

Otozomal resesif işitme kaybı olan bir olguda aile öyküsü, klinik ve moleküler incelemeler

Family history, clinical features, and molecular characterization of a patient
with autosomal recessive non-syndromic hearing loss

Füsun DÜZCAN,¹ Bernd WOLLNIK,² Emre TEPELİ,¹ F. Necdet ARDIÇ,³ Oya UYGUNER,² Hüseyin BAĞCI¹

Kalıtıl çocukluk çağı işitme kayıplarının en yaygın şekli otozomal resesif non-syndromik işitme kayıplarıdır. Genetik heterojenite ve klinik bulguların belirgin olmaması nedeniyle bu tip işitme kayıplarında sorumlu genin tanımlanması oldukça zordur. Doğuştan işitme kaybı nedeniyle incelenen iki yaşındaki kız çocuğunun aile öyküsünde, ağabeylerinden birinin yanı sıra hastanın anne ve baba tarafında tek taraflı veya iki taraflı işitme kaybı olan altı kişinin daha olduğu öğrenildi. Anne-baba arasında akraba evliliği yoktu; ancak yakın köylerden oldukları belirlendi. Odyolojik inceleme sonucunda iki taraflı ileri derecede sensorinöral işitme kaybı tanısı kondu. İndeks olguda yapılan moleküler analizde, otozomal resesif işitme kaybına GJB2 geninde homozigot 35delG mutasyonunun neden olduğu saptandı.

Anahtar Sözcükler: Connexin/genetik; sağırılık/genetik; DNA mutasyon analizi; genetik tarama; işitme kaybı, sensorinöral/etyoloji; mutasyon; pedigrisi.

Autosomal recessive non-syndromic hearing loss is the most common form of inherited childhood deafness. Identification of the responsible gene in this type of hearing loss presents difficulties because of marked genetic heterogeneity and limited clinical presentation. A two-year-old girl was referred to our clinic because of congenital hearing loss. Family history showed that her brother and six relatives of her parents were also affected by unilateral or bilateral hearing loss. There was no consanguinity between the parents, though they were from close villages. Audiometric studies revealed severe bilateral sensorineural hearing loss. Molecular analysis of the index patient documented that autosomal recessive non-syndromic hearing loss resulted from the homozygous 35delG mutation in the connexin 26 gene.

Key Words: Connexins/genetics; deafness/genetics; DNA mutational analysis; genetic screening; hearing loss, sensorineural/etiology; mutation; pedigree.

Doğuştan sensorinöral işitme kaybı (SNİK) her 1000 çocuktan 1'inde görülen bir durumdur.^[1] Tüm olguların yaklaşık %60'ı genetik orijindir; bunla-

rın yaklaşık %80'i otozomal resesif, %20'si otozomal dominant, %2'si de X'e bağlı geçiş özelliği taşımaktadır.^[1,2] Genetik nedenlerin içinde %60'ı

◆ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ³KBB Hastalıkları Anabilim Dalı, Denizli; ²İstanbul Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı, İstanbul.

◆ Dergiye geliş tarihi: 1 Mart 2003. Düzeltme isteği: 7 Eylül 2003. Yayın için kabul tarihi: 20 Eylül 2003.

◆ İletişim adresi: Dr. Füsun Düzcan, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 20020 Kınıklı, Denizli. Tel: 0258 - 213 40 30 / 1330 Faks: 0258 - 213 28 74 e-posta: fduzcan@pamukkale.edu.tr

* V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (9-12 Ekim 2002, Konya).

◆ Departments of ¹Medical Biology, and ³Otolaryngology, Medicine Faculty of Pamukkale University, Denizli; ²Department of Pediatrics, Division of Medical Genetics, University of İstanbul, both in Turkey.

◆ Received: March 1, 2003. Request for revision: September 7, 2003. Accepted for publication: September 20, 2003.

◆ Correspondence: Dr. Füsun Düzcan, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 20020 Kınıklı, Denizli, Turkey. Tel: +90 258 - 213 40 30 / 1330 Fax: +90 258 - 213 28 74 e-mail: fduzcan@pamukkale.edu.tr

* Presented at the 5. Congress of Prenatal Diagnosis and Medical Genetics (October 9-12, 2002, Konya, Turkey).

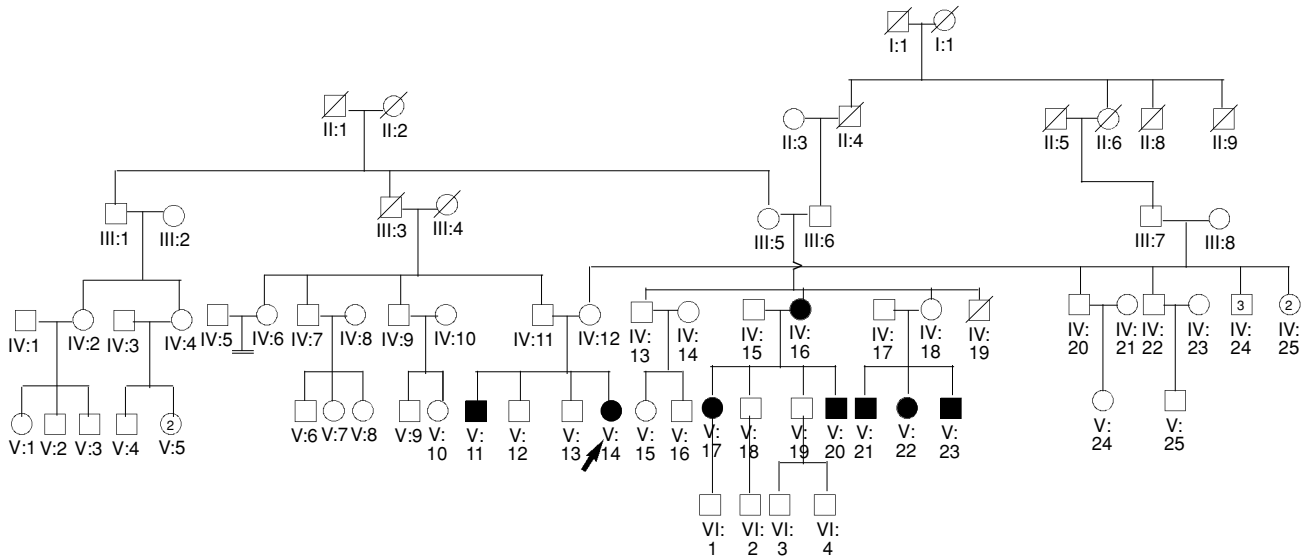
non-sendromik, %40'ı da sendromik işitme kaybı olarak görülmektedir.^[3] Epidemiyolojik ve genetik çalışmalar, 100'ü aşkın gen üzerindeki mutasyonların non-sendromik işitme kaybına neden olabileceğini göstermektedir.^[4] Bugüne kadar bu genler üzerinde 60 lokus tanımlanmış; connexin 26 (Cx26), connexin 31 ve alfa-tectorin proteinlerini kodlayan 21 gen klonlanmıştır.^[4] Skala media, endolenf içindeki yüksek potasyum konsantrasyonunun sağlanması, kokleada işitmenin gerçekleşebilmesi için gereklidir. Yüksek potasyum konsantrasyonunun sağlanması ise connexin 26 proteini sayesinde gerçekleşmektedir. Sorumlu gen olarak belirtilen GJB2 (gap-junction protein beta-2), connexin 26 proteinini kodlamaktadır. GJB2 genindeki mutasyon, Cx26 üretimini bozarak, ileriden çok ileri derecelere kadar değişen non-sendromik doğuştan SNİK'ye neden olmaktadır. Dolayısıyla, Cx26'yı kodlayan GJB2 genindeki mutasyonlar otozomal resesif non-sendromik işitme kaybında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle GJB2 geni üzerinde 35. nükleotidde saptanan G delesyonu, otozomal resesif non-sendromik işitme kaybında en sık karşılaşılan mutasyonu oluşturmaktadır. Nadiren de olsa, GJB2 geni üzerindeki mutasyonların otozomal dominant sendromik işitme kaybına da yol açtığı bilinmektedir.^[5-7] Türk toplumunda otozomal resesif non-sendromik işitme kaybı olan aileler üzerinde yapılan bir çalışmada GJB2 genindeki 35delG mutasyon sıklığının %23.1 olduğu saptanmıştır.^[8,9]

Bu yazıda, doğuştan işitme kaybı olan geniş bir aile klinik ve moleküler yönleriyle incelendi.

OLGU SUNUMU

Seslenince duymama ve konuşmama yakınmalarıyla getirilen iki yaşındaki indeks olgunun aile öyküsünden, ağabeylerinden birinde benzer işitme kaybı olasılığının bulunduğu anlaşıldı. Daha sonra aile öyküsü genişletildiğinde hastanın anne ve baba tarafında tek taraflı ve iki taraflı işitme kaybı olan benzer şikayetli altı kişinin daha olduğu öğrenildi (Şekil 1). Ailede bilinen bir akraba evliliği öyküsü olmadığı, ayrı köylerden evlenmelerin olduğu belirlendi. Fizik muayenede herhangi bir dismorfik bulguya rastlanmadı ve diğer sistem bulgularının normal olduğu görüldü. Odyolojik inceleme sonucunda iki taraflı ileri derecede SNİK tanısı kondu. İndeks olguda mutasyon taraması amacıyla periferik kan örneği alındı. Aile üyeleri, planlanan genetik çalışma için bilgilendirildi ve gerekli onaylar alındı.

Mutasyon analizi: Genomik DNA, 5 ml periferik kan örneklerinden kit kullanılarak elde edildi (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche Diagnostics, İstanbul, Türkiye). Analiz için, PCR-mediated site-directed mutagenesis ve ardından PCR-based restriction enzyme assay (BsiYI) (MBI Fermentas, İstanbul, Türkiye) enzim kesim yöntemi kullanıldı.^[10] PCR amplifikasyonu için normal allel ile uyumlu ileri primer ve mutant allelde BsiYI enzim kesimine olanak sağlayacak modifiye ters primer kullanıldı. BsiYI enzimi CCN5/N2GG dizisini tanıyacağından



Şekil 1 - Olgunun aile ağacı.

mutant alleli kesmekte, ancak normal alleli kesememektedir. Bu durumda, normal allele ait PCR ürünü 207 bp, mutant allele ait PCR ürünü ise 181 bp'dir. PCR ürününün analizinde bu iki alleli ayırabilmek amacıyla %2'lik moleküler tarama agaroz jeli (Roche Diagnostics, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Normal ve mutant PCR ürünleri, dizi analizi sonucuna göre 35delG mutasyonu için homozigot ve heterozigot oldukları belirlenen kontrol DNA'larla paralel olarak çalışıldı.

İndeks olgunun moleküler analizinde, enzim kesiminin doğruluğu, yeterliliği ve agaroz jelin ayırıcı özelliğinin kontrolleri için, 35delG mutasyonunu tek allelde taşıyan heterozigot DNA ve 35delG'yi iki allelde taşıyan homozigot DNA örnekleri, olgu DNA'sı ile aynı koşullarda paralel olarak çalışıldı. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucunda, heterozigot kontrol 181 bp ve 207 bp'de 2 bant, homozigot kontrol ve olguya ait PCR ürünleri de 181 bp'de tek bant olarak gözlemlendi (Şekil 2a). Moleküler test sonucu, indeks olgunun GJB2 geninde 35delG mutasyonunu homozigot olarak taşıdığını gösterdi (Şekil 2b).

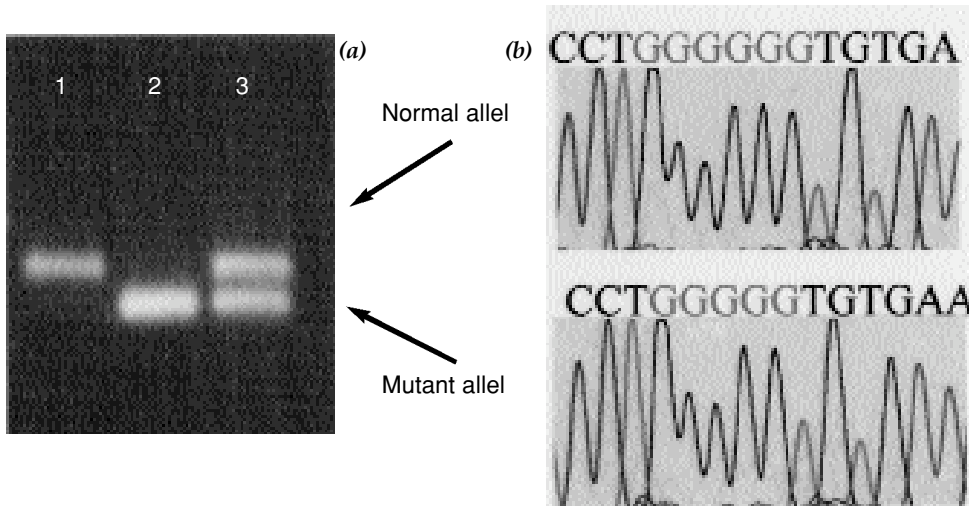
TARTIŞMA

Connexinler, küçük moleküllerin ve iyonların hücrelerarası iletişimini sağlayan ve gap birleşimini oluşturan proteinlerin geniş bir ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan Cx26'nın endolenfatik potasyum

iyonlarının resirkülasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. Bu proteini kodlayan GJB2 genindeki mutasyonlar, otozomal resesif non-sendromik işitme kaybında önemli bir rol oynamaktadır. Farklı topluluklarda bu gende birçok mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunların bir kısmı otozomal dominant, bir kısmı da otozomal resesif işitme kaybına yol açabilmektedir. Avrupa topluluklarında, otozomal resesif non-sendromik işitme kaybında en sık 35delG frame shift mutasyonu gözlenmektedir. Bu toplumlarda 35delG mutasyonu, GJB2 üzerinde görülebilen diğer mutasyonlar arasında en sık görülenidir. Türkiye'de otozomal resesif non-sendromik işitme kaybı belirlenen hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, GJB2 gen mutasyon sıklığı %31.6 oranında saptanmış; bunların %73.6'sını 35delG mutasyonunun oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, otozomal resesif non-sendromik işitme kaybı olan hastaların %23.1'inde 35delG mutasyonuna rastlanmıştır.^[8,9]

İspanyol ve İtalyan kişilerde Cx26 geni üzerindeki mutasyonları araştırmak için yapılan bir çalışmada 280 birey incelenmiş; Cx26 geni üzerindeki mutasyonlar içinde 35delG mutasyon oranı %85 bulunmuştur.^[11]

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise, birbiriyle ilişkisiz, işitme kaybı olan 235 çocuk bu mutasyon yönünden taranmış, 48 bireyin homozigot mutasyon taşıdığı belirlenmiştir. Bu lokusta gerçekleşen



Şekil 2 - (a) Amplifikasyon ürünlerinin, BsiYI enzim kesimi sonucu elde edilen bantların, %2'lik MS agaroz jelde yürütülerek görüntülenmesi. Birinci sırada indeks olgu, ikinci sırada 35delG mutasyonu için homozigot kontrol DNA örneği, üçüncü sırada 35delG mutasyonu için heterozigot DNA örneği gösterilmektedir. (b) Cx26 geninde normal ve mutant allellerin dizi analiz sonuçları.

diğer mutasyonlarla karşılaştırıldığında, GJB2 geninde 35delG mutasyonunun %90'ın üzerinde olduğu bildirilmiştir.^[12] Bu mutasyon nadiren otozomal dominant işitme kayıplarında da gözlenebilmektedir.

Olgumuzda ayrıntılı pedigrinin incelemesinde, ailede sekiz kişide tek taraflı ya da iki taraflı işitme kaybı olduğu öğrenilmiştir. Ailede bilinen bir akraba evliliği olmaması ve ayrı köylerden evlenmelerin olması, ilk başta bizi tam penetre olmayan otozomal dominant kalıtıma yönlendirdi. Ancak, daha sonra ayrıntılı öyküde, yakın iki köy arasındaki evliliklerin çok sık olması ve pedigrinin incelemesi sonucunda hastalığın otozomal resesif kalıtıma uygun olduğu görüldü. Aileye uygun genetik danışmanlık verildi. Mutasyon taraması sonucunda 35. nükleotidde homozigot G delesyonunun saptanması, işitme kaybının otozomal resesif olarak kalıtıldığını gösterdi. Türk toplumunda bu mutasyon sıklığının (35delG) yaklaşık %23.1 gibi yüksek oranda olması nedeniyle, non-sendromik kalıtsal sensorinöral işitme kayıplı olgulara doğru genetik danışmanlık verebilmek için, öncelikle GJB2 geninde mutasyon analizi çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
2. Fortnum H, Davis A. Epidemiology of permanent childhood hearing impairment in Trent Region, 1985-1993. *Br J Audiol* 1997;31:409-46.
3. Fishel-Ghodsion N, Falk RE. Deafness. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 1149-70.
4. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3.
5. Uyguner O, Tükel T, Baykal C, Eris H, Emiroglu M, Hafız G, et al. The novel R75Q mutation in the GJB2 gene causes autosomal dominant hearing loss and palmoplantar keratoderma in a Turkish family. *Clin Genet* 2002;62:306-9.
6. Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, Calzolari E, Cambiagli S, Scudder PM, et al. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 1999;8:1237-43.
7. Richard G, Rouan F, Willoughby CE, Brown N, Chung P, Ryyanen M, et al. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1341-8.
8. Uyguner O, Ulubil-Emiroğlu M, Hafız G, Ghanbari A, Başer N, Yüksel-Apak M ve ark. Cx26 geninde 35delG mutasyon analizinin non-sendromik kalıtsal sağırılıkta tanı testi olarak kullanılması. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002;65:115-9.
9. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafız G, Ghanbari A, Baser N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003;64:65-9.
10. Storm K, Willocx 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;14:263-6.
11. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agostina L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998;351: 394-8.
12. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet* 2001;60:452-5.