A, Berg J, Li MH, Kini U, Joss S, von der Lippe C, Gordon CT, Humberson JB, Robak L, Scott DA, Sutton VR, Skraban CM, Johnston JJ, Poduri A, Nordenskjold M, Shashi V, Gerkes EH, Bongers E, Gilissen C, Zarate YA, Kvarnung M, Lally KP, Kulch PA, Daniels B, Hernandez-Garcia A, Stong N, McGaughran J, Retterer K, Tveten K, Sullivan J, Geisheker MR, Stray-Pedersen A, Tarpinian JM, Klee EW, Sapp JC, Zyskind J, Holla OL, Bedoukian E, Filippini F, Guimier A, Picard A, Busk OL, Punetha J, Pfundt R, Lindstrand A, Nordgren A, Kalb F, Desai M, Ebanks AH, Jhangiani SN, Dewan T, Coban Akdemir ZH, Telegrafi A, Zackai EH, Begtrup A, Song X, Toutain A, Wentzensen IM, Odent S, Bonneau D, Latypova X, Deb W, Study C, Redon S, Bilan F, Legendre M, Troyer C, Whitlock K, Caluseriu O, Murphree MI, Pichurin PN, Agre K, Gavrilova R, Rinne T, Park M, Shain C, Heinzen EL, Xiao R, Amiel J, Lyonnet S, Isidor B, Biesecker LG, Lowenstein D, Posey JE, Denomme-Pichon AS, Deciphering Developmental Disorders s, Ferec C, Yang XJ, Rosenfeld JA, Gilbert-Dussardier B, Audebert-Bellanger S, Redon R, Stessman HAF, Nellaker C, Yang Y, Lupski JR, Goldstein DB, Eichler EE, Bolduc F, Bezieau S, Kury S, Campeau PM (2019). Missense variants in the histone acetyltransferase complex component gene TRRAP cause autism and syndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* 104: 530-541.

210. Schoen CJ, Emery SB, Thorne MC, Ammana HR, Sliwerska E, Arnett J, Hortsch M, Hannan F, Burmeister M, Lesperance MM (2010). Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13396-13401.

211. Thurnham DI (1985). Antimalarial effects of riboflavin deficiency. *Lancet* 2: 1310-1311.

212. Shang KW, Zhang YH, Yang XL, Liu AJ, Yang ZX, Liu XY, Jiang YW, Wu XR (2016). Clinical features and gene mutations in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 54: 735-739.
213. Doummar D, Mignot C, Apartis E, Villard L, Rodriguez D, Chantot-Bastauraud S, Burglen L (2015). A Novel Homozygous TBC1D24 mutation causing multifocal myoclonus with cerebellar involvement. *Mov Disord* 30: 1431-1432.
214. Mavros CF, Brownstein CA, Thyagrajan R, Genetti CA, Tembulkar S, Graber K, Murphy Q, Cabral K, VanNoy GE, Bainbridge M, Shi J, Agrawal PB, Beggs AH, D'Angelo E, Gonzalez-Heydrich J (2018). De novo variant of TRRAP in a patient with very early onset psychosis in the context of non-verbal learning disability and obsessive-compulsive disorder: a case report. *BMC Med Genet* 19: 197.
215. Al-Maawali A, Barry BJ, Rajab A, El-Quessny M, Seman A, Coury SN, Barkovich AJ, Yang E, Walsh CA, Mochida GH, Stoler JM (2016). Novel loss-of-function variants in DIAPH1 associated with syndromic microcephaly, blindness, and early onset seizures. *Am J Med Genet A* 170: 435-440.
216. Lin L, Lyu Q, Kwan PY, Zhao J, Fan R, Chai A, Lai CSW, Chan YS, Shen X, Lai KO (2020). The epilepsy and intellectual disability-associated protein TBC1D24 regulates the maintenance of excitatory synapses and animal behaviors. *PLoS Genet* 16: e1008587.
217. Kolla L, Kelly MC, Mann ZF, Anaya-Rocha A, Ellis K, Lemons A, Palermo AT, So KS, Mays JC, Orvis J, Burns JC, Hertzano R, Driver EC, Kelley MW (2020). Characterization of the development of the mouse cochlear epithelium at the single cell level. *Nat Commun* 11: 2389.
218. Elkon R, Milon B, Morrison L, Shah M, Vijayakumar S, Racherla M, Leitch CC, Silipino L, Hadi S, Weiss-Gayet M, Barras E, Schmid CD, Ait-Lounis A, Barnes A, Song Y, Eisenman DJ, Eliyahu E, Frolenkov GI, Strome SE, Durand B, Zaghloul NA, Jones SM, Reith W, Hertzano R (2015). RFX transcription factors are essential for hearing in mice. *Nat Commun* 6: 8549.
219. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S (2010). Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 14: 533-537.
220. The Human Protein Atlas (2024). Human Protein Atlas [online]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/>. [Accessed 22 Ocak 2024].

221. Scheffer DI, Shen J, Corey DP, Chen ZY (2015). Gene expression by mouse inner ear hair cells during development. *J Neurosci* 35: 6366-6380.
222. Universal Protein Resource (2023). Uniprot [online]. Available from: <https://www.uniprot.org/>. [Accessed 1 Ocak 2023].
223. Huang YD, Huang YX, Li LJ, Xia H, Wen YM (2007). Analyses of differential expression of Homeobox genes between lingual squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 25: 500-503.
224. Hu Z, Liu K, Liu Q, Zhu H (2023). Whole exon capture sequencing for identifying mutations associated with pulmonary benign metastasising leiomyoma. *BMJ Case Rep* 16: e251072.
225. Chen M, Zou C, Tian Y, Li W, Li Y, Zhang D (2024). An integrated ceRNA network identifies miR-375 as an upregulated miRNA playing a tumor suppressive role in aggressive prostate cancer. *Oncogene* 43: 1594-1607.
226. Xu D, Fang H, Liu J, Chen Y, Gu Y, Sun G, Xia B (2022). ChIP-seq assay revealed histone modification H3K9ac involved in heat shock response of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Sci Total Environ* 820: 153168.
227. Kelesoglu N, Kori M, Yilmaz BK, Duru OA, Arga KY (2023). Differential co-expression network analysis elucidated genes associated with sensitivity to farnesyltransferase inhibitor and prognosis of acute myeloid leukemia. *Cancer Med* 12: 22420-22436.
228. Biological General Repository for Interaction Datasets (2024). Biogrid [online]. Available from: (<https://thebiogrid.org/>) [Accessed 1 Haziran 2024].
229. Greene D, Genomics England Research C, Pirri D, Frudd K, Sackey E, Al-Owain M, Giese APJ, Ramzan K, Riaz S, Yamanaka I, Boeckx N, Thys C, Gelb BD, Brennan P, Hartill V, Harvengt J, Kosho T, Mansour S, Masuno M, Ohata T, Stewart H, Taibah K, Turner CLS, Imtiaz F, Riazuddin S, Morisaki T, Ostergaard P, Loeys BL, Morisaki H, Ahmed ZM, Birdsey GM, Freson K, Mumford A, Turro E (2023). Genetic association analysis of 77,539 genomes reveals rare disease etiologies. *Nat Med* 29: 679-688.

230. Ramzan M, Bozan N, Seyhan S, Zafeer MF, Ayral A, Duman D, Bademci G, Tekin M (2023). Novel GPR156 variants confirm its role in moderate sensorineural hearing loss. *Sci Rep* 13: 17010.
231. Pagel J, Beutel K, Lehmberg K, Koch F, Maul-Pavicic A, Rohlf AK, Al-Jefri A, Beier R, Bomme Ousager L, Ehlert K, Gross-Wieltsch U, Jorch N, Kremens B, Pekrun A, Sparber-Sauer M, Mejstrikova E, Wawer A, Ehl S, zur Stadt U, Janka G (2012). Distinct mutations in STXBP2 are associated with variable clinical presentations in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL5). *Blood* 119: 6016-6024.
232. Kindt KS, Akturk A, Jarysta A, Day M, Beirl A, Flonard M, Tarchini B (2021). EMX2-GPR156-Galpai reverses hair cell orientation in mechanosensory epithelia. *Nat Commun* 12: 2861.
233. Jiang T, Kindt K, Wu DK (2017). Transcription factor Emx2 controls stereociliary bundle orientation of sensory hair cells. *Elife* 6: e23661.
234. Martin-Verdeaux S, Pombo I, Iannascoli B, Roa M, Varin-Blank N, Rivera J, Blank U (2003). Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *J Cell Sci* 116: 325-334.
235. Tadokoro S, Kurimoto T, Nakanishi M, Hirashima N (2007). Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin-3 in RBL-2H3 cells. *Mol Immunol* 44: 3427-3433.
236. Vogel GF, van Rijn JM, Krainer IM, Janecke AR, Posovszky C, Cohen M, Searle C, Jantchou P, Escher JC, Patey N, Cutz E, Muller T, Middendorp S, Hess MW, Huber LA (2017). Disrupted apical exocytosis of cargo vesicles causes enteropathy in FHL5 patients with Munc18-2 mutations. *JCI Insight* 2: 94564.
237. Stadt U, Rohr J, Seifert W, Koch F, Grieve S, Pagel J, Strauss J, Kasper B, Nurnberg G, Becker C, Maul-Pavicic A, Beutel K, Janka G, Griffiths G, Ehl S, Hennies HC (2009). Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet* 85: 482-492.
238. Meeths M, Entesarian M, Al-Herz W, Chiang SC, Wood SM, Al-Ateeqi W, Almazan F, Boelens JJ, Hasle H, Ifversen M, Lund B, van den Berg JM, Gustafsson B, Hjelmqvist H, Nordenskjold M, Bryceson YT, Henter JI (2010). Spectrum of clinical presentations in

familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 patients with mutations in STXBP2. *Blood* 116: 2635-2643.

239. Lehto M, Mayranpaa MI, Pellinen T, Ihalmo P, Lehtonen S, Kovanen PT, Groop PH, Ivaska J, Olkkonen VM (2008). The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J Cell Sci* 121: 695-705.

240. Rowe J, Calegari F, Taverna E, Longhi R, Rosa P (2001). Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins. *J Cell Sci* 114: 3323-3332.

241. Matthews CA, Shaw JE, Hooper JA, Young IG, Crouch MF, Campbell HD (2007). Expression and evolution of the mammalian brain gene Ttyh1. *J Neurochem* 100: 693-707.

242. Lapierre LA, Tuma PL, Navarre J, Goldenring JR, Anderson JM (1999). VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J Cell Sci* 112: 3723-3732.



EKLER

Ek 2. (Devam)

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Sendromik Olmayan Otozomal Resesif İşitme Kayıplarından Sorumlu Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yaklaşımı ile Araştırılması”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2022 /88		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ersan KALAY		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Doktora Öğr.Gamze ZEHİR KIRKBİR, Dr.Öğr.Üyesi Bayram TORAMAN, Doç.Dr.Hatice Bengü YALDIZ ÇOBANOĞLU		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☐			

Ek 3. Tüm Ekzom Dizileme Hizmeti Alımı Teknik Şartnamesi-1

1. Sekans ve veri hizmeti Türkiye’de verilmeli, yurt dışına DNA ve veri çıkışı olmamalıdır.
2. Örnek başı minimum 4-6 GB Clean Fastq Data tedarik edilmelidir.
3. Hizmet işini yüklenecek firma/kurum, 6698 numaralı kişisel verilerin korunması ve resmî gazetede yayınlanan Bilgi ve İletişim Güvenliği Tedbirleri 30823 sayılı genelgesine göre sekans hizmetini ve analizleri Türkiye’de yerleşik bir laboratuvarında yapmalıdır.
4. Dizileme için Illumina NovaSeq 6000 ya da DNBseq platformu/teknolojisi kullanılmalıdır.
5. Gerçekleştirilecek ekzom dizileme sonucunda elde edilecek sonuç dataları Fastq formatında verilmelidir.
6. Ekzom dizileme hizmetinde örnek başı standart olarak okuma derinliği ortalama %98’in üzerinde >20x derinlikte olacak şekilde gerçekleştirilmelidir.
7. Ekzom dizileme hizmeti an az $\geq 80\%$ Q30 kalitesinde olmalıdır
8. Verilecek olan ekzom hizmetinde genomdaki tüm ekzonları, ekzon-intron bağlantı bölgelerini ve genlerin 5’ ve 3’ UTR bölgeleri de dahil hedef bölge dizileme içerisinde olmalıdır.
9. Hizmette kullanılacak sekans cihazı 2x100, 2x150 ve 2x250 gibi farklı okuma uzunluklarında çalışmaya uygun olmalı ve gerektiğinde 2 flow cell aynı anda yüklenebilmelidir.
10. Dizileme uzunluğu PE100 veya PE150 şeklinde olup, 100X sekans derinliği ile yapılacaktır.
11. Firma/Kurum, 60 gün içerisinde sonuç verebilmeli ve sonuçları bir rapor şeklinde sunabilmelidir.

Ek 4. Tüm Ekzom Dizileme Hizmeti Alımı Teknik Şartnamesi-2

1. Bu teknik şartname 10273 nolu proje kapsamında satın alınacak olan tüm ekzom dizileme hizmetinde uyulacak esasları belirlemektedir.
2. Dizileme kütüphane oluşturma aşamasında Agilent Sureselect V6+UTR veya muadili bir sistem kullanılmalıdır.
3. Dizileme uzunluğu PE 150 (paired end 150) şeklinde olmalıdır.
4. Verilecek olan ekzom hizmetinde genomdaki tüm ekzonları, ekzon-intron bağlantı bölgelerini ve genlerin 5' ve 3' UTR bölgeleri de dahil hedef bölge dizileme içerisinde olmalıdır.
5. Ekzom dizileme hizmetinde örnek başı standart olarak okuma derinliği ortalama %98'in üzerinde, 100X derinlikte olacak şekilde gerçekleştirilmelidir.
6. Dizileme için Illumina NovaSeq 6000 platformu/teknolojisi kullanılmalıdır.
7. Örnek başı minimum 14 GB Clean Fastq Data tedarik edilmelidir.
8. Dizilemenin 50x coverage oranı >%98 olmalıdır.
9. Ekzom dizileme hizmeti en az $\geq$ %90 Q30 kalitesinde olmalıdır.
10. Gerçekleştirilecek ekzom dizileme sonucunda elde edilecek sonuç dataları Fastq formatında verilmelidir.
11. Firma/Kurum, 45 gün içerisinde sonuç verebilmeli.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze ZEHİR KIRKBİR
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) : -
E-Posta : : -
Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Halen
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya/Biyokimya	2018
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya	2015
Lise	Fethiye Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

İnsan Genetiği, Hücre Biyolojisi, Moleküler Biyoloji

YAYINLAR

1. Kırkbir Zehir G, Kolcuoğlu Y, Gültekin E, Bekircan O, Çolak A (2024). Investigation of the Properties of 1,2,4-Triazole-3-thione Schiff Base Derivatives by Urease Inhibition as Therapeutic or Agrochemical Candidate Molecules. *ChemistrySelect*, 9(26).

BİLDİRİLER

1. Kırkbir Zehir G, Kolcuoğlu Y, Gültekin E, Bekircan O, Çolak A. New Mercapto-1,2,4-triazole Compounds as Candidate Molecules for Ulcer Treatment. 1. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, 27-30 Ekim 2018, Antalya-Türkiye, s.63.

DAHİL OLUNAN PROJELER

1. Yakup KOLCUOĞLU (Yürütücü). Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Projesi (2016). L-asparaginazın Mezofilik Bir Organizmadan Klonlanması ve Antikanser Aday Enzim Olarak Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Araştırmacı*.
2. Gökhan YILDIZ (Yürütücü). 119S356 No'lu TÜBİTAK Projesi (2019). Non-Immune Hydrops Fetalis Hastalığı ile İlişkili LZTR1 Proteininin BACK-2 Domaininin Ras Sinyal Yolağındaki Etkisinin Araştırılması. *Bursiyer*.

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. YÖK 100/2000 Doktora Bursu (2018-2022)
2. 119S356 No'lu TÜBİTAK Projesi Doktora Bursu (2019-2022)

SERTİFİKA EĞİTİMLERİ/PROGRAMLARI

1. Mesleki Kurs (2019). Deneysel Çalışmalarda Hayvan Kullanımı Sertifikası Eğitim Programı, Eğitim Sertifikası, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
2. Cihaz Eğitimi (2019). Leica SP8 Advanced Confocal Laser Scanning Microscopy, Trabzon
3. Akademik Eğitim (2022). Doktora Eğitimi ve Danışmanlık Çalıştayı, Katılım Belgesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER

1. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği, Türkiye, 2021- Halen
2. Kimyagerler Derneği, Türkiye, 2016-Halen