

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

Proje Başlığı

**GJB2 GENİNDE HETEROZİGOT MUTASYON OLAN İŞİTME ENGELLİ TÜRK
OLGULARDA AYNI GENİN KODLAMAYAN BÖLGELERİNİN TARANMASI**

(HIZLANDIRILMIŞ PROJE)

Proje Yürütücüsünün İsmi

Doç.Dr. Mustafa Tekin

Proje Numarası

20050809017

Başlama Tarihi

16.09.2005

Bitiş Tarihi

16.03.2005

Rapor Tarihi

16.03.2005

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - 2005

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

GJB2 GENİNDE HETEROZİGOT MUTASYON OLAN İŞİTME ENGELLİ TÜRK OLGULARDA AYNI GENİN KODLAMAYAN BÖLGELERİNİN TARANMASI

Doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan işitme kaybı yaklaşık 800 doğumda 1 görülür. Sendromik olmayan işitme kayıplarının en sık genetik nedeni DFNB1 lokusunda bulunan *GJB2* (connexin 26) genindeki homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlardır. Bu gendeki mutasyonlar birçok toplumda %20-50 oranında otozomal resesif işitme kayıplarına neden olur.

Değişik toplumlarda yapılan çalışmalarda %20-50'ye kadar olan işitme engelli hastaların DNA örneklerinde *GJB2* geninde yalnızca heterozigot mutasyonlar bulunmuştur. 2002 yılında İspanya'da bu kişilerde *GJB2* geni ile aynı lokusta bulunan *GJB6* geninde 309 kb büyüklüğünde bir delesyon heterozigot olarak bulunmuştur [del(*GJB6-D13S1830*)] (1). Bu delesyon İspanya, Fransa ve İngiltere'de çok sık; Belçika, Amerika ve Avustralya'da daha az sıklıkta; İtalya'da ise nadir olarak bulunmuştur. Avusturya, Çin ve Türkiye'de (sınırlı bir hasta grubunda) bulunmamıştır (2,3). Daha sonra 2005 yılında aynı bölgede 232 kb büyüklüğünde başka bir delesyon [del(*GJB6-D13S1854*)] tanımlanmıştır (4). Bu delesyon *GJB2* heterozigot işitme engellilerin İspanya'da %25.5, İngiltere'de %22.2, Brezilya'da %6.3, Kuzey İtalya'da %1.9'unda bulunmuştur. Fransa, Belçika, İsrail, Amerika ve Avustralya'da bulunamamıştır (4).

Daha önceki çalışmamızda 371 tane birbiriyle akraba olmayan ve sendromik bulgular taşımayan Türk işitme engellide *GJB2* geninin tek kodlayan ekzonu (2. ekzon) PCR-RFLP (5), SSCP ve dizi analizi yöntemleri kullanılarak taranmış 73 örnekte her iki allelde, 19 (%5) örnekte sadece bir allelde *GJB2* mutasyonu bulunmuştur (6). Heterozigot kalan olgularda ve *GJB2* geni kodlayan ekzonunda mutasyon olmayan 271 olguda del(*GJB6-D13S1830*) ve del(*GJB6-D13S1854*) delesyonları tarafımızdan taranmış ancak hiç pozitif örneğe rastlanmamıştır (yayınlanmamış bilgi). Türkiye'de *GJB2* mutasyonu taşıyıcı sıklığı yaklaşık %1.8 olduğuna göre (7) tarama sonucu heterozigot kalan Türklerde *GJB2* geninin kodlayan bölgeleri dışında bir mutasyon bulunması olasılığı vardır. *GJB2* geninin promotörünün özellikleri ve kodlamayan bir ekzonu olduğu daha önce gösterilmiştir. Bugüne değin *GJB2* geninin kodlamayan ekzonunu takip eden verici kırılma noktasında iki farklı mutasyon tanımlanmıştır (8). Bu mutasyonlar değişik toplumlarda bulunmuş olmasına rağmen Türklerde olup olmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışmada *GJB2* geni 2. ekzonunda heterozigot mutasyonu olan 19 Türk olguda *GJB2* geninin kodlamayan ekzonu daha önce tanımlanmış veya tanımlanmamış mutasyonlar için taranmıştır. Bu örneklerden 16 tanesinde kodlamayan ekson PCR ile amplifiye olmuş, kalan 3 örnek DNA kalitesinin bozulması nedeniyle amplifiye edilememiştir. İncelenen 16 olgunun 8'inde c.IVS1+1G>A (-3172G>A) mutasyonu heterozigot bulunmuştur. Türkiye'de ilk kez saptanan bu mutasyon heterozigot kalan işitme engellilerin önemli bir kısmını açıklamaktadır. Bu sonuçlarla Türkiye'de *GJB6* genini de içeren ve tanımlanmamış bir delesyonun olma olasılığının düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

SCREENING OF THE NONCODING REGIONS OF *GJB2* IN PROBANDS WITH DEAFNESS WHO REMAIN HETEROZYGOTE FOR A MUTATION IN *GJB2*

Mutations in *GJB2*, encoding gap junction protein connexin 26, at DFNB1 locus are found in 20-50% of cases with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in many populations. A 309-kb deletion, del(*GJB6-D13S1830*), and a 232-kb deletion, del(*GJB6-D13S1854*), involving the *GJB6* gene at DFNB1 locus have been reported as either accompanying mutation in *GJB2* heterozygotes or as homozygous pathogenic mutations. Our previous screening of the exon 2 of *GJB2* in 371 Turkish individuals with severe to profound sensorineural hearing loss showed biallelic alterations in 73 (19.7%) and single mutations in 19 (5.1%) probands (6). In this study, further screening of noncoding exon 1 of *GJB2* in *GJB2* heterozygotes demonstrated that 8 of 16 heterozygotes were carriers of heterozygous c.IVS1+1G>A (-3172G>A) mutation. Screening of two large *GJB6* deletions in 279 probands with nonsyndromic sensorineural hearing loss who were negative for *GJB2* mutations and in 8 probands with heterozygous *GJB2* mutations did not show a positive example in Turkey. In conclusion approximately 2.2% of deaf probands carry heterozygous *GJB2* mutations and neither del(*GJB6-D13S1830*) nor del(*GJB6-D13S1854*) is present in a large series of Turkish probands with sensorineural hearing loss.

II. Amaç ve Kapsam

GJB2 geninde heterozigot mutasyon bulunan örneklerde kodlamayan 1. ekzon mutasyonu olup olmadığının araştırılması.

III. Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda sendromik olmayan işitme kaybı olan ve daha önce yapılan *GJB2* geni mutasyon analizinde 2.ekzonunda (kodlayan ekzon) heterozigot mutasyon olan 19 kişinin DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu kişilerde *GJB2* geninin kodlamayan ekzonu PCR ile çoğaltılmıştır. Bu PCR ürünleri pürifikasyon sonrası doğrudan dizi analizi yapılarak incelenmiştir.

IV. Analiz ve Bulgular

Toplam 16 örneğin PCR amplifikasyonu sağlanmıştır. Diğer 3 örneğin amplifikasyonu sağlanamamıştır. Daha sonra başka bölgeler için denenen amplifikasyonlar da başarısız olduğundan bu örneklerin büyük olasılıkla degradasyona uğradığı düşünülmüştür. Dizi analizi yapılan 16 örneğin 8 tanesinde normal DNA dizisi saptanırken, 8 örnekte c.IVS1+1G>A (-3172G>A) mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur.

V. Sonuç ve Öneriler

Türkiye’de işitme engelliler arasında *GJB2* geninin kodlamayan ekzonunda c.IVS1+1G>A (-3172G>A) mutasyonu bulunmaktadır. *GJB2* geninin kodlayan ekzonunda yalnızca heterozigot mutasyon bulunan olguların yarısında c.IVS1+1G>A heterozigot olarak bulunmuştur. Bu durumda işitme engelliler arasında *GJB2* geni heterozigot kalanlar yaklaşık %2’ye düşmüştür. Bu oran daha önce Türkiye’de normal işitenler arasında bulunan *GJB2* heterozigot sıklığına yakındır (%1.8). Sonuçlar kodlayan ve kodlamayan ekzonları tarandıktan sonra *GJB2* geni heterozigot kalan işitme engellilerde işitme kaybının başka bir nedenle oluştuğunu düşündürmektedir.

VI. Kaynaklar

1. Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346:243–249.
2. Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HH, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJ, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F. Prevalence and Evolutionary Origins of the del(GJB6-D13S1830) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:1452-1458.
3. Tekin M, Duman T, Boğoçlu G, İncesulu A, Çomak E, İlhan İ, Akar N. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Human Mutation*, 21:552-553 (2003).
4. Del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, De Oliveria CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martin Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HH, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, Del Castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-D13S1830), found in trans with mutations in the GJB2 gene(connexin36) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet.*2005; in press.
5. Storm K, Wilcox 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 Mutat* 1999; 14: 263–266.
6. Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, Orman MN, Tastan H, Elsayed S, Akar N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clin Genet* 2005; 67:31-37.
7. Tekin M, Akar N, Cin Ş, Blanton SH, Xia XJ, Liu XZ, Nance WE, Pandya A. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Human Genetics*, 108: 385-9 (2001).

8. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. JAMA 1999; 16;281(23):2211-2216.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Araştırma bütçesinde bulunan 4000 YTL kapsamında PCR ve DNA dizi analizi sarf malzemeleri alınmıştır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)

Demirbaş alımı yapılmamıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

Araştırma sonuçları Journal of Genetics (SCI'e dahil) dergisinde yayına kabul edilmiştir (Ek1).

NOT :Verilen kesin rapor 2 nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, kesin rapor Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD veya disket ile verilecektir.