



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**BIOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ OLGULARINDA  
GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**SEDA KÖYBAŞI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyokimya Ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. M. CENGİZ YAKICIER**

**İSTANBUL, 2015**

## TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi: Yüksek Lisans (X)                      Doktora ( )

Anabilim Dalı : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Sahibi : Seda Köybaşı

Tez Başlığı : Biotinidaz Eksikliği Olgularında Genetik Değişikliklerin  
Araştırılması

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi A Blok 8. Kat

Sınav Tarihi : 27 Ağustos 2015, saat 11.00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)</b>	<b>Kurumu</b>	<b>İmza</b>
Prof. Dr. Cengiz YAKICIER	Acıbadem Üniversitesi	
<b>Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)</b>		
Doç. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU	Acıbadem Üniversitesi	
Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY	Gebze Teknik Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



27.08.2015

SEDA KÖYBAŞI

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Acıbadem Genetika Genetik Tanı Merkezi Müdürü- Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı, Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER'e

Yüksek lisans eğitimim süresinde, bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım, Prof. Dr. Aysel Özpınar' a, Yrd. Doç. Dr. Özge Can' a, Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Boylu' ya, Yrd. Doç. Dr. Deniz Ağırbaşı' ya ve Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay' a

Laboratuvar çalışmalarım için olanak sağlayan ve organize eden Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Serteser' e

Hep yanımda olan, kıymetli düşüncelerini, fikirlerini paylaşan, tecrübeleriyle bana yardımcı olan, saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. A. Sesin Kocagöz' e ve Dr. Neval Yurttutan Uyar' a

Laboratuvar uygulama aşamalarındaki yardımları ve çalışma yöntemleri geliştirme konusunda bilgi ve tecrübeleri ile sürekli desteğini gördüğüm Mol. Bio. Şirin Yüksel' e

Son olarak desteklerini, bana olan sevgi ve inançlarımı her zaman hissettiren, hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi olarak destekleri gösteren, bana güç veren kıymetli aileme ve bana destek olan arkadaşlarıma en içten saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ .....	ix
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	2
İÇİNDEKİLER	
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Metabolizma Hastalıkları .....	5
2.2. Yenidoğan Taraması .....	6
2.3. Biotin ve Biotinin Yapısı .....	7
2.4. Biotinidaz ve Biotinidaz Eksikliği .....	10
2.5. <i>BTD</i> Gen Yapısı .....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. Gereçler .....	16
3.1.1. Kullanılan Aletler .....	16
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler .....	16
3.1.3. Kullanılan Primerler .....	16
3.1.3.1. Primerler .....	16
3.1.3.2. DNA Dizisi ve Primer Seçimi .....	17
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler .....	21
3.1.4.1. PZR .....	21
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi .....	21
3.2. Yöntem .....	22

3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	22
3.2.2. Örneklerin Saklanması ve Materyalin Elde Edilmesi.....	22
3.2.3. Guthrie Kartlarından DNA İzolasyonu.....	23
3.2.4. PZR Koşulları ve Bileşenleri.....	24
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.2.6. Dizi Analizi Reaksiyonu.....	25
4.BULGULAR.....	28
4.1 PZR-Dizi Analizi Sonuçları.....	28
5. TARTIŞMA.....	34
6. ÇALIŞMANIN GELECEK PLANI.....	37
7. KAYNAKLAR.....	39
Ek 1.	
Özgeçmiş.....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Biotin döngüsü.....	7
Şekil 2. Biotinin biyokimyasal yapısı.....	8
Şekil 3. Biotin bağımlı karboksilazların metabolizmadaki rolleri.....	8
Şekil 4. Biotinidaz Eksikliği akış şeması.....	10
Şekil 5. <i>BTD</i> gen (3p25).....	13
Şekil 6. <i>BTD</i> gen mutasyon spektrumu.....	13
Şekil 7. <i>BTD</i> gen DNA/mRNA.....	14
Şekil 8. <i>BTD</i> gen sekansı.....	15
Şekil 9. Guthrie Kartı.....	23
Şekil 10. <i>BTD</i> geninin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 11. Ekzon 2' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. <i>BTD</i> geninde heterozigot mutasyon (c.98_104del7insTCC). .....	31
Şekil 12. Ekzon 4-I' de DNA Dizi Analizi görüntüsü. <i>BTD</i> geninde Ala171Thr-yabanıl tip dizi (c.511G>A).....	31
Şekil 13. Ekzon 4-II' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. <i>BTD</i> geninde Asp444His mutasyonu, heterozigot dizi (c.1330G>C). .....	32
Şekil 14. Ekzon 4-II' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. <i>BTD</i> geninde Arg538Cys ve Arg538His mutasyonu, yabanıl tip dizi (c.1612C>T- c.1613G>A).....	33

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Biotinidaz Aktivitesi.....	11
<b>Tablo 2.</b> <i>BTD</i> geni Ekzon 2' nin çoğaltılması için kullanılan primer set.....	19
<b>Tablo 3.</b> <i>BTD</i> geni Ekzon 4-I' in çoğaltılması için kullanılan primer set .....	19
<b>Tablo 4.</b> <i>BTD</i> geni Ekzon 4-II' nin çoğaltılması için kullanılan primer set.....	20
<b>Tablo 5.</b> Dizi Analizi Reaksiyonu .....	26
<b>Tablo 6.</b> Dizi Analizi Sonuçları.....	29



## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

**ACC  $\alpha$ :** Asetil-CoA karboksilaz  $\alpha$

**ACC  $\beta$ :** Asetil-CoA karboksilaz  $\beta$

**ACGM:** Amerikan Colege of Medical Genetics

**AL:** Lysis Buffer

**AW1:** Yıkama solüsyonu 1

**AW2:** Yıkama solüsyonu 2

**ATL:** Tissue Lysis Buffer

**BE:** Biotinidaz eksikliği

***BTD*:** Biotinidaz sentezinden sorumlu gen

**Dk:** Dakika

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**dNTP:** Deoksinükleotid trifosfat

**Ekzon 2:** *BTD* Geninde bulunan literatüre göre en sık gözlenen mutasyonun yer aldığı ekzon

**Ekzon 4-I:** *BTD* Geninde bulunan literatüre göre en sık gözlenen mutasyonun yer aldığı ekzon

**Ekzon 4-II:** *BTD* Geninde bulunan literatüre göre en sık gözlenen mutasyonun yer aldığı ekzon

**EtBr:** Etidium bromür

**FE:** Fenilketonüri

- HCS:** Holokarboksilaz sentetaz enzimi
- MCC:** 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information
- PC:** Piruvat karboksilaz
- PCC:** Propiyonil-CoA karboksilaz
- PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- TAE:** Tris bazı, asetik asit ve EDTA tamponu
- Tm:** Erime sıcaklığı
- Tris:** Trishydroxymethylaminomethane
- °C:** Santigrat derece



## ÖZET

Biotin vücutta bulunan karboksilaz enzimlerinden dördünün kofaktörü olarak görev alan, suda eriyen vitamindir. Öncelikle biotin, enzimin yapısındaki apoproteinlere kovalent olarak bağlanarak bu enzimleri aktif hale getirir. Bu bağlanma holokarboksilaz sentaz tarafından gerçekleştirilir. Biotinidaz eksikliği, biotin eksikliği sonucunda oluşan, nörolojik ve cilt anormallikleri ile karakterize olan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Eğer tedavi edilmezse, hücre içi biotin tükenmesi biotin bağımlı karboksilaz aktivitesinin bozulmasına yol açar ve bozukluğun olduğu bireylerde nörolojik anormalliklere neden olabilir. *BTD* geni biotinidaz üretimi için, sorumlu enzimi kodlar. *BTD* geni 3p25 lokusunda yer alan dört ekzonlu 543 aminoasit kodlayan bir genidir. Biotin eksikliği ile alakalı olan *BTD* geninde 402'nin üstünde mutasyon saptanmıştır. Mutasyonlar, *BTD* geninde biotinidaz enzim aktivitesini değiştirir. Bu çalışmada, Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarında Temmuz 2013-Şubat 2014 tarihleri arasında yenidoğan metabolik tarama sonuçlarında biotinidaz enzim eksikliği tanısı konan toplam 43 hastanın, tarama sırasında kullanılan Guthrie kağıtlarından DNA izolasyonu yapılarak, *BTD* genine ait daha önceden literatürde rapor edilmiş olan en sık rastlanılan c. 98\_104del7insTCC, A171T (c. 511G>A), D444H (c.1330G>C), Q456H (c. 1368A>C), R538C (c. 1612C>T) mutasyonları için DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak mutasyon taraması yapılmıştır. Dizi analizi sonucu saptanan mutasyonlar sınıflandırıldığında, daha önceden literatürde rapor edilmiş, c. 98\_104del7insTCC, D444H (c.1330G>C), Q456H (c. 1368A>C) mutasyonları doğrulanmıştır. A171T (c. 511G>A) ve R538C (c. 1612C>T) mutasyonlarına ise rastlanılmamıştır. Bulunan mutasyonlar için biotinidaz enzim eksikliğinin serum düzeyinde kontrolü sağlanılarak, gerekli doğrulama yapılmıştır.

Çalışmamız ülkemizde biotinidaz eksikliğinin genetik tanısı için *BTD* geninin tümünün analizinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

**Anahtar:** Biotin, biotinidaz, biotinidaz eksikliği, histonlar, *BTD* gen, mutasyon

## ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a cofactor of four carboxylase enzymes in the body. Biotin primarily binds covalently to apoproteins present in the enzyme structure in order to activate these enzymes. This binding is catalyzed by halocarboxylase synthetase. Biotinidase deficiency is an autosomal recessive disorder characterized with neurological and skin abnormalities that occur as a result of biotin deficiency. If it is not treated, depletion of intracellular biotin results in disruption of biotin dependent carboxylase activity, and may cause neurological abnormalities in individuals with the disorder. *BTD* gene encodes the enzyme responsible of producing biotinidase. This gene is located at 3p35 locus, and encodes 543 amino acids with 4 exons. Over 402 mutations have been detected in *BTD* gene that are associated with biotin deficiency. Sixty-one mutations in one of the four exons have been reported to cause biotinidase deficiency including the profound form of the disease. These mutations in *BTD* gene alter biotinidase enzyme activity. In this study, totally 43 patients diagnosed with biotinidase enzyme deficiency based on neonatal metabolic screening profiles performed in Acibadem Labmed Clinical Laboratories between July 2013-February 2014 were screened for the most common mutations in *BTD* gene that are previously reported in literature, c. 98\_104del7insTCC, A171T (c. 511G>A), D444H (c.1330G>C), Q456H (c. 1368A>C), R538C (c. 1612C>T), by analysis of DNA sequence after isolating DNA from the Guthrie card samples used for metabolic screening. Classification of the detected mutations in sequence analysis signified the previously reported mutations of c. 98\_104del7insTCC, D444H (c.1330G>C) and Q456H (c. 1368A>C), whereas A171T (c. 511G>A) and R538C

(c. 1612C>T) mutations were not detected. The detected mutations were clinically supported with the confirmation of biotinidase enzyme deficiency at serum level.

**Key Words:** Biotin, biotinidase, biotinidase deficiency, histones, *BTD* gene, mutation

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kalıtsal metabolik hastalıklar, ilk kez 1901’de Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanmıştır (1). Bugüne kadar teknik ve laboratuvar olanaklarının artmasıyla yaklaşık 500’ü aşkın metabolik hastalık tanımlanmıştır.

Metabolik yolları ilgilendiren bozukluklar, biyokimyasal yolu katalize eden enzim veya kofaktörün eksikliği sonucu gelişen metabolitlerin birikmesi ile bağlantılıdır. Tek gen kusurunun yol açtığı ve metabolik yollardaki bloklar sonucunda gelişen klinik tablolar kalıtsal metabolik hastalıklar olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde sıklığı 1/1500 olarak bildirilmektedir. Birçoğunun etkili tedavisi vardır. Tedavisi olmasa bile özgün tanının konulması ailelerin sonraki çocuklar konusunda bilgi sahibi olmalarına olanak sağlamaktadır (2). Bu hastalıklardan bazıları son derece ender görülmekle birlikte, bütün olarak değerlendirildiklerinde çocuk sağlığı açısından önemli bir grubu oluşturmaktadırlar (1).

Kalıtsal metabolik hastalıklar yaşamın herhangi bir döneminde bulgu verebilirler. Yenidoğan döneminde sorunsuz görünüyor olması ardından, kliniğin beklenmedik bir şekilde bozulması doğumsal metabolizma hastalığının karakteristik bulgusudur. Bu nedenle doğumdan saatler ve günler sonra gelişen emme isteksizliği, solunum güçlüğü, apne, hipotoni, kusma, dehidratasyon, letarji ve konvülziyon gibi belirtiler karşımıza çıkabilir (20).

Doğumsal metabolizma hastalıkları tanısında iki farklı laboratuvar yaklaşımı vardır. Bunlardan ilki bir koruyucu hekimlik hizmetidir. Her yenidoğana hastalık belirtileri ortaya çıkmadan uygulanan "yenidoğan taraması" ilk yaklaşımdır. Diğer yaklaşım ise öykü ve/veya klinik bulguları nedeniyle doğumsal metabolik hastalık şüphesi olan hastanın örneklerinin “biyokimyasal ve genetik analizleri” dir (4).

Tedavide ilk olarak yapılması gereken azalmış enzim aktivitesini arttırmaya çalışmaktır. Gen tedavisi uzun dönemdeki en önemli hedef niteliği taşımaktadır. Ancak günümüzde halen gen tedavisinin hedef organ ve dokulara ulaştırılması ve gen aktivitesinin tam anlamıyla kontrol edilebilmesi gerçekleştirilememiştir (5).

Bu çalışmanın amacı, biotinidaz enzim eksikliği tanısı alan hastaların her birine ait *BTD* (biotinidaz enzim geni) geninin en sık karşılaşılan mutasyonlarını, DNA (Deoksiribonükleik Asit) dizi analizi tekniği ile tarayarak, bu hastalarda *BTD* gen mutasyonlarının varlığını saptamaktır. Bu tez çalışmasından elde edilecek veriler daha ileride yapılacak geniş çaplı taramalar için yol gösterici nitelikte olacaktır. Hastalıkla ilgili araştırmalardan elde edilen bilgiler biotinidaz enzim eksikliği taşıyıcılarının, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce belirlenmesine ve erken yaşlarda kesin tanının konulmasına olanak sağlayacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Metabolizma Hastalıkları:

Doğumsal metabolizma hastalıkları ilk kez 1908'de Sir Archibald Garrod tarafından tanımlanmıştır. Vücudun biyokimyasal işlevlerindeki bozukluklar sonucu gelişim göstermektedirler (1). Çoğunluğu otozomal resesif geçişli kalıtsal hastalıklardır. Tek tek ele alındığında her biri nadir gibi görünse de, birlikte değerlendirildiğinde önemli bir grup oluşturmaktadırlar. Değişik yakınmalarla başvurduklarından günümüzde tanımlamadan kalan çok sayıda olgu olduğu gibi, yeni tanımlanan birçok doğumsal metabolizma hastalığı da vardır (2).

Metabolik tarama testleri ile bireylerde herhangi bir belirti vermeden tanı koymak ve gerekli tedaviye başlayarak mortalite ve morbiditeyi azaltmak amaçlanmaktadır. Tarama programında yer alan hastalıklar, toplumda yeterli sıklıkta görünüyor olmalıdır ve erken tanı konulması halinde hastalığın seyrinde değişiklik yapabilmeli ya da tamamen tedavi edilebilmelidir (6).

Doğumsal metabolizma hastalıkları, protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezinde ya da katabolizmasında meydana gelen defektler sonucu gelişen patolojik tablolardır. Metabolik bozukluklar, hatalı genetik bilgi nedeniyle oluşamayan veya görevini yapamayan enzim ürünlerinin yok ya da yetersiz olması sebebi ile oluşur (7).

Nadir sayıda olduğu düşünülen metabolik hastalıkların sayıları her gün hızla artmaktadır. Gelişmiş ülkelere oranla ülkemizde akraba evliliklerinin ve doğum sayısının yüksek olması sonucu doğumsal metabolizma hastalıklarına daha sık rastlanmaktadır. Genelde 1/10.000 sıklıkla görülen fenilketonüriye (FE) ülkemizde 1/4500, genelde 1/60.000 sıklıkta görülen biotinidaz eksikliğine (BE) ülkemizde 1/11.000 oranında rastlanmaktadır (8).

Kalıtsal metabolik hastalıklarda klinik bulgular her hastalıkta hafiften ağıra çok farklı ve geniş bir spektrumda seyredabilmektedir. Aynı gende etkilenme olmasına



rağmen mutasyonların farklılığı nedeniyle birçok hastada klasik hastalık fenotipi saptanamaya bilmektedir (20).

## **2.2. Yenidoğan Taraması:**

Kütle spektrometrisinin kullanıma girmesi ile yenidoğan taraması çerçevesinde bakılan hastalık sayısı giderek artmıştır. Doğumsal metabolizma hastalıklarının bir kısmında, kalıcı hasara ya da ölüme neden olmalarını önlenmek amacıyla "yenidoğan taraması" uygulanmaktadır. Fenilketonüri, biotidinaz eksikliği ve hipotiroidi, hemen her ülkede yenidoğanların istisnasız olarak taranması gerekliliği kabul edilmiş üç hastalıktır. Bu tarama programı çok sayıda ülkede devlet sorumluluğunda yürütülmektedir (21).

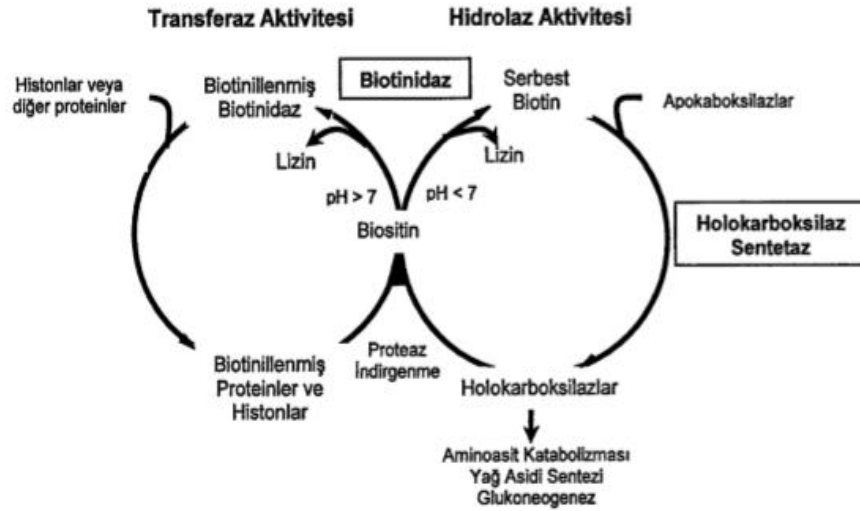
İlk yenidoğan tarama programı, 1962 'de Guthrie tarafından kurulmuştur. Bugün için önemini aynı değerde koruyan, ucuz, semikantitatif ve bakteriyolojik inhibisyon esasına dayanan yöntem fenilketonüri hastalığı için başlatılmıştır. Ekonomik ve teknolojik koşulları iyi bazı merkezlerde, "tandem" kütle spektrofotometrisi gibi komplike aletlerin yenidoğan tarama programlarında kullanılmaya başlanması ile bugün aynı anda 35'in üzerinde hastalığın taraması yapılabilmektedir (22).

Tarama testleri tanısal test olmamakla beraber, tarama sonrasında anormal bir sonuç elde edildiğinde mutlaka tanısal testler uygulanmalıdır. Ayrıca yanlış negatif sonuçların olabileceği de göz önüne alınmalıdır (23).

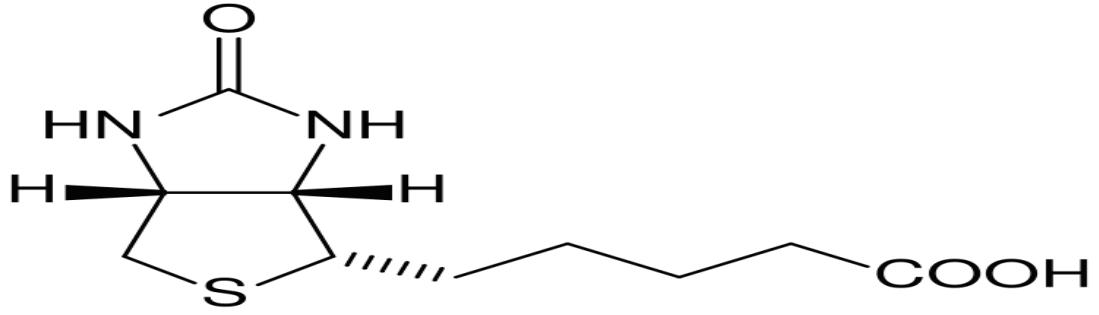
### 2.3. Biotin:

Biotin dört karboksilaz için koenzim olan ve suda eriyen bir vitamindir. Biotin asetil-CoA karboksilaz  $\alpha$  (ACC- $\alpha$ ) ve asetil-CoA karboksilaz  $\beta$  (ACC- $\beta$ ), propiyonil-CoA karboksilaz (PCC), 3-metilcrotonil-CoA karboksilaz (MCC) ve piruvat karboksilaz (PC) için bir koenzim olarak işlev görmektedir (9). Biotin-bağımlı karboksilaz, karbohidrat metabolizmasında rol alan genler için, yağ asidi sentezi, glukoneojenez, trikarboksilik asit döngüsü ve pleiotropik gen regülasyonu için kofaktör olarak önemli bir rol oynar (11).

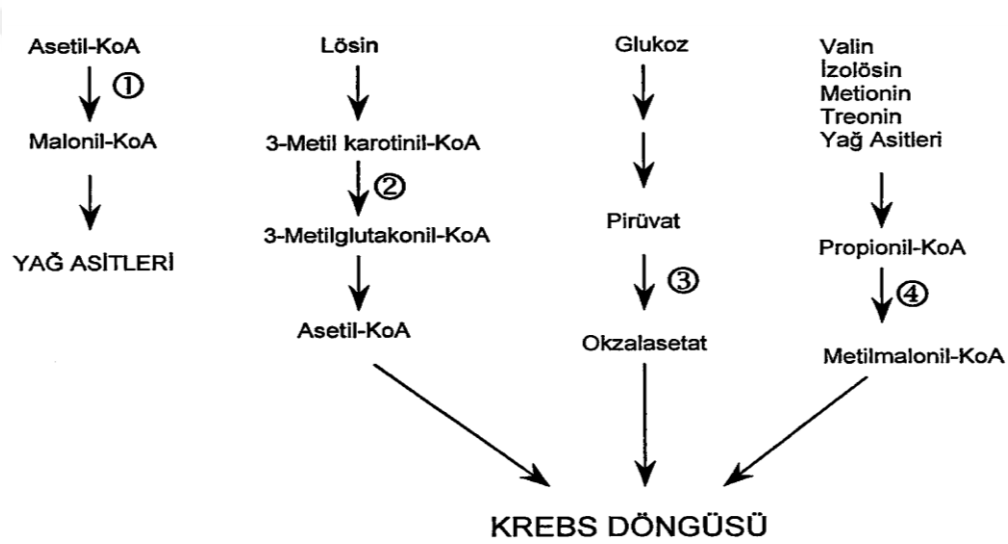
Holokarboksilazsentaz, 5 karboksilazdan biotin bağlayıcı katalize eder. Bu nedenle, biotin bağımlı metabolik yollarda çok önemli bir rol oynar. Ek olarak, Holokarboksilazsentaz'ın kromatinin düzeyinde gen düzenlemesine katılmakta olması yeni araştırmalarda tartışma konusudur (10).



**Şekil 1.** Biotin Döngüsü. Serbest biotin dögü içerisinde Holokarboksilaz sentetaz aracılığıyla metabolizmada rol almaktadır (11).



**Şekil 2.** Biotinin biyokimyasal yapısı. Tiyofen halkası ve bu halkaya bağlı karbomit ile valerik asitten oluşmuştur (10).



1: Asetil CoA karboksilaz

2:  $\beta$ -metil karotininil CoA karboksilaz

3: Pirüvat karboksilaz

4: Propiyonil CoA karboksilaz

**Şekil 3.** Biotin bağımlı karboksilazların metabolizmadaki rolleri. Asetil-KoA; yağ asidi sentezi ve oksidasyonunda, 3-Metil karotininil-KoA; aminoasit metabolizmasında, Pirüvat karboksilaz; glukoz yapımında, Propionil-KoA; yağ asiti sentezinde rol almaktadır (11).

#### **2.4. Biotinidaz ve Biotinidaz Eksikliği:**

Doğumsal metabolizma hastalıklarında, defektli enzim nedeniyle gerekli spesifik son ürün üretilemezler. Bu nedenle öncül maddeler veya alternatif yollarla oluşan başka metabolitler birikerek vücutta toksik etki gösterirler. Bazı hastalarda, biriken maddeler diğer dokulara da geçerek uzak organlarda hasar meydana getirebilirler (12).

Biotinidaz, vücutta biotin döngüsü (Şekil 1) adı verilen sindirim sisteminde, kan dolaşımında, hücre içinde protein ve enzimlere bağlı bulunan biotini serbest hale getiren bir enzimdir. Böylece biotinin sindirim sisteminden emilmesine ve enzimlere tekrar tekrar bağlanarak aktif olmalarını sağlar. Eksikliği durumunda fonksiyon görmeleri için biotine gereksinimleri olan karboksilazların işleyişi durur (12).

#### **BİOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ KESİN TANI KRİTERLERİ:**

Yenidoğan metabolik tarama programı uygulamasında yer alan biotinidaz enzim eksikliği araştırılması birinci basamak olarak yer almaktadır. Uygulamada uygun alınan kan örneği tarama laboratuvarına ulaştırılır ve enzim aktivitesinin hangi seviyede olduğu tespit edilir (Şekil 4). Tarama programında her laboratuvar kullanmış olduğu ölçüm metoduna göre ortalama aktivite değerini elde etmektedir. Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları' nda kullanılan yöntem ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen ortalama değer enzim aktivitesine göre;

5 ve 5' in altında ise; Enzim aktivitesinin eksikliği tespit edilir ve “ NEGATİF”

6-7-8 ise; Enzim aktivitesinin düşük pozitif olma durumu tespit edilir ve “ düşük pozitif” serum düzeyinde biotinidaz aktivitesinin bakılması önerilir

9 ve 9'un üstünde ise; Enzim aktivitesinin var olduğu tespit edilir ve “ POZİTİF” şeklinde raporlanır.



**Şekil 4.** Biotinidaz Eksikliği Akış Şeması. Alınan kan örneği tarama laboratuvarına ulaştırılır ve enzim aktivitesinin hangi seviyede olduğu tespit edilir (thsk.saglik.gov.tr).

Yenidoğan metabolik tarama programı uygulamasında yer alan biotinidaz enzim eksikliği araştırılması dışında yapılan ikinci bir uygulama ise, tarama testinde enzim aktivitesi eksikliğin veya düşük enzim aktivitesinin saptanması durumunda serum örneğinde biotin değeri ölçümüdür. ACGM (Amerikan Colege of Medical Genetics) rehberine göre; biotinidaz serum aktivitesi, ortalama yetişkin biotinidaz serum aktivitesinin (4.2 - 12.8 nmol/ml/dk) %10' undan küçük ise biotinidaz eksikliği, %10-30' u arasında ise kısmi biotinidaz eksikliği olarak değerlendirilmektedir (13).

Yapılan bir çalışmada, enzim aktivitesinin klinik özelliklerine ve enzim eksikliğinin derin-kısmi biotinidaz eksikliği durumuna göre referans değerlerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Biotinidaz Aktivitesi. Etkilenmemiş bireylerde aktivite, 12.8 oranına yakın sonuçlar, derin biotinidaz ve kısmi biotinidaz hasta gruplarında 4.2 oranının altında sonuçlar tespit edilmiştir (13).

<b>BIOTİNİDAZ AKTİVİTELERİ</b>	
<u>Kategori</u>	<u>Biotinidaz Aktivitesi ± SD (nmol/min/ml serum)</u>
Etkilenmemiş bireylerde	7.57 ± 1.41
Ebeveynlerin çocuklarında derin biotinidaz eksikliği olan	3.49 ± 0.72
Klinik semptomları tespit edilen derin biotinidaz eksikliğinde	0.12 ± 0.18
Yenidoğan taraması ile tespit derin biotinidaz eksikliği olan çocuklar	0.19 ± 0.16
Kısmi biotinidaz eksikliği olan bireyler	1.47 ± 0.41

Biotinidaz eksikliği (BE) ise nadir görülen, otozomal resesif geçişli, metabolik bir hastalıktır. BE organizmada biotin döngüsünü bozarak metabolik asidoz, deri bulguları ve nörolojik belirtiler gibi değişik klinik ve laboratuvar bulgularının görüldüğü bir hastalık tablosuna yol açar.

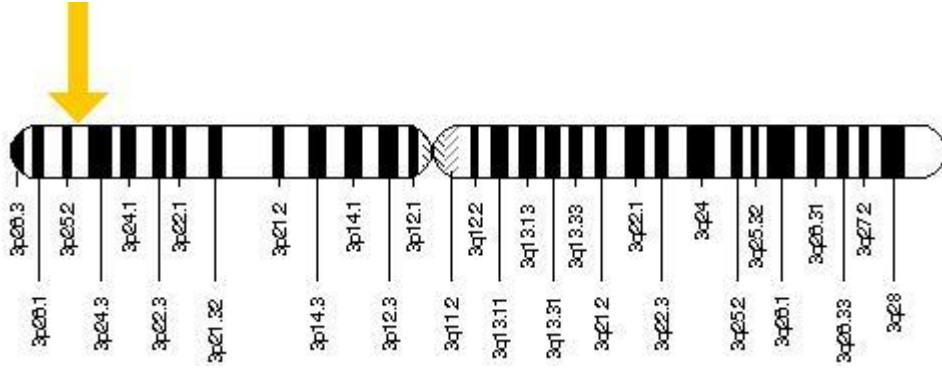
Biotinidaz eksikliğinin batı ülkelerinde görülme sıklığı 1/60.000'dir (24). Ülkemizdeki görülme sıklığı ise akraba evliliğinin sıklığından dolayı 1/14.800'dür (25). Eksiklik enzim aktivitesine göre ağır veya kısmi olabilir. Ağır tip eksiklikte, aktivite %10'dan daha azdır. Kısmi eksiklikte ise %10-30 arası bir aktivite vardır (26). BE'nin diğer organik asidemilerden en önemli farkı deri bulgularının daha belirgin olmasıdır. BE' de ataksi, gelişme geriliği, üst solunum yolu infeksiyonları, duyma ve görme, stafilokoksik deri infeksiyonu görülebilir.

## 2.5. *BTD* Gen Yapısı:

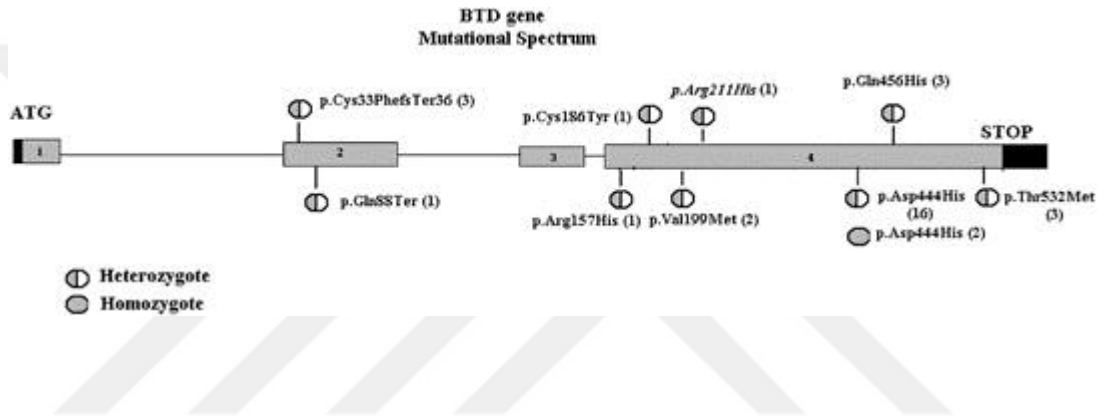
Biotinidaz, serbest biotin oluşumu için gerekli bir enzimdir. Eksiklik durumunda fonksiyon görmeleri için biotine gereksinimleri olan karboksilazların işleyişi durur. Biotinidaz sentezinden sorumlu gen (*BTD*) biotinidaz adı verilen bir enzim yapmak için yönergeler sağlar. Enzim aktivitesi için, *BTD* tarafından kesilen biotinün yeniden bağlanmış olması gerekir. *BTD* eksikliği bu bağlanmayı önler ve biotin eksikliğine yol açar (14).

Biotinidaz sentezinden sorumlu gen 3. kromozomun kısa kolunda (3p25) yer alan, dört ekzonlu 543 aminoasit kodlayan bir gendir (şekil 5-7). Hastalığa neden olan 60' dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (23, 24). Bu genin çok farklı mutasyonları sonucu hastalık gelişmektedir. Ağır biotinidaz eksikliği gösteren hastalarda yüzden fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. En sık görülen mutasyonlar; G98:d7i3, R538C, Q156X, Q456H ve A171T ile D444H olarak bildirilmiştir (Şekil 6).

Bu çalışmada ülkemizdeki biotinidaz eksikliği vakalarında fenotip genotip korelasyonunu ve hedefe yönelik mutasyon analizi ile vakaların ne kadarına tanı konulabileceğini araştırdık.



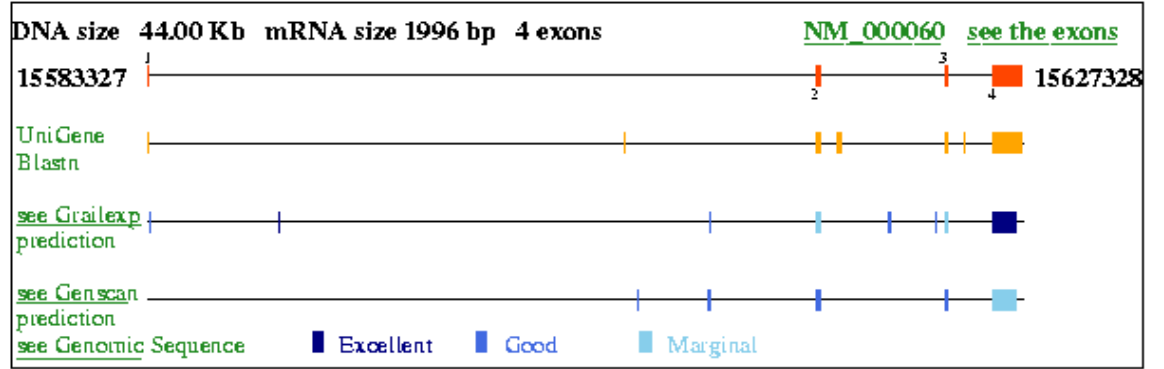
Şekil 5. *BTDR* gen. Kromozomun 3p25 lokusunda yer alan genidir (13).



Şekil 6. *BTDR* gen mutasyon spektrumu. En sık görülen mutasyonlar; G98:d7i3, R538C, Q156X, Q456H ve A171T ile D444H olarak bildirilmiştir (Journal of Human Genetics 56, 861-865 December 2011) (14).

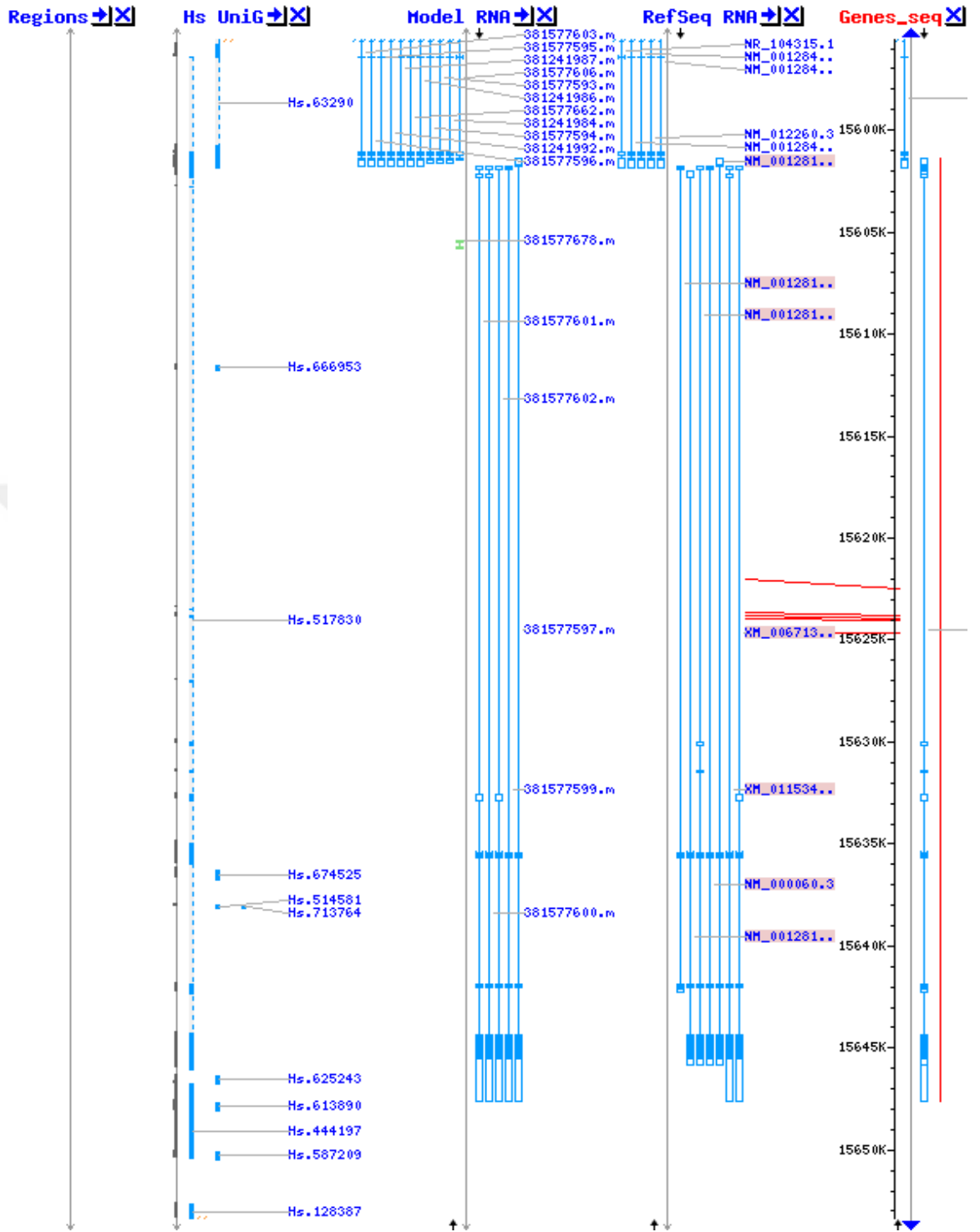


present in the contig : [NT\\_022517](#) of Genbank



**Şekil 7.** *BTD* gen- DNA/mRNA. Dört ekzonlu 543 aminoasit kodlayan 44.000 Kb boyutunda bir gen dir.

<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=BTB> (Erişim tarihi:12 Ocak 2007)



Şekil 8. *BTB* Gen sekansı.

[HACL1+OMIMHGNCsvprdlehmstsSNP](#) best Re Seq 3p25. 12-hydroxyacyl-CoA lyase

[BTB+OMIMHGNCsvprdlehmstsSNP](#) best Ref Seq 3p25 biotinidase

<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=BTB> (Erişim tarihi: 12 Ocak 2007)

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Kullanılan Aletler**

Pipet ve uçları, falcon ve eppendorf tüpler, 1.5 mL mikrosantrifüj tüpleri, 2 mL toplama tüpleri, mikro santrifüj, karıştırıcı, biyogüvenlik kabini, buzdolabı, derin Dondurucu -20, derin Dondurucu -80, agaroz jel elektrofrez sistemi ve güç kaynağı, jel görüntüleme sistemi, termal döngüleyici, otomatik mikropipetler, masa üstü santrifüj

##### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler**

Agaroz jel, Orange G, Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set, Guthrie kartları, SYBR Gold, etanol-nükleik asitlerin çöktürülmesi, isopropanol, Taq DNA Polimeraz Enzimi, tampon seti, ve DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit)

##### **3.1.3. Kullanılan Primerler**

###### **3.1.3.1. Primerler**

Primer, DNA sentezi için bir başlangıç noktası sağlayan nükleik asit dizisidir. DNA replikasyonu için gerekli olan DNA polimeraz, ortama yeni bir nükleotid eklenmesi ile işlem yapabilir. Polimeraz, replikasyonu primerin 3''-ucunda başlatır. Başarılı bir DNA dizileme işlemi için uygun primer dizaynı en önemli adımdır.

### 3.1.3.2. DNA Dizisi ve Primer Seçimi

*BTD* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için kullanılacak özgül primerler tasarlanmıştır. DNA dizisi seçiminde, seçtiğimiz genin National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanını kullanarak nükleotit dizisi belirlenmiştir. Gen boyutunun nedeniyle ekzonların etkin bir şekilde çoğaltılması için ampikon boyunun çalışmaya uygun boyutta primer çiftleri tasarlamaya dikkat edilmiştir. Böylece 4 ekzonlu *BTD* genin sıklıkla mutasyon bildirilmiş 2 ekzonu PZR reaksiyonuyla çoğaltılmıştır. PZR için kullanılan primer setleri aşağıdaki tabloda ‘>’ şeklinde belirtilerek listelenmiştir (Tablo 1, 2, 3).

*BTD* genine ait ekzonların primer tasarımları yapılırken;

- Primerlerin GC içeriğinin fazla olmamasına,
  - Primerlerin 3' ve 5' uçlarının birbirini tamamlayan bölgeler içermemesine,
  - Primerlerin uzunluklarının 18-25 bç arasında olmasına,
  - Primerlerin 3' ucunun G ya da C ile bitmesine ve ikiden fazla G ya da C ile bitmemesine,
  - Primerlerin *BTD* gen bölgesinin bulunduğu 3. kromozom haricinde başka bir kromozom ile eşleşmemesine,
- dikkat edilmiştir (15).

Söz konusu gen bölgesine ait 2 adet ekzon için ileri ve geri (üç çift) primer seti aşağıda verilmiştir.

Tasarlanan kullanılacak olan primerler IONTEK (Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. Liyofilize olarak bulunan primerlere 100 pmol'lük konsantrasyon elde etmek için gerekli miktarda Tris-EDTA ilave edilmiştir. 100 pmol'lük ana

stoktan PZR' de kullanılmak üzere H<sub>2</sub>O ile dilüe edilerek 10 pmol'lük ara stoklar hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.



**Tablo 2.** *BTD* Geninin ekzon 2'nin çoğaltılması için kullanılan primer seti.

Biotinidaz ( <i>BTD</i> gen)	c.98_104del7insTCC ( <i>BTD_2f</i> & <i>BTD_2R</i> )
Primer <i>BTD_2F</i> :	CTGCGAGTGAGTTTAATTGCTG
Primer <i>BTD_2R</i> :	CTGGGATTACCCAACCACTG

**Tablo 3.** *BTD* Geninin ekzon 4-I 'in çoğaltılması için kullanılan primer seti.

Biotinidaz ( <i>BTD</i> gen)	A171 T ( <i>BTD_4aF</i> & <i>BTD_4aR</i> )
Primer <i>BTD_4aR</i> :	GTAGCGGTCAACAAGGGTTC
Primer <i>BTD_4aF</i> :	GTTAGCCAGGGTGGTCTCAA

**Tablo 4.** *BTD* Geninin ekzon 4-II'nin çoğaltılması için kullanılan primer seti.

Biotinidaz ( <i>BTD</i> gen)	D444H & Q456H & R538C ( <i>BTD_4bF</i> & <i>BTD_4bR</i> )
Primer <i>BTD_4aR</i> :	GTAGCGGTCAACAAGGGTTC
Primer <i>BTD_4aF</i> :	GTTAGCCAGGGTGGTCTCAA
Primer <i>BTD_4bF</i> :	TCTCCACGTCTGTTCCAATG
Primer <i>BTD_4bR</i> :	GGCTTGTAGCCTGTGGAAGT

### **3.1.4. Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.1.4.1. PZR**

Taq DNA Polimeraz, enzim yaklaşık 85°C' de ki sıcaklıktaki kaynak sularda yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmektedir. Bu enzimin optimal çalışma sıcaklığı 70-80 °C arasındadır (16).

Enzim hedef DNA' dan ayrılmadan önce DNA' ya bağlayabildiği nükleotidlerin ortalama sayısı 'işlem kapasitesi' olarak tanımlanır. PZR için reaksiyonda direk olarak yer alan maddelerin yanı sıra uygun bir tampon çözeltisine ihtiyaç duyulur. Tampon içeriği kullanılan enzimin özellik ve tipine bağlıdır ve birçok üretici enzimle beraber 10X tamponunu da sağlar.

#### **3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz, 0.5X Tris bazı, asetik asit ve EDTA tamponu (TAE) içinde tamamen çözülüp homojen bir görüntü elde edilinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmış ve çeker ocak altında biraz soğuması beklendikten sonra örnek yüklemeye hazır hale gelmiştir.



## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Örnek Seçimi**

Çalışmaya Temmuz 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasında Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarlarına yenidoğan metabolik tarama testi için başvuran hasta örnekleri alınmıştır.

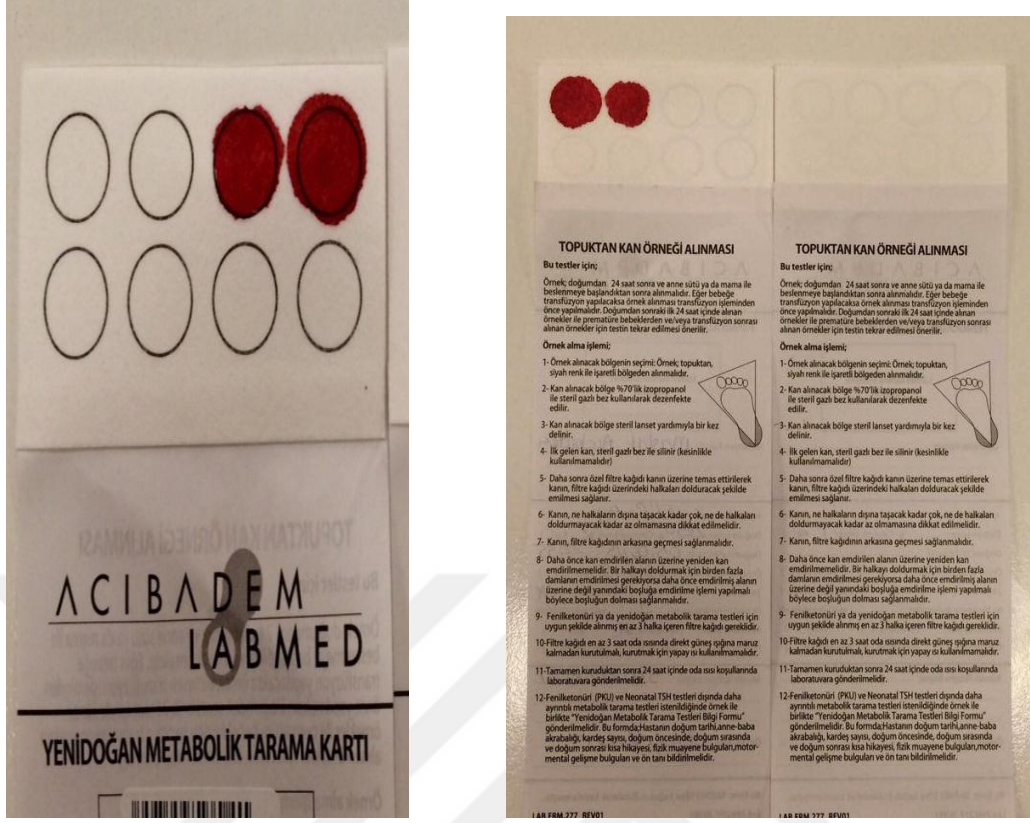
Çalışma grubuna dahil olma kriterleri;

Yenidoğan metabolik tarama testi yapılan ve biotinidaz enzim aktivitesi eksik olan hastaların ebeveynleri tarafından Acıbadem Üniversitesi etik kurulunca onaylanmış aydınlatılmış onam imzalanılarak örneklerinin çalışılması prosedürü şeklindedir. Çalışmadan dışlanma kriterleri ise; yetişkin hastalar ve yenidoğan metabolik tarama sonucu biotinidaz enzim eksikliği bulunmayan bireyler olarak belirtilmiştir.

### **3.2.2. Kanın Saklanması ve Örnek Elde Edilmesi**

Yenidoğan topuk kan örnekleri: Tarama testleri için kanın ideal olanı 3. – 5. günlerde alınması ideal olanıdır. Fenilketonüri için yenidoğanın en az 24 saat beslenmesi gerekir. Doğumdan sonraki ilk 24 hatta 48 saat kan alınması uygun değildir. Topuktan alınan birkaç damla kan yeterlidir. Bu kan damlaları filtre kağıdı şeridi üzerine emdirilir. Kan almadan önce deri %70'lik izopropil alkol ile temizlenmelidir.

Fotometrik yöntemle çalışılan ve biotinidaz tarama testi sonucu negatif olan hastaların Guthrie kağıdı örneklerindeki kan damlatılmış alanlar kesilerek DNA izolasyonu için eppendorf tüplerine aktarılır.



**Şekil 9.** Guthrie Kartı Örnekleri. Guthrie kağıdı örnekleri DNA izolasyonu için eppendorf tüplerine aktarılır.

### 3.2.3. Guthrie Kartlarından DNA İzolasyonu

Saklanan Guthrie kartlarından “QIAamp DNA Mini Kit” kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde genomik DNA elde edilmiştir.

Metot: Hücre Lizisi, Proteinlerin uzaklaştırılması ve DNA’ nın yoğunlaştırılıp izolasyonu.

Guthrie kartları üzerine 500 µl 1X PBS eklenmiştir. 15 saniye vorteksledikten sonra 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dibe çöken örnekler üzerindeki PBS uzaklaştırılıp üzerine 200 µl Doku Liziz Tamponu (Tissue Lysis Buffer-ATL) ile 40 µl Proteinase K eklenmiştir. Ardından 15 saniye vorteksledikten sonra bir saat 56°C’ ye ayarlanmış ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir. Bir saat inkübasyon süresi bitiminde örneklerin üzerine 200 µl Liziz tamponu (Lysis Buffer-AL) eklenerek 15 saniye vortekslenmiştir. 30 dakika 70°C’de inkübe edilen örneklerin üzerine 200 µl

etanol (96-100%) eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir. Ardından örnekler 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak 10,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, altlarındaki tüpler atılarak filtreler temiz tüplere aktarılmıştır. Temiz tüplere alınan örneklerin üzerine 500 µl Yıkama Solüsyonu 1 (Washing Solution I-AW1) eklenmiştir. 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen örneklerde filtreden geçen kısım atılarak, bu sefer üzerine 500 µl Yıkama Solüsyonu 2 (Washing Solution 2- AW2) ilave edilmiştir. Temiz tüpe aktarılmış olan filtrelili tüpler kurutulmak üzere 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Filtrelili tüpler temiz 2ml' lik eppendorf tüplerine alınarak üzerine 200 µl Elution Buffer (AE) eklenilmiştir. Ardından 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen DNA'lar temiz eppendorf tüplere aktarılmış ve +2°C / +8°C'de saklanmıştır. DNA örneklerini uzun süreli saklamak için -20°C de saklanmıştır.

#### **3.2.4. PZR Koşulları ve Bileşenleri**

Çalışmamızda, *BTD* geninin sahip olduğu 4 ekzon bölgeleri için son konsantrasyonlar distile su, 633,7, 5X Colorless Go Taq Flexi Buffer 250, 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 25Mm dNTP, 5 pmol ileri ve geri primerler 6,3 U Go Taq Flexi DNA polimeraz olacak şekilde termal döngüleyici'ye konularak PZR yapılarak çoğaltılmıştır.

Termal döngüleyici cihazına yüklenen örnekler, aşağıda ki parametrelere göre ayarlanmıştır.

96°C'de 20 sn

50 °C'de 20 sn } 30 döngü

60 °C'de 2 dk

4°C'de ∞

### 3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri, standart tampon çözeltiler kullanılarak yatay elektroforez ile görüntülenmiştir.

Agaroz ve 0.5X Tris bazı, asetik asit ve EDTA tamponu (TAE) eklenmiştir. İçinde tamamen çözülüp homojen bir görüntü elde edilinceye kadar orta ısıda mikrodalga fırında kaynatılarak eritilmiş ve çeker ocak altında biraz soğuması için bekletilmiştir.

Örnekler agaroz jele, ticari olarak temin edilen Orange G yükleme boyası (örneklerin 1/5 hacminde) ile pipet yardımıyla karıştırılarak kuyucuklara aktarılmıştır. Boş bir kuyucuğa 100 bazlık marker yüklenmiştir. 120V' da 30 dakika yürütülmüştür.

#### PZR Ürün Saflaştırma:

Elde edilen PZR ürünleri ticari "Exo SAP-IT" kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde 5 µl PZR ürünü içine 2 µl enzim eklenerek 37°C' de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında 85° C' de 15 dakika bekletilerek saflaştırılmıştır.

### 3.2.6. Dizi Analizi Reaksiyonu

DNA dizi analizinde birbirinden farklı iki yöntem Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ile Sanger ve Coulson'un zincir sonlandırılması yöntemidir (17).

Bu çalışmada Otomatize DNA dizi analizinde, Sanger ve Coulson'un zincir sonlandırılması prensibine dayalı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde, DNA polimeraz enzimi dNTP'lerin yanında deoksiribozin 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanır ve sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP'ler eklenince zincir uzaması durmaktadır. Otomatize DNA dizi analizinde reaksiyonların başlangıcında floresans veren madde ile işaretli nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gözlenebilir hale getirilmektedir (18).

DNA dizi analizi cihazında anot ve katot kutuplar arasında uzanan bir kapiler, sıcaklığı sabit tutacak bir ısıtıcı bölge ve anot uca yakın bir bölgede lazer ışık kaynağı ile kamera bulunmaktadır. Ayrıca kapilerin içine polimer dolduran bir şırınga ile her iki kutupta elektrik geçirgenliğini sağlayacak tampon hazneleri bulunmaktadır(17).

Her bir örnek için yeniden polimerle doldurulan kapilerler, örnek tüpüne girdiğinde PZR ile çoğaltılmış ve denatüre edilmiş DNA fragmanlarını elektrokinetik yöntemle kapiler içerisine alır. Bu aşamadan sonra sabit voltaj ve sabit sıcaklıkta anot kutba doğru hareket eden DNA fragmanları, kapilerin silika ile kaplanmamış bölgesinden geçerken lazer ışığını bağlayan bazların rengine göre değişik dalga boylarında yansılar oluşur. Bu yansılar CCD kamera tarafından algılanır. Adenin (A) bazı yeşil, Sitozin (C) bazı mavi, Guanin (G) bazı siyah ve Timin (T) bazı kırmızı renk verir (18).

DNA dizi analizi yapılacak tüm DNA fragmanları için optimize edilen koşullarda hedef bölgeler amplifiye edilmiş ve “Exo SAP-IT” kiti kullanılarak kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır.

**Tablo 5.** Dizi analizi reaksiyonu.

Reaktif	Miktar
Genome Lab DTCS Quick Start Mix	4µl
Primer	1 µl
DNA	1 µl
Su	4 µl
Toplam hacim	10 µl

Saflaştırma işlemi ardından 10 µl sekans ürünü elde edilmiştir. 10 µl sekans ürünü üzerine magnetik parçacıkların bulunduğu 10 µl clean SEQ ve 42 µl %85' lik etanol eklenerek, 6-7 kez pipet ile karıştırılmış ve Beckman Sample plağına yüklenmiştir. 3 dakika boyunca manyetik alanda sabit bir şekilde tutarak, kuyucukları hareket ettirmeden manyetik parçacıkların plate duvarlarına yapışması sağlanmıştır. 3 dakika bitiminde plak manyetik alandan çıkartılmadan kuyulardaki etanol uzaklaştırılmış ve 100 µl %85' lik etanol eklenerek 30 sn bekletilmiştir. Manyetik alandan çıkartılmadan süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Manyetik alandan çıkartıldıktan sonra üzerine 40 µl SLS eklenmiş ve 6-7 kez pipet ile karıştırılmış kuyuların sadece dipleri manyetik alana değecek şekilde 3 dakika bekletilmiştir. 3 dakika bitiminde her örneğin üzerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter S505019) damlatılarak plak sekans cihazına ( Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System ) yüklenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. PZR-Dizi Analizi Sonuçları

Bu tez çalışmasında, Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarı'nda yenidoğan metabolik tarama testi yapılan hastaların sonucunda biotinidaz enzim eksikliği tespit edilen Guthrie kağıtları genetik araştırmaya yönelik olarak DNA Dizi Analizi ile çalışılmıştır. Çalışma kapsamına alınan 43 olgunun DNA Dizi Analizi, biotinidaz enzim aktivitesi ve serum düzeyinde biotinidaz enzim seviyeleri Tablo 8'de verilmiştir.

Mutasyon analizi için çalışmaya alınan 43 hastanın DNA örneklerinde *BTD* gen mutasyon analizi yapılmıştır. Saptanan mutasyonların tümünün heterozigot olduğu DNA Dizi Analizi ile belirlenmiştir. *BTD*-31 kodlu hastanın *BTD* geninin ikinci ekzonunda c.98\_104del7insTCC mutasyonunu taşıdığı saptanmıştır. Ekzon 4-I için yapılan mutasyon analizinde herhangi bir mutasyon taşıyan hastaya rastlanmamıştır. Ekzon 4-II'de yapılan mutasyon analizinde *BTD*-4, *BTD*-11, *BTD*-15, *BTD*-18, *BTD*-20, *BTD*-23 ve *BTD*-26 kodlu hastalarda D444H mutasyonu saptanmıştır.

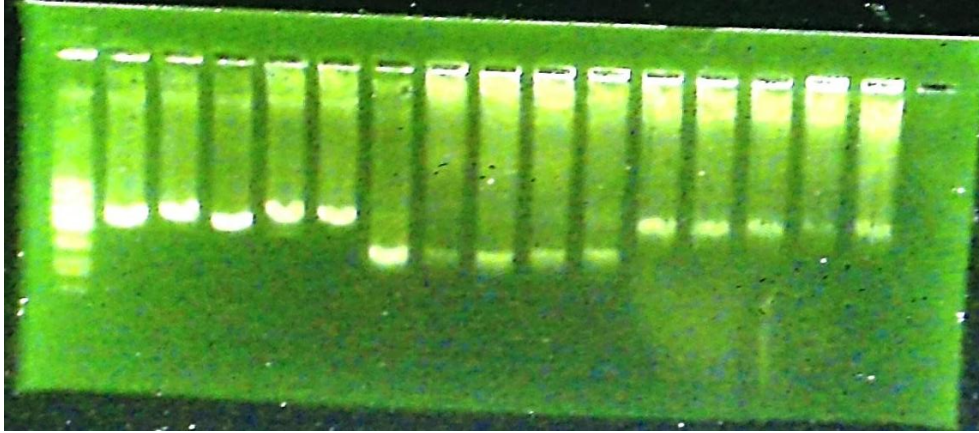
**Tablo 6.** Dizi Analizi Sonuçları.

ÖRNEK	Ekzon 2 c.98_104del7insTCC	Ekzon 4-I A171T	Ekzon 4-II			enzim aktivitesi düşük	Serum Düzeyi
			D444H	Q456H	R538C		
BTD-1	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	çalışılma dı
BTD-2	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	çalışılma dı
BTD-3	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	çalışılma dı
BTD-4	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,75
BTD-5	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,94
BTD-6	WT	WT	Çalışmadı	çalışmadı	çalışmadı	enzim aktivitesi düşük	5,10
BTD-7	WT	WT	Çalışmadı	çalışmadı	çalışmadı	enzim aktivitesi düşük	Çalışılma dı
BTD-8	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılma dı
BTD-9	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	8,14
BTD-10	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	13,49
BTD-11	çalışmadı	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,26
BTD-12	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,94
BTD-13	çalışmadı	çalışmadı	Çalışmadı	çalışmadı	çalışmadı	enzim aktivitesi düşük	Çalışılma dı
BTD-14	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	9,42
BTD-15	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,34
BTD-16	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	6,01
BTD-17	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	7,24
BTD-18	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	6,13
BTD-19	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	10,1
BTD-20	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	7,17
BTD-21	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	8,99
BTD-22	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılma dı

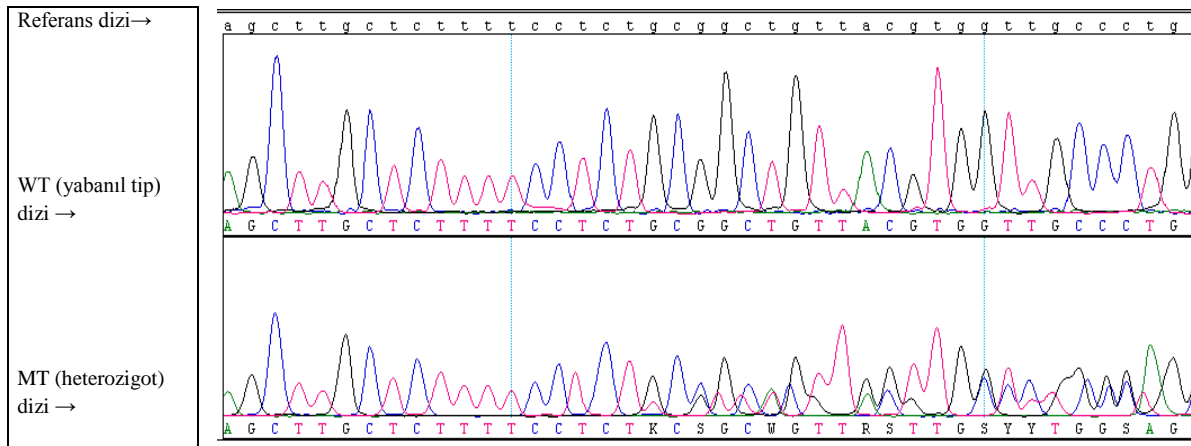


							dı
BTD-23	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-24	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	3,78
BTD-25	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	5,55
BTD-26	WT	WT	MUT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-27	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	6,33
BTD-28	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-29	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	7,85
BTD-30	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-31	MUT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-32	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	8,37
BTD-33	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-34	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-35	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	4,87
BTD-36	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-37	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-38	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-39	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-40	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-41	WT	WT	Çalışmadı	çalışmadı	çalışmadı	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı
BTD-42	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	alışılmadı
BTD-43	WT	WT	WT	WT	WT	enzim aktivitesi düşük	Çalışılmadı

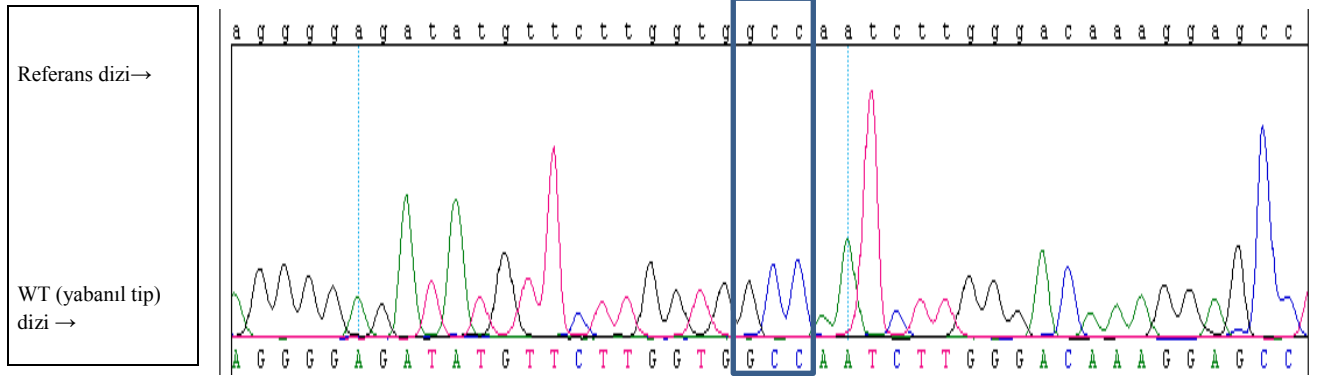
Marker 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



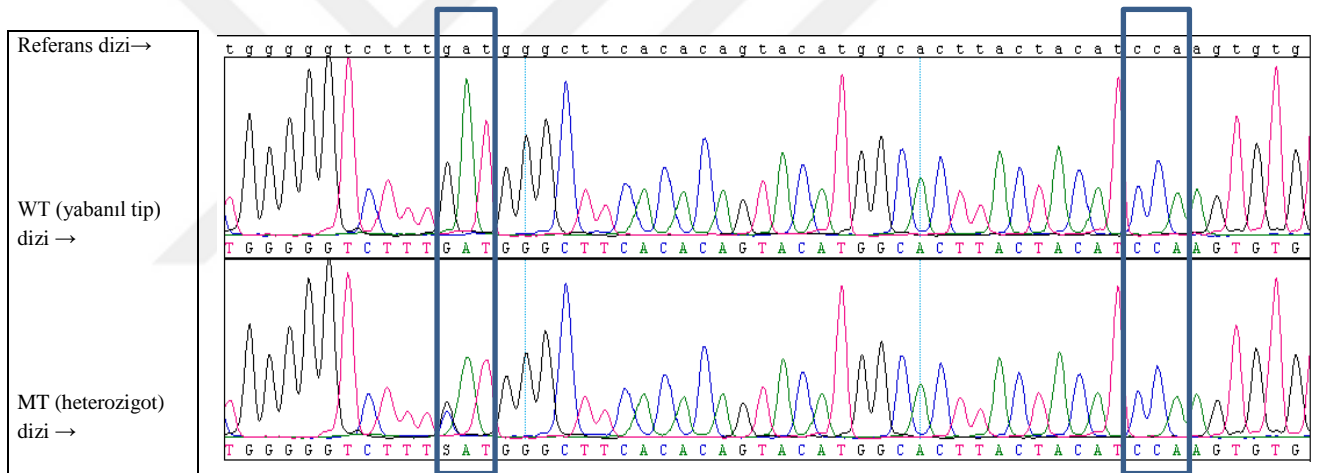
**Şekil 10.** *BTD* geninin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. Soldan sağa 1. Kuyu Marker (100 bç) 2, 3, 4, 5, 6 Ekzon 2 (456bp); 7, 8, 9, 10, 11 Ekzon 4-I (228bp); 12, 13, 14, 15 Ekzon 4-II (464bp), 16. Kuyu: Negatif Kontrol (Su)



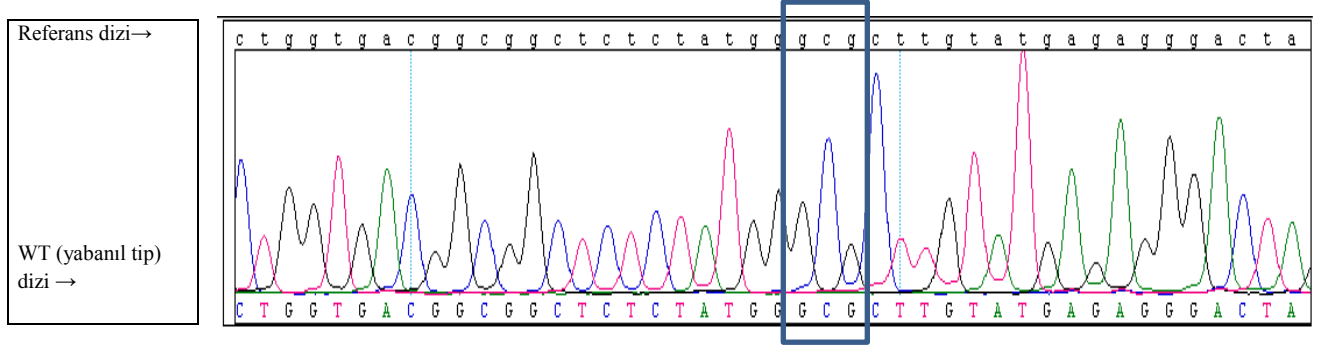
**Şekil 11.** Ekzon 2' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. *BTD* geninde heterozigot mutasyon (c.98\_104del7insTCC). Mutasyon sonrası oluşan faz kayması neticesinde ortaya çıkan iki farklı dizinin örtüşmesi okumayı zorlaştırmaktadır.



**Şekil 12.** Ekzon 4-I' de DNA Dizi Analizi görüntüsü. *BTD* geninde Ala171Thr-yabanıl tip dizi (c.511G>A).



**Şekil 13.** Ekzon 4-II' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. *BTD* geninde Asp444His mutasyonu, heterozigot dizi (c.1330G>C). *BTD* geninde yabanıl tip dizi Gln456His c.1368A>C.



**Şekil 14.** Ekzon 4-II' de ki mutasyonun DNA Dizi Analizi görüntüsü. *BTBD* geninde Arg538Cys ve Arg538His mutasyonu, yabani tip dizi (c.1612C>T- c.1613G>A).

## 5. TARTIŞMA

Türkiye’ de biotidinaz eksikliğinin görölme sıklığı dünya ortalamasının çok üzerinde olup bir çalışmada bu oran dünya ortalamasının yaklaşık 8 katı olarak yenidoğanlarda 1:14800 olarak bildirilmiştir (27). Biotinidaz eksikliği olan hastaların anne baba akrabalık oranı %52 olarak bulunmuştur. Erken tanı ile tedavinin mümkün olması ve sık görölmesi nedeniyle yenidoğan tarama programı içerisinde (41).

Gende gelişen çok sayıdaki farklı mutasyonlar sonucu enzim eksikliği oluşur. Her iki allelde de oluşan mutasyon sonucu hastalık ortaya çıkmaktaysa da bazı mutasyon tiplerinde semptomlar ömür boyu ortaya çıkmadığı gibi, bazılarında da semptomların görölme zamanı farklılıklar göstermektedir (14). Homozigot veya her iki allelde de farklı mutasyon gösteren bireylerde (birleşik heterozigot) enzim eksikliği gelişmekte, ancak enzim aktivitesi farklılıklar gösterebilmektedir. Enzim aktivitesine göre eksiklik ağır ve kısmi olmak üzere ikiye ayrılır. Ağır tip eksiklikte, aktivite %10’dan daha azdır (26). Kısmi eksiklikte ise %10-30 arası bir aktivite vardır. Ağır biotinidaz eksikliği gösteren semptomatik hastalarda yaklaşık 100 kadar farklı mutasyon tanımlanmıştır. Semptomatik olan hastaların hemen hemen yarısında en az bir allelde G98:d7i3 (7 baz delesyonu/3 baz insersiyonu) mutasyonu belirlenmiştir. R538C nokta mutasyonu da ikinci sıklıkta tespit edilen bozukluktur (28). Yenidoğan taramalarında da en sık karşılaşılan mutasyonlar Q456H missens mutasyonu ile A171T:D444H çift mutasyonu olmuştur. D444H ağır biotinidaz eksikliği mutasyonu değildir. Bu mutasyonun homozigotluğunda enzim aktivitesi %50 civarındadır. Ağır eksiklik mutasyonlarının heterozigotluğuna benzer. Ayrıca bir allelde ağır eksiklik mutasyonu taşıyıp, diğer allelde D444H mutasyonu taşıyanlarda da yaklaşık olarak %20-25 enzim aktivitesi mevcut olup kısmi biotinidaz eksikliği gelişir (33). Ülkemizden yapılan bir çalışmada da semptomatik vakalarda G98:d7i3, yenidoğan tarama grubunda da T532M sık karşılaşılan mutasyonlar olarak tespit edilmiştir (35).

Günümüze kadar *BTD* geninde biotinidaz eksikliği ile ilgili literatürde 168 patojenik mutasyon saptanmıştır (31). Bu mutasyonlar delesyon, insersiyon, kriptik yapışma bölgesi oluşma mutasyonu, tek nükleotit insersiyonu ve nokta mutasyonları gibi prematür dur kodonu oluşturan ya da aminoasit değişikliklerine neden olan mutasyonlardır. Azalmış biotinidaz aktivitesine sahip hastalarda genotipleme sayesinde BE'nin allellik heterojenitesi hakkındaki bilgimiz genişletilmiştir. Biz çalışmamızda, bildirilen bu mutasyonlardan en sık rastlanılan grup içerisinde yer alan mutasyonların sekans analizini yaptık. Çalışmamızda gönüllülük esasına dayanarak katılan 43 adet metabolik tarama yapılmış ve biotinidaz enzim eksikliği tanısı konmuş bebeklerde, en sık rastlanılan mutasyon (7 hasta, %16) D444H mutasyonudur. Ekzon 2' de c.98\_104del7insTCC mutasyonu ise sadece 1 hastada tespit edilmiştir. Çalışmamızda daha önce sık olduğu bildirilmiş mutasyonlara; Ekzon 4a A171T mutasyonu ve Ekzon 4b R538C ve Q456H mutasyonlarına rastlanılmamış olup, ekzon 4'de başka herhangi bir mutasyon da tespit edilememiştir.

Hastalarda yapılan dizi analizi sonucunda, D444H varyantının yüksek olması kısmi BE insidansının dünya genelindeki tahminlere göre yüksek olduğunu düşündürmektedir. Enzim aktivitesi kısmi BE ile heterozigosite arasındaki sınıra yaklaştığı zaman, *BTD* genin sekans analizi (ekzon 2 ve 4'ten başlayarak) bu popülasyonda tanı için en uygun teknik olarak gözükmemektedir. Biotinidaz serum düzeyinde kontrolü sağlanan hastaları incelediğimizde, BTD- 12 ve BTD- 24 olan hastalarımızda serum aktivitesi 4, 94- 3, 78 olarak bulunmasına rağmen sekans analizi sonucunda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu sonuç doğrultusunda sekans analizi yapılırken taranan mutasyonlar (ekzon 2 ve 4) dışında lokalize bir mutasyonun bu tabloda sorumlu olabileceği düşünülebilir. Aynı zamanda, yenidoğan taramasında biotinidaz aktivite düzeyi düşük bulunmasına rağmen genotipte durum normal olarak gözlenmiştir. Bu farklılığın erken doğum veya yenidoğan sarılığında kaynaklandığı düşünülmektedir. BTD- 18 ve BTD- 20 örneklerinde ise serum düzeyinin normal aktivite değerleri arasında yer almış olmasına rağmen, sekans analizinde saptanan mutasyonun varlığı, moleküler olarak tanının hastalığı taşıyan bireylerde saptanmasının önemini vurgulamaktadır.

Türkiye’de ise R157H mutasyonunun %27 oranında olduğunu gösteren bir çalışmanın yanı sıra; R79C, c.98-104del7ins3, T532M, Q456H ve A171T:D444H mutasyonlarının da Türkiye’de görüldüğünü belirten çalışmalar mevcut iken, bizim çalışmamızda 43 adet enzim eksikliği tanısı konulan hastadan sadece sekizinde (7 D444H ve 1 c.98\_104del7insTCC mutasyonları) mutasyon bulunması dikkat çekmektedir. Bu farklılığın nedeninin örneklerin gelmiş olduğu coğrafik bölgelerdeki etnik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri’nde semptomatik bulguları olan çocuklarda %35 oranında saptanan en sık mutasyon c.98-104del7ins3 olarak bildirilmiştir. Neonatal taramada ciddi biotinidaz eksikliği olan çocukların %52’sinde üç mutasyonun sık görüldüğü bildirilmiştir. Bunlar, aralarında örneklerimizde de saptanan mutasyonların da olduğu, Q456H, A171T; D444H, D252G (sırasıyla %27,9, %17,3, %6,7)’dir (19). Hedeflenmiş mutasyon analizinde p.Cys33Phefs\*36 (p.C33Ffs\*36), p.Gln456His (p.Q456H), p.Arg538Cys (p.R538C), p.Asp444His (p.D444H), p.[Ala171Thr;Asp444His] (p.a171T; D444H) mutasyonları bakılarak biotinidaz eksikliği bulunan olguların yaklaşık %60’ına tanı konulabilmektedir (37). Türkiye’de ise R157H mutasyonunun %27 oranında olduğunu gösteren bir çalışmanın yanı sıra; R79C, c.98-104del7ins3, T532M, Q456H ve A171T:D444H mutasyonlarının da Türkiye’de görüldüğünü belirten çalışmalar mevcuttur (38, 39). Genotip-fenotip korelasyonu, aynı aile içinde aynı mutasyon için bile zordur. Çünkü bazı ciddi biotinidaz eksikliği olan çocuklar geç çocukluk ya da adölesan döneme kadar semptom vermezken, aynı mutasyona sahip bazı çocuklar erken çocukluk döneminde bulgu verebilmektedirler. Ayrıca Avrupa’da en sık görülen mutasyon D444H mutasyonu olarak bilinmektedir (40). Bu durum bizim sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

## 6.ÇALIŞMANIN GELECEK PLANI

Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda, mutasyonların *BTD* geninin bazı bölgelerinde yoğunlaştığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamız ise çalışılan ekzon 2 ve 4 mutasyonlarının vakaların sadece küçük bir kısmını izah edebildiği ve en azından ülkemizde bu hastalığın fenotipinden sorumlu mutasyonların çoğunlukla bu iki ekzonun dışında yerleşik olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle mutasyon taraması için tüm genin analizi (4 ekzonun) hedeflenmelidir. Eğer tüm gen taramasında enzim eksikliğinin genetik mekanizmalarının tam olarak aydınlatıldığı düşünülür ise bu hastalık için ‘hot-spot’ mutasyonlar belirlenerek sadece bunları içeren tarama yöntemi önerilebilir. Hot-spot mutasyonlar bulunmaz ise enzim eksikliklerinde tüm gen mutasyon taraması yapılabilir.

Sonuç olarak, ülkemizde biotinidaz eksikliği, erken teşhis edilebilmesi açısından tespiti önemli bir hastalıktır. Asemptomatik bireyler genellikle kısmi biotinidaz eksikliğine sahip olup, stresle tetiklenen hipotoni, deri bulguları ve saç kaybı geliştirebilirler (41). Ciddi biotinidaz eksikliği olup asemptomatik ya da adölesan dönem sonrası semptomların ortaya çıktığı olgular tanımlanmış olsa da, tanı konmayıp ve tedavi edilmez ise, yaşamın ilk yılında nörolojik (miyoklonik nöbetler, hipotoni, ataksi, görme ve işitme problemleri gibi) ve dermatolojik semptomlar (alopesi, ekzema gibi) gelişebilir (42). Yenidoğan taramalarında bu hastalığın saptanması önemlidir. Moleküler olarak tanısı konmuş hastaların, diğer aile bireylerinin de bu hastalık açısından moleküler olarak taranması ve preimplantasyon genetik tanı ya da prenatal tanı olanakları ile bu hastalığı taşıyan bireylerin sağlıklı çocuk sahibi olması mümkün olabilecektir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada semptomatik vakalarda G98:d7i3, yenidoğan tarama grubunda T532M sık karşılaşılan mutasyonlar olmuştur. Mutasyon spektrumu çok dağınık olduğu için biotinidaz defektinde *BTD* geninin dizi analizi yapılmaktadır. Biotinidaz taraması ile ön tanı alan hastalarda; kesin tanının koyulabilmesi, moleküler patolojinin belirlenmesi ailede risk altındaki çiftlerin ve bireylerin belirlenmesi ve bu sayede yenidoğan döneminde erken tanının sağlanabilmesi endikasyonları ile *BTD* geni mutasyon analizi yapılması önerilir.



Bu mutasyonların maternal ve paternal allelik segrasyon durumlarını saptamak amacıyla anne ve babanın *BTD* gen mutasyon analizi yapılması çalışmanın ileri düzeyi olacağı belirlendi.



## 7. KAYNAKLAR

1. Clarke JTR: A Clinical Guide to inherited Metabolic Disease. Cambridge University Press, 1996: 1- 267.
2. Wilcken B, Wiley V: Newborn screening. Pathology 2008; 40:104 [PMID: 18203033].
3. Leonard JV, Morris AAW. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth Acta Paediatrica 2006;95:6-14.
4. Fernandes J, Saudubray JM, van denBerghe G (eds): Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment. 2nd Ed, Springer- Verlag, Berlin, 1995: 1-437.
5. Kamboj M: Clinical approach to the diagnoses of in born errors of metabolism Pediatr Clin North Am 2008;55:1113 [PMID: 18929055].
6. Chakrapani A, Cleary MA, Wraith JE. Detection of newborn errors of metabolism in the newborn. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001;84:F205-F210.
7. Kang ES. Clinical and laboratory approach to a neonate suspected of an inborn error of metabolism. Turk J Pediatr 1999;41:1-35.
8. Stern HJ: Lactic acidosis in pediatrics: clinical and laboratory evaluation. Ann Clin Biochem 1994; 31:410-419.
9. Arnold GL et al: A Delphi-based consensus clinical practice protocol for the diagnosis and management of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency. Mol Genet Metab 2008; 93:363 [PMID: 18155630].
10. Van Hove JL et al: Management of a patient with holocarboxylase synthetase deficiency. Mol Genet Metab 2008; 95:201 [PMID: 18974016].

11. Lee WT. Disorders of amino acid metabolism associated with epilepsy. *Brain Dev* 2011; 33: 745-752.
12. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its role in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996;255:1–11.
13. Cole H, Weremowicz H, Morton CC, Wolf B. Localization of serum biotinidase (*BTD*) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics* 1994;22:662–663.
14. Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B. Structure of the human biotinidase gene. *Mamm Genome* 1998;9:327–330.
15. Dienffebach, C.W., Lowe, T.M.J and Dveksler, G.S (1995). General Concepts for PCRPrimer Design. In: Dienffebach, C.W. and Dveksler, G.S (Eds.) PCR Primer, a Laboratory Press, Cold Spring Harbar, NY, USA, pp.33-155.
16. Innis, M:A., Myombo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction- amplified DNA. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 85, 9436-9440.
17. Maxam, A., Gibert, W. 1977, A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4.
18. PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998.
19. Pearl PL. New treatment paradigms in neonatal metabolic epilepsies. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 204-213.
20. Kayser MA: Inherited metabolic diseases in neurodevelopmental and neurobehavioral disorders. *Semin Pediatr Neurol* 2008; 15:127 [PMID: 18708003].
21. Wilcken B: Recent advances in newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:129 [PMID: 17342450]

22. Turecek F et al: Tandem mass spectrometry in the detection of inborn errors of metabolism for newborn screening. *Methods Mol Bio* 2007; 359:143 [PMID: 17484116]
23. Downing M, Pollitt R: Newborn bloodspot screening in the UK—past, present and future. *Ann Clin Biochem* 2008; 45:11 [PMID: 18275669].
24. Wolf B. Disorder of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 3935e62.
25. Baykal T, Huner G, Sarbat G ve ark. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns (letter). *Acta Paediatr* 1998;87:1102-3.
26. Hart PS, Hymes J, Wolf B. Biochemical and immunological characterization of serum biotinidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1992;50:126-36.
27. Baykal T, Huner G, Sarbat G, et al. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. *Acta Paediatr*, 1998;87(10):1102-3.
28. Pomponio RJ, Coskun T, M Demirkol M, et al. Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis*, 2000; 23(2):120-8.
29. Lyon G, Adams RD, Kolodny EH. *Neurology of hereditary metabolic diseases of children*. Second ed. New York: McGraw-Hill, 1996:76-8.
30. Ciency--clinging the diagnosis rapidly can make all the difference! *BMJ Case Rep* 2011; 2011. doi: 10.1136/bcr.07.2011.4494.
31. Procter M, Wolf B, Crockett DK, Mao R. The biotinidase gene variants registry: a paradigm public database. *G3 (Bethesda)* 2013;3(4): 727-31.
32. Hart PS, Hymes J, Wolf B. Biochemical and immunological characterization of serum biotinidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 126-136.

33. Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, et al. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analysis. *Pediatr Res* 1997; 42: 840-848.
34. Swango KL, Demirkol M, Huner G, et al. Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Hum Genet* 1998; 102: 571-575.
35. Pomponio RJ, Coskun T, Demirkol M, et al. Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 120-128.
36. Hymes J, Stanley CM, Wolf B. Mutations in *BTD* causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 2001;18(5):375-81.
37. Cowan TM, Kazerouni NN, Dharajiya N, Lorey F, Roberson M, Hodgkinson C, et al. [Increased incidence of profound biotinidase deficiency]. *Mol Genet Metab* 2012;106(4):485-7
38. Seckin Y, Demirkol M, et al. Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *J Inherit Metab Dis* 2005;28(6):903-12.
39. A, Ozalp I, Hüner G, et al. Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis* 2000;23(2):120-8
40. Loukas YL, Dotsikas Y, et al. High incidence of partial biotinidase deficiency cases in newborns of Greek origin. *Gene* 2013;524(2):361- 2.
41. Clinical utility gene card for: biotinidase deficiency. *Eur J Hum Genet* 2012;20(5). doi: 10.1038/ejhg.2012.28
42. R, Heimann G, Baumgartner ER. A biotinidase Km variant causing late onset bilateral optic neuropathy. *Arch Dis Child* 1992;67(1): 115- 9.

## Ek 1.

# ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Seda	Soyadı	Köybaşı
Doğum Yeri	Fatih/İSTANBUL	Doğum Tarihi	18.12.1988
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	12745646702
E-mail	sedakoybasi1988@hotmail.com	Tel	05548553650

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi	2015
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi	2010
Lise	Sarıyer Vehbikoç Vakfı Lisesi	2009

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Laboratuvar Sorumlu Teknisyeni- Biyolog	Acıbadem Maslak Hastanesi	2014-...
2. Laboratuvar Teknisyeni- Biyolog	Acıbadem Maslak Hastanesi	2010-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

### Yabancı Dil Sınav Notu #

KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

# Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Windows XP/7/8	İyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer:

**SEDA KÖYBAŞI**

**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS**

**İSTANBUL-2015**