



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI KAPSAMINDA TARANAN
BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİNİN GENETİK ETİYOLOJİSİNDE
YER ALAN MUTASYONLARIN DAĞILIMI VE GENOTİP-
FENOTİP KORELASYONU**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. NİGAR SHİRİNOVA

KAYSERİ-2024



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI KAPSAMINDA TARANAN
BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİNİN GENETİK ETİYOLOJİSİNDE
YER ALAN MUTASYONLARIN DAĞILIMI VE GENOTİP-
FENOTİP KORELASYONU**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. NİGAR SHİRİNOVA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MUNİS DÜNDAR

KAYSERİ-2024

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimi ve tez sürecimde yüksek bilgi, tecrübeleri ve vizyonları ile bana değerli katkılar sağlayan, enerjisi ile desteğini her zaman hissettiğim, yoğun çalışma temposu içerisinde bana her zaman vakit ayıran Anabilim Dalı BaŐkanımız ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Asistanlığımın ilk günlerinden itibaren desteğini ve sevgisini hep hiss ettiren, tez çalıŐmam ve diğer tüm akademik çalıŐmalarımnda beni her zaman cesaretlendiren, tecrübe ve donanımlarıyla bana yol gösterici olan, meslek etiği ve hayatın içindeki duruŐuyla kendime rol model olarak belirlediğim, asistanı olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Sevcan TUĞ BOZDOĞAN'a,

Asistanlık sürecimde bana değerli bilgi ve katkılarını sağlayan Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a, Doç. Dr. Aslıhan KİRAZ'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle kendisinden çok Őey öğrendiğim Doç. Dr. Atıl BİŐĐİN'e,

Bu çalışmada desteğini esirgemeyen, bilgi, deneyim ve katkılarında otürü Doç. Dr. Deniz KOR ve Uzm. Dr. Ezgi BURGAÇ'a

Değerli asistan arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde beni her zaman destekleyen anneme, babama, kardeŐime ve canım aileme,

Her zaman yanımda olan, her koŐulda bana güvenen, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her anıma anlam katan sevgili eŐim Vüqar'a ve oğlum Toğrul'a

Sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| KISALTMALAR ve SİMGELER..... | iii |
| TABLolar LİSTESİ | iv |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vi |
| ÖZET | viii |
| ABSTRACT | xi |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1.Biyotinidaz Enzimi | 3 |
| 2.2.Biyotin | 5 |
| 2.4.Biyotinin Metabolizmadaki Rolü | 8 |
| 2.5.Biyotinidaz Enzim Eksikliği (BBE ve KBE)..... | 10 |
| 2.6.İnsidans: | 10 |
| 2.7.Klinik Bulgular | 11 |
| 2.8.Yenidoğan Tarama Programında Biyotinidaz Eksikliği..... | 12 |
| 2.9. Serum veya plazmada enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tanı yöntemleri | 13 |
| 2.10. <i>BTD</i> Geni ve Biyotinidaz eksikliğinin genetik etiyojisi | 14 |
| 3.HASTALAR VE YÖNTEM | 19 |
| 3.1. HASTALAR | 19 |
| 3.2. YÖNTEM | 19 |
| 3.2.1. DNA İzolasyonu | 19 |
| 3.2.2. Yeni Nesil Dizileme..... | 20 |
| 3.2.3. Dizi Varyantlarının Sınıflandırılması | 25 |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME..... | 25 |
| 3.4. ETİK KURUL ONAYI..... | 25 |
| 4.BULGULAR | 26 |
| 5.TARTIŞMA..... | 72 |
| 6.SONUÇLAR..... | 75 |
| 7.KAYNAKLAR..... | 77 |

KISALTMALAR ve SİMGELER

| | |
|---------------|--|
| B-PABA | Biyotinil-p-aminobenzoik asit |
| B-6AQ | Biyotinil-6-aminokinolin |
| SMVT | Sodyum Bağımlı Multivitamin Transporteri |
| PC | Piruvat Karboksilaz |
| ACC | Asetil-CoA Karboksilaz |
| PCC | Propiyonil-CoA Karboksilaz |
| MCC | 3-Metilkrotonil-CoA Karboksilaz |
| TCA | Trikarboksilik Asit Döngüsü |
| HLSC | Holokarboksilaz Sentetaz |
| MCT1 | Monokarboksilat Taşıyıcı 1 |
| BBE | Belirgin Biyotinidaz Eksikliği |
| KBE | Kısmi Biyotinidaz Eksikliği |
| nm | Nanometre |
| ml | Mililitre |
| mg | Miligram |
| kDa | Kilodalton |
| bp | Baz Çifti |
| U | Ünite |
| UYTP | Ulusal Yenidoğan Tarama Programı |
| YND | Yeni Nesil Dizileme |
| ACMG | Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 3.1. YND deneyleri kapsamında yapılan fragmentasyon işlemi termal döngü programı. | 20 |
| Tablo 3.2. YND deneyleri kapsamında yapılan adaptör ligasyonu işlemi termal döngü programı. | 21 |
| Tablo 3.3. YND deneyleri kapsamında yapılan hedef zenginleştirme işlemi termal döngü programı. | 23 |
| Tablo 3.4. YND deneyleri kapsamında yapılan kütüphane hazırlığı işlemi termal döngü programı. | 23 |
| Tablo 4.1. Tespit edilmiş tüm varyantların özellikleri..... | 29 |
| Tablo 4.2. En sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı..... | 37 |
| Tablo 4.3. En sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları..... | 37 |
| Tablo 4.4. c.1270G>C (p.D424H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 38 |
| Tablo 4.5. Alellerinden birinde c.1270G>C (p.D424H) varyantı olan üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastaların dağılımı. | 39 |
| Tablo 4.6. c.410G>A (p.R137H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 40 |
| Tablo 4.7. c.1535C>T (p.T512M) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 42 |
| Tablo 4.8. c.451G>A (p.A151T) varyantının hastalar arasında dağılımı. | 44 |
| Tablo 4.9. Yeni varyantların dağılımı..... | 44 |
| Tablo 4.10. Tüm hastaların mutasyon yüküne göre dağılımı. | 45 |
| Tablo 4.11. Bir varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı..... | 47 |
| Tablo 4.12. İki varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı..... | 48 |
| Tablo 4.13. Üç varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı..... | 49 |
| Tablo 4.14. Mutasyon tespit edilmemiş hastaların enzim düzeylerine göre dağılımı. .. | 49 |

| | |
|---|----|
| Tablo 4.15. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı..... | 50 |
| Tablo 4.16. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı. | 51 |
| Tablo 4.17. EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı. | 52 |
| Tablo 4.18. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları. | 53 |
| Tablo 4.19. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları | 54 |
| Tablo 4.20. EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları. | 54 |
| Tablo 4.21. BBE hastalarının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 55 |
| Tablo 4.22. KBE hastalarının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 56 |
| Tablo 4.23. EA>%30 tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı. | 57 |
| Tablo 4.24. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı. | 59 |
| Tablo 4.25. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı. | 59 |
| Tablo 4.26. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastalar dağılımı..... | 60 |
| Tablo 4.27. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı. | 61 |
| Tablo 4.28. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı. | 63 |
| Tablo 4.29. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA>%30 olan hastaların dağılımı. | 65 |
| Tablo 4.30. Bir varyant tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı..... | 67 |
| Tablo 4.31. Bir varyant tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı..... | 68 |
| Tablo 4.32. Bir varyant tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastaların dağılımı. | 70 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Biotin döngüsü (18) | 4 |
| Şekil 2.2. H2A, H3 ve H4 histonlarındaki modifikasyon bölgeleri (17) | 4 |
| Şekil 2.3. Biotinin moleküler yapısı (29) | 5 |
| Şekil 2.4. Diyetle alınan biyotin alımı (28)..... | 6 |
| Şekil 2.5. Bağırsak lümeninde biyotininin emilimi (28)..... | 7 |
| Şekil 2.6. Memelilerde biyotin bağımlı karboksilazlar. ACC-asetil-CoA karboksilaz; PC-piruvat karboksilaz; PCC-propiyonil-CoA karboksilaz; MCC-β-metilkrotonil-CoA karboksilaz (49)..... | 9 |
| Şekil 2.7. Yenidoğan Tarama Programı ile Biotinidaz Enzim Aktivitesi taranmasının akış şeması (11) | 13 |
| Şekil 2.8. ClinVar, UniProt ve Franklin veritabanlarında bildirilmiş toplam varyantlar | 15 |
| Şekil 2.9: ClinVar varyantları (ClinVar'ın 3 Kasım 2024 sürümünden alınmıştır) | 15 |
| Şekil 2.10. Sanger dizileme yöntemi..... | 16 |
| Şekil 2.11. Illumina dizileme | 18 |
| (Baum, Chloé. (2021). New approaches and concepts to study complex microbial communities)..... | 18 |
| Şekil 4.1. <i>BTD</i> geni dizilenen hastaların cinsiyet dağılımı | 26 |
| Şekil 4.2. Hastaların biyotinidaz enzim düzeyine göre dağılımı..... | 27 |
| Şekil 4.3. Hastaların yaşa göre dağılımı..... | 27 |
| Şekil 4.4. Hastaların yaşa ve enzim aktivitesine göre dağılımı..... | 28 |
| Şekil 4.5. Mutasyon tiplerinin dağılımı..... | 34 |
| Şekil 4.6. Varyantların ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması | 34 |
| Şekil 4.7. Varyantların ekzon lokalizasyonuna göre dağılımı..... | 35 |
| Şekil 4.8. Varyantların REVEL skoruna göre dağılımı..... | 36 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.9. (Yeni) Missense mutasyonlarda REVEL ve MetaRNN puanlarının histogramları..... | 45 |
| Şekil 4.10. Toplam hastaların mutasyon yüküne göre dağılımı | 46 |
| Şekil 4.11. Toplam hastalarda, BBE, KBE ve EA>%30 saptanmış hastalarda kadın/erkek oranı | 50 |
| Şekil 4.12. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı | 51 |
| Şekil 4.13. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı..... | 52 |
| Şekil 4.14. EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı. | 53 |
| Şekil 4.15. BBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı..... | 56 |
| Şekil 4.16. KBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı | 57 |
| Şekil 4.17. EA>%30 saptanmış hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı. | 58 |

ÖZET

Biyotinidaz eksikliği, otozomal resesif kalıtım paterni gösteren dünya çapında görülme sıklığı 1:40.000 ile 1:60.000 arasında değişen, belirti ve semptomları tipik olarak yaşamın ilk birkaç ayında veya yılında ortaya çıkan, hafiften şiddetliye kadar değişen geniş bir klinik belirti yelpazesine sahip nörokütanöz metabolik hastalıktır. Erken tanı ve tedaviye başlama zamanı semptomların önlenebilirliği ve geridönüştürülebilirliği ile doğru orantılı olduğundan bu hastalık dünyada ve Türkiyede Ulusal Yenidoğan Tarama Programına (UYTP) dahil edilen hastalıklardan biri olmuştur.

Bu çalışmada Biyotinidaz Eksikliğine yönelik genetik tetkikleri çalışılması amacıyla yönlendirilmiş hastaların genetik sonuçları incelenerek saptanan varyantların retrospektif olarak değerlendirilmesi, biyokimyasal bulguları ile karşılaştırılarak genotip-fenotip ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 2013-2023 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalına ve Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi'ne (AGENTEM) yönlendirilen hastaların serum biyotinidaz enzim değerleri ve *BTD* geni dizi analizi sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiş, tespit edilen mutasyonlar genin NM_001370658.1 (MANE Select) olarak tanımlanan en son transkripti referans alınarak güncellenmiş, kalıtım paternine ve American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kriterlerine göre patojenite sınıflaması ile sınıflandırılmaları yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmada, varyant saptanmış bireylerin aile üyelerinden çalışılmış (aile taraması kapsamında) *BTD* geni dizi analiz sonuçları da retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya 2013-2023 yılları arasında merkezimize yönlendirilmiş 2672 hasta dahil edilmiştir. Hastaların çoğu pediatrik ve Yenidoğan Tarama Programı ile yönlendirilmiş hastalar olup, 1245 (%47) hasta 30 günden küçük, 672 (%25) hasta 30-365 gün arasında, 125 (%5) hasta 1-18 yaş arasında ve 630 (%23) hasta 18 yaşından büyüktü.

Hastalardan 2105'nin enzim aktivitesi fluorometrik yöntemle ölçülmüştür. Bu hastaların 100'ünde (%5) enzim aktivitesi %10'un altında (Belirgin Biyotinidaz Eksikliği), 1039 (%49) hastada enzim aktivitesi %10-%30 arasında (Kısmi Biyotinidaz Eksikliği), 966

(%46) hastada ise enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. Tüm hastaların *BTD* genine yönelik genetik tetkikleri çalışılmış olup, bu hastaların 2307'sinde mutasyon tespit edildi, 365 hastada ise herhangi bir varyant görülmedi. Mutasyon tespit edilmiş hastalarda toplam 83 farklı varyant görüldü. Varyantlar özellikle genin 4.ekzonunda kümelenmişti. Saptanan 83 varyantın 68'i (%82) missense, 8 (%10) varyant frameshift (çerçeve kayması), 5 (%6) varyant sinonim (sessiz), 1 (%1) varyant nonsense (anlamsız), 1 (%1) varyant intronik olarak sınıflandırıldı. Tespit edilmiş varyantlar ACMG kriterlerine göre 5'i Benign, 3'ü Olası Benign, 29'u Klinik Önemi Belirsiz, 21'i Olası Patojenik ve 25'i Patojenik olmak üzere sınıflandırıldı. 68 missense varyantı REVEL skoruna göre değerlendirildiğinde REVEL skoru 0,75'in üzerinde olan 32, 0,94'ün üzerinde olan 4 varyant görüldü.

Bu çalışmada hastalarda en sık tespit edilmiş genotipler 709 hastada heterozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 479 hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 163 hastada heterozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu, 143 hastada heterozigot c.1535C>T (p.T512M) mutasyonu, 101 hastada c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35)/c.38G>T (p.C13F) birleşik heterozigot mutasyonları oldu. Daha önce veri tabanlarında tanımlanmamış on dört yeni varyant bildirildi.

Ulusal Yenidoğan Tarama Programı, etkilenen binlerce çocuğun ve hatta her yıl bir milyondan fazla yenidoğanın yaşamını büyük ölçüde iyileştiren, hastalıkların nüfus çapında tespit edilmesini sağlayan dikkate değer bir başarı elde etmiştir. *BTD* hastalığının tanısı serumda biyotinidaz aktivitesinin ölçümü ve moleküler analiz yöntemlerine dayanmaktadır. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak ciddi patojenik varyantlara sahip birçok asemptomatik vakalar mevcuttu. Enzim aktivitesi %30'un üzerinde tespit edilmiş 157 hastada homozigot, 107 hastada birleşik heterozigot mutasyon görüldü. Ayrıca mutasyon tespit edilmemiş 365 hastanın 30'unda Kısmi Biyotinidaz Eksikliği görüldü. Biyotinidaz enzim aktivite seviyelerinin yaşamın ilk günlerinde en düşük olup, sonraki günlerde arttığı bildirilmektedir. Aynı zamanda biyotinidaz aktivitesindeki değişkenlikler, çeşitli klinik durumlardan (erken doğum, çevre sıcaklığı, örneklerin transfer koşulları, hiperbilirubinemi ve perinatal asfiksi) etkilenebilmektedir. Bu bulgular, neonatal dönemdeki ölçümlerin mevcut enzim aktivite düzeyini belirlemek için yeterli olmadığını ve ardışık testlerle takip edilmesi gerektiğini

göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, bu bölgedeki BTD'li yenidoğanlarda genotip ile biyokimyasal fenotip arasında düşük bir uyum olduğunu ve varyant patojenitesi ile biyokimyasal fenotip arasında öngörülebilir bir korelasyon kurmanın yeterli olmadığını doğrulamaktadır. Ek olarak, bu çalışma, genotip ve biyokimyasal fenotip arasındaki uyumsuzluğu açıklamak için enzim aktivitesi ölçümlerinde ve moleküler analizlerde analitik zorlukların ele alınmasının önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biotinidaz eksikliği, yenidoğan tarama programı, *BTD* geni, yeni nesil dizileme yöntemleri.



ABSTRACT

Biotinidase deficiency is a neurocutaneous metabolic disease with an autosomal recessive inheritance pattern, a worldwide prevalence of 1:40,000 to 1:60,000, and signs and symptoms typically appear in the first few months or years of life, with a wide range of clinical symptoms ranging from mild to severe. Since early diagnosis and the time to start treatment are directly proportional to the preventability and reversibility of symptoms, this disease has become one of the diseases included in the National Newborn Screening Program (NBS) worldwide and in Turkey.

This study aimed to retrospectively evaluate the detected variants by examining the genetic results of patients referred for genetic tests for Biotinidase Deficiency, compare them with biochemical findings, and examine the genotype-phenotype relationship.

In our study, serum biotinidase enzyme values and BTD gene sequence analysis results of patients referred to Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics and Çukurova University Adana Genetic Diseases Diagnosis and Treatment Center (AGENTEM) between 2013-2023 were evaluated retrospectively, the detected mutations were updated by taking the latest transcript of the gene defined as NM_001370658.1 (MANE Select) as reference, and they were classified with pathogenicity classification according to the inheritance pattern and American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria. In addition, in this study, BTD gene sequence analysis results studied from family members of individuals with variants detected (within the scope of family screening) were also evaluated retrospectively.

In our study, serum biotinidase enzyme values and BTD gene sequence analysis results of patients referred to Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics and Çukurova University Adana Genetic Diseases Diagnosis and Treatment Center (AGENTEM) between 2013-2023 were evaluated retrospectively, the detected mutations were updated by taking the latest transcript of the gene defined as NM_001370658.1 (MANE Select) as reference, and they were classified with pathogenicity classification according to the inheritance pattern and American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria. In addition, in this study, BTD

gene sequence analysis results studied from family members of individuals with variants detected (within the scope of family screening) were also evaluated retrospectively.

The study included 2672 patients referred to our center between 2013-2023. Most of the patients were pediatric and referred through the Newborn Screening Program, 1245 (47%) patients were younger than 30 days, 672 (25%) patients were between 30-365 days, 125 (5%) patients were between 1-18 years of age, and 630 (23%) patients were older than 18 years. Enzyme activity was measured in 2105 patients using the fluorometric method. In 100 (5%) of these patients, enzyme activity was below 10% (Significant Biotinidase Deficiency); in 1039 (49%) patients, enzyme activity was between 10%-30% (Partial Biotinidase Deficiency), and in 966 (46%) patients, enzyme activity was above 30%. Genetic tests for the BTBD9 gene were performed on all patients, and mutations were detected in 2307 of these patients, while no variants were seen in 365 patients. A total of 83 different variants were seen in patients with mutations. The variants were clustered, particularly in the 4th exon of the gene. Of the 83 variants detected, 68 (82%) were classified as missense, 8 (10%) as frameshift, 5 (6%) as synonymous, 1 (1%) as nonsense, and 1 (1%) as intronic. The detected variants were classified according to ACMG criteria as 5 as Benign, 3 as Possible Benign, 29 as Clinically Uncertain, 21 as Possibly Pathogenic, and 25 as Pathogenic. When 68 missense variants were evaluated according to the REVEL score, 32 variants with a REVEL score above 0.75 and 4 variants with a REVEL score above 0.94 were observed. The most frequently detected genotypes in this study were heterozygous c.1270G>C (p.D424H) mutation in 709 patients, homozygous c.1270G>C (p.D424H) mutation in 479 patients, heterozygous c.410G>A (p.R137H) mutation in 163 patients, heterozygous c.1535C>T (p.T512M) mutation in 143 patients, and combined heterozygous c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35)/c.38G>T (p.C13F) mutations in 101 patients. Fourteen new variants not previously identified in databases were reported. The National Newborn Screening Program has achieved remarkable success in detecting the disease population-wide, significantly improving the lives of thousands of affected children and more than a million newborns annually. The diagnosis of BTBD9 disease is based on the measurement of biotinidase activity in serum and molecular analysis methods. In our study, there were many asymptomatic cases with severe

pathogenic variants, consistent with the literature. Homozygous mutations were seen in 157 patients, and compound heterozygous mutations in 107 patients with enzyme activity above 30%. In addition, partial biotinidase deficiency was seen in 30 of 365 patients without mutation. Biotinidase enzyme activity levels are reported to be lowest in the first days of life and increase in the following days. At the same time, variations in biotinidase activity can be affected by various clinical conditions (premature birth, environmental temperature, transfer conditions of samples, hyperbilirubinemia and perinatal asphyxia). These findings indicate that neonatal period measurements are insufficient to determine the current enzyme activity level and should be followed up with sequential tests. The results of this study confirm that there is a low concordance between genotype and biochemical phenotype in newborns with BTD in this region and that it is not sufficient to establish a predictable correlation between variant pathogenicity and biochemical phenotype. In addition, this study highlights the importance of addressing analytical difficulties in enzyme activity measurements and molecular analyses to explain the discordance between genotype and biochemical phenotype.

KEYWORDS: Biotinidase deficiency, newborn screening program, BTD gene, following generation sequencing methods.

1.GİRİŞ

Biyotinidaz Eksikliği (OMİM #253260) *BTD* genindeki mutasyonlarından kaynaklanan ve biyotinün geri dönüştürülmesinin bozulmasına neden olan otozomal resesif kalıtım paterni gösteren nörokütanöz bir hastalıktır (1,2). Enzim eksikliği biyotinün miktarının ve kullanımının azalmasına bağlı olarak tüm karboksilaz enzimlerinin fonksiyonel eksikliğine yol açar ve geç başlanğıçlı multipl karboksilaz eksikliği (Multiple Carboxylase Deficiency- MCD) olarak da adlandırılır (3).

BTD genindeki patojenik veya olası patojenik (fonksiyon kaybettirici) mutasyonlar biyotinidaz enzim aktivitesinin tamamen veya parsiyel olarak azalmasına neden olur. Parsiyel biyotinidaz eksikliğinde enzim aktivitesi normalin %10 ila %30'u, Belirgin biyotinidaz eksikliğinde enzim aktivitesi normalin %10'undan az olarak görülür (4).

Belirgin biyotinidaz eksikliği tipik olarak hipotoni, emme güçlüğü, gelişimsel gecikme, ataksi, nöbetler, saç ve kaşların dökülmesi, tırnak distrofisi, alopesi ve deri döküntüsü ile ortaya çıkar. Tedavi edilmeyen durumlarda optik atrofi, skotom ve işitme kaybı gelişebilir (5,6). Geridöndürülemez ve kalıcı kayıplara neden olabilir.

Ağır vakalarda ensefalopati, hiperventilasyon, laringeal stridor ve apne dahil olmak üzere solunum problemleri görülür. Ayrıca tekrarlayan viral ve fungal enfeksiyonlar gibi immünolojik bulgular görülebilir. Laboratuvar bulgularında metabolik asidoz, laktik asidoz, hiperamonyemi, idrarda 3-hidroksi-izovalerik asit artışı görülebilir (7).

Kısmi Biyotinidaz eksikliğinde daha hafif semptomlar görülür. Asemptomatik seyr eden hastalarda enfeksiyon gibi stress durumlarında klinik bulgular ortaya çıkabilir (8).

Biyotinidaz Eksikliği hastalığına neden olan mutasyonların büyük çoğunluğu *BTD* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlardan kaynaklanır. Bugüne kadar ClinVar, UniProt ve Franklin Community veritabanlarında 729 farklı varyant bildirilmiştir. *BTD* geni toplam uzunluğu 543 amino asitlik proteini kodlamakta olup dört ekzon ve 3 introndan oluşmuştur (9). Varyantlar özellikle ekzon 4'te kümelenmiştir.

c.1270G>C (p.D424H) varyantı hem Türkiye'de hem de dünyada en sık görülen varyanttır. Diğer yaygın patojenik varyantlar arasında c.410G>A (p.R137H), c.1308A>C (p.Q436H), c.38_44delGCGGCTGinsTCC (p.C13Ffs*36), c.1431T>G (p.P477P), c.535G>A (p.V179M), c.1395C>G (p.H465Q) ve c.175C>T (p.R59C) bulunur (1).

İlk defa Biyotinidaz Enzim Aktivitesinin (BEA) kantitatif belirlenmesine yönelik yöntemler 1984 yılında Virginia'da bir pilot yenidoğan tarama programında kullanıldı (10). Türkiye'de ise Biyotinidaz Eksikliğine yönelik UYTP 2008 yılından bu yana uygulanmakta olup Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından başlatılmıştır (11).

Günümüzde biyotinidaz eksikliğine yönelik yenidoğan taraması tüm Amerika Birleşik Devletleri (ABD) eyaletlerinde ve dünya çapında 25'ten fazla ülkede rutin olarak yapılmaktadır (12,13).

Bu çalışmada Biyotinidaz Eksikliğine yönelik genetik tetkikleri çalışılması amacıyla başvuran 2672 hastanın tüm verileri incelenerek saptanan varyantların retrospektif olarak değerlendirilmesi, biyokimyasal bulguları ile karşılaştırılarak genotip-fenotip ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

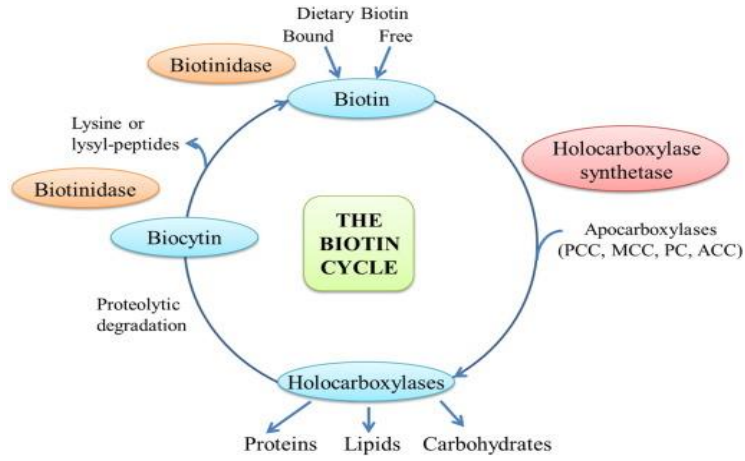
2.1.Biyotinidaz Enzimi

Biyotinidaz enzimi (EC:3.5.1.12) *BTD* geni (OMIM #609019) tarafından eksprese edilen ve biyotin döngüsünde majör olarak rol oynayan bir enzimdir. Bu enzim 543 amino asitten oluşan monomerik bir glikoproteindir. (UniProt P43251) (8,14).

Enzim en az dokuz izoforma (dört majör ve beş minör) ve altı varsayılan N-bağlı glikozilasyon bölgesine sahiptir (15). Proteinin glikozilasyonu, kütesini 13 ila 19 kDa artırabilir ve glikozile edilmiş enzimin moleküler kütesininin 70 ila 76 kDa arasında olduğu tahmin edilmektedir. (8)

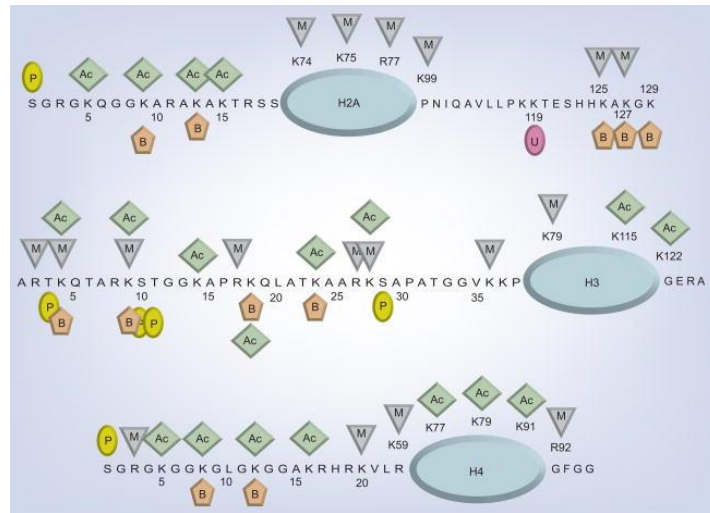
Biyotinidaz enzimi biyotinil-hidrolaz ve biyotinil-transferaz aktivitelere sahiptir (16). Biyotinil-hidrolaz aktivitesi ile, enzim biyositinden ve/veya bozulmuş (fonksiyonunu bitirmiş) holokarboksilazlardan elde edilen küçük biyotinil-peptitlerinden biyotini geri dönüştürür. Ayrıca biyotinin diyet kaynaklarından serbest bırakılmasında rol oynar (17). Serbest bırakılan biyotin ise biyotin bağımlı dört karboksilaz enzimi için koenzim görevi görmektedir: piruvat karboksilaz (PC) (EC 6.4.1.1), asetil-CoA karboksilaz (ACC) (EC 6.4.1.2), propiyonil-CoA karboksilaz (PCC) (EC 6.4.1.3) ve 3-metilcrotonil-CoA karboksilaz (MCC) (EC 6.4.1.4) (14).

Bu enzimler glikoneogenez, yağ asidi sentezi, dallı zincirli amino asitlerin metabolizması ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde rol oynamaktadır (18).



Şekil 2.1. Biotin döngüsü (18)

Biyotinidaz enzimi, aynı zamanda biyotinin transferaz aktivitesine de sahip olup biyotinin biyositinden histonlara aktarılmasından sorumludur (20,21). Bugüne kadar on bir farklı biyotininilasyon bölgesi tanımlanmıştır: beşi histon H2A'da (K9, K13, K125, K127 ve K129), dördü histon H3'te (K4, K9, K18 ve belki de K23) ve ikisi histon H4'te (K8 ve K12) (22,23).



Şekil 2.2. H2A, H3 ve H4 histonlarındaki modifikasyon bölgeleri (17)

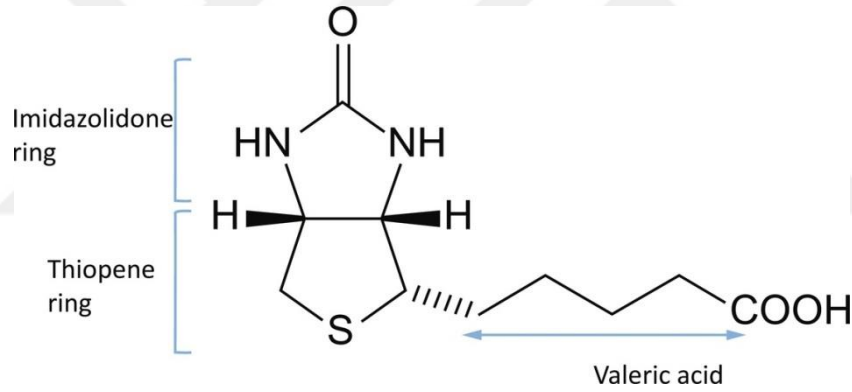
Histonların biyotininilasyonu geri dönüşümlü bir süreç olup biyotin molekülünün çekirdek histonlardaki lizin kalıntılarının ϵ -amino grubuna kovalent bağlanmasına dayanır (24). Bu süreçte biyotinidaz enziminin yanısıra holokarboksilaz sentetaz (HCS)

enzimi de rol oynamaktadır (25,26). Histonların biyotiniasyonunda biyotinidaz enzimi substrat olarak biyosit (biyotini-q-lizin), HCS ise biyotin ve ATP kullanır (25).

Histon proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonlarından biri olan histon biyotiniasyonunun nükleozomların fiziksel yapısını değiştirilmesi, kromatinin yeniden şekillenmesi, genlerin transkripsiyonel baskılanmasına neden olduğu ve genom stabilitesinde rol oynadığı bildirilmektedir (18,27).

2.2.Biyotin

Biyotin, suda çözünen bir vitamin olup, H vitamini veya B7 vitamini olarak da bilinmektedir (28). Bu molekül $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ formülü ve 244,31 g/mol moleküler ağırlığı ile tanımlanmış olup, tetrahidroimidazol halkası ile valerik asit yan zincirine sahip kükürt içeren bir tetrahidrotiyofen halkasının birleşmesinden ibarettir (29).



Şekil 2.3. Biotinin moleküler yapısı (29)

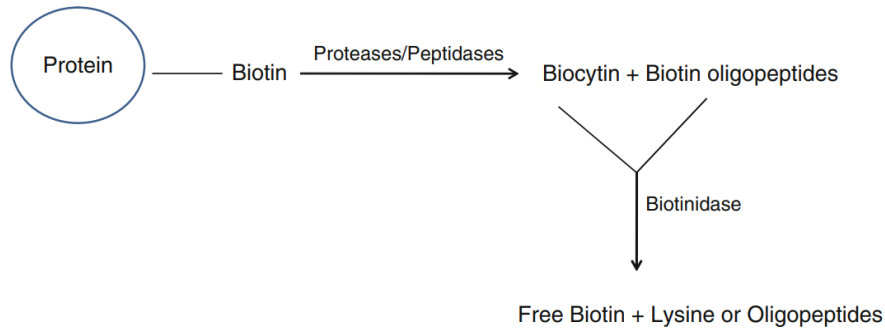
Doğada biyotin molekülünü sadece bitkiler ve mikroorganizmalar sentezleme yeteneğine sahip olup, insanlar ve diğer memeliler sentezleyemezler. Bu nedenle insanlar biyotini iki yolla, ekzojen olarak diyet kaynakları ile, endojen olarak ise bağırsak mikroflorası yolu ile alırlar (31). Ekzojen biyotin kaynağı olarak maya tam, buğday ekmeği, avakado, karnıbahar gibi bitkisel gıdalar ve karaciğer, yumurta sarısı, inek sütü gibi hayvansal gıdalar biyotinden zengindir (32,33). Endojen biyotin kaynağı ise kolondaki simbiyotik olarak yaşıyan bakterilerdir (34).

2.3.Biyotin Döngüsü

Biyotin döngüsünde 3 önemli protein rol oynamaktadır (18):

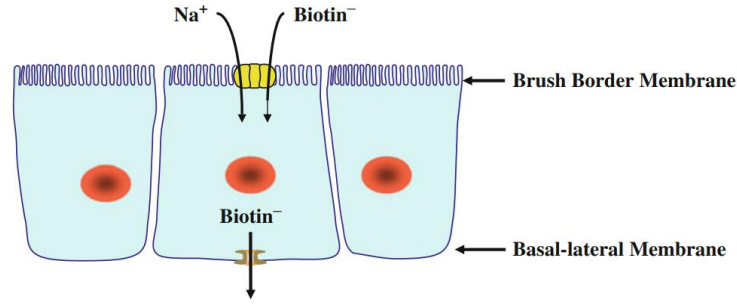
- Biotinidaz enzimi
- Sodyum bağımlı multivitamin taşıyıcı (SMVT)
- Holokarboksilaz sentetaz enzimi

Diyetle alınan biyotin serbest formda veya genellikle büyük bir kısmı proteinlerdeki lizin kalıntılarına kovalent bir şekilde bağlı formda bulunur. Bağlı form bağırsaktan emilmeden önce serbest biyotine dönüştürülür (28, 35-37). Biotin içeren proteinler önce bağırsak lümenine salgılanan proteazlar ve peptidazlar tarafından yıkılarak biyositin (biyotiniil-ε-lizin) ve biyotin oligopeptitlere parçalanır ve daha sonra ise bu moleküller intestinal ve pankreatik biyotinidaz enzimi ile serbest biyotine dönüştürülür (28).



Şekil 2.4. Diyetle alınan biyotin alımı (28).

Biyotinin hemostazında iştirak eden bir diğer protein Sodyum Bağımlı Multivitamin Transporteri (SMVT) olup proksimal ince bağırsak epitel hücrelerinin apikal membranında bulunur ve biyotinin bağırsaklardan emilmesinde iştirak eder (37,38).



Şekil 2.5. Bağırsak lümeninde biyotininin emilimi (28).

SMVT, serbest biyotinin bağırsaklardan emilmesinin yanı sıra, böbreklerden yeniden emilmesinden ve karaciğer ve periferik dokulardaki hücre zarları boyunca taşınmasından da sorumludur (18,37). Lenfoid hücrelerde SMVT'nin yanı sıra biyotin alımına katkıda bulunan proteinlerden biri de monokarboksilat taşıyıcı 1 (MCT1) proteindir (39).

Çeşitli çalışmalar, SMVT proteinini kodlayan ve kromozom 2 üzerinde yerleşen *SLC5A6* genindeki bialelik mutasyonların biyotinle birlikte, diğer B grubu vitaminleri pantoteik asit (B5 vitamini), α -lipoik asit ve iyodürün de emiliminin bozulmasına neden olduğunu göstermektedir. Etkilenmiş hastalarda, nörodejeneratif bozukluklar, nöbetler, serebral palsy, beyin atrofisi, gelişim geriliği, ishal, kusma, immün yetmezlik ve osteopeni de dahil olmak üzere bir dizi semptomlar ortaya çıkmaktadır. *SLC5A6*'daki resesif varyantlar, *linik* olarak değişen semptomlarla biyotinin azlığına taklit eden tedavi edilebilir bir metabolik bozukluğa neden olabilir (40,41). Biotin, pantotenik asit ve α -lipoik asitin birlikte verildiği üçlü vitamin replasman tedavisinin *SLC5A6* mutasyonları olan bireylerde klinik iyileşmeye yol açtığı gösterilmiştir (42). Biotinin bazolateral membrandan transportu ise sodyumdan bağımsız ve elektrojenik olarak gerçekleşmektedir (43). Emilimi hücre içi ve hücre dışı birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. İntraselüler olarak protein kinaz C ve Ca^{+2} /Calmodulin yoluyla emilim düzenlenirken, ekstraselüler olarak ise biyotin alım miktarındaki değişimlere bağlı olarak taşıyıcı protein ve mRNA miktarındaki artış ve azalışla düzenlenir (44).

Ayrıca insanlarda ve hayvanlarda yapılan *in-vivo* çalışmalar kalın bağırsak epitelinden de biyotinin emilebildiğini göstermiştir (45,46). Kalın bağırsağın mikroflorası

tarafından sentezlenen ve bağırsak lümenine salınan serbest biyotin kolonun epitel hücrelerinde bulunan Na^+ bağımlı taşıyıcı ile emildiği gösterilmiştir (47). Kana salınan biyotin esas olarak serbest biyotin (%81) olarak ve daha az oranda da plazma proteinlerine bağlı olarak (%19) taşınır (37).

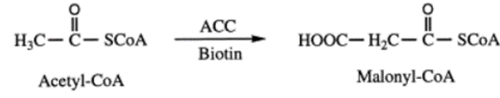
Biyotin ve metabolitleri idrar yoluyla, bağırsak bakterileri tarafından sentezlenen ve emilmeyen biyotin ise dışkı yoluyla atılır (37,48).

2.4.Biyotin Metabolizmadaki Rolü

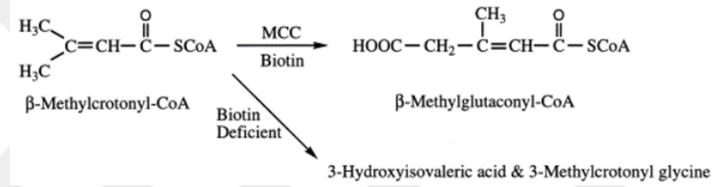
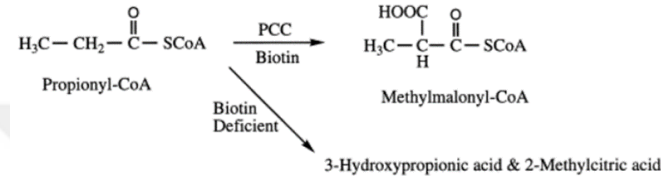
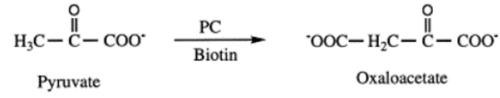
Memelilerde biyotin molekülü, ACC 1 ve 2, PC, PCC ve MCC enzimleri için koenzim görevi görmektedir (49). Apokarboksilazlar şeklinde inaktif olarak bulunan bu enzimlerdeki lizinin ϵ -amino grubu holokarboksilaz sentetaz enzimi aracılığı ile biyotinle kovalent bağla bağlanarak holokarboksilaz adlanan aktif bir hale gelir. Bu biyotininilasyon reaksiyonu iki aşamada gerçekleştirilir ve ATP gerektirir (50).

1. $\text{ATP} + \text{biyotin} + \text{HCS} \rightarrow \text{Biyotin-AMP-HCS} + \text{pirofosfat}$
2. $\text{Biyotin-AMP-HCS} + \text{apokarboksilaz} \rightarrow \text{holokarboksilaz} + \text{AMP} + \text{HCS}$

Cytosol and mitochondria



Mitochondria



Şekil 2.6. Memelilerde biyotin bağımlı karboksilazlar. ACC-asetil-CoA karboksilaz; PC-piruvat karboksilaz; PCC-propiyonil-CoA karboksilaz; MCC-β-metilkrotonil-CoA karboksilaz (49)

ACC enziminin sitozolik ve mitokondriyal formu vardır. Sitozolik formu bikarbonatın asetil-CoA'ya bağlanmasını katalize ederek yağ asidi sentezi için malonil-CoA'yı oluşturur (51,52). Mitokondriyal ACC enzimi ise yağ asidi oksidasyonunu kontrol eder ve ayrıca biyotin için bir rezervuar görevi görebilir (18,51,52). Eksikliğinde heksanoik asidin farklı türevleri dahil olmak üzere farklı moleküllerin birikmesine neden olur (53). Diğer üç biyotine bağımlı karboksilazlar ise yalnızca mitokondride bulunur. PC enzimi glukoneogenezde anahtar bir enzimdir ve ayrıca bir trikarboksilik asit döngüsü ara maddesi sağlama görevi görür (18,51). Eksikliği laktik asit ve alanin birikimine neden olur (53). PCC enzimi, izolösin, valin, metiyonin, treonin gibi amino asitlerin, kolesterol ve tek zincirli yağ asitlerinin metabolizmasındaki önemli adımları katalize eder (51). Eksikliği 3-hidroksi propiyonik asit ve metil sitrat birikimine neden olur (53). MCC

karboksilaz, lösin metabolizmasında önemli bir rol oynar (18,49). Eksikliğinde 3-metilkrotonilglisin ve 3-hidroksiizolerat birikimi görülür (53).

Görevini tamamlayan holokarboksilazlar daha sonra biyositine ve/veya biyotinin-peptitlere proteolize edilir; sonrasında ise bu moleküller biyotini serbest bırakmak için biyotinidaz enzimi tarafından parçalanır ve böylece biyotin geri dönüştürülür (8). İnsan *HLCS* genindeki mutasyonlar *HLCS* enziminin aktivitesinde azalmaya ve metabolik anormalliklere neden olur (54). Erken teşhis edilip tedavi edilmediği takdirde, erken başlangıçlı çoklu karboksilaz eksikliğine yol açarak fetal yaşamın çok erken dönemlerinde anormal santral sinir sistemi bulguları ve intrauterin büyüme geriliği şeklinde ortaya çıkabilir.

2.5. Biyotinidaz Enzim Eksikliği (BBE ve KBE)

Biyotinidaz Enzim Eksikliği (OMİM #253260) *BTD* genindeki mutasyonlarından kaynaklanan ve biyotinin geri dönüştürülmesinin bozulmasına neden olan otozomal resesif kalıtım paterni gösteren nörokütanöz bir hastalıktır (1,2). Bu da biyotinin miktarının ve kullanımının azalmasına bağlı olarak tüm karboksilaz enzimlerinin fonksiyonel eksikliğine yol açar ve geç başlangıçlı multipl karboksilaz eksikliği (Multiple Carboxylase Deficiency- MCD) olarak adlandırılır (3).

Biyotinidaz eksikliği serumdaki enzim seviyesine göre iki tipte sınıflandırılır: Belirgin Biyotinidaz Eksikliği (BBE) ve Kısmi Biyotinidaz Eksikliği (KBE). KBE'de enzim aktivitesi normalin %10 ila %30'u, BBE'de ise enzim aktivitesi normalin %10'undan az olarak görülür. Bu ayırım prognoz ve tedavi için çok önemli olup, klinik bulguların başlangıç yaşını, şiddetini ve tedavi yaklaşımını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (9).

2.6. İnsidans:

Biyotinidaz eksikliğinin insidansı dünya çapında yaklaşık 1:40.000 ile 1:60.000 ve taşıyıcılık frekansı ise 1:120'dir. BBE 137.401'de bir; KBE 109.921'de bir; ikisinin birlikte görülme sıklığı ise 61.067'de birdir (55). Akrabalık oranının yüksek olduğu Türkiye ve Suudi Arabistan Krallığı gibi ülkelerde bu prevalans daha yüksektir (56).

Türkiye'deki ulusal yenidoğan tarama programı yüksek oranda olduğunu ortaya koymuştur. Sağlık Bakanlığı'nın yayınladığı verilere göre, insidans yaklaşık 1: 7,116'dır (57,58).

2.7.Klinik Bulgular

KBE'de semptomlar bebeklikten yetişkinliğe kadar ortaya çıkabilir. Hastalar genellikle asmeptomatik veya daha hafif semptomlara sahiptir. Tedavi altında olmayan nadir durumlarda stres, hipotoni, deri döküntüsü ve saç dökülmesi gibi gelişimsel semptomları tetikleyebilir (59).

BBE'nin klinik prezentasyonu ise aynı aile içinde bile oldukça değişken olup, tedavi edilmeyen hastalarda semptomlar genellikle 2 ila 5 aylıkken ortaya çıkar (59,60). Yaşamın ilk on yılında hipotoni, emme güçlüğü, ensefalopati, generalize ve miyoklonik nöbetler, infantil spazm, spastik paraparezi, ataksi, gelişme geriliği gibi nörolojik bulgular görülebilir. Tedavi edilmemiş derin biyotinidaz eksikliği olan bireylerde en sık görülen nörolojik özellikler nöbetler ve hipotonidir (61). Etkilenen yaşlı bireylerde genellikle ataksi ve gelişimsel gecikme vardır (62). Nöro-görüntüleme en karakteristik anormallikler serebral atrofi ve ventriküler dilatasyonu içerir (62).

Cilt bulgularında egzamatöz dermatit, saç ve kaşların dökülmesi görülebilir. Ağır vakalarda kabuklanma, likenleşme ve sekonder enfeksiyon haline gelebilecek açık lezyonlar görülebilir (57).

Hastalarda optik atrofi, keratokonjuktivit, skotom, sensorinöral işitme kaybı, tekrarlayan viral ve fungal enfeksiyonlar gibi immünolojik bulgular ve laringeal stridor diğer sistem bulgularıdır.

Görme, işitme kaybı ve gelişimsel gecikmedeki değişiklikler, meydana gelirse, geri döndürülemez (63).

Tedavi edilmeyen ergenler ve yetişkinlerde genellikle miyelopati ve optik nöropati görülür ve sıklıkla başlangıçta multipl skleroz tanısı konur. Bu bireylerin çoğu, biyotin takviyesi ile semptomlarında iyileşme yaşamaktadır (64-67).

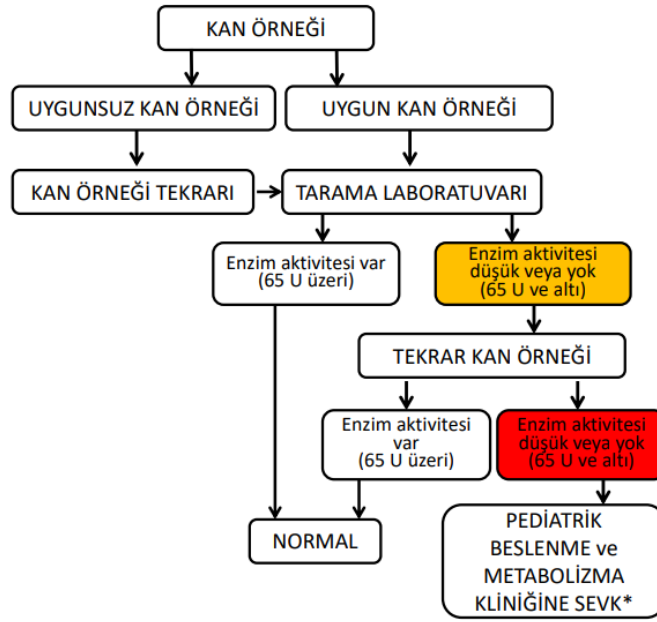
Tedavisiz BE'de akut metabolik dekompanseasyon döneminde metabolik asidoz, laktik asidoz, ketoasidoz, hiperamonyemi gibi organik asidemileri taklit eden bulgular ortaya çıkabilir. Metabolik tetkiklerde idrarda organik asit analizinde 3-hidroksi-izovalerik asit, metilkrotonilglisin, 3-hidroksi propiyonik asit, propiyonil glisin, laktik asit gibi organik asidemilerde görülen metabolitler ve tandem kütle spektrometrisinde (MSMS) 3-hidroksi izovaleril karnitin (C5-OH) yüksekliği beklenir (7).

2.8.Yenidoğan Tarama Programında Biotinidaz Eksikliği

Kurutulmuş kan lekeleri üzerindeki Biotinidaz Enzim Aktivitesinin (BEA) yarı kantitatif belirlenmesine yönelik yöntemler 1984 yılında ilk olarak Virginia'da bir pilot yenidoğan tarama programında kullanıldı (68). Türkiye'de Biotinidaz Eksikliğine yönelik UYTP 2008 yılından bu yana uygulanmakta olup Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından başlatılmıştır (11). Günümüzde biotinidaz eksikliğine yönelik yenidoğan taraması tüm Amerika Birleşik Devletleri (ABD) eyaletlerinde ve dünya çapında 25'ten fazla ülkede rutin olarak yapılmaktadır (12,13). Ülkemizde de UYTP'de birinci basamak test yöntemi topuk kanının Guthrie kağıdına alınarak BEA'nin ölçülmesidir. İdeal tarama zamanı postnatal 36-72.saat olup, bebeğin 48 saattir besleniyor olması tercih edilmektedir. Bu kapsamda alınan topuk kanları İl Sağlık Müdürlüğü'nde toplanarak ilgili laboratuvarlarda çalışılır. Tarama testinin pozitif olması, yani BEA'nin 65 U ve altı olması halinde bebek geri çağrılarak tekrar ikinci bir tarama yapılır. Negatif olması durumunda ise herhangi bir bildirimde bulunulmaz.

İkinci taramasında da BEA 65 U ve altı çıkan bebekler, kolorimetrik veya fluoremetrik yöntemlerle serum veya plazmada enzim aktivitesinin ölçülmesi amacıyla Pediatri Beslenme ve Metabolizma Kliniğine yönlendirilir. Aynı zamanda mutasyon durumunun belirlenmesi ve aileye genetik danışmanlık sağlanması amacıyla *BTD* genine yönelik Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemi ile Tüm Gen Dizi (TGD) analizi ve Multiplik Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) gibi moleküler genetik testlerin çalışılması için Tıbbi Genetik uzmanlarına ve Genetik Tanı merkezlerine yönlendirilir (11).

Biyotinidaz Eksikliği Akış Şeması



Şekil 2.7. Yenidoğan Tarama Programı ile Biotinidaz Enzim Aktivitesi taranmasının akış şeması (11)

2.9. Serum veya plazmada enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tanı yöntemleri

Biyotinidaz eksikliğinin teşhisi, serum veya plazmada biyotidinaz enzim aktivitesinin ölçülmesine dayanır (69). Bugüne kadar enzim aktivitesini ölçmek için farklı analitik yöntemler geliştirilmiştir. Serum veya plazmada enzim aktivitesi kolorimetrik ve fluorimetrik yöntemler ile ölçülebilmektedir.

Kolorimetrik yöntem biyotinidaz enzim aktivitesini doğrudan ölçen renk değişimine dayalı testlerdir. Bu yöntemde substrat olarak biyotinidil-4-aminobenzoik asid (B-PABA) kullanılmaktadır. Serum biyotinidaz enzimi bu molekülü p-aminobenzoik asit'e (PABA) hidrolize eder. P-aminobenzoik asitin N-1-naftiletillen-diamin dihidroklorid ile diazotizasyon reaksiyonuna girmesi sonucu oluşan azo boyası pembe-mor renkte görülür. Ortaya çıkan renk değişimi, spektrofotometre adı verilen bir cihaz yardımıyla ölçülür ve enzim aktivitesi miktarı belirlenir. Aktivite düzeyi renk yoğunluğuna göre hesaplanır (53). Biotinidaz eksik olduğunda veya tamamen inaktif olduğunda renk değişikliği görülmez. Kolorimetrik yöntemde biyotinidaz enzim aktivitesi, serumun mL'si başına dakikada serbest kalan p-aminobenzoatın nmol'ü olarak ifade edilir (62).

Fluorometrik testler, biyotinidaz aktivitesini floresans ölçümleriyle değerlendiren daha hassas testlerdir. Fluorimetrik yöntemde ise biyotinidazın aktivitesiyle floresans sinyal üreten bir substrat: biyotininil-6-aminokinolin (B-6AQ) molekülü kullanılır. Biyotinidaz enziminin amid bağlarına etki etmesiyle ile boya maddesi olan 6-nitrokinolin (6AQ) serbest hale gelir. Florometrik olarak ölçüm; 6AQ'nin cihazda artan intensite değerleri vermesiyle yapılmaktadır. Enzim aktivitesi arttıkça floresans sinyalin şiddeti artar (70).

2016 yılında İşeri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fluorimetrik ve spektrofotometrik yöntemle ölçülen hastaların biyotinidaz enzim aktiviteleri karşılaştırılmış, hastaların genetik sonuçlarıyla da karşılaştırılarak tanılar doğrulanmış ve çalışma sonucunda fluorimetrik yöntem %100 sensitif bulunurken, spektrofotometrik yöntem %90,5 sensitif saptanmıştır (71).

2.10. *BTD* Geni ve Biyotinidaz eksikliğinin genetik etiyolojisi

İnsan Biyotinidaz geni (*BTD*) (OMIM 609019), biyotinidaz enziminin sentezinden sorumlu olup, ilk defa Cole ve arkadaşları tarafından floresan in situ hibridizasyon kullanarak, kromozom 3p25,1 üzerinde olduğu bildirilmiştir (72). Genin en güncel (MANE Select) transkripti NM_001370658.1 transkriptidir. *BTD* geni toplam uzunluğu 543 amino asitlik proteini kodlayan dört ekzon, 3 intron ve 2 ATG başlatma kodonundan oluşmuştur (9). Ekzon 1, 2, 3 ve 4'ün boyutları sırasıyla 79 bp, 265 bp, 150 bp ve 1502 bp civarındadır ve ilgili intron bölgelerinin boyutları 12.5 kb, 6.2 kb ve 0.7 kb'dir (73). Gende iki ATG başlatma kodonu mevcuttur. Her iki başlatma kodonu da aynı okuma çerçevesindedir. Birincisi ekzon 1'de kodlanırken, diğeri olgun enzimin N-terminal metiyoninini içeren ekzon 2'de kodlanır (8). İki başlatma kodonu arasında bir intronun varlığı, farklı *BTD* transkriptlerinin dokuya özgü ekspresyon olasılığını artırarak alternatif kırılmaya izin verebilir (14).

Biyotinidaz eksikliği, *BTD* genindeki Otozomal Resesif (OR) mutasyonlardan kaynaklanan ve yetersiz biyotin metabolizmasına neden olan nadir görülen bir metabolik bozukluktur. Hastalığa neden olan mutasyonların büyük çoğunluğu homozigot veya bileşik heterozigottur. *BTD* hastalarında her türlü mutasyon bulunmuştur; Yanlış anlam, saçmalık, tek ve çoklu nükleotid delesyonları, tek ve çoklu

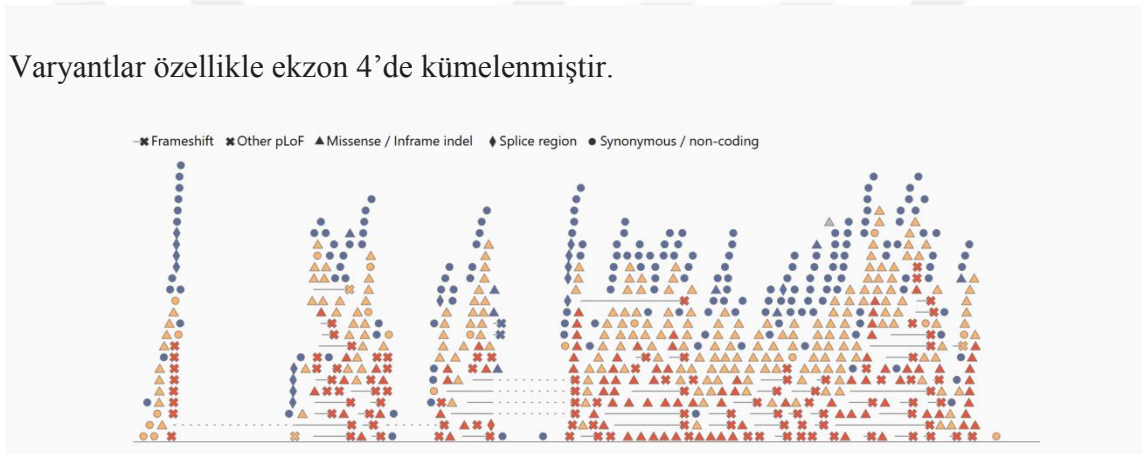
nükleotid insersiyonları, delesyon/insersiyonlar, kriptik ekleme yeri mutasyonları ve bileşik alelik mutasyonlar (74).

Bugüne kadar ClinVar, UniProt ve Franklin veritabanlarında 729 farklı varyant bildirilmiştir.

| | LOF | Missense + Inframe Indel | Non-coding | Synonymous | Total |
|--------------|-----|--------------------------|------------|------------|-------|
| ● Pathogenic | 112 | 165 | 10 | 0 | 287 |
| ● VUS | 3 | 177 | 22 | 4 | 206 |
| ● Benign | 2 | 21 | 51 | 162 | 236 |
| Total | 117 | 363 | 83 | 166 | 729 |

Şekil 2.8. ClinVar, UniProt ve Franklin veritabanlarında bildirilmiş toplam varyantlar

Varyantlar özellikle ekzon 4’de kümelenmiştir.



Şekil 2.9: ClinVar varyantları (ClinVar'ın 3 Kasım 2024 sürümünden alınmıştır)

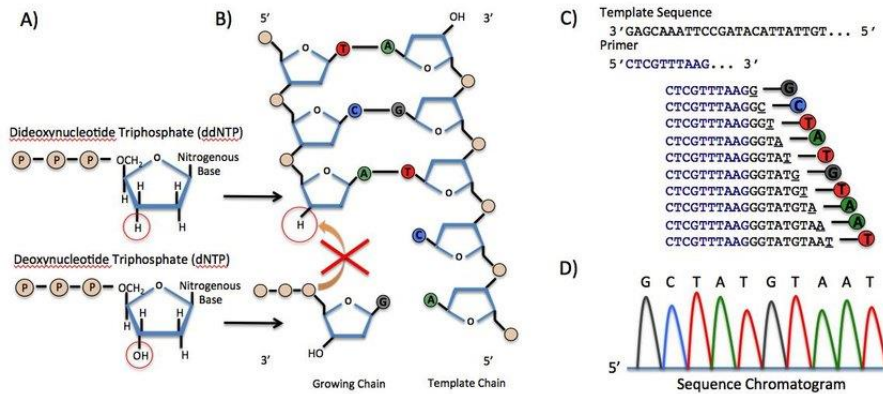
c.1270G>C (p.D424H) varyantı hem Türkiye’de hem de dünyada en sık görülen varyanttır. Diğer yaygın patojenik varyantlar arasında c.410G>A (p.R137H), c.1308A>C (p.Q436H), c.38_44delGCGGCTGinsTCC (p.C13Ffs*36), c.1431T>G (p.P477P), c.535G>A (p.V179M), c.1395C>G (p.H465Q) ve c.175C>T (p.R59C) bulunur (1). Literatüre göre p.Cys186Tyr, p.Gln456His derin biyotinidaz eksikliği ile, c.1270G>C (p.D424H) ise parsiyel biyotinidaz eksikliği ile ilişkilidir (75,76). c.1270G>C homozigot grupta ortalama BEA düzeyinin, c.1270G>C kombine heterozigot gruba ve c.1270G>C varyantı olmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (1).

2.11. Biotinidaz eksikliğinin tanısında kullanılan moleküler tanı yöntemleri

Frederick Sanger ve Alan.R.Coulson tarafından tasarlanmış, Sanger-Coulson yöntemi enzimatik olarak DNA sentezine dayanan bir zincir sonlandırma yöntemidir (77).

Bu yöntemin temel prensibi, DNA sentezi esnasında uzayan zincirin rastgele inhibisyonu ile oluşan çeşitli uzunluktaki fragmanların jel elektroforezinde yürütülerek boyutlarına göre ayrılabilmesi esasına dayanmaktadır.

Bu yöntemde DNA polimeraz enzimi tarafından substrat olarak modifikasyona uğramamış nükleotitler olan deoksi nükleozit trifosfatların (dNTP) yanısıra özel modifiye nükleotitler olan ve her biri farklı floresan boyalarla (florofor) işaretlenmiş 4 farklı di deoksi nükleozit trifosfatlar da (ddNTP) kullanılmaktadır. Bu ddNTP'lerin deoksiriboz molekülü hem 2'-hidroksil grupundan (de-oksi) hem de 3'-hidroksil grupundan (di-deoksi) yoksundur. Dolayısıyla bu ddNTP'ler DNA polimerazın spesifik zincir sonlandırıcı inhibitörleri olarak görev yaparak zincire yeni bir nükleotitin eklenmesini bloke ederler. Sanger Dizi Yönteminin Dideoksi veya Zincir Sonlandırma yöntemi olarak da bilinmesinin ana nedeni buradan kaynaklanmaktadır (78).



Şekil 2.10. Sanger dizileme yöntemi

Bu yöntem ile yaklaşık 800 baz çiftinden 1000 baz çifti uzunluğuna kadar DNA bölgesi dizilenebilmektedir (79,80).

Elektroforez tabanlı Sanger dizilemenin dezavantajı ise elektroforez ile tek seferde çok sayıda örneğin kullanılması için uygun olmadığından, bu yöntem ile sadece sınırlı sayıda dizi verisi üretilebilir (81).

Dolayısıyla Sanger dizileme yönteminde karşılaşılan bu zorluklar bilim insanlarını, kısa sürede daha fazla dizileme yapabilen, daha ucuz ve doğruluk oranı daha yüksek yeni yöntemler geliştirmeye zorladı.

2005 yılından başlayarak, Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojileri olarak bilinen bazı devrim niteliğinde yeni yöntemler geliştirildi (82).

Dizileme teknolojilerinin daha da geliştirilmesi ile çok sayıda paralel dizileme tekniği ile tek bir örnekten alınmış milyonlarca parçaya ayrılmış DNA molekülünün her bir parçasının aynı anda ve uyum içerisinde dizilenmesi (Sanger dizilemenin sınırlaması olan ‘tek seferde bir DNA parçası’ının aksine) ve aynı zamanda aynı reaksiyonda onlarca örneğin bir arada çalıştırılması gerçekleştirildi. Bu da yüksek hızlı bir sonuç elde edilerek çalışma başına elde edilen veri miktarında (dizi çıktısı), dizilenen genomların sayısında ve çeşitliliğinde artış ile megabaz başına dizileme maliyetinde dramatik düşüşe neden olarak dizileme teknolojilerini daha da ileriye taşıdı (83).

Sonuç olarak, dizileme skalası daha da genişletilerek tek tek ekzonlar veya genlerin dizilenmesi, tüm ekzon dizileme, tüm genom dizileme, tüm veya hedeflenmiş transkriptom dizileme ve metil-dizileme (genom boyunca DNA metilasyon bölgelerini tanımlamak için) uygulamalarının ortaya çıkmasına neden oldu.

YND teknolojileri, Sanger yöntemine göre her ne kadar daha avantajlı olsa da elde edilen verilerin çeşitliliği ve karmaşıklığı ve bunların raporlanabilir sonuç haline getirilmesi için biyoinformatik yazılımların doğru bir şekilde kullanılarak komplike hizalama veya birleştirme prosedürlerinin uygulanması gerekir (84).

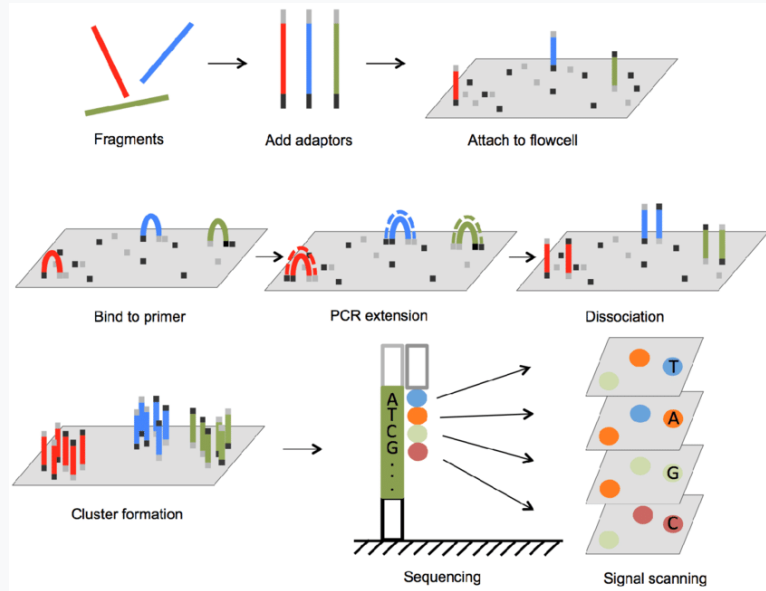
Yeni nesil dizileme yöntemlerinin biyokimyasal mekanizmaları değişkenlik gösterse de hepsi kitlesel bir dizilemenin aynı anda paralel bir şekilde gerçekleştirilmesini hedeflemektedir.

Illumina dizileme

Bu çalışmanın temeli ilk olarak 1990'lı yılların ortasında, Cambridge Üniversitesi'nde Shankar Balasubramanian ve David Klenerman tarafından atılmıştır.

Bu yöntemin temel prensibi köprü amplifikasyonu ile hedef zenginleştirilmesi yapılmış DNA fragmanlarının dizileme aşamasında substrat olarak DNA polimeraz enzimi tarafından florofor ile işaretli zincir sonlandırıcı modifiye ddNTP'ler kullanımına dayanmaktadır. Sangerden farklı olarak bu yöntemde normal (modifikasyona uğramamış) dNTP'ler kullanılmaz. DNA polimeraz DNA fragmentlerine bir seferde yalnızca bir nukleotit ekleyebilir. Bu zaman kamera tarafından renk kaydedilmek için görüntülenir ve daha sonra hem bloke edici grup hem de boya uzaklaştırılır. Böylece bir sonraki döngü başlar ve ikinci bir nukleotitin eklenmesine izin verilir.

Illumina sekanslama yöntemi, tek bir döngüde milyon bazlara varan veri sağladığı ve hata oranı Sanger gibi eski yöntemlere kıyasla oldukça düşük olduğu için genellikle organizmaların tüm genomlarının sekanslanmasında ve hastalıklarla ilişkili SNP'lerin (tek nukleotitlik değişimleri) ortaya çıkarılmasını hedefleyen GWAS (İng: "Genome Wide Association Study", Tr: "Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları") araştırmalarında kullanılır.



Şekil 2.11. Illumina dizileme

(Baum, Chloé. (2021). New approaches and concepts to study complex microbial communities)

3.HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

Çalışmamıza 2013-2023 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı ve Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi'ne (AGENTEM) yönlendirilen *BTD* geni dizi analizi çalışılmış ve klinik bilgilerine ulaşılmış 2672 hasta dahil edilmiştir.

Tüm hastaların ailelerinden, kurumsal etik kurulun (Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu) etik standartlarına ve Helsinki deklarasyonuna uygun olarak bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Bu çalışmada tüm hastaların dosyaları retrospektif taranarak, saptanan tüm mutasyonlar belirlenmiş ve fenotip genotip korelasyonu açısından tekrar değerlendirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, varyant saptanmış bireylerin aile üyelerinden yapılan (aile taraması kapsamında) hastaların *BTD* genine yönelik genetik tetkiklerinin sonuçları da restrospektif olarak değerlendirilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA İzolasyonu

Toplanan periferik kan örneklerinden, üreticinin talimatlarına göre QIAamp DNA Blood Mini Kit'i (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit Florimetre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile ölçülmüştür (ng/μL).

3.2.2. Yeni Nesil Dizileme

- Yeni nesil dizileme çalışmalarına yönelik kütüphane hazırlıklarında *BTD* genine yönelik spesifik primerleri içeren Qiaseq Targeted DNA Panels (Qiagen, Almanya) kullanılmış olup uygulamalar Çukurova Üniversitesi AGENTEM laboratuvarında yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu geliştirilen protokollere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sekanslama işlemi MiSeq ve NextSeq platformlarında (Illumina, ABD) aracılığıyla yapılmıştır.
- Öncelikle izole edilen örneklerden DNA fragmentasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir örnek için 2,5 µL Fragmentasyon tamponu ve 0,75 µL FERA solüsyonu içeren fragmentasyon miksi hazırlanarak 96 kuyucuklu plakaya her bir örnek için 3,25 µL dağıtılmıştır. Miks üzerine her örnekten 160 ng olacak şekilde (maksimum 16 µL'de) DNA örnekleri eklenmiştir. Reaksiyon hacmi 20 µL'den az olan örneklerin üzerine nükleaz içermeyen su eklenerek tüm reaksiyonlar 20 µL'ye tamamlanmıştır. Son olarak her kuyucuğa 5 µL Fragmentasyon enzim miksi de eklenerek otomatik pipet yardımıyla homojenize edilmiştir. Tüm aşamalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- Termal döngü cihazında aşağıda belirtilmiş olan program ayarlanarak plaka henüz yerleştirilmeden cihaz başlatılmış ve sıcaklık 4°C'ye ulaştığında program bekletilerek örnekler yerleştirilerek program devam ettirilmiştir.

Tablo 3.1. YND deneyleri kapsamında yapılan fragmentasyon işlemi termal döngü programı.

| Sıcaklık | Zaman | Döngü sayı |
|----------|-------|------------|
| 4°C | 1 dk | 1 |
| 32°C | 24 dk | 1 |
| 72°C | 30 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | Süresiz |

- Fragmentasyon aşaması tamamlandıktan sonra hızlıca adaptör ligasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla her örnek için 10 µL Ligasyon tamponu, 5 µL DNA ligaz ve 7,2 µL Ligasyon solüsyonu içeren ligasyon miksi hazırlanmıştır. Hazırlanan miksten 22,2 µL yeni bir 96 kuyucuklu plakaya dağıtılmış ve üzerlerine her bir örnek için spesifik ve birbirinden ayrı moleküler barkodlardan (9 bp uzunluğunda oligonükleotidler) 2,8 µL eklenmiştir. Son olarak fragmente haldeki 25 µL örnekler barkod eklenen ligasyon mikslere eklenerek pipetaj ile homojenize edilmiştir. Reaksiyonları içeren plaka, termal döngü cihazına yerleştirilerek Tablo 3.2’de verilen programda çalıştırılmıştır.

Tablo 3.2. YND deneyleri kapsamında yapılan adaptör ligasyonu işlemi termal döngü programı.

| Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 4°C | 1 dk | 1 |
| 20°C | 15 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | Süresiz |

- Adaptör ligasyonu tamamlanan örneklerin saflaştırma (yıkama) işlemi manyetik boncuk (QIAact Beads, Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda öncelikle örnekleri içeren plakanın oda sıcaklığına ulaşması sonrasında 1 dk maksimum devirde santrifüj edilmiş ve buharlaşma nedeniyle sıvı miktarı azalan örnekler tespit edilerek hacimleri nükleaz içermeyen su ile 100 µL’ye tamamlanmıştır. Örnekler üzerine önceden oda sıcaklığına getirilen ve homojenize edilmiş manyetik boncuklar 1x oranında (100 µL) eklenerek pipetaj ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Örnekler ilk olarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş sonrasında ise 10 dk manyetik stand üzerine bırakılmıştır. Tamamen berraklaşan süpernatant kısmı, manyetik boncuklara tutunmuş olan örneklere temas etmeden aspire edilmiştir. Manyetik boncuklar üzerine 200 µL %80’lik etanol eklenmiş ve boncukları hareket ettirmek amacıyla plak 4 kez 180° döndürülmüştür. Yıkama sonrası solüsyonun tamamen berraklaşması beklendikten sonra içerisindeki etanol tamamen aspire edilmiştir.

Etanol ile yıkama aşaması 2. kez tekrarlanmıştır. İkinci kez aspirasyon sonrası örnekler manyetik stand üzerinden alınarak 10 sn santrifüj edilmiş ve tekrar manyetik standda yerleştirilmiştir. Dipte kalan alkol kalıntıları da pipet ile aspire edildikten sonra boncuklar 10 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (çok fazla kurumaması için ara ara kontrol edilir). Kuruyan boncuklar manyetik standtan alınarak üzerine 52 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve nazikçe pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Bu sayede DNA örneklerinin manyetik boncuklardan ayrılması sağlanmıştır. Plaka tekrar manyetik stand üzerine yerleştirilip 5-10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra berrak elüsyon içerisinde 50 µL alınarak yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır.

- Pürifikasyonun ikinci basamağı için alınmış olan 50 µL elüsyonlar üzerine 1 x oranında (50 µL) manyetik boncuk eklenerek yıkama basamakları tekrar edilmiştir. İkinci yıkama sonunda kuruyan manyetik boncuklar üzerine 12 µL nükleaz içermeyen su eklenerek 9,4 µL elüsyonlar yeni bir 96 kuyucuklu plakaya alındı.
- Bir sonraki basamak olan hedef zenginleştirmede DNA fragmanlarının BTG genini kapsayan primerler aracılığıyla amplifikasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla öncelikle her bir örnek için 4 µL TEPCR tamponu, 0,8 µL IL-Forward primer, 0,8 µL HotStarTaq DNA Polimeraz ve son olarak 5 µL primer içeren PCR miksi hazırlanarak 96- kuyucuklu plakaya her bir örnek için 10,6 µL dağıtılmıştır. Üzerlerine 9,4 µL örnek eklenerek 20 µL total hacimli reaksiyon pipetaj ile homojenize edildi. Reaksiyonlar termal döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen programda çalıştırılmıştır.

Tablo 3.3. YND deneyleri kapsamında yapılan hedef zenginleştirme işlemi termal döngü programı.

| Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 95°C | 13 dk | 1 |
| 98°C | 2 dk | |
| 98°C | 15 sn | 8 |
| 68°C | 10 dk | |
| 72°C | 5 dk | 1 |
| 4°C | 5 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | Süresiz |

- Program sonunda örnekler nükleaz içermeyen su ile 100 µL'ye tamamlanmıştır. 1x oranında manyetik boncuk eklenerek daha önce belirtildiği şekilde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonunda DNA amplikonları, kuruyan manyetik boncuklardan 16 µL nükleaz içermeyen su ile ayrılmış ve 13,4 µL elüsyonlar temiz bir 96-kuyucuklu plakaya alınmıştır.
- Kütüphane hazırlığının gerçekleştirilmesi amacıyla her bir örnek için 4 µL 5x UPCR tamponu, 1 µL HotStarTaq DNA Polimeraz ve 1,6 µL nükleaz içermeyen su kullanılarak PZR miksi hazırlanmıştır. Hazırlanan 6,6 µL miks, üretici firma tarafından sağlanan ve her bir kuyucukta liyofilize halde evrensel moleküler barkod bulunan kuyucuklara dağıtılmıştır.

Kuyucukların üzerine hedef zenginleştirme sonucu elde edilen saf DNA amplikonlarından 13,4 µL eklenmiştir. Kuyucuklar termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve aşağıda belirtilen PZR programı çalıştırılmıştır.

Tablo 3.4. YND deneyleri kapsamında yapılan kütüphane hazırlığı işlemi termal döngü programı.

| Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 95°C | 13 dk | 1 |
| 98°C | 2 dk | |
| 98°C | 15 sn | 26 |
| 60°C | 2 dk | |
| 72°C | 5 dk | 1 |
| 4°C | 5 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | Süresiz |

Program sonunda örnekler nükleaz içermeyen su ile 100 µL'ye tamamlanmış ve 1 x oranında manyetik boncuk ile (100 µL) daha önce belirtilen şekilde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonunda DNA amplikonları, kuruyan manyetik boncuklardan 28 µL nükleaz içermeyen su ile ayrılmış ve 25 µL final elüsyonlar temiz bir 96-kuyucuklu plakaya alınmıştır.

- Saflaştırma sonrası örneklerin kalite kontrol ölçümü florometrik ölçüm cihazı kullanılarak (Qubit 4, Thermo Fischer Scientific, ABD) gerçekleştirilmiştir (ng/µL).

- Örnekler konsantrasyonları standart değere çekmek amacıyla normalize edilerek eşit miktarlarda birleştirilip örnek havuzu oluşturulmuştur. Örnek havuzu konsantrasyonu florometrik ölçüm cihazı kullanılarak (Qubit 4, Thermo Fischer Scientific, ABD) ölçülmüş ve ng cinsinden elde edilen konsantrasyon değeri nM cinsinden hesaplanmıştır. Örnek havuzu, nükleaz-içermeyen su kullanılarak 4 nM'a dilüe edilmiştir.

- MiSeq yeni nesil dizileme platformu için yükleme hazırlıkları üretici firmanın kılavuzları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Örnek havuzundaki amplikonların denatüre edilmesi amacıyla 10 µL örnek alınarak başka bir tüpte 1:1 oranında NaOH ile karıştırılmıştır. Kısa vorteks spinin ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Denatüre edilen örnek havuzundan 10 µL alınarak üzerine 990 µL hibridizasyon tamponu eklenmiş (HT1, Illumina, ABD) ve denatürasyon durdurulmuştur. Örnek havuzu yine hibridizasyon tamponu kullanılarak 600 µL yükleme hacminde uygun yükleme konsantrasyonu olacak şekilde dilüe edilmiştir. Ek olarak, 3 µL sekans primeri (QIAseq Read 1 Custom Primer, Illumina, ABD) üzerine 597 µL hibridizasyon tamponu eklenerek uygun konsantrasyonda sekans primeri hazırlanmıştır.

- Yükleme konsantrasyonundaki örnek havuzu ve sekans primeri, yükleme kartuşundaki uygun kuyulara aktarılmıştır. Yükleme çipi, yükleme kartuşu ve yıkama solüsyonları cihaza yerleştirilerek sekans başlatılmıştır.

- Sekans sonrası kalite kontroller laboratuvar içi optimize edilmiş olan kalite kontrol basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir.
- Kalite kontrol parametreleri, QIAGEN Clinical Insight (QCI) Analiz aracı ve QCI Interpret arayüzü aracılığıyla hem sıralama hem de varyant kaliteleri için kontrol edildi.

3.2.3. Dizi varyantlarının sınıflandırılması

Tespit edilmiş varyantlar Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği'nin 2015 yılında yayınlandığı rehberdeki kriterler referans alınarak Patojenik (P), Olası Patojenik (LP), Klinik Önemi Belirsiz (VUS), Benign (B), Olası Benign (LB) ve Benign (B) olarak sınıflandırıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin analizi için SPSS istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak tanımlandı.

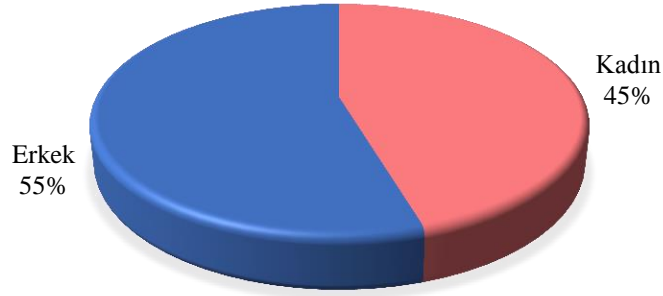
3.4. ETİK KURUL ONAYI

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan, “02.12.2022 tarihli ve 2022/128 kayıt numaralı” ve “04.10.2024 tarihli ve 2024/148 kayıt numaralı” etik kurul onayı alınmıştır.

4.BULGULAR

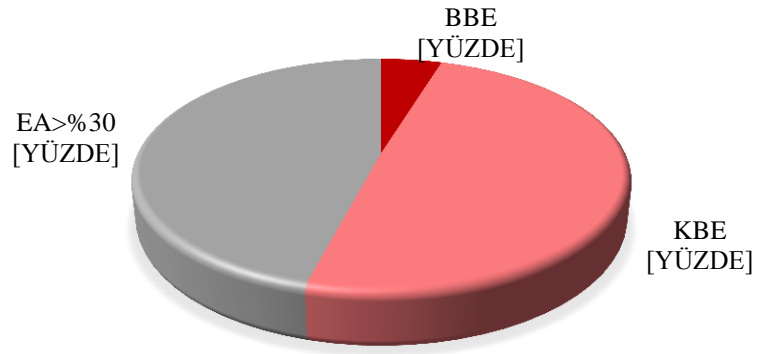
Çalışmaya toplam 2672 hasta dahil edilmiştir. Tüm hastaların genetik tetkikleri Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile çalışılarak *BTD* geninin dört ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri analiz edilmiştir. Tespit edilen varyantlar, genin NM_001370658.1 (MANE Select) olarak tanımlanan en son transkripti referans alınarak güncellenmiştir. Toplam 2105 hastanın enzim aktivitesi fluorometrik yöntemle ölçülmüştür. Bununla birlikte, çoğunluğu aile taraması ile taşıyıcılığın tespit edilmesi amacıyla yönlendirilmiş 567 hastada enzim aktivitesi çalışılmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 1212'si (%45) kadın, 1460'ı (%55) erkek hastadır (Şekil 4.1). Hastaların yaş ortalaması 17,3 ay olarak görüldü.



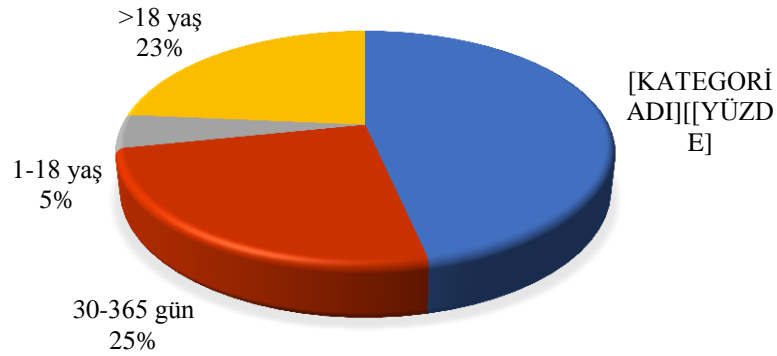
Şekil 4.1. *BTD* geni dizilenen hastaların cinsiyet dağılımı

Enzim aktivitesi çalışılmış 2105 hastanın 100'ünde (%5) enzim aktivitesi %10'un altında (Belirgin Biyotinidaz Eksikliği), 1039 (%49) hastada enzim aktivitesi %10-30 arasında (Kısmi Biyotinidaz Eksikliği), 966 (%46) hastada ise enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü (Şekil 4.2).

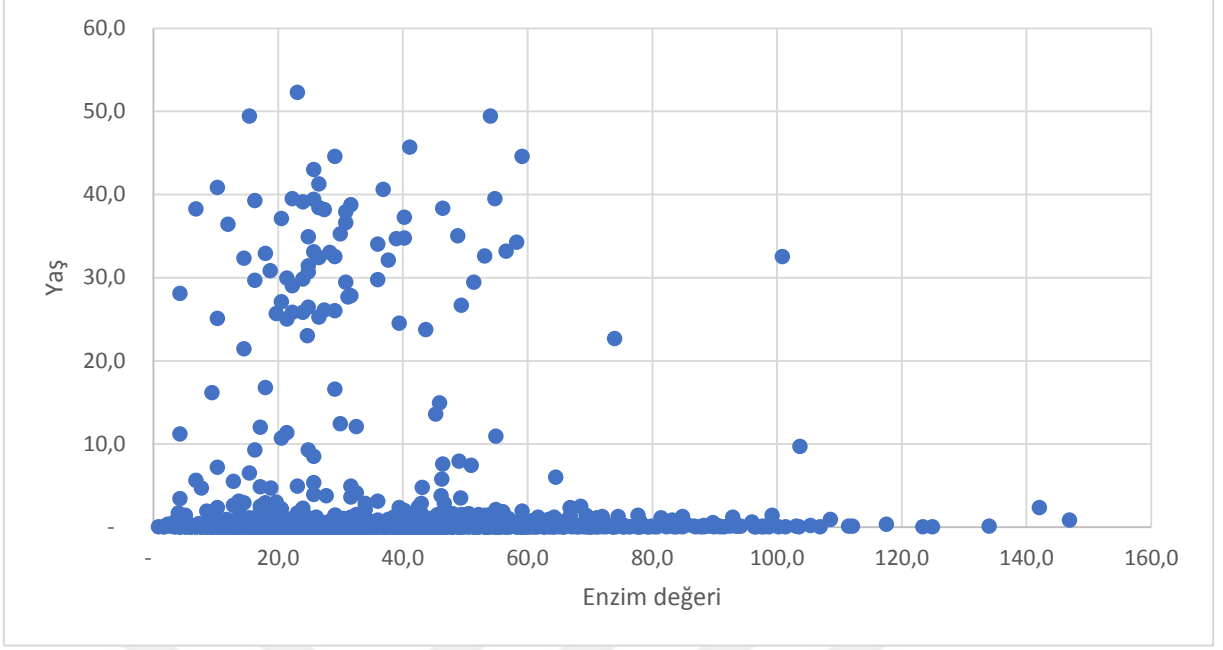


Şekil 4.2. Hastaların biyotinidaz enzim düzeyine göre dağılımı

Hastaların çoğu pediatrik ve Yenidoğan Tarama Programı ile yönlendirilmiş hastalardı. 1245 (%47) hasta 30 günden küçük, 672 (%25) hasta 30-365 gün arasında, 125 (%5) hasta 1-18 yaş arasında ve 630 (%23) hasta 18 yaşından büyüktü (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Hastaların yaşa göre dağılımı



Şekil 4.4. Hastaların yaşa ve enzim aktivitesine göre dağılımı

Hastaların 2307'sinde (%86,3) mutasyon tespit edildi. 365 (%13,7) hastada ise herhangi bir varyant görülmedi. Mutasyon tespit edilmiş hastalarda toplam 83 farklı varyant görüldü. Bu varyantların listesi Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tespit edilmiş tüm varyantların özellikleri.

| Varyantlar | Lokalizasyon | Protein kodu | Mutasyon tipi | dbSNP | ACMG | REVEL SKORU (0-1) | Alel sayı |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------------------|-------------------|-----------|
| c.1270G>C | ekzon 4 | p.D424H | Missense | rs13078881 | Patojenik | 0.769 | 1983 alel |
| c.410G>A | ekzon 4 | p.R137H | Missense | rs146015592 | Patojenik | 0.589 | 287 alel |
| c.1535C>T | ekzon 4 | p.T512M | Missense | rs104893688 | Patojenik | 0.908 | 210 alel |
| c.40_44delGGCTGinsC | ekzon 2 | p.G14Lfs*35 | Frameshift | | Olası Patojenik | - | 134 alel |
| c.38G>T | ekzon 2 | p.C13F | Missense | rs141131444 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.345 | 123 alel |
| c.1308A>C | ekzon 4 | p.Q436H | Missense | rs80338685 | Patojenik | 0.773 | 73 alel |
| c.175C>T | ekzon 2 | p.R59C | Missense | rs104893687 | Patojenik | 0.8 | 59 alel |
| c.1193G>C | ekzon 4 | p.C398S | Missense | rs397514410 | Olası Patojenik | 0.83 | 50 alel |
| c.497G>A | ekzon 4 | p.C166Y | Missense | rs397514369 | Patojenik | 0.887 | 46 alel |
| c.1264delG | ekzon 4 | p.V422Sfs*59 | Frameshift | rs1057517362 | Patojenik | - | 46 alel |
| c.38_44delGCGGCTGinsTCC | ekzon 2 | p.C13Ffs*36 | Frameshift | rs80338684 | Patojenik | - | 38 alel |
| c.908A>G | ekzon 4 | p.H303R | Missense | rs397507176 | Olası Patojenik | 0.817 | 20 alel |
| c.565C>T | ekzon 4 | p.R189C | Missense | rs369102875 | Olası Patojenik | 0.75 | 20 alel |
| c.1301A>G | ekzon 4 | p.Y434C | Missense | rs397514345 | Olası Patojenik | 0.87 | 16 alel |
| c.1379G>A | ekzon 4 | p.G460E | Missense | rs558477960 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.216 | 16 alel |
| c.1429C>T | ekzon 4 | p.P477S | Missense | rs138818907 | Patojenik | 0.895 | 15 alel |

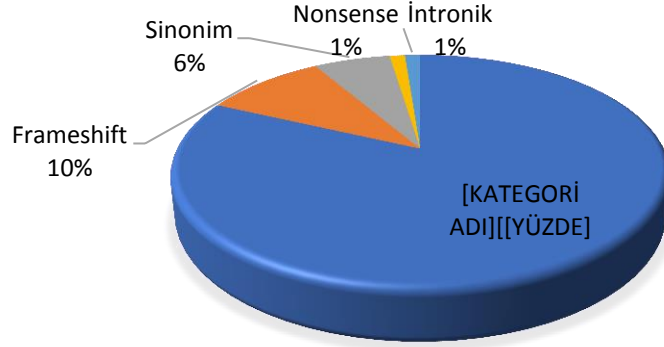
| | | | | | | | |
|---------------------------|---------|--------------|------------|--------------|-------------------------|-------|---------|
| c.197T>G | ekzon 2 | p.M66R | Missense | rs587783002 | Patojenik | 0.955 | 15 alel |
| c.111T>G | ekzon 2 | p.Y37* | Nonsense | rs397514339 | Patojenik | - | 14 alel |
| c.581A>G | ekzon 4 | p.N194S | Missense | rs397514377 | Olası Patojenik | 0.856 | 14 alel |
| c.73G>A | ekzon 2 | p.G25R | Missense | rs34885143 | Benign | 0.427 | 13 alel |
| c.451G>A | ekzon 4 | p.A151T | Missense | rs13073139 | Patojenik | 0.78 | 10 alel |
| c.1046C>T | ekzon 4 | p.P349L | Missense | rs397514400 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.486 | 9 alel |
| c.1273G>A | ekzon 4 | p.G425R | Missense | rs397514417 | Olası Patojenik | 0.894 | 9 alel |
| c.44G>T | ekzon 2 | p.C15F | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.323 | 9 alel |
| c.1280A>G | ekzon 4 | p.H427R | Missense | | Olası Patojenik | 0.867 | 8 alel |
| c.695A>G | ekzon 4 | p.D232G | Missense | rs28934601 | Patojenik | 0,541 | 7 alel |
| c.1493A>G | ekzon 4 | p.H498R | Missense | rs1366159937 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.298 | 4 alel |
| c.1035G>T | ekzon 4 | p.L345F | Missense | rs768786956 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.166 | 4 alel |
| c.581A>C | ekzon 4 | p.N194T | Missense | | Olası Patojenik | 0.832 | 4 alel |
| c.218A>G | ekzon 2 | p.Y73C | Missense | rs397514348 | Patojenik | 0.9 | 4 alel |
| c.1350dupC | ekzon 4 | p.C451Lfs*13 | Frameshift | rs886041559 | Patojenik | - | 3 alel |
| c.1253A>G | ekzon 4 | p.Y418C | Missense | rs397514415 | Patojenik | 0.931 | 3 alel |
| c.961C>G | ekzon 4 | p.P321A | Missense | rs1307539855 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.343 | 3 alel |
| c.952G>A (YENİ) | ekzon 4 | p.A318T | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.299 | 3 alel |

| | | | | | | | |
|----------------------------|---------|--------------|------------|--------------|-------------------------|-------|--------|
| c.566G>A | ekzon 4 | p.R189H | Missense | rs398123139 | Patojenik | 0.84 | 3 alel |
| c.333delC | ekzon 3 | p.F111Lfs*28 | Frameshift | rs397514356 | Patojenik | - | 3 alel |
| c.124G>A | ekzon 2 | p.V42M | Missense | rs397507170 | Patojenik | 0.804 | 3 alel |
| c.1553G>A | ekzon 4 | p.R518H | Missense | rs397514429 | Patojenik | 0.958 | 2 alel |
| c.967G>C | ekzon 4 | p.G323R | Missense | rs774003531 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.213 | 2 alel |
| c.1013A>G | ekzon 4 | p.H338R | Missense | rs1379845261 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.137 | 2 alel |
| c.1147T>G | ekzon 4 | p.F383V | Missense | rs104893686 | Olası Patojenik | 0.881 | 2 alel |
| c.1411A>G | ekzon 4 | p.S471G | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.261 | 2 alel |
| c.1255G>T (YENİ) | ekzon 4 | p.A419S | Missense | | Olası Patojenik | 0.597 | 2alel |
| c.820A>G | ekzon 4 | p.I274V | Missense | rs35976361 | Benign | 0.317 | 2 alel |
| c.535G>A | ekzon 4 | p.V179M | Missense | rs397514375 | Patojenik | 0.805 | 2 alel |
| c.585C>T | ekzon 4 | p.L195L | Sinonim | rs145388314 | Benign | - | 2 alel |
| c.382C>T | ekzon 3 | p.R128C | Missense | rs137877018 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.49 | 2 alel |
| c.297C>G (YENİ) | ekzon 3 | p.N99K | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.458 | 2 alel |
| c.281G>T | ekzon 3 | p.G94V | Missense | rs375712490 | Patojenik | 0.827 | 2 alel |
| c.201C>T | ekzon 2 | p.N67N | Sinonim | rs147057169 | Benign | - | 2 alel |
| c.571C>T | ekzon 4 | p.R191C | Missense | rs372844636 | Patojenik | 0.874 | 1 alel |
| c.1042G>A | ekzon 4 | p.D348N | Missense | rs769903360 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.19 | 1 alel |

| | | | | | | | |
|----------------------------|---------|--------------|------------|--------------------------|-------------------------|-------|--------|
| c.1015A>G (YENİ) | ekzon 4 | p.S339G | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.16 | 1 alel |
| c.1226A>G (YENİ) | ekzon 4 | p.E409G | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.244 | 1 alel |
| c.1375A>G (YENİ) | ekzon 4 | p.T459A | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.112 | 1 alel |
| c.1309G>A | ekzon 4 | p.V437M | Missense | rs146600671 | Olası Patojenik | 0.696 | 1 alel |
| c.142_145dup | ekzon 2 | p.L49Hfs*24 | Frameshift | rs1205964567 | Patojenik | - | 1 alel |
| c.1421A>G | ekzon 4 | p.Y474C | Missense | rs750598655 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.482 | 1 alel |
| c.1536G>A | ekzon 4 | p.T512T | Sinonim | rs774052068 | Olası Benign | - | 1 alel |
| c.1559A>G | ekzon 4 | p.Y520C | Missense | rs397514431 | Patojenik | 0.96 | 1 alel |
| c.158C>T | ekzon 2 | p.P53L | Missense | rs2065326097 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.743 | 1 alel |
| c.113A>G | ekzon 2 | p.Y38C | Missense | Variation ID: 2050859 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.689 | 1 alel |
| c.202C>G | ekzon 2 | p.Q68E | Missense | rs151071780 | Benign | 0.24 | 1 alel |
| c.284T>G (YENİ) | ekzon 3 | p.I95S | Missense | | Olası Patojenik | 0.884 | 1 alel |
| c.291A>G | ekzon 3 | p.G97G | Sinonim | Variation ID: 2697667 | Olası Benign | - | 1 alel |
| c.337C>A (YENİ) | ekzon 3 | p.P113T | Missense | | Olası Patojenik | 0.846 | 1 alel |
| c.368G>T | ekzon 3 | p.C123F | Missense | | Olası Patojenik | 0.979 | 1 alel |
| c.373del (YENİ) | ekzon 3 | p.E125Sfs*14 | Frameshift | | Olası Patojenik | - | 1 alel |
| c.481A>G | ekzon 4 | p.S161G | Missense | rs541012569 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.175 | 1 alel |

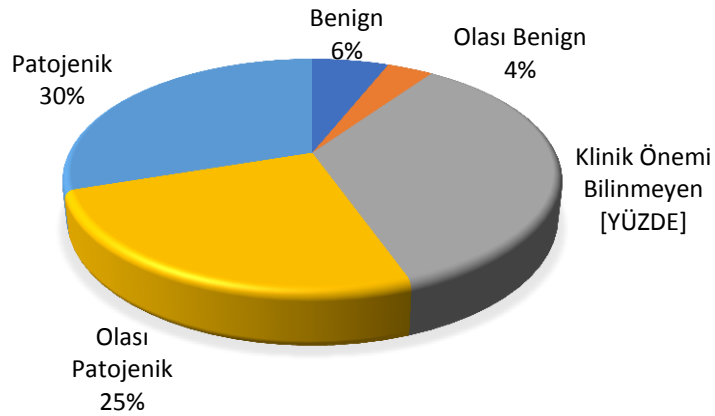
| | | | | | | | |
|----------------------------|----------|-------------|------------|-------------|-------------------------|-------|--------|
| c.545A>T | ekzon 4 | p.N182I | Missense | rs397514376 | Olası Patojenik | 0.317 | 1 alel |
| c.572G>A | ekzon 4 | p.R191H | Missense | rs112195009 | Olası Patojenik | 0.517 | 1 alel |
| c.596C>T (YENİ) | ekzon 4 | p.A199V | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.322 | 1 alel |
| c.682_686del (YENİ) | ekzon 4 | p.I228Vfs*3 | Frameshift | | Olası Patojenik | - | 1 alel |
| c.868G>A | ekzon 4 | p.G290R | Missense | | Olası Patojenik | 0.909 | 1 alel |
| c.832G>A (YENİ) | ekzon 4 | p.A278T | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.75 | 1 alel |
| c.899T>G (YENİ) | ekzon 4 | p.F300C | Missense | | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.465 | 1 alel |
| c.39C>T | ekzon 2 | p.C13C | Sinonim | rs201564216 | Olası Benign | - | 1 alel |
| c.1001C>T | ekzon 4 | p.T334M | Missense | rs535651486 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.259 | 1 alel |
| c.1225G>A | ekzon 4 | p.E409K | Missense | rs770633850 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.262 | 1 alel |
| c.1376C>T | ekzon 4 | p.T459M | Missense | rs142249642 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.147 | 1 alel |
| c.-16-5418A>C | intron 1 | | İntron | | Klinik Önemi Bilinmeyen | - | 1 alel |
| c.216C>G | ekzon 2 | p.I72M | Missense | rs748688625 | Klinik Önemi Bilinmeyen | 0.47 | 1 alel |
| c.1567G>C | ekzon 4 | p.D523H | Missense | rs397514432 | Olası Patojenik | 0.891 | 1 alel |

Hastalarda en sık missense (yanlış anlamlı) varyantlar tespit edildi. Saptanan 83 varyantın 68'i (%82) missense, 8 (%10) varyant frameshift (çerçeve kayması), 5 (%6) varyant sinonim (sessiz), 1 (%1) varyant nonsense (anlamsız), 1 (%1) varyant intronik olarak sınıflandırıldı (Şekil 4.5).



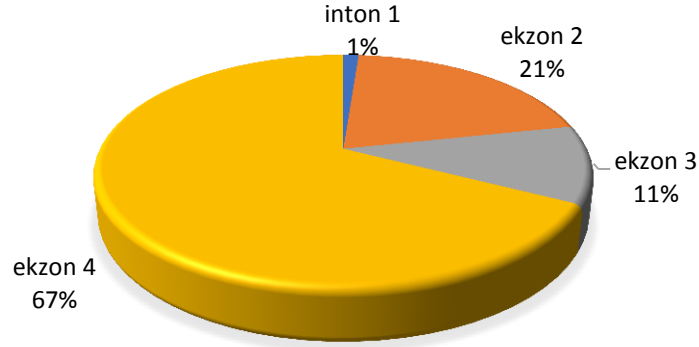
Şekil 4.5. Mutasyon tiplerinin dağılımı

Tespit edilmiş varyantlar ACMG kriterlerine göre değerlendirildiğinde 5'i (%6) Benign, 3'ü (%4) Olası Benign, 29'u (%35) Klinik Önemi Bilinmeyen, 21'i (%25) Olası Patojenik ve 25'i (%30) Patojenik olmak üzere sınıflandırıldı (Şekil 4.6).



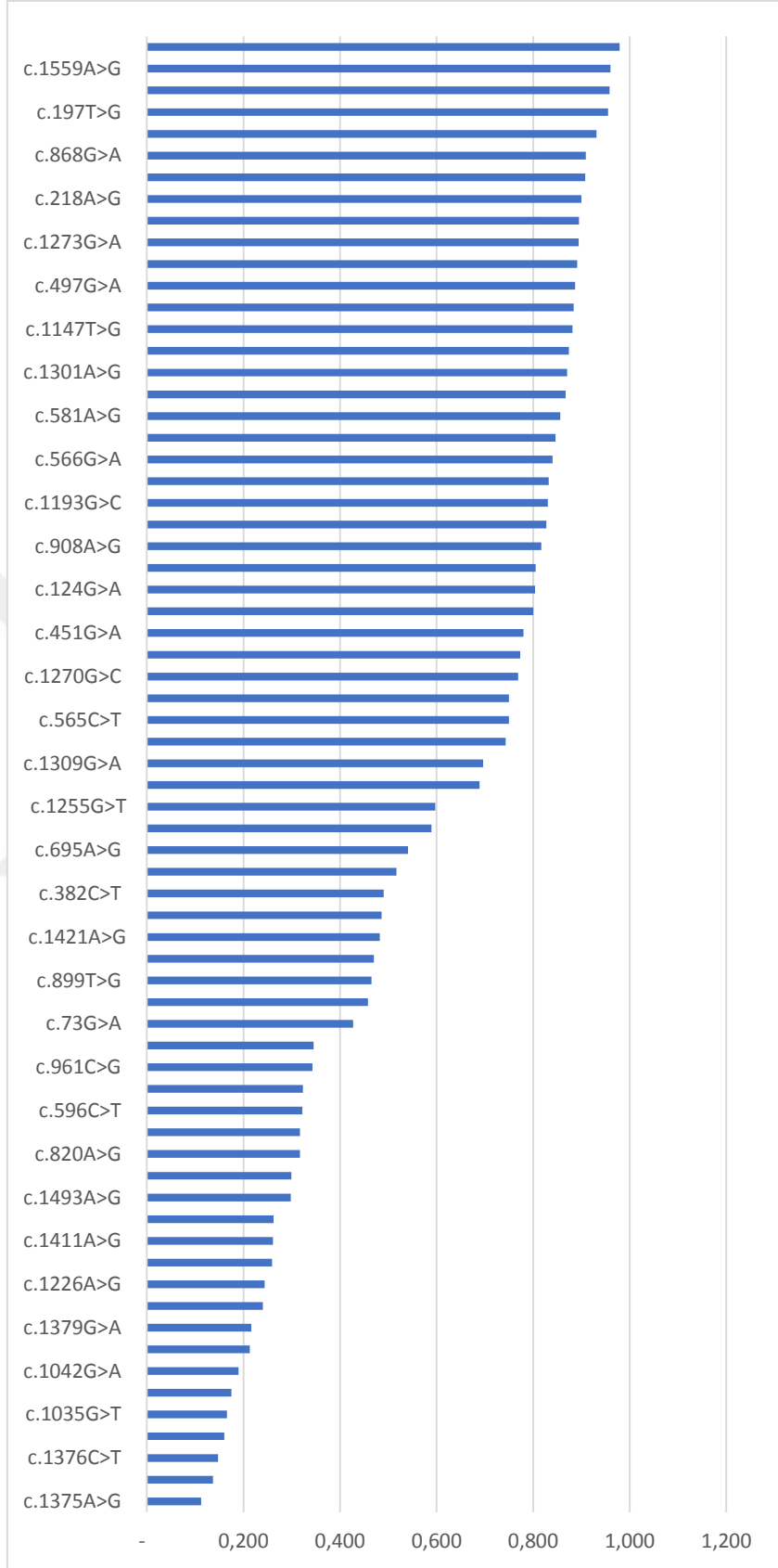
Şekil 4.6. Varyantların ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması

Tespit edilmiş varyantlar yerleştiği ekzonların lokalizasyonuna göre değerlendirildiğinde 17 (%21) varyantın ekzon 2’de, 9 (%11) varyantın ekzon 3’te, 56 (%67) varyantın ekzon 4’te, 1 (%1) varyantın ise intron 1’de yerleştiği görüldü (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. Varyantların ekzon lokalizasyonuna göre dağılımı

Tespit edilmiş 68 missense varyant REVEL skoruna göre değerlendirildiğinde REVEL skoru 0,75’in üzerinde olan 32, 0,94’ün üzerinde olan 4 varyant görüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Varyantların REVEL skoruna göre dağılımı

Bu çalışmada hastalarda en sık tespit edilmiş genotipler 709 (%27) hastada heterozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 479 (%18) hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 163 (%6) hastada heterozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu, 143 (%5) hastada heterozigot c.1535C>T (p.T512M) mutasyonu, 101 (%3.8) hastada c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35)/c.38G>T (p.C13F) birleşik heterozigot mutasyonu oldu (Tablo: 4.2).

Tablo 4.2. En sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı.

| Zigosite | Mutasyon | Hasta sayısı | Sıklığı | Ortalama enzim aktivitesi |
|-----------------------------|---|--------------|---------|---------------------------|
| Heterozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 709 | %27 | %37.7 |
| Homozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 479 | %18 | %27.9 |
| Heterozigot | c.410G>A (p.R137H) | 163 | %6 | %30.4 |
| Heterozigot | c.1535C>T (p.T512M) | 143 | %5 | %30.2 |
| Her iki varyant Heterozigot | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35)/c.38G>T (p.C13F) | 101 | %3.8 | %27.2 |

Tespit edilmiş varyantlar alel frekanslarına göre değerlendirildiğinde alel frekansı en yüksek olan varyantlar c.1270G>C (p.D424H) (1983 alel), c.410G>A (p.R137H) (287 alel), c.1535C>T (p.T512M) (210 alel), c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35) (134 alel) ve c.38G>T (p.C13F) (123 alel) varyantları oldu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. En sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları.

| Varyantlar | Hasta sayısı | Alel sayısı | Alel frekansı | Ekzon numarası |
|-----------------------------------|--------------|-------------|---------------|----------------|
| c.1270G>C (p.D424H) | 1495 | 1983 | %37 | Ekzon 4 |
| c.410G>A (p.R137H) | 264 | 287 | %5,4 | Ekzon 4 |
| c.1535C>T (p.T512M) | 201 | 210 | %3,9 | Ekzon 4 |
| c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35) | 133 | 134 | %2,5 | Ekzon 2 |
| c.38G>T (p.C13F) | 122 | 123 | %2,3 | Ekzon 2 |

Bu çalışmada en sık tespit edilen varyant *BTD* geninin 4. ekzonunda yerleşen c.1270G>C (p.D424H) varyantı oldu (1983 alel). Bu dizi değişikliği, asidik ve polar olan aspartik asidi, *BTD* proteininin 424.kodonunda bazik ve polar olan histidin ile değiştirir (p.Asp424His).

c.1270G>C (p.D424H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı incelendi (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. c.1270G>C (p.D424H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon yükü | Mutasyon | Hasta Sayı | Ortalama enzim aktivitesi |
|--|--|---------------|---------------------------|
| 1 varyant | HOMOZİGOT c.1270G>C (p.D424H) | 479 | %27,9 |
| | HETEROZİGOT c.1270G>C (p.D424H) | 709 | %37,7 |
| | c.1270G>C (p.D424H) varyantı içermeyen HOMOZİGOT | 61 | %17,5 |
| | c.1270G>C (p.D424H) varyantı içermeyen HETEROZİGOT | 599 | %30,9 |
| 2 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HOMOZİGOT c.1270G>C (p.D424H) | 9 | %12,3 |
| | HETEROZİGOT c.1270G>C (p.D424H) | 281 | %24,1 |
| | c.1270G>C (p.D424H) varyantı içermeyen | 148 | %25,2 |
| 3 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HETEROZİGOT c.1270G>C (p.D424H) | 17 | %15,6 |
| | c.1270G>C (p.D424H) varyantı içermeyen | 4 (hepsi BBE) | %4,9 |
| Hiç mutasyon tespit edilmemiş hastalar | - | 365 | %52,2 |

Tablo 4.4'deki veriler üzerine 2 karşılaştırma yapıldı:

- 1) Heterozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi c.1270G>C (p.D424H) varyantı dışında diğer varyantlara göre heterozigot tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Heterozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer heterozigot varyant taşıyan hastalardan daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

- 2) Homozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi diğer homozigot ve birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarla karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Homozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer homozigot ve birleşik heterozigot gruplara kıyasla daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarda c.1270G>C (p.D424H) varyantı hastaların tümünde (n=17) c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) ve c.38G>T (p.C13F) varyantlarıyla birlikte görüldü (Tablo 4.5). Bu hastaların 11'inde KBE, 3 hastada BBE, 2 hastada ise EA>%30 saptanmıştır (1 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır).

Tablo 4.5. Alellerinden birinde c.1270G>C (p.D424H) varyantı olan üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastaların dağılımı.

| Alel I | Zigosite | Alel II | Zigosite | Alel III | Zigosite | Hasta sayısı | Enzim düzeyi |
|---------------------|----------|----------------------------------|----------|------------------|----------|--------------|--------------|
| c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | 11 | KBE |
| c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | 3 | BBE |
| c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | 2 | EA>%30 |

Bu çalışmada en sık tespit edilen ikinci varyant *BTD* geninin 4.ekzonunda yerleşen c.410G>A (p.R137H) varyantı oldu (287 alel). Bu dizi değişikliği, *BTD* proteininin 137. kodonunda bazik ve polar arjinini, bazik ve polar olan histidin ile değiştirir (p.Arg137His).

c.410G>A (p.R137H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı incelendi (Tablo 4.6)

Tablo 4.6. c.410G>A (p.R137H) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon yükü | Mutasyon | Hasta sayısı | Ortalama enzim aktivitesi |
|--|---|--------------|---------------------------|
| 1 varyant | HOMOZİGOT c.410G>A (p.R137H) | 23 | %12,4 |
| | HETEROZİGOT c.410G>A (p.R137H) | 163 | %30,4 |
| | c.410G>A (p.R137H) varyantı içermeyen HOMOZİGOT | 517 | %27,4 |
| | c.410G>A (p.R137H) varyantı içermeyen HETEROZİGOT | 1145 | %34,8 |
| 2 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HETEROZİGOT c.410G>A (p.R137H) | 77 | %24,0 |
| | c.410G>A (p.R137H) varyantı içermeyen | 361 | %24,4 |
| 3 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HETEROZİGOT c.410G>A (p.R137H) | 1 | %4,3 |
| | c.410G>A (p.R137H) varyantı içermeyen | 20 | %13,9 |
| Hiç mutasyon tespit edilmemiş hastalar | - | 365 | %52,2 |

Tablo 4.6'daki veriler üzerine 2 karşılaştırma yapıldı:

- 1) Heterozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi c.410G>A (p.R137H) varyantı dışında diğer varyantlara göre heterozigot tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Heterozigot c.410G>A (p.R137H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer heterozigot varyant taşıyan hastalardan daha düşüktü. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

- 2) Homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi diğer homozigot ve birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarla karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer homozigot ve birleşik heterozigot gruplara göre daha düşüktü. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Bu çalışmada en sık tespit edilen üçüncü varyant *BTD* geninin 4.ekzonunda yerleşen c.1535C>T (p.T512M) varyantı oldu (210 alel). Bu dizi değişikliği, nötr ve polar olan treonini, *BTD* proteininin 512. kodonunda nötr ve polar olmayan metiyonin ile değiştirir (p.Thr512Met).

c.1535C>T (p.T512M) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı incelendi (Tablo 4.7)

Tablo 4.7. c.1535C>T (p.T512M) varyantının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon yükü | Zigosite | Hasta Sayı | Ortalama enzim aktivitesi |
|--|--|------------|---------------------------|
| 1 varyant | HOMOZİGOT c.1535C>T (p.T512M) | 9 | %12,0 |
| | HETEROZİGOT c.1535C>T (p.T512M) | 143 | %30,2 |
| | c.1535C>T (p.T512M) varyantı içermeyen HOMOZİGOT | 531 | %27,0 |
| | c.1535C>T (p.T512M) varyantı içermeyen HETEROZİGOT | 1165 | %34,8 |
| 2 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HETEROZİGOT c.1535C>T (p.T512M) | 48 | %21,2 |
| | c.1535C>T (p.T512M) varyantı içermeyen | 390 | %24,7 |
| 3 varyant için birleşik heterozigot mutasyon | HETEROZİGOT c.1535C>T (p.T512M) | 1 | %4,3 |
| | c.1535C>T (p.T512M) varyantı içermeyen | 20 | %13,9 |
| Hiç mutasyon tespit edilmemiş hastalar | | 365 | %52,2 |

Tablo 4.7'deki veriler üzerine 2 karşılaştırma yapıldı:

- 1) Heterozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi c.1535C>T (p.T512M) varyantı dışında diğer varyantlar açısından heterozigot tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Heterozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer heterozigot varyant taşıyan hastalardan daha düşüktü. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

- 2) Homozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi diğer homozigot ve birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarla karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Homozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer homozigot ve birleşik heterozigot gruplara göre daha düşüktü. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

- 1) Ayrıca heterozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi heterozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Heterozigot c.410G>A (p.R137H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi ile heterozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

- 2) Homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesi homozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Sonuçların yorumlanması: Homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi ile homozigot c.1535C>T (p.T512M) varyantı tespit edilmiş hastaların ortalama enzim aktivitesi arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

10 hastada saptanmış c.451G>A (p.A151T) varyantı tüm hastalarda c.1270G>C (p.D424H) varyantı ile (1 hastada homozigot, 9 hastada heterozigot) birleşik heterozigot durumda görüldü (Tablo 4.8).

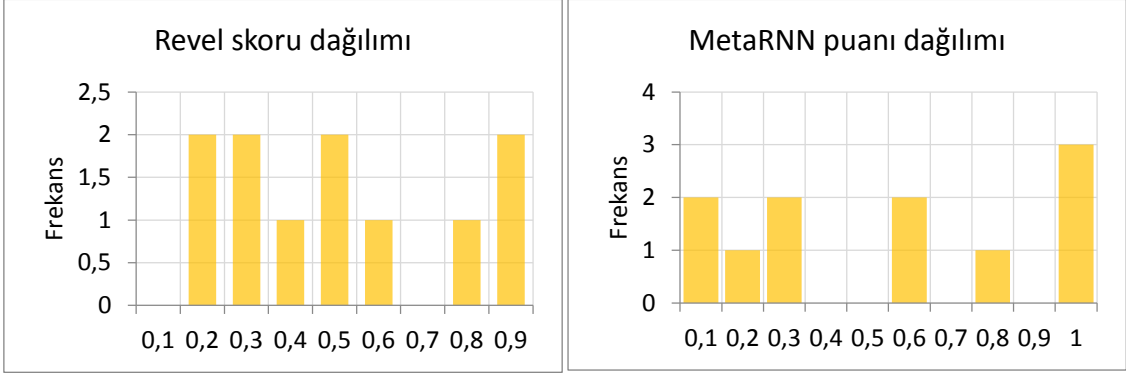
Tablo 4.8. c.451G>A (p.A151T) varyantının hastalar arasında dağılımı.

| Allel I | Zigosite | Allel II | Zigosite | Hasta sayısı | Enzim düzeyi |
|--------------------|----------|---------------------|----------|--------------|--|
| c.451G>A (p.A151T) | HET | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | 1 | KBE |
| c.451G>A (p.A151T) | HET | c.1270G>C (p.D424H) | HET | 9 | 6 hasta KBE/ 1 hasta BBE/ 1 hasta EA>%30/ 1 hastada EA çalışılmamış |

Hastalarda bildiğimiz kadarıyla literatürde bildirilmemiş ve veritabanlarında tanımlanmamış 14 yeni varyant tespit edildi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Yeni varyantların dağılımı.

| Nukleotid değişikliği | Aminoasit değişikliği | Mutasyon tipi | ACMG | Allel sayısı | REVEL Skoru | MetaRNN puanı |
|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------------------|--------------|-------------|---------------|
| c.952G>A | p.A318T | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 3 | 0.299 | 0.1873 |
| c.297C>G | p.N99K | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 2 | 0.458 | 0.5471 |
| c.1255G>T | p.A419S | Missense | OLASI PATOJENİK | 2 | 0.597 | 0.7619 |
| c.-16-5418A>C | | İntronik | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | | |
| c.284T>G | p.I95S | Missense | OLASI PATOJENİK | 1 | 0.884 | 0.9305 |
| c.337C>A | p.P113T | Missense | OLASI PATOJENİK | 1 | 0.846 | 0.9829 |
| c.373del | p.E125Sfs*14 | Frameshift | OLASI PATOJENİK | 1 | | |
| c.596C>T | p.A199V | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.322 | 0.2418 |
| c.682_686del | p.I228Vfs*3 | Frameshift | OLASI PATOJENİK | 1 | | |
| c.832G>A | p.A278T | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.75 | 0.9179 |
| c.899T>G | p.F300C | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.465 | 0.5143 |
| c.1015A>G | p.S339G | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.16 | 0.05729 |
| c.1226A>G | p.E409G | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.244 | 0.2066 |
| c.1375A>G | p.T459A | Missense | KLİNİK ÖNEMİ BİLİNMEYEN | 1 | 0.112 | 0.08217 |



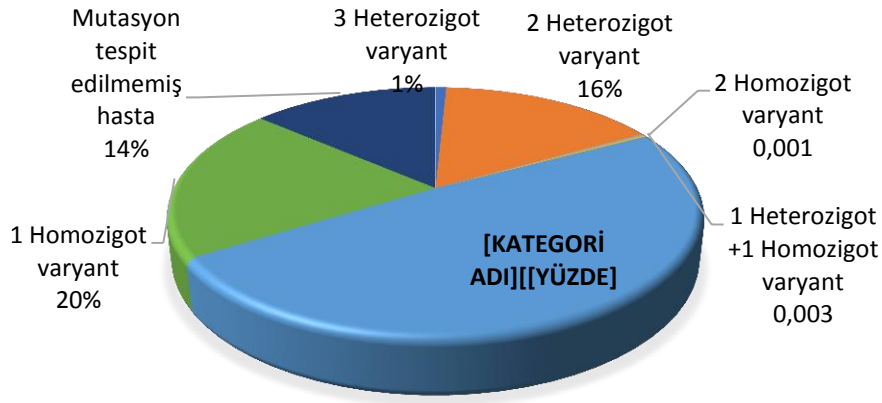
Şekil 4.9. (Yeni) Missense mutasyonlarda REVEL ve MetaRNN puanlarının histogramları

Bu grafikler, missense mutasyonlar arasında REVEL ve MetaRNN puanlarının hem düşük hem de yüksek değerlerde görülebildiğini ve puanların geniş bir dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, mutasyonların patojenik olma potansiyellerinin oldukça değişken olduğunu ve bazı mutasyonların klinik açıdan daha fazla önem arz edebileceğini göstermektedir.

2672 hastanın klinik dosyasının retrospektif olarak taranması ve mutasyon yüküne göre dağılımı incelendiğinde Tablo 4.11'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4.10. Tüm hastaların mutasyon yüküne göre dağılımı.

| Mutasyon | Hasta sayısı | |
|--|--------------|-------|
| Bir varyant tespit edilmiş hastalar | 1848 hasta | |
| Heterozigot | 1308 hasta | %34,2 |
| Homozigot | 540 hasta | %26,7 |
| İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalar | 438 hasta | |
| Heterozigot+Heterozigot | 427 hasta | %24,4 |
| Heterozigot+Homozigot | 7 hasta | %16,4 |
| Homozigot + Homozigot | 4 hasta | %15,5 |
| Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalar | 21 hasta | |
| Heterozigot+Heterozigot+Heterozigot | 21 hasta | %13,4 |
| Yok | 365 hasta | %52,2 |



Şekil 4.10. Toplam hastaların mutasyon yüküne göre dağılımı

Hastaların mutasyon yükü ve enzim aktivitesine göre dağılımı incelendiğinde ise aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

❖ 1848 hastada en az bir varyant tespit edildi (Tablo 4.11).

- Hastaların 1308'sinde heterozigot mutasyon görüldü. Bu hastaların 9'unda belirgin biyotinidaz eksikliği, 432 hastada kısmi biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. 477 hastada biyotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. 390 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.
- Hastaların 540'ında homozigot mutasyon görüldü. Bu hastaların 39'unda belirgin biyotinidaz eksikliği, 321 hastada kısmi biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. 157 hastada biyotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. 23 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.

Tablo 4.11. Bir varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı.

| 1 varyant tespit edilmiş 1848 hasta | |
|-------------------------------------|------------|
| Heterozigot mutasyon | 1308 hasta |
| BBE | 9 hasta |
| KBE | 432 hasta |
| EA>%30 | 477 hasta |
| EA çalışmamış. | 390 hasta |
| Homozigot mutasyon | 540 hasta |
| BBE | 39 hasta |
| KBE | 321 hasta |
| EA>%30 | 157 hasta |
| EA çalışmamış. | 23 hasta |

- ❖ 438 hastada iki varyant için birleşik heterozigotluk saptandı (Tablo 4.12).
- Hastalardan 427'sinde her iki varyant heterozigot olarak görüldü. Bu hastaların 41'inde belirgin biyotinidaz eksikliği, 242 hastada kısmi biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. 104 hastada biyotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. 40 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.
 - İki varyant için birleşik heterozigotluk saptanmış 7 hastada, varyantlardan biri heterozigot biri homozigot olarak görüldü. Bu hastaların 1'inde belirgin biyotinidaz eksikliği, 3 hastada kısmi biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. 3 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.
 - İki varyant için birleşik heterozigotluk saptanmış 4 hastada her iki varyant homozigot olarak görüldü. Bu hastaların 3'ünde belirgin biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. 1 hastada biyotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü.

Tablo 4.12. İki varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı.

| 2 varyant tespit edilmiş 438 hasta | |
|------------------------------------|-----------|
| Heterozigot+Heterozigot | 427 hasta |
| BBE | 41 hasta |
| KBE | 242 hasta |
| EA>%30 | 104 hasta |
| EA çalışılmamış. | 40 hasta |
| Heterozigot+Homozigot | 7 hasta |
| BBE | 1 hasta |
| KBE | 3 hasta |
| EA>%30 | - |
| EA çalışılmamış. | 3 hasta |
| Homozigot +Homozigot | 4 hasta |
| BBE | 3 hasta |
| KBE | - |
| EA>%30 | 1 hasta |
| EA çalışılmamış. | - |

❖ 21 hastada üç varyant için birleşik heterozigotluk tespit edildi (Tablo 4.13).

- Bu hastaların 7'sinde Belirgin Biotinidaz Eksikliği, 11 hastada kısmi biotinidaz eksikliği saptanmıştır. 2 hastada biotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. 1 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.

Tablo 4.13. Üç varyant tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve enzim düzeylerine göre dağılımı.

| 3 varyant tespit edilmiş 21 hasta | |
|-------------------------------------|----------|
| Heterozigot+Heterozigot+Heterozigot | 21 hasta |
| BBE | 7 hasta |
| KBE | 11 hasta |
| EA>%30 | 2 hasta |
| EA çalışılmamış. | 1 hasta |

❖ 365 hastada herhangi bir varyant tespit edilmedi (Tablo 4.14).

- Bu hastaların 30'unda Kısmi Biyotinidaz Eksikliği saptanmıştır. 225 hastada biyotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. 110 hastanın enzim aktivitesine bakılmamıştır.

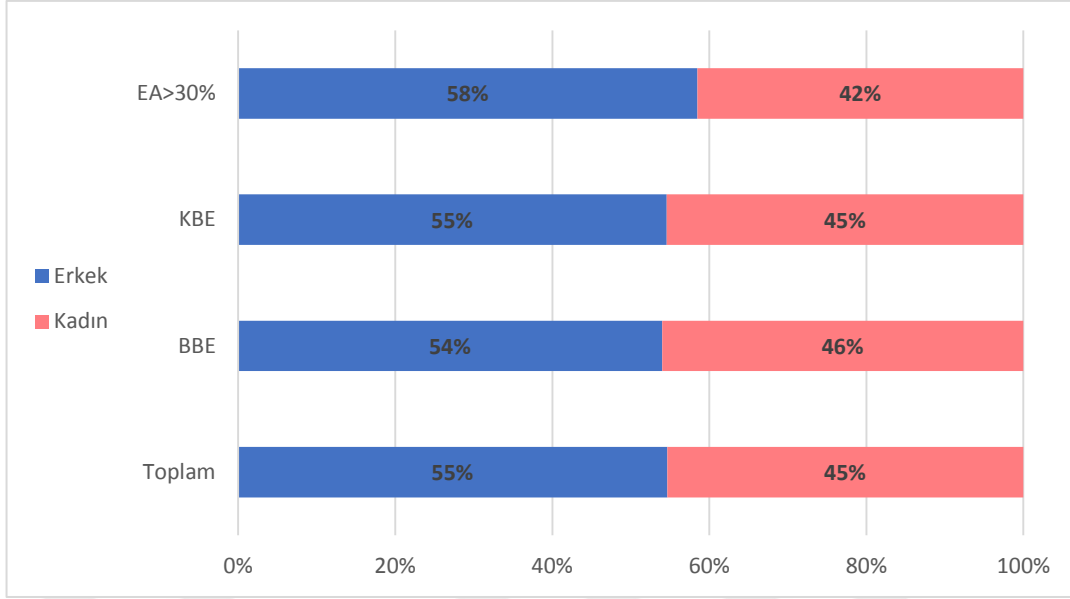
Tablo 4.14. Mutasyon tespit edilmemiş hastaların enzim düzeylerine göre dağılımı.

| Mutasyon tespit edilmemiş 365 hasta | |
|-------------------------------------|-----------|
| BBE | - |
| KBE | 30 hasta |
| EA>%30 | 225 hasta |
| EA çalışılmamış. | 110 hasta |

Belirgin Biyotinidaz Eksikliği, Kısmi Biyotinidaz Eksikliği ve Enzim aktivitesi>%30 saptanmış hastalarının genotip ve fenotip bulguları

1. BBE, KBE ve EA>%30 saptanmış hastalarda kadın/erkek oranı (Şekil 4.12).

- Belirgin Biyotinidaz Eksikliği (BBE) saptanmış hastaların 46'sı (%46) kadın, 54'ü (%54) erkek hastadır.
- Kısmi Biyotinidaz Eksikliği (KBE) saptanmış hastaların 472'si (%45) kadın, 567'si (%55) erkek hastadır.
- EA>%30 saptanmış hastaların ise 401'i (%42) kadın, 565'i (%58) erkek hastadır.



Şekil 4.11. Toplam hastalarda, BBE, KBE ve EA>%30 saptanmış hastalarda kadın/erkek oranı

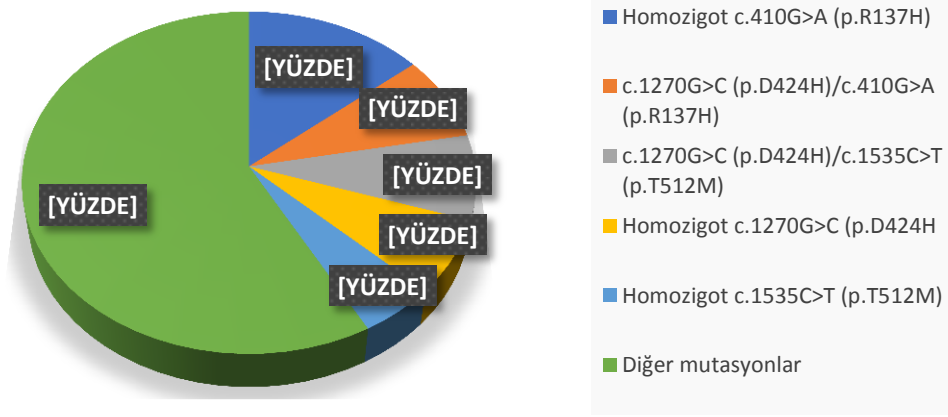
2. BBE, KBE ve EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı

BBE hastaları retrospektif olarak incelendiğinde:

- En sık saptanan genotipin 14 hastada tespit edilmiş homozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu olduğu görüldü. Diğer varyantların listesi Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı.

| Zigosite | Mutasyon | Hasta sayısı | Ortalama Enzim Aktivitesi |
|----------------------|---|--------------|---------------------------|
| Homozigot | c.410G>A (p.R137H) | 14 | %7,2 |
| Birleşik Heterozigot | c.1270G>C (p.D424H)/c.410G>A (p.R137H) | 8 | %7,3 |
| Birleşik Heterozigot | c.1270G>C (p.D424H)/c.1535C>T (p.T512M) | 8 | %6,5 |
| Homozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 7 | %8,2 |
| Homozigot | c.1535C>T (p.T512M) | 5 | %4,1 |



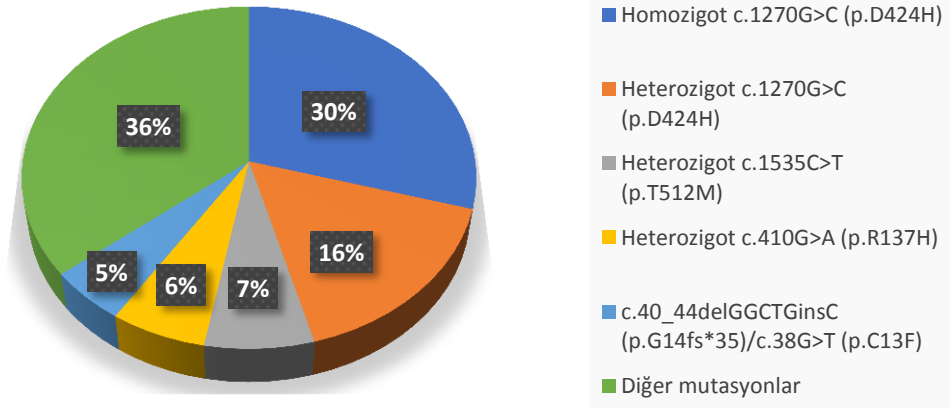
Şekil 4.12. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı

KBE hastaları retrospektif olarak incelendiğinde:

- En sık saptanan genotipin 306 hastada tespit edilmiş homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu olduğu görüldü. Diğer mutasyonların listesi Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.16. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı.

| Zigosite | Mutasyon | Hasta sayısı | Ortalama enzim aktivitesi |
|-----------------------------|---|--------------|---------------------------|
| Homozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 306 | %20,4 |
| Heterozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 170 | %24,3 |
| Heterozigot | c.1535C>T (p.T512M) | 74 | %21,7 |
| Heterozigot | c.410G>A (p.R137H) | 65 | %19,9 |
| Her iki varyant Heterozigot | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35)/c.38G>T (p.C13F) | 53 | %22,1 |



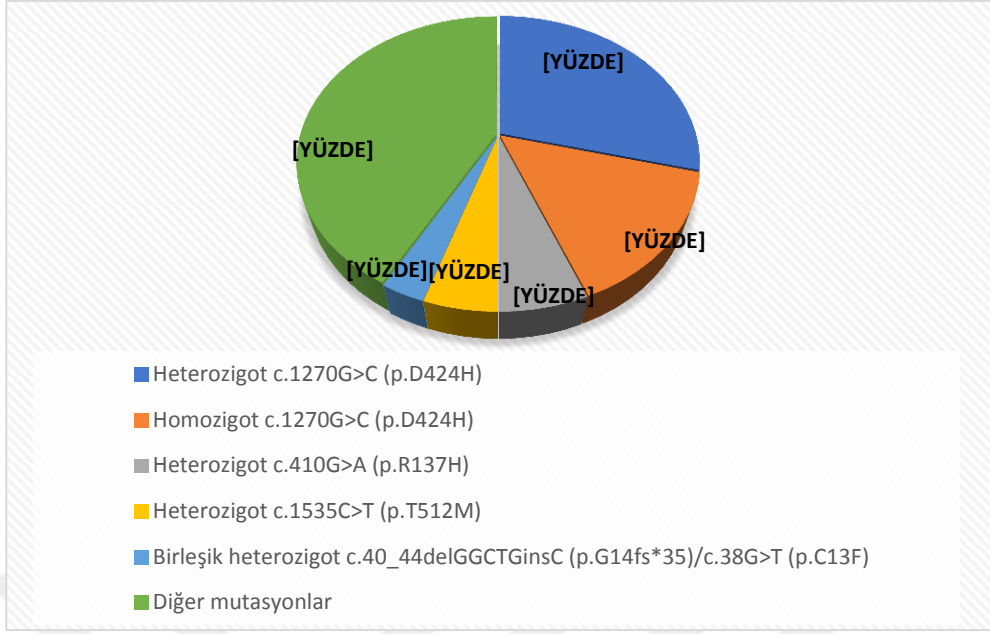
Şekil 4.13. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı

EA>%30 saptanmış hastalar retrospektif olarak incelendiğinde:

- En sık saptanan genotipin 279 hastada tespit edilmiş heterozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu olduğu görüldü. Diğer mutasyonların listesi Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4.17. EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı.

| Zigosite | Mutasyon | Hasta sayısı |
|----------------------|---|--------------|
| Heterozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 279 |
| Homozigot | c.1270G>C (p.D424H) | 145 |
| Heterozigot | c.410G>A (p.R137H) | 60 |
| Heterozigot | c.1535C>T (p.T512M) | 48 |
| Birleşik heterozigot | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35)/c.38G>T (p.C13F) | 25 |



Şekil 4.14. EA > %30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş genotiplerin dağılımı.

3. BBE, KBE ve EA > %30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş varyantların alel frekansları

- Toplam 100 BBE hastasında alel frekansı en yüksek görülen varyant 52 alelde tespit edilmiş c.1270G>C (p.D424H) varyantıdır. Diğer varyantların listesi Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.18. BBE hastalarında en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları.

| Varyant | Hasta sayısı | Alel sayısı | Alel frekansı |
|----------------------------------|--------------|-------------|---------------|
| c.1270G>C (p.D424H) | 42 | 52 | %26 |
| c.410G>A (p.R137H) | 29 | 43 | %21,5 |
| c.1535C>T (p.T512M) | 19 | 24 | %12 |
| c.1193G>C (p.C398S) | 8 | 12 | %6 |
| c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | 11 | 11 | %5,5 |

- Toplam 1039 KBE hastasında alel frekansı en yüksek görülen varyant 1067 alelde tespit edilmiş c.1270G>C (p.D424H) varyantıdır. Diğer varyantların listesi Tablo 4.19’da verilmiştir.

Tablo 4.19. KBE hastalarında en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları

| Varyant | Hasta sayısı | Alel sayısı | Alel frekansı |
|-------------------------------------|--------------|-------------|---------------|
| c.1270G>C (p.D424H) | 658 | 1067 | %51,34 |
| c.410G>A (p.R137H) | 115 | 121 | %5,82 |
| c.1535C>T (p.T512M) | 102 | 105 | %5,05 |
| c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | 69 | 69 | %3,32 |
| c.38G>T (p.C13F) | 64 | 64 | %3,08 |

- EA>%30 saptanmış 966 hastada alel frekansı en yüksek görülen varyant 643 alelde tespit edilmiş c.1270G>C (p.D424H) varyantıdır. Diğer varyantların listesi Tablo 4.20’de verilmiştir.

Tablo 4.20. EA>%30 saptanmış hastalarda en sık tespit edilmiş varyantlar ve alel frekansları.

| Varyant | Hasta sayısı | Alel sayısı | Alel frekansı |
|-------------------------------------|--------------|-------------|---------------|
| c.1270G>C (p.D424H) | 498 | 643 | %33,3 |
| c.410G>A (p.R137H) | 84 | 86 | %4,45 |
| c.1535C>T (p.T512M) | 60 | 61 | %3,16 |
| c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | 29 | 30 | %1,55 |
| c.38G>T (p.C13F) | 28 | 29 | %1,50 |

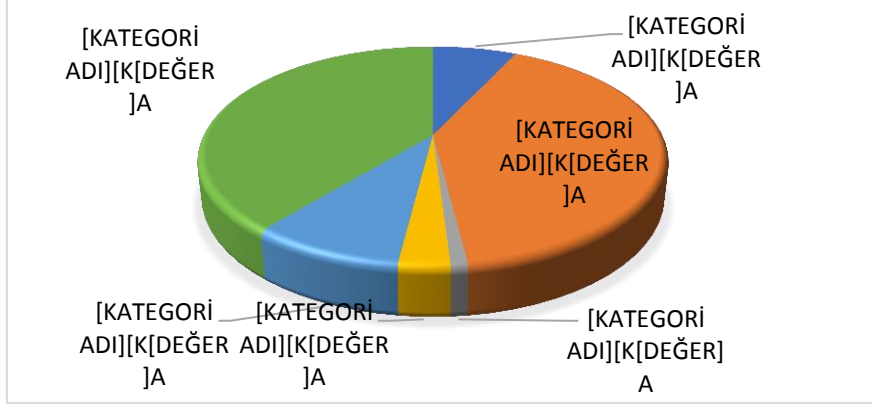
4. BBE, KBE ve EA>%30 saptanmış hastaların mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı

BBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımına bakıldığında hastaların 48’inde bir varyant tespit edilmiştir. 45 hastada iki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit

edildi. 7 hastada üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. BBE hastaları arasında mutasyon tespit edilmeyen hasta görülmedi (Tablo 4.21)

Tablo 4.21. BBE hastalarının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon | Hasta sayı | Ortalama enzim aktivitesi |
|--|------------|---------------------------|
| 1 varyant tespit edilmiş hasta | 48 | |
| Homozigot | 39 | (%6,4) |
| Heterozigot | 9 | (%7,2) |
| İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 45 | |
| Heterozigot+Heterozigot | 41 | (%7,0) |
| Heterozigot+Homozigot | 1 | (%9,4) |
| Homozigot + Homozigot | 3 | (%4,3) |
| Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 7 | |
| Heterozigot+Heterozigot+Heterozigot | 7 | (%5,1) |
| Mutasyon tespit edilmemiş hasta | Yok | |

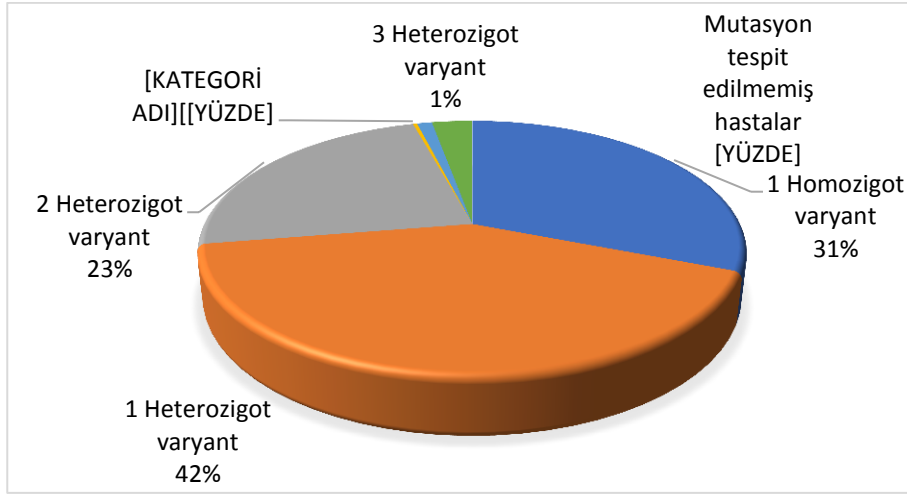


Şekil 4.15. BBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı.

KBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımına bakıldığında hastaların 753'ünde bir varyant tespit edilmiştir. 245 hastada iki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. 11 hastada üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. 30 hastada mutasyon tespit edilmedi (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. KBE hastalarının mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon | Hasta sayısı | Ortalama enzim aktivitesi |
|--|--------------|---------------------------|
| 1 varyant tespit edilmiş hasta | 753 | |
| Homozigot | 321 | (%20,2) |
| Heterozigot | 432 | (%22,2) |
| İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 245 | |
| Heterozigot+Heterozigot | 242 | (%19,4) |
| Heterozigot+Homozigot | 3 | (%18,7) |
| Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 11 | |
| Heterozigot+Heterozigot+Heterozigot | 11 | (%14,4) |
| Mutasyon tespit edilmemiş hastalar | 30 | %23,6 |

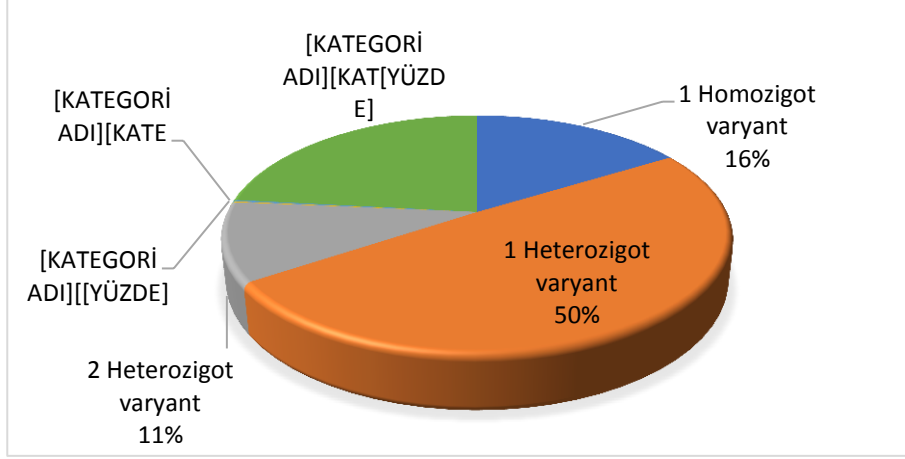


Şekil 4.16. KBE hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı

EA>%30 görülen hastaların mutasyon yüküne göre dağılımına bakıldığında hastaların 634'ünde bir varyant tespit edilmiştir. 105 hastada iki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. 2 hastada üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. 225 hastada mutasyon tespit edilmedi (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. EA>%30 tespit edilmiş hastaların mutasyon yükü ve ortalama enzim aktivitesine göre dağılımı.

| Mutasyon | Hasta sayı |
|--|------------|
| 1 varyant tespit edilmiş hasta | 634 |
| Homozigot | 157 |
| Heterozigot | 477 |
| İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 105 |
| Heterozigot+Heterozigot | 104 |
| Homozigot+Homozigot | 1 |
| Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon | 2 |
| Heterozigot+Heterozigot+Heterozigot | 2 |
| Mutasyon tespit edilmemiş hastalar | 225 |



Şekil 4.17. EA>%30 saptanmış hastalarının mutasyon yüküne göre dağılımı.

5. Üç varyant, iki varyant ve tek varyant tespit edilmiş BBE, KBE ve Enzim Aktivitesi>%30 olan hastalarının dağılımı ve genotip-fenotip korelasyonu

❖ Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastaları

BBE hastalarının 7'sinde üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi (Tablo 4.24).

1) c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) varyantı (varyant I) tüm hastalarda ortak bir varyant olarak görüldü ve her hastada bulunduğu için, enzim aktivitesindeki düşüşte önemli bir katkı sağladığı düşünüldü.

2) Varyant II ve Varyant III: Bu aleller arasındaki varyantlar hastalar arasında değişiklik göstermekte ve enzim aktivitesindeki farklılıkları etkilemektedir.

Tablo 4.24. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite | Varyant III | Zigosite | Ortalama Enzim aktivitesi |
|--------------|----------------------------------|----------|------------------|----------|---------------------|----------|---------------------------|
| 3 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.1270G>C (p.D424H) | HET | %5,4 |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET | %6 |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.1535C>T (p.T512M) | HET | %4,3 |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.175C>T (p.R59C) | HET | %5,1 |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.44G>T (p.C15F) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET | %4,3 |

❖ **Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastaları**

KBE hastaların 11'inde üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi (Tablo 4.25).

Hastaların tümünde c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35), c.38G>T (p.C13F) ve c.1270G>C (p.D424H) varyantları ortak varyantlar olarak görüldü.

Tablo 4.25. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite | Varyant III | Zigosite | Ortalama Enzim aktivitesi |
|--------------|----------------------------------|----------|------------------|----------|---------------------|----------|---------------------------|
| 11 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.1270G>C (p.D424H) | HET | %14,4 |

❖ **Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastaların dağılımı**

EA>%30 tespit edilmiş hastaların 2'sinde üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi (Tablo 4.26).

Hastaların tümünde c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35), c.38G>T (p.C13F) ve c.1270G>C (p.D424H) varyantları ortak varyantlar olarak görüldü .

Tablo 4.26. Üç varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastalar dağılımı.

| Hasta sayı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite | Varyant III | Zigosite |
|------------|----------------------------------|----------|------------------|----------|---------------------|----------|
| 2 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | c.1270G>C (p.D424H) | HET |

❖ **İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastaları**

BBE hastalarının 45'inde iki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi.

1) İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastalarında en sık görülen varyant 32 hastada görülen; 29 hastada heterozigot ve 3 hastada homozigot olmak üzere c.1270G>C (p.D424H) varyantı oldu (Tablo 4.27).

2) c.1270G>C (p.D424H) varyantı en sık c.410G>A (p.R137H) ve 1535C>T (p.T512M) varyantları ile birlikte görüldü. (Tablo 4.17).

3) Çerçeve kayması mutasyonları: enzim aktivitesini ciddi bir şekilde azaltma eğiliminde oldu ve bu da protein işlevselliği üzerindeki önemli etkilerini gösterdi.

Tablo 4.27. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite | Ortalama Enzim aktivitesi |
|--------------|---------------------------------------|----------|---------------------------------------|----------|---------------------------|
| 8 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET | %7,3 |
| 8 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1535C>T (p.T512M) | HET | %6,5 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.1264delG (p.V422fs*59) | HOM | %0,9 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.1264delG (p.V422fs*59) | HET | %9,4 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1264delG (p.V422fs*59) | HET | %9,4 |
| 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1308A>C (p.Q436H) | HET | %7,3 |
| 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.175C>T (p.R59C) | HET | %5,6 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.111T>G (p.Y37*) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET | %9,9 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1301A>G (p.Y434C) | HET | %7,7 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.333delC (p.F111fs*28) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.38_44delGCGGCTGinsTCC p.(C13Ffs*36) | HET | %1,7 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.451G>A (p.A151T) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.695A>G (p.D232G) | HET | %9,4 |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.1147T>G (p.F383V) | HOM | %7,7 |
| 3 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET | %6,9 |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.44G>T p.C15F | HET | %6,0 |
| 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.73G>A (p.G25R) | HET | %8,6 |
| 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET | %4,3 |
| 1 | c.1308A>C (p.Q436H) | HET | c.1035G>T (p.L345F) p | HET | %9,4 |
| 1 | c.38_44delGCGGCTGinsTCC p.(C13Ffs*36) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET | %2,3 |
| 1 | c.175C>T (p.R59C) | HET | c.1301A>G (p.Y434C) | HET | %3,6 |
| 1 | c.175C>T (p.R59C) | HOM | c.1301A>G (p.Y434C) | HOM | %4,3 |
| 1 | c.1308A>C (p.Q436H) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET | %7,3 |
| 1 | c.1429C>T (p.P477S) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET | %9,4 |

❖ **İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastaları**

KBE hastalarının 245'inde iki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edildi. (Tablo 4.24).

- 1) İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarında en sık görülen varyant, 168 hastada heterozigot ve 3 hastada homozigot olmak üzere 171 hastada görülen c.1270G>C (p.D424H) varyantı oldu (Tablo 4.28).
- 2) Heterozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantının BBE hastalarında olduğu gibi birleşik heterozigot olarak en sık görüldüğü varyant 39 hastada görülen 410G>A (p.R137H) varyantıdır.
- 3) İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarında c.1270G>C (p.D424H) varyantından sonra ikinci sırada en sık görülen varyant 57 hastada tespit edilmiş c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) varyantıdır (Tablo 4.29).

Tablo 4.28. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı.

| Enzim aktivitesi | Hasta sayısı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite |
|------------------|--------------|---------------------|----------|---------------------------------------|----------|
| %17,6 | 38 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET |
| %18,7 | 25 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1264delG (p.V422fs*59) | HET |
| %16,3 | 21 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1535C>T (p.T512M) | HET |
| %16,9 | 14 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1308A>C (p.Q436H) | HET |
| %23,1 | 8 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.38_44delGCGGCTGinsTCC (p.C13Ffs*36) | HET |
| %18,6 | 7 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.497G>A (p.C166Y) | HET |
| %21,0 | 7 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.565C>T (p.R189C) | HET |
| %21,9 | 6 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.451G>A (p.A151T) | HET |
| %22,1 | 5 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET |
| %23,1 | 5 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.908A>G (p.H303R) | HET |
| %20,4 | 4 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET |
| %16,3 | 3 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.111T>G (p.Y37*) | HET |
| %12,6 | 3 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.175C>T (p.R59C) | HET |
| %19,3 | 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1280A>G (p.H427R) | HET |
| %21,3 | 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.218A>G (p.Y73C) | HET |
| %18,4 | 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.695A>G (p.D232G) | HET |
| %30,0 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET |
| %17,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1015A>G (p.S339G) | HET |
| %20,6 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1046C>T (p.P349L) | HET |
| %12,0 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.113A>G (p.Tyr38Cys) | HET |
| %26,6 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1226A>G p.(Glu409Gly) | HET |
| %10,3 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.124G>A (p.V42M) | HET |
| %21,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1411A>G (p.S471G) | HET |
| %21,4 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1493A>G p.H498R | HET |
| %11,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1553G>A p.R518H) | HET |

| | | | | | |
|-------|----|-------------------------------------|-----|--------------------------|-----|
| %24,0 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.197T>G (p.M66R) | HET |
| %22,3 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.337C>A (p.P113T) | HET |
| %28,6 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.39C>T (p.Cys13=) | HET |
| %11,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.566G>A (p.R189H) | HET |
| %20,6 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.73G>A (p.G25R) | HET |
| %19,7 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.967G>C (p.Gly323Arg) | HET |
| %17,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1567G>C (p.D523H) | HET |
| %10,3 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.1264delG (p.V422fs*59) | HET |
| %23,1 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.451G>A (p.A151T) | HET |
| %22,5 | 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | c.410G>A (p.R137H) | HET |
| %22,1 | 53 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET |
| %22,7 | 4 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.44G>T p.C15F | HET |
| %28,7 | 2 | c.175C>T (p.R59C) | HET | c.1301A>G (p.Y434C) | HET |
| %12,9 | 2 | c.175C>T (p.R59C) | HET | c.952G>A (p.A318T) | HET |
| %12,9 | 1 | c.175C>T (p.R59C) | HET | c.1429C>T (p.P477S) | HET |
| %17,1 | 2 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.1493A>G p.H498R | HET |
| %13,7 | 1 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.908A>G (p.His303Arg) | HET |
| %18 | 1 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.382C>T (p.R128C) | HET |
| %14,6 | 1 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET |
| 29,1 | 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.201C>T (p.N67=) | HET |
| 24,0 | 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.1225G>A (p.E409K) | HET |
| 11,1 | 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.1013A>G (p.His338Arg) | HET |
| 12,9 | 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | c.961C>G p.P321A | HET |
| %24 | 1 | c.1046C>T (p.P349L) | HET | c.111T>G (p.Y37*) | HET |
| %12,9 | 1 | c.1046C>T (p.P349L) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET |
| %14,6 | 1 | c.333delC (p.F111fs*28) | HET | c.73G>A (p.G25R) | HET |

❖ **İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastalar**

1) İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA> %30 üzerinde olan 105 hastada en sık görülen varyant 72 hastada görülen c.1270G>C (p.D424H) varyantıdır. Bu hastalarda her iki varyant heterozigot durumda görüldü (Tablo 4.29).

2) c.1270G>C (p.D424H) varyantı en sık c.410G>A (p.R137H) varyantı ile birlikte görüldü.

3) Bu grupta c.1270G>C (p.D424H) varyantından sonra ikinci sırada en sık c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) varyantı (27 hasta) görüldü.

Tablo 4.29. İki varyant için birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş ve EA>%30 olan hastaların dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant I | Zigosite | Varyant II | Zigosite |
|--------------|---------------------|----------|--|----------|
| 20 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.410G>A (p.R137H) | HET |
| 11 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1535C>T (p.T512M) | HET |
| 8 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1264delG (p.V422fs*59) | HET |
| 4 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.908A>G (p.H303R) | HET |
| 3 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1193G>C (p.C398S) | HET |
| 3 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.565C>T (p.R189C) | HET |
| 3 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.38_44delGCGGCTGinsTCC p.(C13Ffs*36) | HET |
| 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.73G>A (p.G25R) | HET |
| 2 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.197T>G (p.M66R) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.581A>G (p.N194S) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1280A>G (p.H427R) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1042G>A (p.D348N) | HET |

| | | | | |
|----|--|-----|-----------------------|-----|
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1046C>T (p.P349L) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.111T>G (p.Y37*) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1375A>G (p.T459A) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.1536G>A (p.T512T) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.158C>T (p.P53L) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.175C>T (p.R59C) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.281G>T (p.Gly94Val) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.291A>G (p.G97G) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.695A>G (p.D232G) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.585C>T (p.Leu195=) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.868G>A (p.G290R) | HET |
| 1 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | c.451G>A (p.A151T) | HET |
| 25 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.38G>T (p.C13F) | HET |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HOM | c.38G>T (p.C13F) | HOM |
| 1 | c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35) | HET | c.44G>T p.C15F | HET |
| 1 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.216C>G p.I72M | HET |
| 1 | c.410G>A (p.R137H) | HET | c.565C>T (p.R189C) | HET |
| 1 | c.1255G>T (p.A419S) | HET | c.1001C>T (p.T334M) | HET |
| 1 | c.1301A>G (p.Y434C) | HET | c.175C>T (p.R59C) | HET |
| 1 | c.581A>G (p.N194S) | HET | c.1379G>A (p.G460E) | HET |
| 1 | c.38_44delGCGGCTGinsTCC p.(C13Ffs*36) | HET | c.-16-5418A>C | HET |

❖ **Bir varyant tespit edilmiş BBE hastaları**

BBE hastalarının 48'inde bir varyant (39 hastada homozigot, 9 hastada heterozigot) tespit edilmiştir. (Tablo 4.30).

Hem homozigot, hem heterozigot BBE hastaları arasında en sık görülen varyant c.410G>A (p.R137H) varyantı oldu.

Tablo 4.30. Bir varyant tespit edilmiş BBE hastalarının dağılımı.

| Hasta sayı | Varyant | Zigosite | Ortalama Enzim aktivitesi |
|------------|---------------------------------------|----------|---------------------------|
| 14 | c.410G>A (p.R137H) | HOM | %7,2 |
| 7 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | %8,2 |
| 5 | c.1535C>T (p.T512M) | HOM | %4,1 |
| 4 | c.1193G>C (p.C398S) | HOM | %5,6 |
| 3 | c.38_44delGCGGCTGinsTCC p.(C13Ffs*36) | HOM | %6,2 |
| 2 | c.1273G>A (p.G425R) | HOM | %7,3 |
| 2 | c.1308A>C (p.Q436H) | HOM | %4,9 |
| 2 | c.175C>T (p.R59C) | HOM | %3,9 |
| 4 | c.410G>A (p.R137H) | HET | %6,6 |
| 2 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | %9,4 |
| 2 | c.1308A>C (p.Q436H) | HET | %6,9 |
| 1 | c.175C>T (p.R59C) | HET | %6,0 |

❖ Bir varyant tespit edilmiş KBE hastaları

KBE hastalarının 753'ünde bir varyant (321 hastada homozigot, 432 hastada heterozigot) tespit edilmiştir. (Tablo 4.31).

- 1) Bu hastalarda en sık tespit edilmiş varyant 476 hastada görülen c.1270G>C (p.D424H) varyantı (306 hastada homozigot, 170 hastada heterozigot) oldu. (Tablo 4.30).

Tablo 4.31. Bir varyant tespit edilmiş KBE hastalarının dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant | Zigosite | Ortalama enzim aktivitesi |
|--------------|--|----------|---------------------------|
| 306 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM | %20,4 |
| 170 | c.1270G>C (p.D424H) | HET | %24,3 |
| 6 | c.410G>A (p.R137H) | HOM | %14,6 |
| 3 | c.1535C>T (p.T512M) | HOM | %18,4 |
| 2 | c.1308A>C (p.Q436H) | HOM | %14,4 |
| 2 | c.581A>G (p.N194S) | HOM | %18,0 |
| 1 | c.497G>A (p.C166Y) | HOM | %30,0 |
| 1 | c.1193G>C (p.C398S) | HOM | %14,6 |
| 74 | c.1535C>T (p.T512M) | HET | %21,7 |
| 65 | c.410G>A (p.R137H) | HET | %19,9 |
| 24 | c.497G>A (p.C166Y) | HET | %20,0 |
| 23 | c.175C>T (p.R59C) | HET | %19,9 |
| 21 | c.1308A>C (p.Q436H) | HET | %21,4 |
| 11 | c.1193G>C (p.C398S) | HET | %20,8 |
| 9 | c.1429C>T (p.P477S) | HET | %17,5 |
| 4 | c.581A>G (p.N194S) | HET | %20,0 |
| 4 | c.1280A>G (p.H427R) | HET | %27,1 |
| 2 | c.38_44delGCGGCTGinsTCC (p.C13Ffs*36) | HET | %19,4 |
| 2 | c.535G>A (p.V179M) | HET | %29,6 |
| 2 | c.197T>G (p.M66R) | HET | %24,4 |
| 2 | c.566G>A (p.R189H) | HET | %21,0 |
| 2 | c.1273G>A (p.G425R) | HET | %27,0 |
| 2 | c.1350dupC (p.C451Lfs*13) | HET | %16,7 |
| 1 | c.1035G>T (p.L345F) | HET | %30,0 |
| 1 | c.124G>A (p.V42M) | HET | %22,3 |
| 1 | c.1253A>G (p.Y418C) | HET | %24,0 |
| 1 | c.1309G>A) p.V437M | HET | %19,7 |

| | | | |
|---|----------------------------------|-----|-------|
| 1 | c.1379G>A (p.G460E) | HET | %13,7 |
| 1 | c.142_145dupATCC (p.L49fs*24) | HET | %21,4 |
| 1 | c.1421A>G (p.Y474C) | HET | %18,0 |
| 1 | c.368G>T (p.C123F) | HET | %25,7 |
| 1 | c.373del (p.E125Sfs*14) | HET | %18,9 |
| 1 | c.545A>T (p.N182I) | HET | %28,3 |
| 1 | c.565C>T (p.R189C) | HET | %21,4 |
| 1 | c.592_594delGTC | HET | %21,4 |
| 1 | c.695A>G (p.D232G) | HET | %18,0 |
| 1 | c.832G>A (p.A278T) | HET | %18,9 |
| 1 | c.908A>G (p.H303R) | HET | %30,0 |

❖ **Bir varyant tespit edilmiş ve enzim aktivitesi %30 olan hastalar**

Bu gruptaki hastaların 634'ünde (157 hastada homozigot, 477 hastada heterozigot) bir varyant tespit edilmiştir (Tablo 4.32).

Bir varyant tespit edilmiş hastalarda en sık görülen varyant 424 hastada saptanmış c.1270G>C (p.D424H) varyantı oldu. Bu varyant 145 hastada homozigot durumda, 279 hastada heterozigot durumda görüldü.

Tablo 4.32. Bir varyant tespit edilmiş ve EA> %30 olan hastaların dağılımı.

| Hasta sayısı | Varyant | Zigosite |
|--------------|---------------------------------------|----------|
| 145 | c.1270G>C (p.D424H) | HOM |
| 279 | c.1270G>C (p.D424H) | HET |
| 60 | c.410G>A (p.R137H) | HET |
| 48 | c.1535C>T (p.T512M) | HET |
| 14 | c.38_44delGCGGCTGinsTCC (p.C13Ffs*36) | HET |
| 8 | c.497G>A (p.C166Y) | HET |
| 8 | c.1308A>C (p.Q436H) | HET |
| 7 | c.1193G>C (p.C398S) | HET |
| 7 | c.73G>A (p.G25R) | HET |
| 5 | c.565C>T (p.R189C) | HET |
| 5 | c.581A>G (p.N194S) | HET |
| 5 | c.175C>T (p.R59C) | HET |
| 4 | c.908A>G (p.H303R) | HET |
| 3 | c.197T>G (p.M66R) | HET |
| 2 | c.1046C>T (p.P349L) | HET |
| 2 | c.820A>G (p.Ile274V) | HET |
| 2 | c.1253A>G (p.Y418C) | HET |
| 2 | c.1429C>T (p.P477S) | HET |
| 1 | c.111T>G (p.Y37*) | HET |
| 1 | c.202C>G (Q68E) | HET |
| 1 | c.201C>T (p.N67=) | HET |
| 1 | c.218A>G (p.Y73C) | HET |
| 1 | c.284T>G (p.I95S) | HET |
| 1 | c.572G>A (p.R191H) | HET |
| 1 | c.695A>G (p.D232G) | HET |
| 1 | c.682_686del (p.Ile228ValfsTer3) | HET |
| 1 | c.899T>G (p.Phe300Cys) | HET |

| | | |
|---|---------------------------|-----|
| 1 | c.967G>C (p.Gly323Arg) | HET |
| 1 | c.961C>G (p.Pro321Ala) | HET |
| 1 | c.585C>T (p.Leu195=) | HET |
| 1 | c.1379G>A (p.G460E) | HET |
| 1 | c.1350dupC (p.C451Lfs*13) | HET |
| 1 | c.596C>T (p.Ala199V) | HET |
| 1 | c.1559A>G (p.Y520C) | HET |
| 3 | c.1308A>C (p.Q436H) | HOM |
| 2 | c.197T>G (p.M66R) | HOM |
| 2 | c.410G>A (p.R137H) | HOM |
| 1 | c.1301A>G (p.Y434C) | HOM |
| 1 | c.1535C>T (p.T512M) | HOM |
| 1 | c.565C>T (p.R189C) | HOM |
| 1 | c.908A>G (p.H303R) | HOM |
| 1 | c.1193G>C (p.C398S) | HOM |

5.TARTIŞMA

Bu çalışmaya toplam 2672 hasta dahil edilmiştir. Bu sayı literatür taramasında erişebildiğimiz vaka serileri içerisindeki en yüksek sayıdır. Çalışmaya dahil edilen hastaların 1212'si (%45) kadın, 1460'ı (%55) erkek hastadır. Enzim aktivitesi çalışılmış 2105 hastanın 100'ünde (%5) enzim aktivitesi %10'un altında (Belirgin Biyotinidaz Eksikliği), 1039 (%49) hastada enzim aktivitesi %10-30 arasında (Kısmi Biyotinidaz Eksikliği), 966 (%46) hastada ise enzim aktivitesi %30'un üzerinde görüldü. Bu çalışmada 2307 (%86,3) hastada mutasyon tespit edildi. 365 (%13,7) hastada ise herhangi bir varyant saptanmadı. Varyant saptanmayan hastaların 30'unda KBE tespit edildi, BBE tespit edilmiş hasta ise görülmedi. Ülkemizde Murat ve arkadaşlarının Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaptığı 711 hastalık bir çalışmada hastaların 325'i (%45,8) kadın, 386'sı (%54,2) erkek hastaydı. Bu hastaların 22'sinde (%3) BBE, 95'inde (%13) KBE, 594 (%84) hastada ise normal enzim aktivitesi görülmüştür. 55 (%7,7) hastada varyant saptanmamıştır. Varyant saptanmayan hastalardan 1 hastada BBE, 1 hastada ise KBE görülmüştür (85).

Bu çalışmada mutasyon tespit edilmiş 2307 hastada 83 farklı varyant tespit edildi. Bu varyantların 68'i (%82) missense, 8'i (%10) frameshift, 5'i (%6) sinonim, 1'i (%1) nonsense, 1 (%1) varyant intronik olarak görüldü. Bu varyantlardan 14'ü bildiğimiz kadarıyla daha önce yayınlanmamış ve veri tabanlarında tanımlanmamış yeni varyantlardı. Ülkemizde Begüm ve arkadaşlarının yaptığı 247 hastalık bir çalışmada toplam mutasyonların %98,6'sı missense, %0,8'i frameshift, %0,3'ü nonsense ve %0,3'ü kodlamayan mutasyonlardı ve 4 varyant daha önce tanımlanmamış yeni bir varyantdı (1).

Bu çalışmada hastalarda en sık tespit edilmiş genotipler incelendiğinde 709 (%27) hastada heterozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantı, 479 (%18) hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantı, 163 (%6) hastada heterozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı, 143 (%5) hastada heterozigot c.1535C>T (p.T512M), 101 (%3,8) hastada c.40_44delGGCTGinsC (p.G14Lfs*35)/c.38G>T (p.C13F) birleşik heterozigot mutasyonları oldu. 2018 yılında Canda ve arkadaşlarının yaptığı 259 hastalık bir çalışmada en sık görülen genotipler c.410G>A (p.R137H)/c.1270G>C (p.D424H) (44 hasta; %19,4), ikinci sırada en sık görülen mutasyon c.1270G>C (p.D424H) varyantı ile bileşik heterozigot mutasyonları (41 hasta; %16), 38 (%16,8) hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu ve 26 (%11,5) hastada homozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonlarıydı (75).

Bu çalışmada 100 BBE hastasında en sık tespit edilmiş genotipler incelendiğinde 14 (%14) hastada homozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu, 8 (%8) hastada c.1270G>C (p.D424H)/c.410G>A (p.R137H) birleşik heterozigot mutasyonu, 8 (%8) hastada c.1270G>C (p.D424H)/c.1535C>T (p.T512M) birleşik heterozigot mutasyonu, 7 (%7) hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu ve 5 (%5) hastada homozigot c.1535C>T (p.T512M) mutasyonlarının saptandığı görüldü. 1039 KBE hastasında en sık tespit edilmiş genotipler incelendiğinde 306 hastada homozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 170 hastada heterozigot c.1270G>C (p.D424H) mutasyonu, 74 hastada heterozigot c.1535C>T (p.T512M) mutasyonu, 65 hastada heterozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu ve 53 hastada c.40_44delGGCTGinsC (p.G14fs*35)/c.38G>T (p.C13F) birleşik heterozigot mutasyonlarının saptandığı görüldü. Gökpınar G. ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada ise BBE saptanan 19 hastada en sık görülen mutasyonlar birleşik heterozigot c.1270G>C (p.D424H)/c.410G>A (p.R137H) (%26,3), homozigot p.C33Fsf*36 (%10,5) ve homozigot c.410G>A (p.R137H) mutasyonu (%10,5) olarak bildirilmiştir. KBE saptanan 51 hastada ise en sık saptanan mutasyonlar sırası 67 ile homozigot p.D424H mutasyonu (%25,4), birleşik heterozigot c.1270G>C (p.D424H)/c.410G>A (p.R137H) mutasyonu (%21,5) ve birleşik heterozigot c.1270G>C (p.D424H)/p.C33Fsf*36 mutasyonu (%13,7) olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada varyantları alel frekanslarına göre değerlendirdiğimizde en sık tespit edilen varyant c.1270G>C (p.D424H) varyantı oldu. Homozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesini diğer homozigot ve birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarla karşılaştırdığımızda homozigot c.1270G>C (p.D424H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantı saptanmış hastaların ortalama enzim aktivitesini diğer homozigot ve birleşik heterozigot mutasyon tespit edilmiş hastalarla karşılaştırdığımızda ise homozigot c.410G>A (p.R137H) varyantına sahip hastaların ortalama enzim aktivitesi, diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü.

Literatürde Begüm ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da benzer olarak c.1270G>C (p.D424H) homozigot varyantı olan hastalarda ortalama enzim aktivitesi, c.1270G>C (p.D424H) birleşik heterozigot hastalardaki ortalama enzim aktivitesinden ve c.1270G>C (p.D424H) varyantı olmayan hastaların ortalama enzim aktivite seviyesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. c.410G>A (p.R137H) homozigot varyantı tespit edilmiş hastalardaki ortalama enzim aktivitesi, c.410G>A (p.R137H) birleşik heterozigot hastaların ortalama enzim aktivitesinden ve c.410G>A (p.R137H) varyantı olmayan hastaların ortalama enzim aktivite seviyesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (1).

6.SONUÇLAR

Çalışmaya dahil edilen 2672 hastanın 2105'inde enzim aktivitesi fluorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Enzim aktivitesi çalışılmış 2105 hastanın 100'ünde (%5) enzim aktivitesi <%10 altında (Belirgin Biotinidaz eksikliği), 1039 (%49) hastada enzim aktivitesi %10-%30 arasında (Kısmi Biotinidaz Eksikliği), 966 (%46) hastada ise enzim aktivitesi >%30'un üzerinde görülmüştür.

Tüm hastaların 1212'si (%45) kadın, 1460'ı (%55) erkek hasta olup, BBE, KBE ve NEA hastalarını ayrı ayrılıkta değerlendirdiğimizde Belirgin Biotinidaz Eksikliği (BBE) saptanmış hastaların 46'sı (%46) kadın, 54'ü (%54) erkek, Kısmi Biotinidaz Eksikliği (KBE) saptanmış hastaların 472'si (%45) kadın, 567'si (%55) erkek, Normal Enzim Aktivitesi (NEA) saptanmış hastaların ise 401'i (%42) kadın, 565'i (%58) erkek hasta olduğu görüldü. Kız erkek oranında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Hastaların 2307'inde (%86,3) mutasyon tespit edildi, 365 (%13,7) hastada ise herhangi bir varyant görülmüdü. Mutasyon tespit edilmiş hastalarda toplam 83 farklı varyant görüldü. Bu varyantların 68'i (%82) missense, 8 (%10) varyant frameshift (çerçeve kayması), 5 (%6) varyant sinonim (sessiz), 1 (%1) varyant nonsense (anlamsız), 1 (%1) varyant intronik olarak görüldü. Tespit edilmiş varyantlar ACMG kriterlerine göre değerlendirildiğinde 5'i (%6) Benign, 3'ü (%4) Olası Benign, 29'u (%35) Klinik Önemi Belirsiz, 21'i (%25) Olası Patojenik, 25'i (%30) Patojenik olmak üzere sınıflandırıldı.

Tespit edilmiş varyantları alel frekanslarına göre değerlendirdiğimizde hastalarda en sık görülen 3 varyant 1270G>C (p.D424H) (1983 alel), c.410G>A (p.R137H) (287 alel), c.1535C>T (p.T512M) (210 alel) varyantları oldu.

Hastalarda bildiğimiz kadarıyla literatürde bildirilmemiş ve veritabanlarında tanımlanmamış 14 yeni varyant tespit edildi. Yeni Misense mutasyonları arasında

REVEL ve MetaRNN puanlarının hem düşük hem de yüksek değerlerde görülebildiğini ve puanların geniş bir dağılım gösterdiğini ortaya koyuyor. Bu sonuçlar, mutasyonların patojenik olma potansiyellerinin oldukça değişken olduğunu ve bazı mutasyonların klinik açıdan daha fazla önem arz edebileceğini göstermektedir.

Ulusal Yenidoğan Tarama Programı, etkilenen binlerce çocuğun ve hatta her yıl bir milyondan fazla yenidoğanın yaşamını büyük ölçüde iyileştiren, hastalıkların nüfus çapında tespit edilmesini sağlayan dikkate değer bir başarı elde etmiştir. BTĐ hastalığının tanısı serumda biyotinidaz aktivitesinin ölçümü ve moleküler analiz yöntemlerine dayanmaktadır. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak ciddi patojenik varyantlara sahip birçok asemptomatik vakalar mevcuttu. Enzim aktivitesi %30'un üzerinde tespit edilmiş 157 hastada homozigot, 107 hastada birleşik heterozigot mutasyon görüldü. Ayrıca mutasyon tespit edilmemiş 365 hastanın 30'unda Kısmi Biyotinidaz Eksikliği görüldü. Biyotinidaz enzim aktivite seviyelerinin yaşamın ilk günlerinde en düşük olup, sonraki günlerde arttığı bildirilmektedir. Aynı zamanda biyotinidaz aktivitesindeki değişkenlikler, çeşitli klinik durumlardan (erken doğum, çevre sıcaklığı, örneklerin transfer koşulları, hiperbilirubinemi ve perinatal asfiksi) etkilenebilmektedir. Bu bulgular, neonatal dönemdeki ölçümlerin mevcut enzim aktivite düzeyini belirlemek için yeterli olmadığını ve ardışık testlerle takip edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, bu bölgedeki BTĐ'li yenidoğanlarda genotip ile biyokimyasal fenotip arasında düşük bir uyum olduğunu ve varyant patojenitesi ile biyokimyasal fenotip arasında öngörülebilir bir korelasyon kurmanın yeterli olmadığını doğrulamaktadır. Ek olarak, bu çalışma, genotip ve biyokimyasal fenotip arasındaki uyumsuzluğu açıklamak için enzim aktivitesi ölçümlerinde ve moleküler analizlerde analitik zorlukların ele alınmasının önemini vurgulamaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Yılmaz B, Ceylan AC, Gündüz M, Ünal Uzun Ö, Küçükcongür Yavaş A, Bilginer Gürbüz B, et al. Evaluation of clinical, laboratory, and molecular genetic features of patients with biotinidase deficiency. *Eur J Pediatr.* 2024;183(3).
2. Hymes J, Stanley CM, Wolf B. Mutations in BTD causing biotinidase deficiency. Vol. 18, *Human Mutation.* 2001.
3. Saudubray JM, Baumgartner MR, García-Cazorla Á, Walter JH. Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment.* 2022.
4. Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, Wolf B. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: A technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine.* 2017;19(10).
5. Elrefai S, Wolf B. Disorders of Biotin Metabolism. In: Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Fifth Edition. 2014.
6. Porta F, Pagliardini V, Celestino I, Pavanello E, Pagliardini S, Guardamagna O, et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency: A 30-year single center experience. *Mol Genet Metab Rep.* 2017;13.
7. Mardhiah M, Azize NAA, Yakob Y, Affandi O, Hock NL, Rowani MR, et al. Clinical, biochemical and mutational findings in biotinidase deficiency among Malaysian population. *Mol Genet Metab Rep.* 2020;22.
8. Wolf B. Biotinidase deficiency: "If you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have." Vol. 14, *Genetics in Medicine.* 2012.
9. Kannan B, Navamani HK, Jayaseelan VP, Arumugam P. A Rare Biotinidase Deficiency in the Pediatrics Population: Genotype–Phenotype Analysis. *J Pediatr Genet.* 2023;12(01).
10. Wolf B, Miller JB, Hymes J, McVoy JS, Ishikawa Y, Shapira E. Immunological comparison of biotinidase in serum from normal and biotinidase-deficient individuals. *Clinica Chimica Acta.* 1987;164(1).

11. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Yenidoğan Metabolik ve Endokrin Hastalık Tarama Programı (NTP). Published 2021 [online]. Available at: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/cocukergen-tp-liste/yenidoğan_tarama_programi.html. Accessed December 30, 2021
12. Hsu RH, Chien YH, Hwu WL, Chang IF, Ho HC, Chou SP, et al. Genotypic and phenotypic correlations of biotinidase deficiency in the Chinese population. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1).
13. Hong X, Kumar AB, Ronald Scott C, Gelb MH. Multiplex tandem mass spectrometry assay for newborn screening of X-linked adrenoleukodystrophy, biotinidase deficiency, and galactosemia with flexibility to assay other enzyme assays and biomarkers. *Mol Genet Metab.* 2018;124(2).
14. Cowan TM, Blitzler MG, Wolf B. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. Vol. 12, *Genetics in Medicine.* 2010.
15. Hart PS, Hymes J, Wolf B. Isoforms of human serum biotinidase. *Clinica Chimica Acta.* 1991;197(3).
16. Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. In: *Journal of Nutrition.* 1999.
17. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. Vol. 255, *Clinica Chimica Acta.* 1996.
18. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SSK. Biotin and biotinidase deficiency. Vol. 3, *Expert Review of Endocrinology and Metabolism.* 2008.
19. Donti TR, Blackburn PR, Atwal PS. Holocarboxylase synthetase deficiency pre and post newborn screening. *Mol Genet Metab Rep.* 2016;7.
20. Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: Assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med.* 1995;56(1).
21. Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, Meyers GA, Fleischhauer K, Buck GA, 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(6).

22. Hassan YI, Zempleni J. A novel, enigmatic histone modification: Biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. Vol. 66, Nutrition Reviews. 2008.
23. Sadakierska-Chudy A, Filip M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. Vol. 27, Neurotoxicity Research. 2015.
24. Kothapalli N, Sarath G, Zempleni J. Biotinylation of K12 in histone H4 decreases in response to DNA double-strand breaks in human JAr choriocarcinoma cells. Journal of Nutrition. 2005;135(10).
25. Brenner C. Catalysis in the nitrilase superfamily. Vol. 12, Current Opinion in Structural Biology. 2002.
26. Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: A nuclear role for holocarboxylase synthetase. Hum Mol Genet. 2004;13(1).
27. Filenko NA, Kolar C, West JT, Abbie Smith S, Hassan YI, Borgstahl GEO, et al. The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes. PLoS One. 2011;6(1).
28. Said HM. Biotin: Biochemical, physiological and clinical aspects. Subcell Biochem. 2012;56.
29. Luong JHT, Male KB, Glennon JD. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. Vol. 37, Biotechnology Advances. 2019.
30. Keller A, Kopyra J, Gothelf K V., Bald I. Electron-induced damage of biotin studied in the gas phase and in the condensed phase at a single-molecule level. New J Phys. 2013;15.
31. Said HM. Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. In: Journal of Nutrition. 2009.
32. Frape D. The Vitamins; Fundamental Aspects in Nutrition and Health . By Gerald F Combs Jr Publisher. Equine Vet J. 1992;24(3).
33. Hardinge MG, CrookS H. Lesser known vitamins in foods. J Am Diet Assoc. 1961;38.

34. Gibson JA. The Large Intestine: Its Role in Mammalian Nutrition and Homeostasis. O. M. Wrong , C. J. Edmonds , V. S. Chadwick . Q Rev Biol. 1983;58(1).
35. Wolf B, Grier RE, Secor McVoy JR, Heard GS. Biotinidase deficiency: A novel vitamin recycling defect. J Inherit Metab Dis. 1985;8(1 Supplement).
36. Said HM, Thuy LP, Sweetman L, Schatzman B. Transport of the biotin dietary derivative biocytin (N-biotinyl-L-lysine) in rat small intestine. Gastroenterology. 1993;104(1).
37. Solvik BS, Strand TA. Biotin: a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. Vol. 68, Food and Nutrition Research. 2024.
38. Said HM, Redha R, Nylander W. A carrier-mediated, Na⁺ gradient-dependent transport for biotin in human intestinal brush-border membrane vesicles. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1987;253(5).
39. Daberkow RL, White BR, Cederberg RA, Griffin JB, Zempleni J. Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. Journal of Nutrition. 2003;133(9).
40. Holling T, Nampoothiri S, Tarhan B, Schneeberger PE, Vinayan KP, Yesodharan D, et al. Novel biallelic variants expand the SLC5A6-related phenotypic spectrum. European Journal of Human Genetics. 2022;30(4).
41. Schwantje M, de Sain van der Velden M, Jans J, van Gassen K, Dorrepaal C, Koop K, et al. Genetic defect of the sodium-dependent multivitamin transporter: A treatable disease, mimicking biotinidase deficiency. JIMD Rep. 2019;48(1).
42. Byrne AB, Arts P, Polyak SW, Feng J, Schreiber AW, Kassahn KS, et al. Identification and targeted management of a neurodegenerative disorder caused by biallelic mutations in SLC5A6. NPJ Genom Med. 2019;4(1).
43. Said HM, Redah R. Ontogenesis of the intestinal transport of biotin in the rat. Gastroenterology. 1988;94(1).
44. Said HM. Cellular uptake of biotin: Mechanisms and regulation. In: Journal of Nutrition. 1999.
45. Barth CA, Frigg M, Hagemeister H. Biotin absorption from the hindgut of the pig. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 1986;55(1–5).

46. Bowman BB, Rosenberg IH. Biotin absorption by distal rat intestine. *Journal of Nutrition*. 1987;117(12).
47. Said HM, Ortiz A, McCloud E, Dyer D, Moyer MP, Rubin S. Biotin uptake by human colonic epithelial NCM460 cells: A carrier-mediated process shared with pantothenic acid. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1998;275(5 44-5).
48. Gropper SS, Smith JL. *Advanced Nutrition and Human Metabolism, Sixth Edition*. Advanced Nutrition in Human. 2013.
49. Knowles JR. The mechanism of biotin-dependent enzymes. Vol. 58, *Annual Review of Biochemistry*. 1989.
50. Zemleni J, Mock DM. Biotin biochemistry and human requirements. Vol. 10, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1999.
51. McBurney R, B Bowman & R Russell. *Present Knowledge in Nutrition Vol. 2*. Washington DC: International Life Sciences Institute, 2006, ISBN 9781578811991. *British Journal of Nutrition*. 2008;99(1).
52. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. Vol. 17, *Annual Review of Nutrition*. 1997.
53. Khan AR, Al-Enazi S, Al-Gahtani A, Al-Zahrani S, Saad SM, Khan KM, et al. Accurate determination of Biotinidase activity in serum by HPLC and its utilization as second tier test for the confirmation of initial positive newborn screening results. *Mol Genet Metab Rep*. 2024;38.
54. Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Kure S, et al. Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency. *Hum Genet*. 2001;109(5).
55. Sharma R, Kucera CR, Nery CR, Lacbawan FL, Salazar D, Tanpaiboon P. Biotinidase biochemical and molecular analyses: Experience at a large reference laboratory. *Pediatrics International*. 2024;66(1).
56. Saleem H, Simpson B. Biotinidase Deficiency. 2023 Feb 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 32809442.
57. Canda E, Kalkan Uçar S, Çoker M. Biotinidase Deficiency: Prevalence, Impact And Management Strategies. *Pediatric Health Med Ther*. 2020;11.

58. Baykal T, Huner G, Sarbat G, Demirkol M. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns [3]. Vol. 87, *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. 1998.
59. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr*. 1983;103(2).
60. Wolf B, Heard GS, Weissbecker KA, McVoy JRS, Grier RE, Leshner RT. Biotinidase deficiency: Initial clinical features and rapid diagnosis. *Ann Neurol*. 1985;18(5).
61. Wolf B. The neurology of biotinidase deficiency. Vol. 104, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011.
62. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clinica Chimica Acta*. 1983;131(3).
63. Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, Wanigasinghe J, Monaghan K, Suchy SF, et al. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children. *Mol Genet Metab Rep*. 2015;2.
64. Wolf B. Biotinidase deficiency should be considered in individuals exhibiting myelopathy with or without and vision loss. Vol. 116, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015.
65. Lott IT, Lottenberg S, Nyhan WL, Buchsbaum MJ. Cerebral metabolic change after treatment in biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1993;16(2).
66. Ramaekers Th. V, Brab M, Rau G, Heimann G. Recovery from neurological deficits following biotin treatment in a biotinidase Km variant. *Neuropediatrics*. 1993;24(2).
67. Deschamps R, Savatovsky J, Vignal C, Fisselier M, Imbard A, Wolf B, et al. Adult-onset biotinidase deficiency: Two individuals with severe, but reversible optic neuropathy. Vol. 89, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2018.
68. Heard GS, Secor McVoy JR, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem*. 1984;30(1).
69. Mock DM. Biotin: From nutrition to therapeutics. *Journal of Nutrition*. 2017;147(8).

70. Wastell H, Dale G, Bartlett K. A sensitive fluorimetric rate assay for biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Anal Biochem.* 1984;140(1).
71. İşeri-Erten SÖ, Dikmen ZG, Ulusu NN. Comparison of Spectrophotometric and Fluorimetric Methods in Evaluation of Biotinidase Deficiency. *J Med Biochem.* 2016;35(2).
72. Cole H, Weremowicz S, Morton CC, Wolf B. Localization of serum biotinidase (btd) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics.* 1994;22(3).
73. Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B. Structure of the human biotinidase gene. *Mammalian Genome.* 1998;9(4).
74. Wolf B. Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? Vol. 114, *Molecular Genetics and Metabolism.* 2015.
75. Canda E, Yazici H, Er E, Kose M, Basol G, Onay H, et al. Single center experience of biotinidase deficiency: 259 patients and six novel mutations. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2018;31(8).
76. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, Carvalho MRS, Fonseca PAS, Camelo JS, et al. Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One.* 2017;12(5).
77. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12).
78. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3).
79. Gupta AK, Gupta UD. Next generation sequencing and its applications. In: *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation.* 2020.
80. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2020;32(6).
81. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic evaluation of sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clin Chem.* 2016;62(4).
82. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437(7057).

83. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. Vol. 17, Nature Reviews Genetics. 2016.
84. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK, Gerstein MB. The real cost of sequencing: Higher than you think! Genome Biol. 2011;12(8).
85. Karaoglan M, Nacarkahya G, Aytac EH, Keskin M. Genotype-biochemical phenotype analysis in newborns with biotinidase deficiency in Southeastern Anatolia. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2024;25(1).



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan Arş. Gör. Dr. Nigar SHİRİNOVA'ya ait “**YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI KAPSAMINDA TARANAN BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİNİN GENETİK ETİYOLOJİSİNDE YER ALAN MUTASYONLARIN DAĞILIMI VE GENOTİP-FENOTİP KORELASYONU**” adlı tez çalışması, 12/12/2024 tarihinde sunulmuş ve jürimiz tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Bu tutanak tarafımızca imza altına alınmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Üye: Doç. Dr. Aslıhan KİRAZ