

## Cx26 GENİNDE 35DELG MUTASYON ANALİZİNİN NON-SENDROMİK KALITSAL SAĞIRLIKTA TANI TESTİ OLARAK KULLANILMASI ♦

Oya UYGUNER\*, Melike ULUBİL-EMİROĞLU\*\*, Günter HAFİZ\*\*,  
Asadollah GHANBARI\*, Nermin BAŞERER\*\*, Memnune YÜKSEL-APAK\*,  
Bernd WOLNIK\*

### ÖZET

Bu çalışmada, otozomal resesif kalıtım modeline uyan non-sendromik sensorinöral (NSSİK) işitme kaybı bulunan 52 hastadan elde edilen DNA materyalinde Cx 26 geninin dizi analizi yapıldı. Test edilen ailelerin %27.8 inde Cx26 geninde mutasyon saptandı. Bu mutasyonların %79.3 ünü 35delG mutasyonu oluşturdu. Türk toplumunda bu mutasyonun prevalansını saptamak amacıyla 360 kontrol birey tarandı ve taşıyıcılık sıklığı %0.84 olarak saptandı. Elde edilen bulgular, Türk NSSİK hastalarında Cx26 genindeki 35delG mutasyonunun diğer Akdeniz ülkelerine göre daha az olduğunu gösterdi. Cx26 geninde 35 del G mutasyonunu saptamak için laboratuvarımız koşullarına uyarladığımız test, Mart 2001 den itibaren Moleküler Genetik Laboratuvarımızda rutin uygulamaya girdi.

**Anahtar kelimeler:** NSSİK (non-sendromik sensorinöral işitme kaybı), mutasyon, moleküler genetik.

### SUMMARY

*Application of 35delG mutation analysis test for Cx26 gene for the diagnosis of non-syndromic hereditary deafness.* In this study, we present the results of Cx26 gene sequence analysis data on the DNA isolates from 52 autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss patients. Cx 26 gene mutations were found in 27.8% of the tested alleles. 35delG mutation constituted to 79.3% of these mutations. For the carrier frequency of 35delG mutation in Turkish population, we screened 360 control DNA samples and found the prevalence rate of 0.84%. Our results showed that the 35delG mutation is less frequent in Turkey when compared with other Mediterranean countries. Mutation screening for 35delG on Cx26 gene has been established in our Molecular Genetics Laboratory and being offered as a routine diagnostic test since March 2001.

**Key words:** NSSHL (non-syndromic sensorineural hearing loss), mutation, molecular genetics.

### GİRİŞ

Dünyada her bin doğumdan birinde konjenital sağırılık görülmektedir. Bunların %75'ini otozomal resesif, %15'ini otozomal dominant, %2-3 ünü X'e bağlı ve çok azını da mitokondrial kalıtım ile geçen sağırılıklar oluşturmaktadır. Literatüre göre *Connexin 26* gen (Cx26) mutasyonları konjenital sağırılıkların yaklaşık %50'sinden sorumlu tutulmaktadır (1,2). *Connexin'ler gap junction* proteinleri olup küçük moleküllerin ve iyonların

pasif difüzyon ile hücreler arasından geçmesini sağlayan transmembran yapılarıdır. Cx 26 geni, iç kulakta kokleanın çeşitli bölgelelerinde ve cildin epidermis katmanında eksprese olan GJB2 (gap junction beta protein 2) proteinini kodlamaktadır (3).

Bugüne kadar, Cx 26 geninde sağırılığa neden olan 40 dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (4). Bu mutasyonların arasında en sık rastlanan mutasyon 35delG delesyonu (anlamsız mutasyon) olup, değişik topluluklar

Memuaya geldiği tarih: 14.11.2001

\* İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Tıbbi Genetik Bilim Dalı

\*\* İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Burçin-Engin İnan Ağır İşiten Çocuklar Tanı ve Eğitim Merkezi

♦ Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 1517/28072001.

da non-sendromik sensorinöral işitme kayıplarındaki (NSSİK) sıklığı %30 ile %62 arasında değişmektedir (5,6 ve 7).

Çalışmamız, Türkiye'de kalıtsal sağırılıklarda Cx26 gen mutasyonları üzerine yapılan ilk geniş kapsamlı çalışma olması ve Türk toplumuna özgün bulguları ortaya çıkarması bakımından orjinal bir çalışma niteliği taşımaktadır.

## MATERYAL ve METOD

### Olguların Seçimi ve Klinik Değerlendirmeler

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Burçin-Engin İnan Ağır İşiten Çocuklar Tanı ve Eğitim Merkezi'ne 1990-2001 yılları arasında açılmış 4000 hasta dosyası incelenerek, aile ağacı analizine göre otozomal resesif kalıtmı ve non sendromik işitme kaybı bulunan 57 aile onayları alınarak çalışma için seçildi. Ancak detaylı aile ağacı bilgilerinin dökümünden sonra ortak atadan geldikleri anlaşılan 5 aile çalışma dışı bırakıldı. Her bir ailede en az 2, en fazla 12 bireyde bilateral sensorineural işitme kaybı vardı. Olguların klinik muayeneleri ve odyolojik testleri (Serbest saha odyometresi, BE-RA-İşitsel beyin sapı cevabı odyometresi ve saf ses odyometresi) yapıldı. Sağırılığa neden olabilecek diğer unsurların örneğin neonatal komplikasyonların, bakteriyel menenjit ve diğer enfeksiyonların, ototoksik ilaç kullanımı ve travmanın dışlanması için ayrıntılı öykü alındı.

Taşıyıcılık sıklığının saptanması için, birbiri ile herhangi bir akrabalık ilişkisi bulunmayan bireylerden toplanan 360 kontrol DNA materyali kullanıldı.

### Mutasyon Analizi:

Genomik DNA, 5 ml periferik kan örneklerinden kit kullanılarak elde edildi (DNA Iso-

lation Kit for Mammalian Blood-Roche). Tüm hastaların (52 adet), Cx26 geninin kodon bölgesinin (ekson 2) tamamı yayınlanmış protokole göre çoğaltıldı (6). DNA fragmanları agaroz jelden saflaştırma yolu ile elde edildi (Agarose Gel DNA extraction Kit-Roche). Elde edilen saf DNA, dizi analizine tabi tutuldu (İontek-Bursa).

Cx26 geninde 35delG taşıyıcılık sıklığını saptayabilmek için bir süre önce yayınlanan, PCR-mediated site directed mutagenesis testi ve ardından BsiYI (MBI Fermentas) enzim kesim yöntemi laboratuvarımız koşullarına uyarlanarak kullanıldı (Bkz. Şekil 1) (8). Bu yöntem ile 360 kontrol DNA materyali 35delG mutasyon taşıyıcılığı için tarandı.

## BULGULAR

Cx26 geni dizi analizi sonuçlarına göre 52 olgunun 12 sinde homozigot, 1 inde tek allelde ve 2 sinde de "compound" heterozigotluk saptandı. Toplamda test edilen 104 allelin 29 unda (%27.8) mutasyon bulundu (Tablo 1). Mutasyon saptanan ailelerin 23 ünde (10 olguda homozigot 3 olguda heterozigot) 35delG mutasyonu vardı. Üç allelde (1 olguda homozigot ve bir olguda heterozigot), amino asit diziliminde W24X (nonsense) değişimine neden olan G71A mutasyonu, 1 allelde R127H değişimine neden olan G380A ve 2 allelde (1 olguda homozigot) 355-357del(GAG) kodon delesyonu (119delE) saptandı.

Bu bulguların yanısıra, bir olguda G160S ve V153I ve bir diğer olguda da V27A, E116G ve Q80R polimorfizmlerinin heterozigot olarak bulunduğu saptandı. İkinci olgunun anne ve babasında yapılan dizi analizinde, Q80R babada homozigot, annede heterozigot olarak saptandı.

360 kontrol DNA sında yapılan 35delG taramasında 3 kişide taşıyıcılık saptandı.

**Tablo 1.** Olguların klinik bulguları ve Cx 26 gen mutasyon analizi sonuçları (n=15)

Aile no	Başlama evresi	Sağrlığın şiddeti	Mutasyon
DF 1	Dil öncesi	Çok ileri derece	35delG/35delG
DF 2	Dil öncesi	Çok ileri derece	35delG/35delG
DF 10	Dil öncesi	Çok ileri derece	119delE/119delE
DF 15	Dil öncesi	Çok ileri derece	35delG/35delG
DF 22	Dil öncesi	Orta, ileri derece	35delG/35delG
DF 23	Dil öncesi	İleri, çok ileri derece	35delG/35delG
DF 27	Dil öncesi	İleri, çok ileri derece	35delG/35delG
DF 30	Dil öncesi	İleri derece	W24X/W24X
DF 32	Dil öncesi	İleri derece	35delG/35delG
DF 35	Dil öncesi	Orta, ileri derece	35delG/35delG
DF 38	Dil öncesi	İleri derece	35delG/35delG
DF 52	Dil öncesi	İleri, çok ileri derece	35delG/ R127H
DF 53	Dil öncesi	Çok ileri derece	35delG/35delG
DF 56	Dil öncesi	İleri derece	35delG/-?
DF 63	Dil öncesi	Orta, çok ileri derece	35delG/W24X

## TARTIŞMA

Test edilen 104 allelin 29 unda Cx26 gen mutasyonunun bulunması, Türkiye'de NSSİK li hastalarda bu gendeki mutasyon sıklığının %27.8 (29/104) olduğunu göstermektedir. Cx26 gen mutasyonlarının arasında da en sık saptanan mutasyon %79.3 (23/29) oranı ile 35delG olmuştur. Bu mutasyonun test edilen 104 alleldeki görülme sıklığı ise %22.1 (23/104)'dir. 35delG nin toplumdaki taşıyıcılık sıklığı %0.84 (1:120) olarak bulunmuştur. Taşıyıcılık sıklıkları İtalya'da 1:32, İspanya'da 1:40, Tunus'ta 1:77, Malta'da 1:36 ve Yunanistan'da 1:33 dür (7,9-10). Japonya'da yapılan bir çalışmada 35delG mutasyonuna hiç rastlanmamış bunun yerine % 73 oranında 235delC mutasyonu bulunmuştur (11). Elde edilen bulgular, Türkiye'de ki NSSİK'lı olgularda 35delG sıklığının diğer Akdeniz ülkelerine oranla düşük olduğunu göstermektedir. Türk toplumunda, 11 sağır ailede daha önce yapılan bir çalışmada Cx26 geninde 35delG mutasyon sıklığı %64 ve 674 kontrol DNA sında yapı-

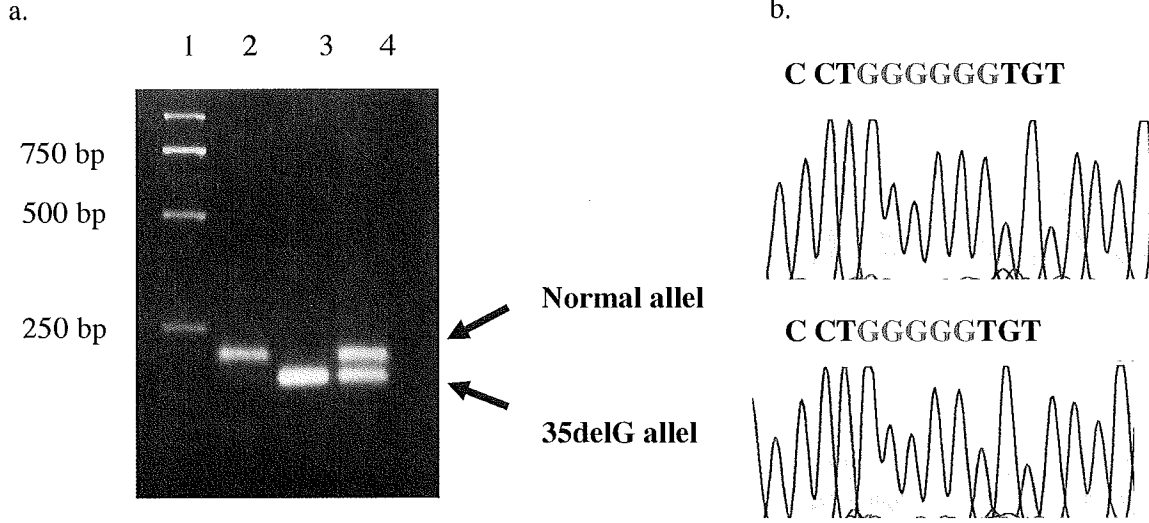
lan taşıyıcılık sıklığı ise %1.78 olarak bulunmuştur (12). Bu çalışmada bulunan oranların bizim saptadığımız oranlara göre daha yüksek bulunmasına karşın, incelenen hasta sayısının az olması ve kontrol DNA larm seçilme kriterlerinin bilinmemesi sonuçlarımızın karşılaştırılmasını güçleştirmiştir.

Cx 26 gen dizi analizinde bulunan diğer değişiklikler W24X, R127H ve 119delE, literatüre göre sağrlığa neden olan mutasyonlardır (13-15).

Bir olguda saptanan Q80R değişikliği ise sağır olgumuzda heterozigot, sağrlık anne ve babasında ise sırasıyla heterozigot ve homozigot olarak bulunduğundan, bu değişikliğin polimorfizm olduğu kanısındayız. Ancak olgumuzda bu polimorfizm diğer polimorfizmlerle birlikte (V27A ve E116G) bulunduğundan, bu durumun Cx26 gen ürün fonksiyonuna olan etkisinin araştırılması gerekmektedir (14).

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bir diğer bilgi de 35delG mutasyonunun farklı

**Şekil 1-a ve b:** (a) Cx26 geninde 35delG mutasyon taraması için laboratuvarımız koşullarına uyarlanan *PCR-mediated site directed mutagenesis* + BsiYI restriksiyon enzim kesim testi. Şekilde % 2.5 agaroz jel elektroforezinde yürütülen DNA ürünleri görülmektedir. Sıra 1: 1 kb DNA Ladder (Marker); sıra 2: normal DNA; sıra 3: Cx26 geninde 35delG homozigotluğu; sıra 4: Cx26 geninde 35delG heterozigotluğu. (b) Cx26 35delG için normal allelin ve mutant allelin dizi analiz sonucu (İontek-Bursa)



fenotipte ekspresyonlar göstermesidir (Tablo 1). Tüm hastalarımızda sağırılığın başlangıcı dil öncesi evrede gerçekleşmesine rağmen, şiddeti orta ile çok ileri derece arasında değişkenlik göstermektedir <sup>(1)</sup>. Bu durum sağırılığın şiddetini etkileyen başka faktörlerin bulunma olasılığını düşündürmektedir <sup>(15)</sup>.

Sonuç olarak, Türkiye'de otozomal resesif NSSİK'da Cx26 geninde 35delG mutasyon sıklığı %22.1 olarak ve taşıyıcılık sıklığı ise %0.84 (1:120) olarak saptanmıştır. Bu mutasyonun araştırılması için laboratuvarımız koşullarına uyarladığımız yöntem, bu tip sağırılıklarda erken dönemde tanı konulmasını ve ailelere gerekli danışmanlık ve eğitim hizmetlerinin verilmesine olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Kalatzis V, Petit C: The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 7:1589 (1998).
2. Kelsell D P, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM: Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387:80 (1997).
3. Richard G, White TW, Smith LE, Bailey RA, Compton JG, Paul DL, Bale SJ: Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 103:393 (1998).
4. Cohn ES, Kelley PM: Clinical phenotype and mutations in Connexin 26 (DFN1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet* 89: 130 (1999).
5. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahi H-HM, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S et al: Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the Connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6:2173 (1997).
6. Estivil X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Míla M, Zelante L, Gasparaini P: Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351:394 (1998).
7. Gasparini P, Rabionet R, Barbuji G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivil X, Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Europ J Hum Genet* 8:19 (2000).
8. Storm K, Willcox S, Flothmann K, Van Camp G: determination of the carrier frequency of the common GJB2 (Connexin 26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mut* 14:263 (1999).
9. Masmoudi S, Elgaied-Boulila A, Kassab I, Ben Arab S, Blanchard S, Bouzouita JE, Drira M, Kassab A, Hachicha S, Petit C, Ayadi H: Determination of the frequency of Connexin 26 mutations in inherited sensorineural deafness and carrier rates in the Tunisian population using DGGE. *J Med Genet* 37:39 (2000).
10. Antoniadis T, Gronskov K, Sand A, Pampanos A, Brondum-Nielsen K, Petersen MB: Mutation analysis of the