

Sensörinöral işitme kaybı olan kişilerde mitokondriyal 12S rRNA (*MTRNR1*) geninin taranması

Screening of the mitochondrial 12S rRNA (*MTRNR1*) gene
in probands with sensorineural hearing loss

Dr. Yaprak E. ÇIRÇIR,^{1,2} Dr. Armağan İNCESULU,³ Dr. Mustafa TEKİN^{1,2}

Amaç: Aminoglikozit kullanma öyküsü bulunan ve bulunmayan sensörinöral işitme kayıplı olgularda mitokondriyal DNA 12S rRNA (*MTRNR1*) genindeki mutasyonlar araştırıldı.

Hastalar ve Yöntemler: Araştırmaya sendromik olmayan sensörinöral işitme kayıplı 70 olgu (40 kadın, 30 erkek; yaş dağılımı 3-42) alındı. On bir bireyin öyküsünde işitme kaybı gelişmeden önce aminoglikozit kullanımı olduğu öğrenildi. Bütün olgularda önce *GJB2* (connexin 26) geni tarandı ve normal bulundu. m.1555A>G mutasyonunun araştırılmasında PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. Daha sonra *MTRNR1* geni PCR-TTGE ile tarandı. Bu taramada bant farklılığı gösteren örneklerle doğrudan dizi analizi yapıldı.

Bulgular: Aminoglikozit kullanımı öyküsü olan 11 hastanın birinde m.1555A>G mutasyonu bulundu. Aminoglikozit kullanımı öyküsü olmayan ve sensörinöral işitme kaybı olan iki kişide m.750A>G polimorfizmi saptandı. Diğer olgularda, patojenik olabilecek başka bir baz değişimine rastlanmadı.

Sonuç: Aminoglikozit ototoksitesine yatkınlık yapan en önemli DNA değişikliği olan m.1555A>G mutasyonu dışında Türkiye’de yaygın bir mitokondriyal 12S rRNA mutasyonu bulunamadı. Ancak, bu genin geniş serilerde taranması daha az görülen değişikliklerin saptanmasını sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Aminoglikozit; sensorinöral işitme kaybı/etiolojisi; RNA/genetik.

Objectives: We investigated mitochondrial DNA 12S rRNA (*MTRNR1*) gene mutations as a cause of hearing loss in probands with or without a history of aminoglycoside use.

Patients and Methods: The study included 70 patients (40 females, 30 males; age range 3 to 42 years) with nonsyndromic sensorineural hearing loss. Eleven probands had a history of aminoglycoside use before the onset of hearing loss. All cases were first screened and found to be negative for the *GJB2* (connexin 26) gene mutations. The m.1555A>G mutation was screened using the PCR-RFLP technique. The entire 12S rRNA gene was later screened with the PCR-TTGE technique followed by direct sequencing.

Results: Of 11 patients with a history of aminoglycoside use, one patient was found to have the m.1555A>G mutation. Two probands with no history of aminoglycoside use exhibited the m.750A>G polymorphism. No pathogenic base substitutions were detected in the remaining patients.

Conclusion: Apart from the common aminoglycoside ototoxicity-related DNA change, m.1555A>G, we could not identify a common mitochondrial 12S rRNA mutation associated with hearing loss in Turkey. Screening of larger series may document rare alterations.

Key Words: Aminoglycosides; hearing loss, sensorineural/etiology; RNA/genetics.

* ¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı (¹Department of Pediatric Molecular Pathology and Genetics, Medicine Faculty of Ankara University); ²Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (²Ankara University, Institute of Biotechnology); ³Ankara Eğitim Hastanesi 2. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği (³Department of Otolaryngology, Ankara Training Hospital), both in Ankara, Turkey.

* Dergiye geliş tarihi - 10 Haziran 2005 (Received - June 10, 2005). Düzeltme isteği - 11 Şubat 2006 (Request for revision - February 11, 2006). Yayın için kabul tarihi - 7 Nisan 2006 (Accepted for publication - April 7, 2006).

* İletişim adresi (Correspondence): Dr. Mustafa Tekin. Birlik Mah., 65. Sok., No: 20/7, 06610 Çankaya, Ankara, Turkey. Tel: +90 312 - 362 30 30 Faks (Fax): +90 312 - 320 14 33 e-posta (e-mail): mtekin@medicine.ankara.edu.tr

Doğuştan işitme kaybı yaklaşık 800 canlı doğumda bir görülür. İleri ve çok ileri derecedeki işitme kaybının en az yarısında genetik faktörlerin bulunduğu ortaya konmuştur. İşitme kaybı bulunan bir kişide ek bir klinik veya laboratuvar bulgusu varsa ve bulgular bir sendrom tanısı koymaya yetiyorsa sendromik işitme kaybı olduğu söylenir. Eğer ek bir bulgu saptanamazsa sendromik olmayan işitme kaybından bahsedilir. Sendromik olmayan ve doğuştan veya dil gelişimi öncesi ortaya çıkan işitme kaybı büyük çoğunlukla sensörinöral işitme kaybı şeklinde görülmektedir. İnsan hücreleri çekirdeğinde yer alan kromozomlar üzerinde bulunan ve yaklaşık üç milyar baz uzunluğundaki genomik DNA'da bugüne kadar 100'den fazla bölge ve 40'tan fazla gendeki değişikliklerin sendromik olmayan işitme kaybı yapabildiği gösterilmiştir.^[1,2] Çok daha küçük olan (yaklaşık 15 bin baz uzunluğunda) mitokondriyal DNA'da ise 12S rRNA (*MTRNR1*) geni başta olmak üzere bir grup gendeki mutasyonlar sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybıyla sonuçlanabilir.^[3,4]

Mitokondriyal 12S rRNA (*MTRNR1*) genindeki mutasyonlar diğer mitokondriyal mutasyonlara benzer şekilde maternal kalıtım gösteren işitme kaybı yapabilecekleri gibi, Mendel'in tanımladığı otozomal kalıtım biçimlerinden birine uyan, genellikle az sayıda bireyin etkilendiği, ailelerde de bulunabilir. Bu mutasyonlar aile öyküsünde hiç işitme kaybı olmayan kişilerde de işitme kaybı nedeni olabilir.^[4] *MTRNR1* genindeki değişimlerden işitme kayıplarında en sık rastlanan m.1555A>G mutasyonu hem klinik uygulamaları sırasında bilinmesi gereken özel bir öneme sahiptir. Bu mutasyon başka hiçbir faktör olmadan işitme kaybı yapabileceği gibi, aminoglikozit kullanımına bağlı işitme kayıplarının da önemli bir nedenidir.^[5] *MTRNR1* genindeki diğer bir değişim olan m.961delTCins(n) de yine aminoglikozit ototoksitesisiyle ilişkili olarak tanımlanmıştır.^[5] Yakın bir zamanda Çinli bir ailede tanımlanan aynı gendeki m.1494C>T mutasyonunun da aminoglikozit ototoksitesisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir.^[6] Bu mutasyonlar dışında, *MTRNR1* geninde işitme kaybıyla ilişkili olabilecek ancak büyük olasılıkla aminoglikozit ototoksitesisi nedeni olmayan az sayıda değişiklik bildirilmiştir.^[4,7]

İşitme kaybı nedeni olan mitokondriyal DNA değişikliklerinin sıklığı toplumlar arasında belirgin değişiklik göstermektedir. Örneğin m.1555A>G mutasyonu Yunanistan'da ve İngiltere'de çok nadir

saptanırken Uzak Doğu ülkeleri ve İspanya'da bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır.^[4]

Türkiye'de doğuştan veya dil gelişimi öncesi başlayan sensörinöral işitme kayıplı çocuklarda m.1555A>G mutasyonu sıklığı yaklaşık %1.5 olarak bildirilmiştir.^[8] Yine m.961delTCins(n) mutasyonuna Türkiye'de nadir olarak rastlanmıştır.^[9] Ancak, Türkiye'de diğer *MTRNR1* mutasyonlarının bulunup bulunmadığı ve varsa sıklıkları konusunda bir veri bulunmamaktadır.

Bu araştırmanın hipotezi, daha önce mutasyonlarının işitme kaybı yaptığı gösterilen *MTRNR1* geninde işitme kaybıyla ilişkili başka değişikliklerin bulunduğudür. Bu hipotezi test etmek için sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybı bulunan ve aminoglikozit kullanma öyküsü bulunan/bulunmayan bir grup insanda *MTRNR1* geninin tamamı incelenmiştir.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya sensörinöral işitme kaybı olan ve birbiriyle akraba olmayan 70 hasta (40 kadın, 30 erkek; yaş dağılımı 3-42) alındı. Olguların hiçbirinde bir sendrom tanısı konulmasını sağlayacak klinik ve/veya laboratuvar bulgusu yoktu. Olguların işitme kaybı şiddetleri orta-çok ileri dereceler arasında değişiyordu. Olguların 11'inde aminoglikozit kullanım öyküsü vardı. Biri hariç tüm hastalarda doğuştan veya prelingual başlangıçlı işitme kaybı bulunurken, 42 yaşındaki bir erkek olguda işitme kaybının 24 yaşında aminoglikozit kullanımı sonrası başladığı öğrenildi. Bu olguda tüberküloz tanısı sonrası birkaç doz streptomisin sonucu çınlama ile başlayan ve ilacın kesilmesine yol açan işitme kaybı öyküsü vardı. Aminoglikozit kullanım öyküsü olan diğer 10 olguda amikasin, tobramisin gibi bakteriyel enfeksiyonlarda kısa süreli kullanılan ve işitme kaybı ile doğrudan ilişkilendirilemeyen kullanım öyküleri alındı. Yetmiş olgu arasında 21'inin aile öykülerinde işitme engelli başka bireyler vardı. İki ailede vertikal kalıtım örneği varken, hiçbir ailede belirgin mitokondriyal (maternal) kalıtım örneği gösterilemedi. Aminoglikozit kullanım öyküsü olan 11 olgudan ikisinin ailesinde işitme engelli başka bireyler vardı. Diğer dokuz hastanın ailelerinde işitme engelli birey yoktu.

Olgulardan veya anne babalarından, çalışmaya başlamadan önce 22.10.2001 tarih ve 10-2001/141 sayılı Ankara Tıp Fakültesi Etik Kurulu onaylı bildirilmiştir onam alındıktan sonra antikoagülanlı

tüplere alınan periferik kan örneklerinden fenol-kloroform yöntemiyle DNA elde edildi.

Bütün olgularda önce *GJB2* (connexin 26) geninin kodlayan ve kodlamayan eksonları taranarak^[10,11] mutasyon olmadığı gösterildi. *MTRNR1* geni m.1555A>G mutasyonu daha önce tanımlanan şekilde PCR-RFLP yöntemiyle tarandı.^[3,8] Daha sonra *MTRNR1* geni birbiriyle örtüşen dört bölge halinde PCR ile çoğaltılarak PCR-TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) ile tarandı (bu yöntemde kullanılan primer dizileri dileyenlere gönderilebilir). Bu taramada bant farklılığı gösteren örnekler doğrudan dizi analizi yapıldı. TTGE daha önce yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA değişikliklerinin saptanmasında duyarlılığı ve homoplazmi-heteroplazmi ayırma gücü yüksek, kolay ve ucuz bir teknik olarak bildirilmiştir.^[12,13]

Tüm PCR reaksiyonlarında son konsantrasyonları 0.6 pikomol/µl olacak şekilde primer çiftleri kullanıldı. Diğer PCR bileşenleri son konsantrasyon 0.2 mM olacak şekilde deoksinükleotittrifosfatlar [dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Fermentas, Litvanya)], *Taq DNA Polimeraz* (Fermentas, Litvanya), 10 mM TrisHCl (25 °C pH: 8,8), 50 mM KCl, %0.8 Nonidet P40 ve 1.5 mM MgCl₂'dir. Toplam hacim 25 µl'ye ddH₂O ile tamamlanarak PCR yapıldı.

PCR-TTGE'de yapılan PCR reaksiyonları için protokol 95 °C'de 5 dk denatürasyon; bunu izleyen 35 siklusta 94 °C'de 1 dk, 56 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk'dır. Son siklus 72 °C'de 10 dk olarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele 5 µl yüklenerek agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

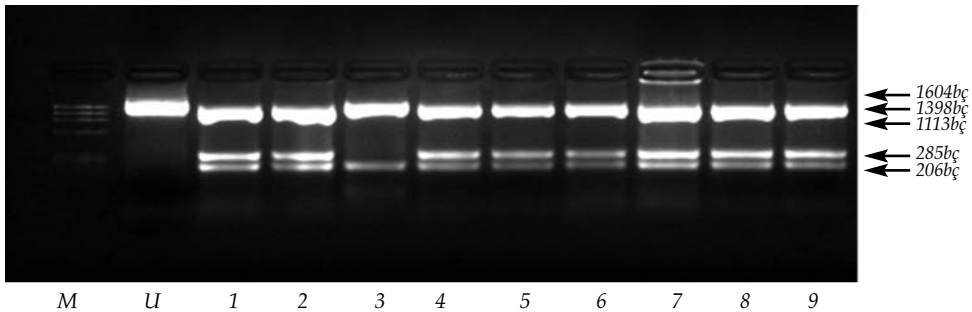
Bu çalışmada gerçekleştirilen enzimle kesim analizleri için reaksiyon tüpü başına 10 ünite BsmAI (Fermentas, Litvanya) restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. PCR ürünleriyle enzimlerin reaksiyon süreleri 16 saatte, 55 °C'de (optimum sıcaklık değeri) gerçekleşti.

PCR ürünleri TTGE elektroforezi yapılmadan önce 95 °C'de 30 saniye denature edildi ve 45 dakikalık bir periyotta 1.1 °C/dk hızında 45 °C'ye kadar yavaş yavaş soğutuldu.^[12] PCR ürünleri eşit hacimde 2X yükleme boyası ile boyanarak %8'lik poliakrilamidli 6 mol/L üre içeren jellere yüklendi. Altı-sekiz saat 130 voltta 1~2 °C arasında değişen sabit bir sıcaklık artışı ile yürütüldü (yazılım programı WinMelt 2.0.13'ten yararlanılarak sıcaklık aralığı hesaplandı). Gümüş boyama ile boyanan jellerde bant farklılığı gösteren örnekler yeniden PCR ve pürifikasyon sonrası "well-red" ile işaretli "cycle sequencing" kitleri (Beckman Coulter, California, ABD) kullanılarak dizi analizine sokuldu. Dizi analizi için Beckman Coulter CEQ 2000XL cihazı kullanıldı ve sonuçlar Beckman Coulter 4.3.9 yazılımı kullanılarak okundu.

BULGULAR

Yetmiş işitme engelliden birinde m.1555A>G mutasyonu pozitif bulundu (Şekil 1). Mutasyon taşıyan örnekte agaroz jelde yalnızca mutant DNA'ya ait bantlar gözlemlendiği için, bu mitokondriyal genom homoplazmik olarak kabul edildi. Bu olgu 24 yaşında tüberküloz tanısıyla streptomisin kullanmaya başlamış; ancak, ilk birkaç dozdan sonra işitme kaybı nedeniyle bırakmak zorunda kalmıştı (Şekil 2).

Aminoglikozit kullanım öyküsü olmayan ve sensörinöral işitme kaybı olan iki hastada PCR-TTGE

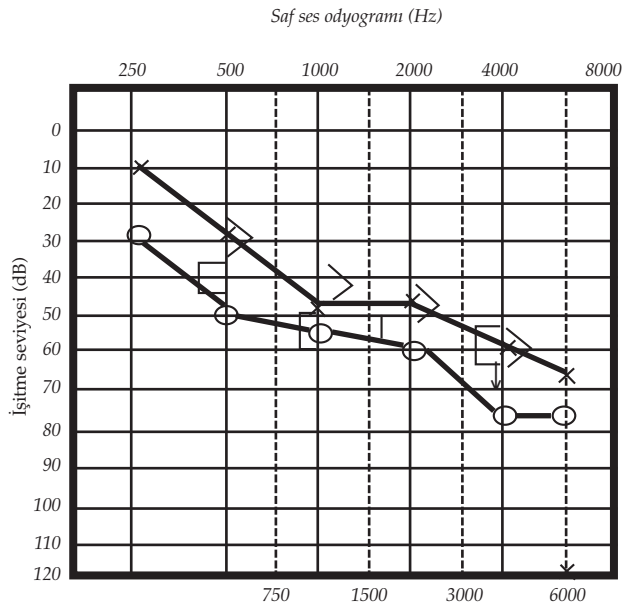


Şekil 1 - *MTRNR1*'deki 1555A>G mutasyonunun BsmAI restriksiyon endonükleazı ile gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. İlk kuyucuktaki örnek marker (Φ X174 HaeIII), ikinci kuyucuktaki örnek BsmAI enzimi ile muamele edilmemiş (Uncut) PCR ürünü (1604 bp), 1, 2 ve 4-9. örnekler m.1555A>G mutasyonunu taşımayan 1113, 285, 206bp'lik üç bant veren bireyleri, 3. örnekte bu mutasyonu taşıyan 1398 ve 206bp'lik iki bantı veren bireyin PCR ürünü. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri bu jelin sağ kısmında kalmış olup görüntülenmemiştir.

yöntemiyle bant değişikliği saptandı. Daha sonra DNA dizi analiziyle bu değişikliğin 750. pozisyonda A>G polimorfizmi olduğu bulundu (Şekil 3). Diğer örneklerde *MTRNR1* geninde başka bir değişikliğe rastlanmadı.

TARTIŞMA

Bu çalışmada m.1555A>G mutasyonu 70 işitme engelli arasında bir bireyde (%1.43) bulunmuştur. Araştırmaya katılan tek postlingual başlangıçlı işitme kaybı olan ve aminoglikozitlerle doğrudan ilişkilendirilebilen kişide bu mutasyona rastlanması ilgi çekicidir. Türkiye’de böyle bireylerin taranması halinde büyük olasılıkla daha fazla mutasyon taşıyıcıya ulaşılabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada mutasyon saptanan kişinin ailesinde işitme kayıplı başka birey bulunmamaktadır. Ancak mutasyon mitokondriyal DNA’da bulunduğu ve anneden kalıtıldığı için bireyin annesi ve kardeşlerinde de aynı mutasyonun bulunduğu kesindir. m.1555A>G mutasyonunun aminoglikozit kullanımını olduğunda 30 yaşında penetransının %97 olduğu, aminoglikozit kullanmaksızın ise %40 olduğu bildirilmiştir.^[14] Bu nedenle bu ailede m.1555A>G mutasyonu taşıyanlarda aminoglikozitlerle karşılaşma olmasa da yaş ilerledikçe işitme kaybı ortaya çıkma riski bulunmaktadır. Ancak bundan çok daha önemlisi bu mutasyonları taşıyanların aminoglikozitlerle karşılaşması mutlaka önlenmelidir.

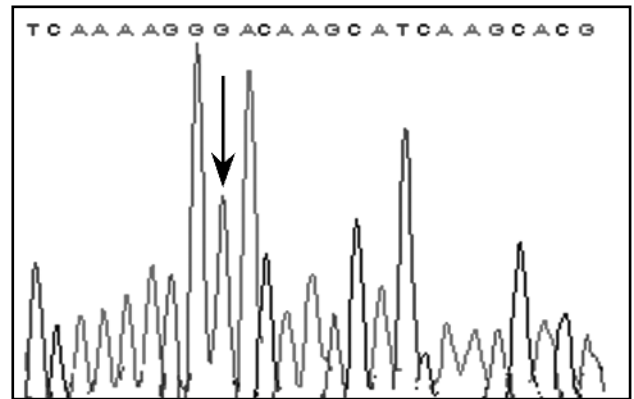


Şekil 2 - m.1555A>G mutasyonu saptanan hastanın 42 yaşında yapılan saf ses odyogramı.

Araştırmamızda m.1555A>G mutasyonu dışında iki işitme engellide m.750A>G polimorfizmi olduğu görülmüştür. Bu polimorfizm ilk kez 1992’de Brown ve ark.^[15] tarafından tanımlanmıştır. 12S rRNA geninin de aralarında bulunduğu RNA genleri, evrimsel açıdan yüksek derecede korunmuş bölgelerde bulunmaktadır. Fakat, m.750A>G değişiminin de içinde olduğu nadir görülen 21 polimorfizm, protein kodlamayan genlerde kontrol gruplarında da tanımlanmıştır. Bu değişime, önemli polimorfik sıklıklar incelenirken farklı etnik kökenli grupların kontrol grubunda da rastlanmıştır.^[16] Bu yüzden, bu değişimin bir nötral polimorfizm olduğu ve hastalık yapıcı bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Bizim m.750A>G bulduğumuz olgulardan biri sporadik bir olgudur ve aminoglikozit kullanım öyküsü yoktur. Yine aminoglikozit kullanma öyküsü olmayan diğer olgunun aile ağacında başka işitme engelliler olsa da DNA’daki değişimin kalıtımı işitme kaybıyla birlikte gitmemektedir.

Araştırma sonunda, aminoglikozit ile ilişkili veya ilişkisiz yukarıda tanımlananlar dışında *MTRNR1* değişikliği bulunamamıştır. Bu durum Türk toplumunda m.1555A>G dışında yaygın bir *MTRNR1* değişikliğinin bulunmadığını düşündürmüştür. Ancak daha fazla aminoglikozit kullanma öyküsü olan işitme kayıplı bireyin araştırılmasıyla yeni mutasyonların bulunabilmesi olasıdır.

Bu çalışmada aminoglikozit kullanımını öyküsü olan bir olguda m.1555A>G değişimi bulunduğundan bu konuda biraz bilgi verilmesinin uygun olacağını düşünüyoruz. Aminoglikozitler yüksek dozda verildiğinde neredeyse tüm memeli türlerinde işitme kaybı ortaya çıkarabilmektedir. Ancak kısa süre-



Şekil 3 - m.750A>G polimorfizminin dizi analizi görüntüsü. Mutasyon noktası okla işaretlenmiştir.

li ve normal dozda aminoglikozit kullanımı ile işitme kaybı gelişebileceği bu antibiyotiklerin insanlarda kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra anlaşılmıştır. Bu tür ototoksitesiteye genetik bir yatkınlık olabileceği ve bu genetik değişikliğin mitokondriyal DNA içinde olma olasılığı ilk kez 1989'da ortaya atılmıştır.^[17] İki yıl sonra Çin'in bir bölgesinde 763 işitme engellinin 167'sinde (%22) aminoglikozit kullanım öyküsü olduğu görülmüş ve işitme engelli ailelerde tartışmaya yer bırakmayacak şekilde anneden (mitokondriyal) kalıtım olduğu gösterilmiştir.^[18] Bu ailelerden üçü ve büyük bir Arap-İsrail ailesinde mitokondriyal DNA incelendiğinde işitme kaybı olan tüm bireylerde 12S rRNA (*MTRNR1*) geninde 1555. pozisyonda adenin nükleotidinin guanine dönüştüğü bulunmuştur.^[3] Aminoglikozitler etkilerini bakterilerdeki küçük ribozomal RNA'ya bağlanıp protein sentezini değiştirerek veya durdurarak yaparlar. Mitokondriyal DNA dizisi bakteriyel DNA'ya benzerlik göstermektedir. m.1555A>G mutasyonu insan mitokondriyal DNA'sında olduğu zaman bu benzerlik artmakta ve aminoglikozitler daha kolay bağlandıkları RNA molekülü üzerinde mitokondriyal protein sentezini azaltmakta veya durdurmaktadır.^[19] Bu şekilde ortaya çıkan enerji üretiminde azalma işitmenin normal fizyolojisinin bozulmasına yol açmakta ve geri dönüşsüz bir hasarla sonuçlanmaktadır.

Daha sonraki yıllarda yine mitokondriyal *MTRNR1* geninde m.1494C>T mutasyonunun Çinli bir ailede aminoglikozit ototoksitesitesine yatkınlık yaptığı gösterilmiştir.^[6] Aynı gendeki 961delTinsC (n) ve m.1095T>C mutasyonlarının da aminoglikozit ototoksitesitesiyle ilgili olduğu öne sürülmüş, ancak henüz ispatlanmamıştır.^[4] Ancak her durumda bugüne kadar tanımlanan mitokondriyal mutasyonların aminoglikozit ototoksitesitesine yatkınlık yapan genetik değişikliklerin tamamı olduğu söylenemez. Aminoglikozit kullanımına bağlı işitme kaybının en sık görüldüğü ülkelerden olan Çin'de yapılan bir çalışmada mitokondriyal kalıtım gösteren ve hep-sinde işitme kaybının aminoglikozit kullanımıyla ilgili olduğu gösterilen 34 ailenin yalnızca 16'sında bir mitokondriyal mutasyon gösterilebilmiştir.^[6]

Bu çalışmanın sonunda aminoglikozit ototoksitesitesine genetik yatkınlık yapan mitokondriyal m.1555A>G mutasyonunun Türkiye'de bulunduğu bir kez daha gösterilmiştir. Aminoglikozit kullanılması gereken bir hastada aile öyküsünde aminoglikozitle ilişkili veya ilişkisiz, doğuştan veya daha

sonradan ortaya çıkmış, progresif veya progresif olmayan, her türlü şiddette ve frekansta sensörinöral işitme kaybı olup olmadığı sorulmalıdır. Ancak bu çalışmanın sonucu da göstermektedir ki, bu şekilde alınan öykü negatif bile olsa o bireyde aminoglikozit ototoksitesitesine yatkınlık yapan bir DNA değişikliği bulunabilir. Aminoglikozit kullanmadan önce bu genetik değişikliklerin kısa sürede tespiti gündeme gelebilir. Mutasyon bulunması hastada ve anne tarafındaki akrabalarında aminoglikozit kullanımı için kesin bir kontrendikasyon oluşturmalıdır. Henüz bu tür değişikliklerin tamamı bilinmediğinden mutasyon sonucunun negatif çıkması diğer değişiklikler konusunda bilgi veremez. Bu nedenlerle aminoglikozit kullanımından mümkün olduğunca kaçınmak ve çok zorunlu hallerde işitmenin çok yakından izlenmesi tek seçenek olarak kalmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmada M.T. Türkiye Bilimler Akademisi tarafından TÜBA-GEBİP kapsamında desteklenmiştir (MT/TUBA-GEBİP/2001-2-19). Bu çalışma Y.E.Ç.'nin Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans tezi olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001;358:1082-90.
2. Smith RJ, Bale JF Jr, White KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 2005;365:879-90.
3. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993;4:289-94.
4. Tekin M. Aminoglycoside induced deafness. In: Fuchs J, Podda M, editors. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. New York: Dekker Publication; 2004. p. 57-61.
5. Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999;20: 151-6.
6. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004; 74:139-52.
7. Van Camp G, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000;57:409-14.
8. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Fitoz S, et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr* 2003;162:154-8.

9. Duman T, Arican ST, Tokgoz-Yilmaz S, Kupka S, Pandya A, Akar N, et al. Mitochondrial DNA alterations involving position 961 are not sufficient to explain sensorineural hearing loss. *Mediterr J Otol* 2005;1:110-6.
10. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat* 2003;21:552-3.
11. Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, Orman MN, Tastan H, Elsobky E, et al. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clin Genet* 2005;67:31-7.
12. Chen TJ, Boles RG, Wong LJ. Detection of mitochondrial DNA mutations by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clin Chem* 1999;45(8 Pt 1):1162-7.
13. Wong LJ, Chen TJ, Tan DJ. Detection of mitochondrial DNA mutations using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2004;25:2602-10.
14. Estivill X, Govea N, Barcelo E, Badenas C, Romero E, Moral L, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998;62:27-35.
15. Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 1992;130:163-73.
16. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6206-10.
17. Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. *Clin Genet* 1989;35:433-6.
18. Hu DN, Qui WQ, Wu BT, Fang LZ, Zhou F, Gu YP, et al. Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet* 1991;28:79-83.
19. Hamasaki K, Rando RR. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 1997;36:12323-8.