



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PTK2 GENİNDEKİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN
İN SİLİCO ANALİZİ**

Birol TURAN

**Tez Danışmanı Doç. Dr. Mesut KARAHAN Eş Danışman Dr. Öğr. Üyesi Ebru
ÖZKAN OKTAY**

İSTANBUL-2021

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PTK2 GENİNDEKİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN
İN SİLİCO ANALİZİ**

Birol TURAN

**Tez Danışmanı Doç. Dr. Mesut KARAHAN Eş Danışman Dr. Öğr. Üyesi Ebru
ÖZKAN OKTAY**

İSTANBUL-2021

ÖZET

PTK2 GENİNDEKİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN İN SİLİCO ANALİZİ

Kanser, hem genetik hem de çevresel faktörlerin sebep olduğu çok faktörlü bir hastalıktır. Kötü huylu kanser hücrelerinin çoğalmaya başladığı bölgeden, vücudun başka bölgelerine lenf veya damar yolu gibi çeşitli yollarla yayılarak yerleşmesine metastaz denir. Göç haline geçmiş olan kanser hücresi, vücudun içinde dolaşırken herhangi bir sağlıklı dokuya yapışarak bu bölgede gelişimine devam edebilir. Kanser hücresinin vücudun herhangi bir bölgesine yapışmasını sağlayan birtakım proteinler vardır. PTK2 geni tarafından kodlanan fokal adezyon kinaz (FAK1) proteini bunlardan birisidir. Bu çalışmada, PTK2 genindeki yanlış anlamlı (missense) tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) proteinin yapısı, fonksiyonu ve stabilizasyonu üzerine tahmini olarak verebileceği zararların in silico yöntemler ile belirlenmesi amaçlanmıştır. SNP'lerin olası zararlı etkilerinin tahmininde PolyPhen-2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP2 ve SIFT yazılım araçları kullanılırken, SNP'lerin protein stabilizasyonu üzerine etkilerinin tahmininde I-Mutant 2.0 ve MUpro yazılım araçları kullanılmıştır. Yabanıl ve mutant tip proteinlerin üç boyutlu modelleri ise Project HOPE yazılım aracı ile elde edilmiştir.

Sonuçlar, *PTK2* geninde yer alan toplam 85899 SNP'nin 634 tanesinin yanlış anlamlı SNP olduğunu göstermiştir. 634 SNP'nin in silico analizlerine göre, rs374415488, rs199594538, rs111757839, rs41315637, rs55903738, rs56051231, rs369459709, rs150410292, rs374480150 ve rs375118877 polimorfizmlerinin zararlı etkilerinin olabileceği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, zararlı etkilere sahip olabileceği tahmin edilen SNP'ler, gelecekte yapılabilecek genotipleme çalışmalarının önemli bir basamağı olan SNP seçiminde ve deney tasarımıyla kullanılabilecektir. Bu nedenle, elde ettiğimiz sonuçların kanser hastalığı ve kanser hücresinin adezyonu ile ilgili gelecekte yapılacak olan hem deneysel hem de in silico çalışmalara faydalı bilgiler sunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), *PTK2* geni, In silico, Kanser Hastalığı

ABSTRACT

IN SILICO ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS WITHIN PTK 2 GENE

Cancer is a multifactorial disease caused by both genetic and environmental factors. Metastasis is the spread of malignant cancer cells from the area where they begin to multiply to other parts of the body by various means such as lymph or vascular access. Cancer cell, which has migrated, can continue to develop in this area by adhering to any healthy tissue while traveling through the body. There are a number of proteins that allow cancer cells to adhere to any part of the body. Focal adhesion kinase (FAK1) protein encoded by the *PTK2* gene is one of them. In this study, it was aimed to determine the predictive damages of missense single nucleotide polymorphisms (SNP) within *PTK2* gene on the structure, function and stabilization of the protein by in silico methods. While PolyPhen-2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP2 and SIFT software tools were used in the prediction of possible harmful effects of SNPs, I-Mutant 2.0 and MUpro software tools were used in predicting the effects of SNPs on protein stabilization. Three dimensional models of wild and mutant type proteins were obtained with Project HOPE software tool.

The results showed that 634 of the 85899 SNPs in the *PTK2* gene were missense SNPs. According to the in silico analysis of 634 SNPs, it was determined that the polymorphs rs374415488, rs199594538, rs111757839, rs41315637, rs55903738, rs56051231, rs369459709, rs150410292, rs374480150, and rs375118877 may have harmful effects. In this thesis, SNPs that are predicted to have harmful effects can be used in SNP selection and experimental design, which is an important step of future genotyping studies. Therefore, it is thought that our results will provide useful information for both experimental and in silico studies to be conducted in the future regarding cancer disease and cancer cell adhesion.

Keywords: Single nucleotide polymorphism, *PTK2* gene, In silico, Cancer Disease,

TEŞEKKÜR

Bu kısımda başta tez danışmanım Doç. Dr. Mesut KARAHAN olmak üzere tez çalışması sırasında çok büyük yardımları dokunan eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖZKAN OKTAY hocama , her zaman yanımda olan sevgili eşime, zor zamanlarımda beni mutlu eden kızıma ve bu günlere kadar gelmemde büyük katkısı olan babama çok teşekkür ederim.



BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim .

Tarih:.....

Birol TURAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN FORMU	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1.Çalışmanın Amacı.....	2
1.2.Çalışmanın Önemi.....	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Polimorfizm.....	4
2.1.1.VNTR.....	4
2.1.2.RFLP.....	4
2.1.3.STR.....	5
2.1.4.Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	5
2.2.Biyoinformatik Analizler.....	8
2.3. Karsinogenez	9
2.3. 1.Metastaz.....	10
2.4. Fokal Adezyon Kinaz Proteini(FAK).....	11
2.4.1. PTK2 Genindeki SNP'ler Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	14
2.4. 2.PTK2 Geninin İlişkili Olduğu Hastalıklar.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Araştırmanın Tipi	16
3.2. Veri Eldesi	16
3.2.1.NCBI.....	16
3.2.2.NCBI dbSNP.....	16

3.2.3.Uniprot.....	16
3.3.Zararlı SNP'lerin Biyoinformatik Araçlar İle Tahmini.....	17
3.3.1.SIFT.....	17
3.3.2.PolyPhen-2.....	17
3.3.3.PROVEAN.....	18
3.3.4.Mutation Assessor.....	18
3.3.5.SNAP2.....	18
3.4.SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmini.....	18
3.4.1.I-Mutant 2.0.....	18
3.4.2. MUpro	19
3.5.Üç Boyutlu Modelleme.....	19
3.5.1.Project Hope.....	19
3.6.Gen-gen Etkileşimlerinin Belirlenmesi.....	20
3.6.1.GeneMania.....	20
4. BULGULAR	21
4.1. Veri Eldesi	21
4.1.1.Gen-gen İlişkileri.....	21
4.2. Zararlı SNP'lerin Biyoinformatik Araçlar İle Tahmin Sonuçları.....	22
4.3. SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmin Sonuçları.....	29
4.4.Zararlı SNP'lerin Project HOPE ile Modellenmesi.....	29
5.TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	42
EKLER	49
Ek 1.	49

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: SIFT, Polyphen-2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP2 yazılım araçlarına ait sonuçlar	28
Tablo 2: SNP'lerin protein stabilizasyonu üzerine etkilerinin tahmin sonuçları.....	29
Tablo 3: SNP'lerin sebep olduğu aminoasit değişimleri.....	30
Tablo 4: Yabanıl ve mutant tip amino asitlerin Project HOPE yazılımına göre belirlenen özellikleri.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Tek nükleotid polimorfizmi	6
Şekil 2: Transisyon ve transversiyon gösterimi	6
Şekil 3: Metastaz oluşumu	10
Şekil 4: FAK yapısı	12
Şekil 5: PTK2 gen-gen etkileşim ağı	21
Şekil 6: PTK2 genindeki yanlış anlamlı SNP'lerin nükleotid değişimlerinin % dağılımı	23
Şekil 7: SIFT yazılım aracı ile elde edilen sonuçların sayısal dağılımı	23
Şekil 8: PolyPhen-2 tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı	24
Şekil 9: Provean tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı.....	25
Şekil 10: Mutation Assessor tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı.....	26
Şekil 11: SNAP2 tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı.....	27
Şekil 12: Üç boyutlu gösterimde 501. pozisyonda bir lösinin bir valine dönüşümü.....	33
Şekil 13: L501V polimorfizm bölgesinin yakından görünümü	34
Şekil 14: Üç boyutlu gösterimde 919. pozisyondaki arjinin amino asidinin bir triptofan amino asidine dönüşmesi (R919W)	34
Şekil 15: R919W polimorfizm bölgesinin yakından görünümü	35
Şekil 16: Üç boyutlu gösterimde 600. pozisyonda bir treonin aminoasidinin alanin aminoasidine dönüşümü (T600A).....	35
Şekil 17: T600A polimorfizm bölgesinin yakından görünümü	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PTK	: Fosfotrozın Kinaz 2
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
NLS	: Nükleer lokalizasyon dizisi
NES	: Nükleer ihracat dizisi
KDBS	: Kinaz alanı bağlama bölgesi
FDBS	: FERM alanı bağlanma bölgesi
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
PolyPhen-2	: Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	: Protein Variation Effect Analyzer
SIFT	: Sorting Intolerant From Tolerant

1. GİRİŞ

Kanser, farklı genetik, epigenetik ve transkripsiyonel özelliklere sahip kanser hücrelerinden oluşan, kanser hücrelerinin heterojen fonksiyonel popülasyonlarını oluşturan, teşhisi ve tedavisi için büyük bir engel oluşturan oldukça çeşitli ve karmaşık bir hastalıktır (Williams GM 2001), Williams G M (1979), Williams G M (1985), Williams G M (1987), Williams GM (1987), Williams GM (1992)).

Mutasyonların gen ifadesinde değişimlere sebep olması tüm kanserlerde görünen özellik olarak kabul edilmektedir. Tüm durumlar göz önünde bulundurulduğunda kanser; hücre seviyesinde meydana gelen genetik bozukluk olarak kabul edilebilir. Genomik değişiklikler kanserle ilişkilidir. Örneğin; kromozom kazanımı ya da kaybı, viral genomun hücre genomuna katılımı, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli veya tek nukleotid değişimi (SNP) gibi küçük ölçekli değişiklikler kanserle ilişkili genomik değişikliklerdir. SNP'ler sonucu amino asit değişimlerinin protein yapısı ve işlevi üzerindeki etkisi, SNP'lerin sebep olabileceği insan hastalıklarının yanı sıra kanser gibi hastalıkların karmaşık işleyişlerini anlamak için oldukça önemlidir. SNP'ler, hastalığa yatkınlık hakkında bilgi almak için belirlenen biyobelirteçlerdir. Her SNP'nin protein işlevi üzerindeki etkisini deneysel olarak karakterize etmek zaman alıcı, zor ve pahalı olabilmektedir. Ancak bir amino asit değişikliğinin uygunluk üzerinde büyük bir etkisi olabileceğinden, bir amino asit değişiminin protein işlevini etkileyip etkilemediğini tahmin edebilen bir in silico hesaplama yöntemi, araştırmacıların ek çalışma için aminoasit değişimlerini önceliklendirmesine yardımcı olmaktadır (Ng ve Henikoff, 2006). Bu amaçla çok sayıda dizi ve/veya yapıya dayalı amino asit değişikliği tahmin yöntemi kullanılmaktadır. Biyoinformatik analizler yardımıyla kanser gibi önemli hastalıklarla bağlantılı olan SNP'leri açığa kavuşturmak için ilk önce in silico araçlar kullanarak SNP'lerin tahmini olarak zararlı etkilerini bulmak ve elde edilen bulgulara göre genotipleme çalışmalarını planlamak günümüzde tercih edilen yaklaşımlardan biridir (ERSOZ ve ark.). İyi huylu olmayan kanser hücrelerinin başladığı yerden vücudun başka bölgelerine yayılarak yerleşmesi durumuna metastaz denir (Barrett ve ark). Göç halinde olan kanser hücresi vücudun içinde yol alırken herhangi sağlıklı bir dokuya adezyon yaparak gelişimine devam edebilirler. Kanser hücresinin bir yerden yola çıkıp vücudun herhangi bir yerine sabitlenmesini sağlayan birtakım proteinler vardır.

Fokal adezyon kinaz, hücre göçü, adezyonu, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, fokal adezyonların ve hücre çıkıntılarının oluşumu ve çıkıntıların ayrıştırılması, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan reseptör olmayan protein trozin kinazdır (Robert ve ark.). Bu çalışmanın odak noktasında yer alan fokal adezyon kinaz proteini *PTK2* geni tarafından kodlanmaktadır.

1.1. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, fokal adezyon kinazı kodlayan *PTK2* genindeki amino asit değişimine neden olan (yanlış anlamlı) tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) çeşitli biyoinformatik yazılım araçları kullanılarak değerlendirilmesidir. Bu amaçla, SNP'lerin proteinin fonksiyonu, yapısı ve stabilizasyonu üzerine olası etkilerinin tahmin edilmesi ve elde edilen verilerin olası sonuçlarının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

1.2. Çalışmanın Önemi

Omik devrimi, insana özgü hastalıklarla ilgili SNP'lerin tespitini hızlandırmıştır. Bu SNP'lerin önemli bir kısmı, genomun protein kodlayan bölgelerinde bulunur ve bu nedenle proteinin yapısını ve işlevini etkilemekle kalmayıp fenotipik bir etkiye de neden olabilir. Bazı SNP'ler aminoasit değişimlerine sebep olduğu için yabancıl tip rezidüde birtakım değişikliklere neden olmaktadır. SNP sonucu yabancıl tip rezidünün sahip olduğu boyut, yük, hidrofobiklik özelliklerinde değişim görülebilmektedir. Örneğin, boyutta görülen bir değişiklik proteinin bağlarını ve proteinin diğer moleküller ile bağlantılarını etkileyebilmektedir. Yükte görülen herhangi bir değişim sonucu yabancıl rezidünün diğer rezidüler ile yapacağı bağlantılar etkilenebilmektedir. Hidrofobiklikteki bir değişim ise yabancıl tip rezidünün hidrofobik etkileşimlerini etkileyebilmektedir.

Bir SNP'nin protein yapısı ve fonksiyonu üzerine olası etkileri hakkında bilgi elde etmek kolay değildir. Bununla birlikte, bu etkilerin tahmin edilmesini sağlayan bazı çevrimiçi web sunucuları bulunmaktadır. Bu sunucular, bir amino asit değişiminin patojenitesi hakkında sonuçlara varmak için çok çeşitli kaynaklardan alınan bilgileri kullanmaktadır. Çalışmamızda, literatür taramalarında daha önceden herhangi bir in silico

Çalışma yapılmadığı tespit edilen *PTK2* geninde bulunan SNP'lerin olası etkilerini in silico yöntemlerle araştırmak için bir takım evrimii yazılım araçları kullanılmıştır. Bu sayede, SNP sebebi ile oluşan aminoasit değişimlerinin ortaya çıkarabileceği sonuçların tahmin edilip yorumlanması gerçekleştirilmiştir (Hanka Venselaar ve ark.).

Çalışmamızda kullandığımız bu yapısal ve işlevsel etkilerin bilgisi, daha ileri deneylerin tasarımına yardımcı olabilecek ve sonunda daha iyi hastalık teşhisi ve hatta hastaları iyileştirmeye yardımcı olacak ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimorfizm

Bir popülasyondaki bir bölgede (lokusta) bulunan genin iki veya ikiden fazla alelinin belirli frekansta gözlenmesine polimorfizm denir. Genellikle mutasyonlar sonucu oluşurlar. Mutasyonlar DNA dizisine bir nükleotidin eklenmesi veya çıkması sonucu oluşabileceği gibi bir nükleotidin başka bir nükleotidle değişimi sonucu (tek nükleotid değişimi-SNP) da oluşabilirler. Proteinlerdeki aminoasitler, genlerde bulunan şifreye göre sıralanır. Bir gene ait farklı DNA sıralanması mevcutsa o gen polimorfiktir (Alberts B. 1993). Polimorfizm çeşitleri kısaca şunlardır: Kısa ardışık tekrarlar (mikrosatellitler; short tandem repeats, STR), değişken sayıda tandem tekrarlar (minisatellitler; variable numbers of tandem repeats, VNTR), sınırlayıcı enzim parça uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ve tek nükleotid polimorfizmidir (single nucleotide polymorphism, SNP) (Reece JB ve ark.)(Devrim ve Kaya,2004).

2.1.1. VNTR

İnsan genomundaki farklı sayıda birbiri ardına tekrarlayan bölgelere VNTR denir. Bu tekrarların daha kısa olan alt gruplarına ise STR adı verilmektedir. Genellikle 2-6 baz (baz çifti) uzunluktaki çekirdek ünitenin 10-50 kez ardı ardına tekrarından oluşmaktadır. Genellikle toplam olarak 100-400 baz çifti uzunluğundaki DNA tekrar üniteleridir (Edwards ve ark. 1992). Genom boyunca yaklaşık 500.000 STR lokusunun olduğu tahmin edilmektedir. Sık olarak iki nükleotid tekrarlarına rastlanmaktadır (Murphy 2007).

2.1.2. RFLP

Restriksiyon enzimleri vasıtasıyla DNA molekülü farklı boyuttaki fragmentlere bölünür ve elde edilen DNA parçaları jel elektroforez tekniği ile görünür hale getirilir. Bu işleme RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) denir. İlk restriksiyon haritası Simian Virüs 40 (SV40) DNA'sının HindIII restriksiyon enzimi ile parçalara ayrılması sonucu elde edilmiştir.

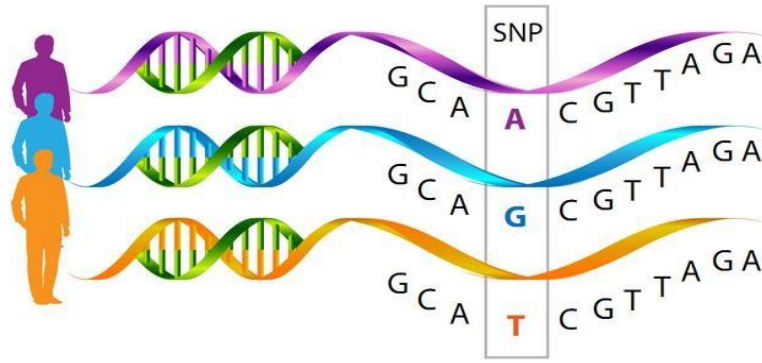
RFLP tekniği ökaryotik hücre genom analizlerinde ve birçok genetik hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. RFLP tekniği uygulama şekli ile kolay bir yöntemdir fakat çalışılan gen bölgesini farklı boyutlarda fragmentlere ayıracak uygun enzimin seçilmesi oldukça önemlidir. RFLP tekniği tatbikinden sonra elde edilen ürünler baz uzunluğuna göre uygun por çapı içeren agaroz jelle yüklenir ve etidyum bromür ile boyandıktan sonra jel elektroforezinde yürütölür daha sonra UV ışık altında gözlemlenmektedir. Elde edilen RFLP ürünleri -20°C’de kullanılmaya kadar saklanabilmektedir (Klug W S ve ark. 2011) (KOLÖREN ve ark.2017)

2.1.3.STR

Kısa ardışık tekrar dizileri, 2-6 baz çifti (bç) uzunluğundaki tipik kısa dizilerin ardarda tekrarlanmasından oluşurlar (Short Tandem Repeats-STR)(Gomolka M 1994). Aynı zamanda STR’lerin tekrar ünitelerindeki baz sayısı minisatellitlerden daha azdır. Bu sebepten dolayı bu lokuslara mikrosatellitler de denilmektedir. Bu bölgeler insan genomu boyunca dağılmıştır ve her 6-10 kb’de bir görölmektedir (Donbak L.2002 , Edwards A 1992). Genom içindeki 2, 3 veya 4 nükleotidlik ardışık tekrar dizilerinden en yaygın olanı ikili CA şeklindeki nükleotid tekrarlarıdır (Luleyap HU 2008). STR’ler basit, bileşik ve kompleks STR olmak üzere üç gruptan oluşmaktadır.

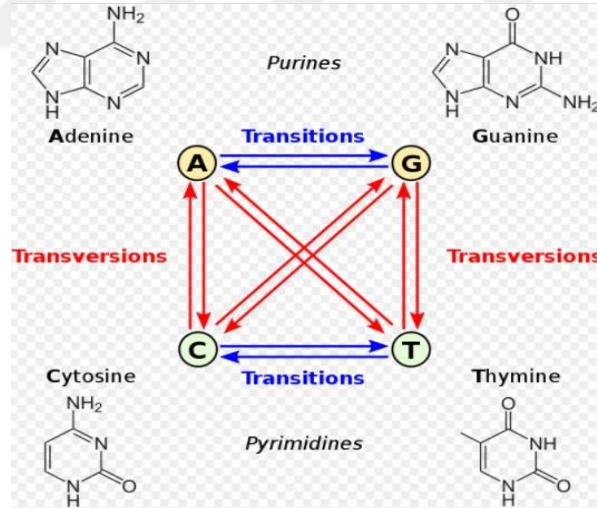
2.1.4. Tek Nükleotid Polimorfizmi

SNP iki birey arasındaki belli bir DNA parçasındaki tek baz farklılıklarıdır (Şekil 1). Bir popülasyondaki örnek bireyler arasında yüksek yer değıştirme (substitösyon) oranı gösteren nükleotid olarak da tanımlanabilir (Özden A. 2006). Transisyon veya transversiyon yoluyla DNA üzerinde her 2.000-2.500 bazda bir tek nükleotid değışimi görölmektedir (Reece JB). Bir pürin bazının diğer pürin bazına (A→G ya da G→A) ya da bir pirimidin bazının diğer pirimidin bazına (T→C ya da C→T) dönüşmesine transisyon denir(Şekil 2).



Şekil 1: Tek nükleotid polimorfizmi (<https://medium.com/sanogenetics/snp-of-the-week77753b4aea87>).

Bir pürin bazının (A, G) pirimidin bazlarından (C, T) birine dönüşmesine ise transversiyon denir (Russell PJ). Brookes (Reid E.) tarafından yapılan başka bir açıklamaya göre (allel sıklığı en az % 1 veya daha fazla olan) bazı popülasyonlardaki normal bireylerde bulunan farklı alelli genomik DNA’lardaki tek baz değişimine tek nükleotid polimorfizmi denilmektedir. Sık bir şekilde oluşan bu olay SNP’yi nadir nokta mutasyonlarından farklı kılar ve genetik markör olarak seçilmesini sağlar. SNP markörleri biçimsel olarak tek nükleotid ekleme veya çıkarımlarını içermez (Collins DW 1994).



Şekil 2: Transisyon ve transversiyon gösterimi

(https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html)

SNP’ler, genin kodlanan dizilerinde veya genin kodlayıcı olmayan bölgeleri veya genler arası bölgelerde (genler arasındaki bölgeler) yer alabilir. Genin kodlama

bölgesindeki SNP'ler iki türe ayrılır: Sinonim ve nonsinonim SNP'ler. Sinonim SNP'ler, proteinin amino asit dizisini değiştirmez veya protein fonksiyonunu etkilemez. Nonsinonim SNP'ler ikiye ayrılır: Yanlış anlamlı (missense) ve saçma (nonsense) SNP'ler. Yanlış anlamlı bir SNP'de, tek nükleotid değişikliği farklı bir amino asidi kodlayan bir kodonla sonuçlanır ve bu da protein işlevsizliğine neden olabilir. Saçma SNP ise bir DNA dizisindeki bir sonlanma kodonuna dönüşen nokta mutasyonu olup işlevsel olmayan bir protein ürünüyle sonuçlanır (Sukhumsirichart, W. 2018). Nonsinonim bir varyant, protein fonksiyonunu değiştirirse, bu değişikliğin ciddi fenotipik sonuçları olabilir. Bu değişikliklerin çoğu sağlığa zararlıdır ve bu nedenle sonunda seçim yoluyla ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, faydalı mutasyonlar popülasyona sabitlenebilir, böylece türlerin farklılaşmasına katkıda bulunabilir (Ng ve Henikoff, 2006). Sinonim varyantlar yakın zamana kadar sessiz mutasyonlar olarak adlandırılıyordu. Ancak birkaç sinonim mutasyonun mRNA splicing ve stabilitesini, gen ifadesini ve protein katlanmasını ve fonksiyonunu etkilediği bildirilmiştir (Sauna, Kimchi-Sarfaty 2011).

Amino asit değişimlerinin protein yapısı ve işlevi üzerindeki etkisi, SNP'lerin neden olduğu insan hastalıklarının karmaşık işleyişlerini anlamak için oldukça önemlidir. SNP'ler, hastalığa yatkınlık hakkında bilgi almak için belirlenen biyobelirteçlerdir (Ng ve Henikoff, 2006). Hastalıklarla ilişkili aday genlerdeki SNP'ler üzerine yapılan çalışmalar, son yıllarda dikkate değer bir artışa tanık olmuştur (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

SNP'ler sonucu meydana gelen zararlı mutasyonların etkilerinin tahmini teşhis ve ilaç tasarımı için kullanılabilir. Polimorfizmlerin meydana getirmiş olduğu aminoasit değişimleri sonucu boyut, yan zincir polaritesi, yan zincir esnekliği gibi amino asit özellikleri ve bir hidrojen bağı oluşturma yeteneği ve diğer geometrik hususlar ile protein stabilitesi, reseptör-ligand kompleksinin afinitesi ve yapısal esneklik gibi 3D protein yapısal özellikleri, dizi koruma ve filogenetik ağaçlar gibi evrimsel özellikler hakkında bilgi elde edebiliriz (Teng S.ve ark.).

2.2.Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik, biyolojik bilgilerin elde edilmesi ve depolanması için veritabanlarının meydana getirilmesidir. Günümüzde bilginin saklanması için kullanılan ve etkili ulaşma

izin veren en güvenli araç veri tabanı programlarıdır. Veri tabanı, toplanan bilgileri işleyebilen, istenen sonuçları kolaylıkla hazırlayabilen bir bilgisayar programıdır (Bayat A ve ark.2002). Biyolojik sistemler ve olaylar ile ilgili elde edilen bilgilerin sağlıklı biçimde kullanılması interdisipliner bir bilim dalı olan biyoinformatik sayesinde gerçekleşir. Biyoinformatik biyoloji yanında biyokimya, kimya ve tıp ile bilişim bilimleri, matematik ve istatistiğinin birbirleri ile bağlantısı sonucu doğan yeni bilgileri elde etmemizi sağlar. (Luscombe NM ve ark. 2001)

Biyoinformatik, biyolojik sorunların açığa kavuşturulmasında bilişim teknolojilerinin kullanılması esasına dayanmaktadır (Luscombe NM ve ark.2001). Bunun yanı sıra maddi değeri yüksek olan laboratuvar çalışmalarına yol gösterip ön bilgi sunması sebebi ile daha makul maddi gereksinim ile laboratuvar çalışmalarının yapılmasını kolaylaştırır ve deneylerde kullanılacak deney hayvanlarının sayısını da biyoinformatik analizler sayesinde azaltılabilmektedir. Genomik sekansları destekleyen biyolojik veritabanlarının oluşturulması ve işletilmesi ile biyolojik problemlerin çözümü daha kolay olacaktır (Telefoncu A. Ve ark.2003).

İn siliko yöntemler , bilgisayar veya simülasyonlar yardımı ile ortaya çıkan çalışmalardır (Vivona ve ark.2008). İn siliko çalışmaları, ucuz olmayan laboratuvar deneyleri ve klinik araştırmalara olan talebin azalmasını sağlar. İn siliko teknikler, protein tasarımı, hücre davranışlarının modellenmesi, biyoproses optimizasyonu ve benzeri alanlarda tercih edilmektedir (Lescot 2002), (Wishart 2006). Deneysel yaklaşımla etkileşim tespitine destek sağlama ve alternatif oluşturmak için çeşitli in silico yöntemler geliştirilmiştir. İn siliko tespit, yapı, dizilim, gen komşuluğu, gen birleşimi, filogenetik ağaç ve gen ifadesine dayalı yaklaşımları içerir (Vivona ve ark.2008).

İnsan popülasyonunun 67.000–200.000 ortak nonsinonim SNP'ye (nsSNP'ler) sahip olduğu tahmin edilmektedir (Cargill M ve ark. 1999), (Halushka MK ve ark.1999), (Livingston RJ ve ark.2004) ve her bir kişinin 24.000–40.000 nsSNP için heterozigot olduğu düşünülmektedir (Cargill M ve ark. 1999). Her nsSNP'nin protein işlevi üzerindeki etkisini deneysel olarak karakterize etmek zaman alıcı, zor ve pahalı olabilmektedir. Ancak bir amino asit değişikliğinin uygunluk üzerinde büyük bir etkisi

olabileceğinden, bir amino asit değişiminin protein işlevini etkileyip etkilemediğini tahmin edebilen bir in silico hesaplama yöntemi, araştırmacıların ek çalışma için aminoasit değişimlerini önceliklendirmesine yardımcı olmaktadır (Ng ve Henikoff, 2006). Bu amaçla çok sayıda dizi ve/veya yapıya dayalı amino asit değişikliği tahmin yöntemi kullanılmaktadır. Biyoinformatik analizler yardımıyla hastalıklarla bağlantılı olan SNP'leri açığa kavuşturmak için ilk önce in silico araçlar kullanarak SNP'lerin tahmini olarak zararlı etkilerini bulmak ve elde edilen bulgulara göre genotipleme çalışmalarını planlamak günümüzde tercih edilen yaklaşımlardan biridir (ERSOZ ve ark.2019).

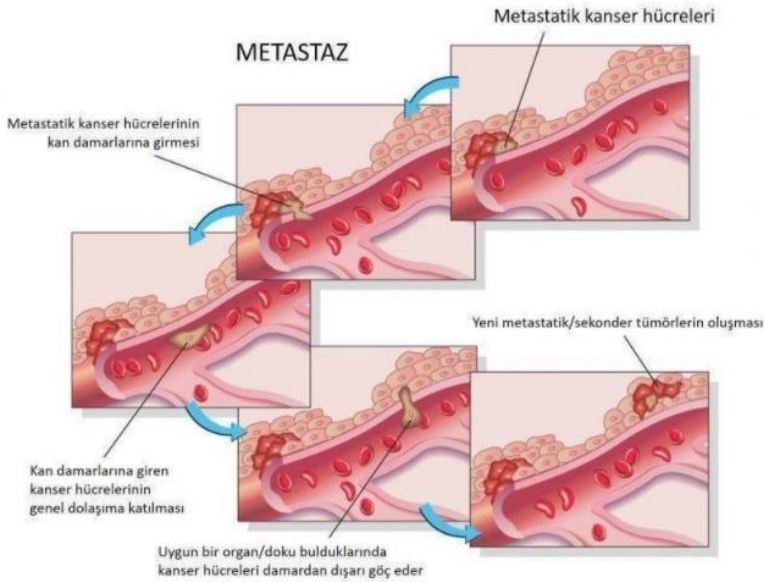
Örneğin, bir araştırmada çeşitli biyoinformatik algoritmaları uygulayarak GBA1 genindeki en sık Gaucher Hastalığına bağlı tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) analiz etmiştir (Veysel Oğulcan ve ark.). Başka bir çalışmada ise , farklı biyoinformatik yöntemleri entegre ederek, papiller tiroid karsinomu ile ilişkili hedef genleri ve yolları bulmak hedeflenmiştir. Bu amaçla in-silico metodolojiler kullanılarak hastalık gelişim mekanizmalarını açıklayabilecek aday genler ve yollar belirlenir (ERSOZ ve ark.).

2.3. Karsinogenez

Kanser hastalığı, farklı genetik, epigenetik ve transkripsiyonel özelliğe sahip kanser hücrelerinden oluşan, kanser hücrelerinin heterojen fonksiyonel popülasyonlarını oluşturan, teşhisi ve tedavisi için büyük bir engel oluşturan oldukça çeşitli ve karmaşık bir hastalıktır (Kreso ve ark. 2014) (Yachida ve ark. 2010). Kanser hücrelerinin işlevsel durumlarını kapsamlı ve yeterli bir şekilde çözmek çok önemlidir (Meacham ve ark.2013). Genel olarak kanser oluşumu üç evrede meydana gelmektedir. Bunlar başlangıç (inisiasyon), gelişme (promosyon) ve ilerleme (progresyon) evreleridir. Kanser multifaktöryel bir hastalıktır. Kanser oluşumunda bakteriler, virüsler, radyasyon, beslenme alışkanlığı ve çevresel faktörler gibi birçok faktör etkilidir (Williams ve ark.2001). Bir kez kanserojene maruz kalmak kanser oluşumunu sağlamaz, kanser oluşumunda önemli olan sürekli ve düzenli bir şekilde kanserojene maruz kalmaktır.

2.3.1. Metastaz

Vücutta kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun diğer bölgelerindeki doku ve organlara göç etmesi olayına metastaz denir. Bu olay angiogenez, invazyon, migrasyon, motilite, ekstrasvazyon ve proliferasyon gibi birbirleriyle bağımlı olan bir dizi kompleksli ve birçok basamağı bulunan olaylar zinciri ile gerçekleşir (Poste G, Fidler IJ.1980). İlk olarak, tümör hücreleri yeni damar oluşumunu uyarırlar ve sonra komşu hücrelerle olan bağlarını kopararak primer tümör dokusundan ayrılırlar. Dokudan ayrılıp ilerleyen hücreler çevre dokulara erişirler veya bir damar ile karşılaştığında damarın duvarını da eriterek damar içine nüfus eder ve daha sonra damar içindeki kanla birlikte vücudun içinde göç etmeye (metastaz) başlar.(Şekil 3) Tümör hücrelerinin damar içindeki yolculuğu sırasında belli organlardaki damar yüzeyine bu hücreler adezyon yapar. Adezyon yapan kanser hücresi tutunduğu bölgede damar duvarını tekrar eritmeye başlar ve hedef dokuya nüfus ederek çoğalmaya devam eder (Song Y ve ark.2008). Bu sayede yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürürler (İbrahim H. Güllü,İbrahim Akalın2005). Fakat bu yayılma süresi boyunca kanserli olan hücreler oluşmaya başladığı doku veya organdan başka bölgelere sıçrayıp yerleşse de en başta ortaya çıktığı tümör ile aynı ismi taşır (İbrahim H. Güllü,İbrahim Akalın 2005).



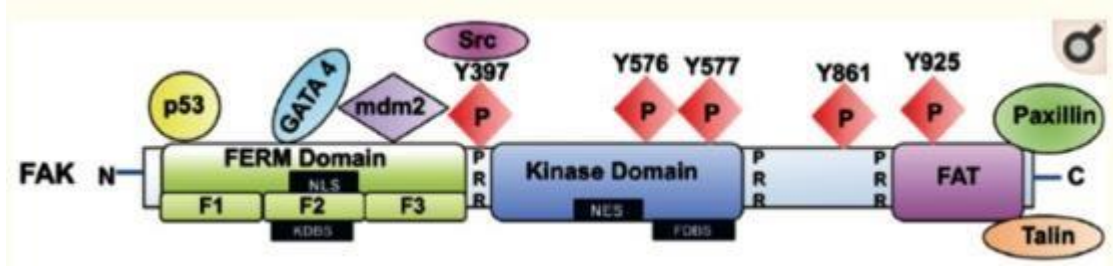
Günümüzde yapılan araştırmalarda mezastazın gerçekleşmesini sağlayan iki etken olduğu belirlenmiştir. Bunlardan biri epitel hücrelerinin tüm özelliklerini kaybetmesinin ardından mezenkimal özellik kazanmasını sağlayan epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasıdır. Diğer etken ise metastaz ile ilişkili hücre sinyal yollarıdır. Epitel hücrelerin bir çok morfolojik ve biyokimyasal değişimlerin etkisi altında kalması sonucunda epitel özelliklerini kaybederek mezenkimal özellik kazanmasına epitel mezenkimal geçiş (Epitelial Mezenkimal Transition) denilmektedir (Hafize Seda VATANSEVER 2016).

Epitel mezenkimal geçiş embriyonik gelişimde, yaraların iyileşmesinde ve tümör hücrelerinin vücudun başka bölgelerine yayılması esnasında görülen bir mekanizmadır. Embriyonik gelişim süresi boyunca epitel hücreleri organizmanın farklı bölgelerine göç ederek morfogenez sırasında farklı dokuları oluşturmak üzere değişirken, özellikle tümör hücrelerinde ise metastaz oluşumu mekanizmasında gözlenmektedir. Epitelial hücrelerin mezenkimal hücrelere değişmesi, göçü ve dokuya tekrar yerleşiminde gerektiğinde tekrar epitelial hücrelere dönüşü birçok mekanizmalar ile kontrol edilmektedir (Hafize Seda VATANSEVER 2016).

Kanserin ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan altı biyolojik yeteneği içerir. Bunlar, proliferatif sinyalleme sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçmak, hücre ölümüne direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi indüklemeye ek olarak istila ve metastazı aktive etmektir (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu ayırt edici özelliklerin temelinde, genom istikrarsızlığı ve birden fazla ayırt edici işlevi teşvik eden iltihaplanma vardır (Lisa ve Zena 2002).

2.4) Fokal Adezyon Kinaz Proteini (FAK)

Fokal adezyon kinaz (FAK) olarak da bilinen *PTK2* (protein tirozin kinaz 2, *PTK2*), insanlarda *PTK2* geni tarafından kodlanan bir proteindir (André ve Becker-André 1993). *PTK2* geni, insanlarda 8q24'te kromozomu üzerinde bulunur.



Şekil 4:FAK yapısı.(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4305513/>)

FAK yapısında N-terminali (FERM alanı dahil), merkezi kinaz ve C-terminal alanları vardır. FAK'ın N-terminal alanı, F1, F2 ve F3 alt alanlarından oluşan FERM domeinini içerir. FAK, N-terminalinin sonunda ve kinaz alanının başlangıcında yer alan tirozin Y397'de otofosforile edilir ve protein üzerinde dört ek tirozin fosforilasyon bölgesi (Y576, Y577, Y861 ve Y925) vardır (Şekil 4). Y397'nin fosforilasyonu, FAK tarafından kontrol edilen çoğu biyolojik aktivite için kritiktir ve FAK lokusunun Y397 rezidüsü eksik olan bir mutant tarafından değiştirildiği bir fare modeli, embriyonik letalite gösterir (Corsi JM 2009). Y397 fosforilasyonunun ardından, Src tirozin kinaz Y397 bölgesine bağlanır ve FAK-Src kompleksi ayrıca kinazın katalitik aktivitesi için önemli olan aktivasyon döngüsü Y576 / 577 bölgelerini fosforile eder. P53, Mdm-2 ve büyüme faktörü reseptörleri gibi birçok düzenleyici protein, FAK'ın FERM alanına bağlanır. FAK'ın C-terminal alanı, iki tirozin bölgesi, Y861 ve Y925 içeren bir FAT (fokal adhezyon hedefleme) alanı içerir (Şekil 4); FAK'ın bu sitelerdeki fosforilasyonu, SH2 (Src homoloji-2) alanları için bağlanma yerleri yaratırken, prolin bakımından zengin bölgeler (PRR), SH3 alanı içeren proteinler için bağlanma yerleri sağlar. FAT alanı, paxillin ve talin gibi fokal yapışma proteinleri yoluyla dolaylı olarak integrin reseptörleri ile birleşir (Hyunho Yoon ve ark.2015).

Fokal adezyon kinaz proteini; hücre göçü, adezyonu, yayılması, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, fokal adezyonların ve hücre çıkıntılarının oluşumu ve çıkıntıların ayrıştırılması, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan reseptör olmayan protein-tirozin kinazdır. Aynı zamanda kas lifi kuvvetinin yanıl iletiminde rol oynayan yapısal bir proteindir (Erskine ve ark.2012). Erken embriyonik gelişim ve plasenta gelişimi için gereklidir. Embriyonik

anjyogenez, normal kardiyomiyosit göçü ve proliferasyonu ve normal kalp gelişimi için gereklidir. Akson büyümesini ve nöronal hücre göçünü, akson dallanmasını ve sinaps oluşumunu düzenler; sinir sisteminin normal gelişimi için gereklidir. Osteogenezde ve osteoblastların farklılaşmasında rol oynar (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q05397>). FAK, hem katalitik hem de iskele aktivitesine sahiptir ve Ras / mitojen ile aktive olan protein kinaz yolu, fosfatidilinositol 3'-kinaz / Akt yolu ve Rho ailesi GTPazlar dahil olmak üzere bir dizi yolun aktivasyonu ile downregüle sinyallerini tetikler (Wei Fu ve ark.2012). İntegrin sinyal transdüksiyonunda ve aynı zamanda çok sayıda büyüme faktörü reseptörünün, G-proteinine bağlı reseptörlerin (GPCR), EPHA2, netrin reseptörlerinin ve LDL reseptörlerinin downregüle sinyalizasyonunda işlev görür (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q05397>).

FAK fonksiyonları iki ana kategoriye ayrılabilir bunlar; kinaza bağımlı ve kinazdan bağımsızdır. FAK kinaza bağımlı fonksiyonlar sıklıkla, FAK'ın hem normal hem de kanser hücrelerinde hücresel göç ve adezyonda önemli bir rol oynadığı fokal adezyonlarda integrin ile ilgili sinyal yolları ile ilişkilidir (Cary LA ve ark.1996). FAK ayrıca bir yapı iskelesi olarak işlev görür ve kinazdan bağımsız işlevleri yoluyla proteinprotein etkileşimlerine katılır. İlginç bir şekilde, FAK'ın çekirdekte lokalize olduğu ve p53 bozunması yoluyla hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını desteklemek için doğrudan p53 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Golubovskaya VM ve ark.2008). Bu, kinazdan bağımsız bir tarzda meydana gelen çekirdekte FAK'ın yeni bir fonksiyonunu gösterir.

FAK'ın kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olduğu öne sürülmüştür (Van Nimwegen ve ark.2007). FAK kinaz inhibitörü TAE226, meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (Golubovskaya VM ve ark.2008). Başka bir grup, meme karsinogenezini bloke etmek için Src kinaz inhibitörü SKI-606'yı kullanmıştır ve FAK fosforilasyonunu engellediğini ve insan meme kanseri hücre göçünü ve invazyonunu baskıladığını bulmuştur (Vultur A ve ark.2008). ATP bağlanma bölgesini hedefleyen başka bir inhibitör PF-271, FAK fosforilasyonunu ve göğüs kanseri tümör oluşumunu bloke eder (Roberts WG ve ark.2008). Y15 olarak adlandırılan yeni FAK inhibitörü veya

FAK'ın Y397 bölgesini hedefleyen bileşik 14 de göğüs tümör oluşumunu bloke etmiştir (Golubovskaya VM J Med Chem. 2008). Son zamanlarda, yeni FAK kinaz inhibitörü PND1186, göğüs tümörünün ilerlemesini ve akciğer metastazlarının kendiliğinden göğüse doğru ilerlemesini engellemiştir (Walsh C , Tanjoni I 2010).

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücrelerin epitel fenotiplerini yitirdiği, bir mezenkimal fenotip aldığı, disosiye olduğu ve bazı fizyolojik veya patolojik koşullar altında daha hareketli ve istilacı hale geldiği bir süreçtir. Bu morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler ile ilişkili olan, epitelyal / mezenkimal hücrelerin protein markörlerinin ekspresyonundaki değişikliklerdir. EMT, embriyojenez ve doku rejenerasyonu sırasında önemli bir işlemdir ve patolojik olarak EMT, kanser progresyonu ve metastazında önemli bir rol oynayabilir. Büyüme faktörleri (örn., TGF- β), Src ve Wnt gibi EMT işlemine katılan birkaç onkojenik sinyal yoluna ek olarak, hücre dışı matris gibi mikro çevre faktörleri de rol oynar. Bu faktörlerin birçoğu FAK'ı düzenlediğinden, karsinogenez ve kanser metastazı sırasında FAK'ın önemli bir fonksiyonu EMT'yi düzenleyebilir. (Kalluri R.2009).

2.4.1. PTK 2 Genindeki SNP'ler Üzerine Yapılan Çalışmalar

Protein tirozin kinaz-2 (*PTK2*) geni, kas lifi kuvvetinin yanıl iletiminde rol oynayan yapısal bir protein olan fokal adezyon kinazı kodlar (Erskine ve ark. 2012). Fokal yapışma (adezyon), hücre sağkalımı için kritiktir. Fokal adezyon kinazı insan interaktomunun önemli bir bileşenidir ve bu nedenle, potansiyel bir uzun ömürlülükle ilgili proteindir (Garatachea ve ark., 2014). Aşağıda *PTK2* genindeki SNP'ler ile bireyler arasında uzun ömürlülük ve bireyler arasında iskelet kası kuvvetinin değişkenliği üzerine yapılan çalışmalara bazı örnekler verilmiştir:

Erskine ve ark. (2012) Kafkas toplumunda yapmış oldukları çalışmada, *PTK2* geninin tek nükleotid polimorfizmlerinin (rs7843014 ve rs7460), insan iskelet kası kuvvetinin çeşitli indeksleri ve direnç eğitime verilen kuvvet yanıtlarındaki bireyler arası değişkenlikle ilişkili olup olmadığını araştırmıştır. Bu çalışmada, kas spesifik kuvveti ile *PTK2* SNP'leri arasındaki ilişkilerin, kuvvetin kas liflerinden tendona iletilme biçiminde

bireyler arası farklılıkların var olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir (Erskine ve ark.2012).

Bir başka çalışmada, *PTK2* genindeki rs7843014 ve rs7460 polimorfizmleri ve istisnai uzun ömür (EL) arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada, İspanyol, İtalyan ve Japon olmak üzere üç farklı kohortta, yüz yaşını aşmış bireyler ve sağlıklı kontroller arasında bu iki SNP'nin genotip/allel sıklığı incelenmiştir. Sonuç olarak, FAK geninin iki genotipinin, rs7460 TT ve rs7843014 CC, muhtemelen daha düşük gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve İspanyol popülasyonunda uzun ömre ulaşma olasılığını destekleyebildiği rapor edilmiştir. İtalyan veya Japon kohortları için hiçbir ilişki bulunamadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, FAK ekspresyonunun belki de yaşlanma oranını etkileyebileceği mekanizmaları ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Garatachea ve ark., 2014).

Stebbing ve arkadaşları yapmış olduğu bir çalışmada, sağlıklı erkeklerde insan kas gücü fenotipleri ile ilişkiler için *PTK2*'de bulunan iki SNP (rs7843014 ve rs7460) araştırılmıştır. *PTK2* rs7843014 ve rs7460 için genotip ve alel frekansları, Kafkas popülasyonlarında önceki raporlara (Erskine ve ark. 2012) benzer olduğu bildirilmiştir (Stebbing ve ark.2017)

2.4.2 PTK 2 Geninin İlişkili Olduğu Hastalıklar

Büyük çoğunlukla Anormal *PTK2* / *FAK1* ekspresyonu, kanser hücresi proliferasyonunda, göçünde ve invazyonunda, tümör oluşumu ve metastazında rol oynayabilir. *PTK2* / *FAK1* aşırı ekspresyonu birçok kanser türünde görülür. FAK proteini, nöroblastom, pankreas kanseri, yumurtalık, servikal, osteosarkom, böbrek kanseri, akciğer kanseri, baş boyun kanseri, ağız kanseri, hepatosellüler karsinom, kolon kanseri, prostat kanseri, beyin kanseri, melanom, tiroid kanseri, akut miyeloid lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde eksprese edilir.(Vita M. Golubovskaya 2010)

Kanser hastalığı dışında bir çok hastalık ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Bunlar, Üçlü A sendromu (Achalasia-Alacrima Sendromu), Charcot-Marie-Tooth Hastalığı,

Kombine Oksidatif Fosforilasyon Eksikliği⁸, Yumurtalık Yetmezliği ile Progresif Lökoensefalopati , GABA Transamin Eksikliği, Tangier Hastalığı , Hipoalfalipoproteinemi 1, Doğuştan otozomal resesif İhtiyoz 4A, Sürfaktan Metabolizma Disfonksiyonu Pulmoner 3 hastalığıdır (<https://www.omim.org/entry/231550>).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız bir *in silico* analiz çalışmasıdır. *PTK2* genindeki SNP'lerin *in silico* analizlerinde, kamuya açık ve çevrimiçi erişim sağlanabilen çeşitli yazılım araçları kullanılmıştır.

3.2. Veri Eldesi

PTK2 genine ait bilgilere ve SNP verilerine ulaşmak için NCBI, NCBI dbSNP ve UniProt veritabanları kullanılmıştır. Veri tabanları ile ilgili açıklamalar aşağıda özetlenmiştir.

3.2.1. NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) sağlık, biyomedikal, genomik ve biyoteknoloji gibi çok geniş alanlarda birçok bilgiye ulaşmamızı sağlayan bir veritabanıdır. *PTK2* geni ile ilgili bilgiler ve erişim numarası NCBI veri tabanından temin edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.2. NCBI dbSNP

Tek Nükleotid Polimorfizm veritabanı (dbSNP), basit genetik polimorfizmlerin geniş bir koleksiyonu için kamuya açık bir arşivdir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). *PTK2* genindeki SNP'lere ulaşmak için dbSNP veritabanı kullanılmıştır. Bu SNP'lerden yanlış anlamlı olanlar (missense) bir sonraki analizler için belirlenmiştir.

3.2.3. UniProt

UniProt, serbestçe erişilebilir bir proteinin aminoasit dizisi ve işlevsel bilgi veritabanıdır. Bu çalışmada *PTK2* geninin ürünü olan fokal adezyon kinaz 1'in protein dizisi (FASTA format) ve erişim numarasının (UniProtKB) temin edilmesinde kullanılmıştır (<https://www.uniprot.org/>).

3.3 Zararlı SNP'lerin Biyoinformatik Araçlar ile Tahmini

SNP'lerin protein yapısı ve fonksiyonu üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek amacıyla SIFT (KAMAN ve ark. 2019)(Nithya ve ark.2019), PolyPhen-2 (ÖZKAN OKTAY ve ark. 2019), PROVEAN (Abdulazeez ve arkadaşları, 2019)(Choi Y ve ark.2012), MutationAssesor (Reva, Antipin & Sander, 2011) ve SNAP2 (Reeb ve ark.2020) yazılım araçları kullanılmıştır (Pereira ve arkadaşları, 2019).

3.3.1 SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)

SIFT, proteindeki bir amino asit değişiminin amino asitlerin sekans homolojisine ve fizyokimyasal özelliklerine bağlı olarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin eden bir programdır. SIFT, belirli bir pozisyondaki bir amino asit değişikliğinin tolere edilme olasılığını hesaplamaktadır. SIFT programındaki cutoff değeri ≥ 0.05 bir tolerans değeridir. Aminoasit değişiminin < 0.05 bir değere sahip olması vücuda zararlı olarak tahmin edilirken > 0.05 bir değere sahip olması ise tolere edilebilir olduğu şeklinde tahmin edilmektedir (Ng PC ve ark.2003)(Kaur T ve ark.2017)(<https://sift.bii.aster.edu.sg/>)

3.3.2 PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)

PolyPhen-2 yazılım aracı bir aminoasit değişiminin bir insan proteininin yapısı ve işlevindeki tahmini etkisini, doğrudan, fiziksel ve karşılaştırmalı değerlendirmeler kullanarak tahmin eden bir araçtır (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Tahmin sonuçları zarar verici ya da tehlikesiz şeklinde elde edilmektedir. PolyPhen-2, SNP veya DNA seviyesinden ziyade protein dizisi seviyesiyle sınırlıdır. PolyPhen-2 çıktısı, 0 ile pozitif sayı arasında değişen bir skor içerir ve sıfır, aminoasit değişiminin protein fonksiyonu üzerindeki nötr etkisini gösterir. Tersine, büyük bir pozitif sayı, değişimin protein fonksiyonu için zararlı olduğunu gösterir. Bu tür puanlama, SNP'lerin önemlerine göre sıralanması, protein fonksiyonu üzerindeki etkinin ciddiyetinin kantitatif değerlendirmesini mümkün kılmak için gerçekleştirilebilmesi sebebi ile faydalıdır (Ng, P.C. ve Henikoff, S. 2006). Polyphen-2 yazılım aracının HumDiv ve Humvar olmak üzere iki farklı tahmin modeli bulunmaktadır. HumDiv, yoğun nadir alelleri

değerlendirmek, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ile belirlenen bölgelerin haritalanması ve doğal seçilimin analizi için tercih edilen modeldir. HumVar, şiddetli etkilere sahip mutasyonları, bol miktarda hafif derecede zararlı aleller dahil olmak üzere geri kalan tüm insan varyasyonlarından ayıran Mendel hastalıklarının teşhisi için tercih edilen modeldir (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

3.3.3. PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer)

PROVEAN bir amino asit değişiminin veya indelin bir proteinin biyolojik işlevi üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını tahmin eden bir yazılım aracıdır (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php).

3.3.4. Mutation Assessor

Bu sunucu, kanserde keşfedilen mutasyonlar veya yanlış anlamlı polimorfizmler gibi proteinlerdeki amino asit yer değişimlerinin işlevsel etkisini tahmin etmektedir (<http://mutationassessor.org/r3/>).

3.3.5. SNAP2

SNAP2 yazılım aracı kullanılarak mutasyonların fonksiyonel etkileri ile tahmin edilebilmektedir. SNAP2, "sinir ağı" adı verilen bir öğrenme cihazına dayanan eğitilmiş bir sınıflandırıcıdır. Çeşitli sekans ve varyant özelliklerini hesaba katarak etkili ve nötr varyantlar / sinonim olmayan SNP'ler arasında ayrım yapmaktadır. Tahmin için en önemli giriş sinyali, otomatik olarak oluşturulan çoklu dizi hizalamasından alınan evrimsel bilgidir. Ayrıca tahmin edilen ikincil yapı ve solvent erişilebilirliği gibi yapısal özellikler de dikkate alınır (<https://roslab.org/owiki/index.php/Snap2>) (Bromberg ve ark.2007)

3.4. SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmini

3.4.1. I-Mutant 2.0

I-Mutant 2.0, tek nokta mutasyonlarında protein stabilite değişikliklerinin otomatik olarak tahmin edilmesi için destek vektör makinesi (SVM=Support Vector Machine) tabanlı bir araçtır. I-Mutant2.0 tahminleri, ya protein yapısından ya da daha da önemlisi

protein dizisinden başlayarak gerçekleştirilir. I-Mutant2.0, hem mutasyon üzerine protein stabilitesi değişikliğinin işaretini tahmin etmek için bir sınıflandırıcı olarak hem de ilgili Delta-DeltaG değerlerini tahmin etmek için bir regresyon tahmincisi olarak kullanılabilir. Bir sınıflandırıcı olarak hareket eden I-Mutant 2.0, yapısal veya sekans bilgisinin kullanımına bağlı olarak, veri setinin sırasıyla % 80 veya % 77'sini doğru bir şekilde tahmin eder (Capriotti, Fariselli & Casadio, 2005), (<https://folding.biofold.org/i-mutant/imutant2.0.html>)

3.4.2. MUpro

Tek amino asit mutasyonlarından kaynaklanan protein stabilitesi değişikliklerinin doğru tahmini, protein yapılarını anlamak ve yeni proteinler tasarlamak için önemlidir. Hem sekans hem de yapısal bilgidен yararlanarak tek amino asit mutasyonları için protein stabilite değişikliklerini tahmin etmek için destek vektör makineleri kullanılmaktadır.

Yöntemi; protein stabilitesi değişikliklerini yalnızca birincil dizi bilgisini kullanarak doğru bir şekilde tahmin edebildiğinden, üçüncül yapının bilinmediği ve üçüncül bilgi gerektiren önceki yöntemlerin büyük bir sınırlamasının üstesinden gelerek birçok duruma uygulanabilir (Cheng ve ark.2005) (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>)

3.5. Üç Boyutlu Modelleme

3.5.1 Project HOPE

Project HOPE, üç boyutlu protein yapısı üzerindeki hesaplamaları, UniProt veritabanındaki dizi açıklamalarını ve Refseq yazılımındaki tahminleri de ele alan bir çok kaynaktan temel bilgileri elde eden bir yazılım aracıdır. HOPE, protein yapısında ortaya çıkan mutasyonun etkisini belirlemek için bu bilgileri birleştirir ve yabanıl ile mutant tip amino asitlerin, proteinin üç boyutlu yapısındaki değişimlerin, modellemeler aracılığıyla tahmin edilmesine yardımcı olur. Proteinin mutant ve yabanıl tip modellerinin karşılaştırılarak yorumlanmasını sunar ve sonucunda zararlı olduğu tahmin edilen SNP lerin modelleri Project HOPE programı ile görselleştirilir (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

Bu tez çalışmasında fonksiyonel analizler sonucu zararlı olabileceği tahmin edilen

SNP'lerin olası etkileri oluşturulan modeller üzerinden değerlendirilerek doğrulanacaktır.

3.6. Gen-gen Etkileşimlerinin Belirlenmesi

3.6.1. GeneMANIA

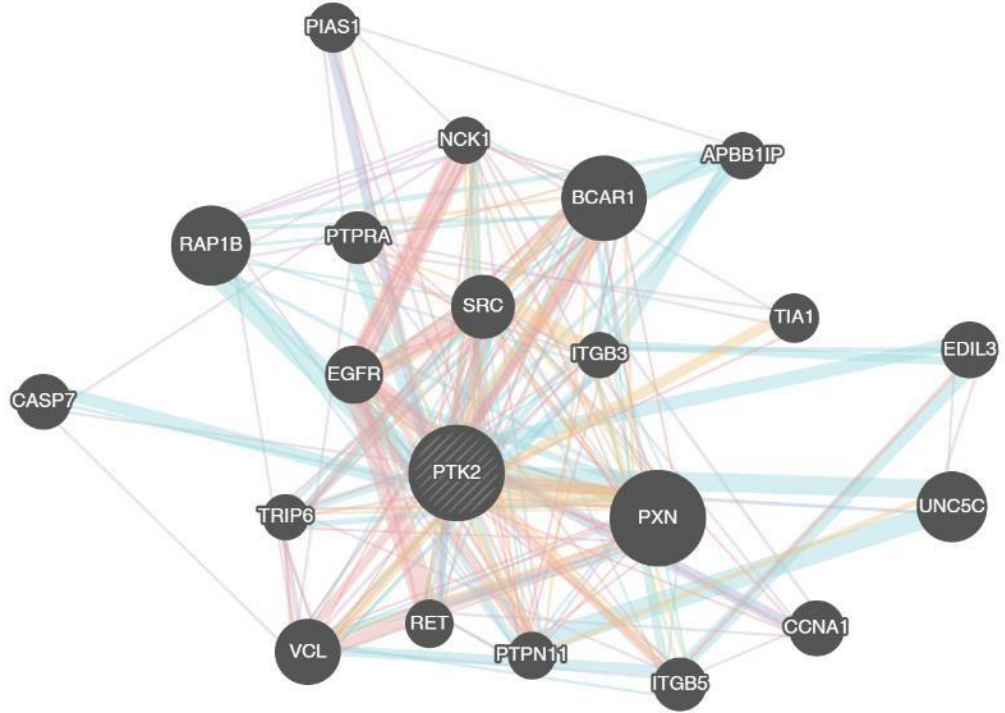
GeneMANIA, çok geniş bir fonksiyonel ilişki verisini kullanarak bir dizi gen ile ilişkili diğer genleri bulmaktadır. İlişkilendirme verileri arasında protein ve genetik etkileşimler, birlikte ifade, birlikte yerleştirme ve protein alanı benzerliği bulunmaktadır. GeneMANIA bir yolun veya kompleksin yeni üyelerini bulmak, gözden kaçırmış olabileceğimiz ek genleri bulmak veya protein kinazlar gibi belirli bir işlevi olan yeni genler bulmak için kullanılabilir (https://genemania.org/).

4. BULGULAR

4.1. Veri Eldesi

4.1.1 Gen-gen ilişkileri

Şekil 6’da gen-gen etkileşim sonuçlarına ait etkileşim ağı verilmiştir. Buna göre, PTK2 geninin 20 gen ile ilişkisi değerlendirildiğinde, bu genler arasında toplam 325 bağlantı olduğu belirlenmiştir (<https://genemania.org/>).



Şekil 5: PTK2 gen-gen etkileşim ağı (<https://genemania.org/search/homo-sapiens/ptk2/>)

GeneMANIA yazılım aracı vasıtasıyla genler arasındaki fiziksel etkileşimler, birlikte eksprese edilen genler, birlikte lokalize olan genler, genetik etkileşimler ve ortak protein domainleri hakkında bilgi elde edilmiştir. GeneMANIA yazılım aracı ile elde edilen bilgilerde PTK2 geni ile birlikte eksprese olan genler VCL, PIAS1, BCAR1 ve CASP7 olarak belirlenmiştir. UNCC5C, SRC, CCNA1, PIAS1 ve RET genleri ise PTK2 geni ile beraber lokalize olan genlerdir. Elde edilen bir diğer bilgi ise PTK2 geni ile fiziksel

etkileşimde bulunan genlerdir. Bunlar, EGFR, PXN, BCAR1, SRC, ITGB5, NCK1, ITGB3 ve CCNA1 genleridir. PXN, BCAR1, RAP1B, VCL, SRC, EDIL3, CASP7 ve RET genleri PTK2 geni ile bazı noktalarda sinyal yolları ile etkileşim halindedir (<https://genemania.org/search/homo-sapiens/ptk2/>).

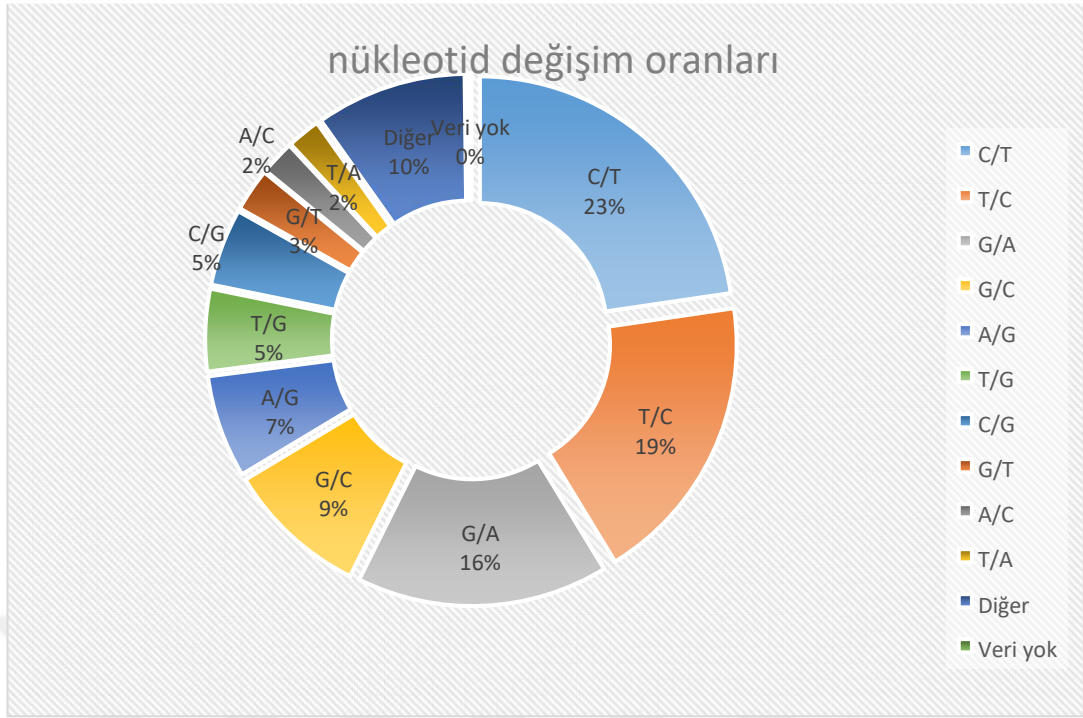
4.2. Zararlı SNP'lerin Biyoinformatik Araçlar ile Tahmin Sonuçları

Çalışmamızda analiz edilen PTK2 geninin erişim numarası (Gene ID) 5747 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5747>) ve UniprotKB Kodu Q05397'dir (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q05397>).

Araştırmamızda öncelikle NCBI dbSNP veritabanından PTK2 geni ile ilgili tüm SNP bilgilerine ulaşılmıştır. Toplam 85899 adet SNP olduğu belirlenmiştir. 85899 adet SNP arasından sadece yanlış anlamlı olan SNP'ler filtrelendiğinde ise toplam 634 adet yanlış anlamlı SNP olduğu belirlenmiştir. SNP'lerin pozisyon, nükleotid değişimi, amino asit değişimi vb. bilgileri kaydedilmiştir.

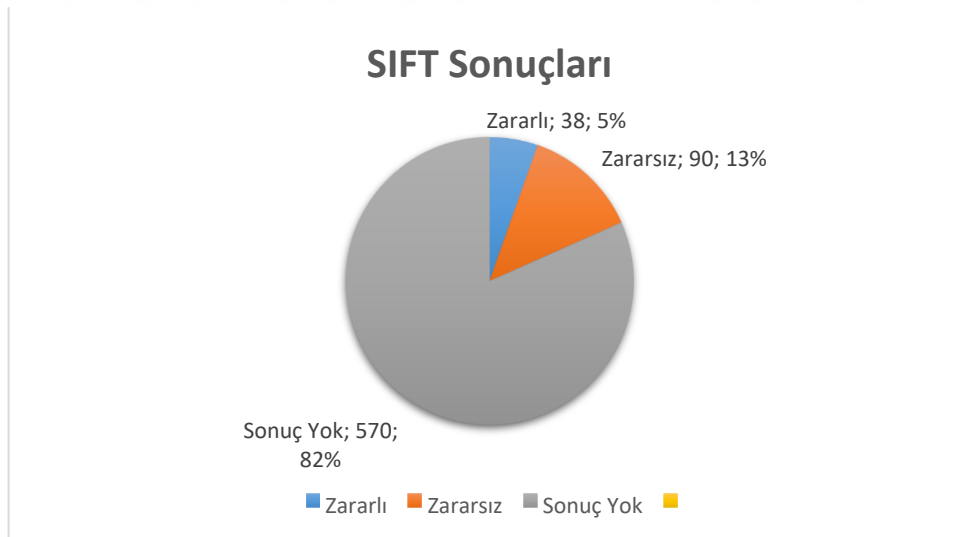
Analizlerin devamında 634 adet yanlış anlamlı SNP'nin, amino asitlerin sekans homolojisine ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin etme özelliğine sahip olan SIFT programında olası etkileri araştırılmıştır. SIFT yazılım aracının bulgularına göre 1601 adet farklı sonuç elde edilmiştir. 1601 adet sonuç arasından 655 tanesinde SIFT programında bir sonuca ulaşılamamıştır. Geri kalan 946 adet sonucun aminoasit değişimleri incelendiğinde bazı SNP'ler için birden çok varyant olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 698 adet farklı varyant (aminoasit değişimi) içeren veri elde edilmiştir.

Aynı zamanda elde edilen SNP'lerdeki nükleotit değişimleri de araştırılmıştır. Nükleotit değişimleri gruplandırılarak toplam nükleotit sayısına oranlanmıştır. Buna göre en çok bulunan nükleotid değişimi sitozin ve timin nükleotidinin yer değişimidir (Şekil 6).



Şekil 6: PTK2 genindeki yanlış anlamlı SNP'lerin nükleotid değişimlerinin % dağılımı

SIFT programı ile yapılan analizler sonucu 38 adet varyantın zararlı olduğu tespit edilmiştir. 90 adet varyant ise zararsız/tolere edilebilir olarak tespit edilip 570 adet varyant için SIFT programında sonuç elde edilememiştir (Şekil 7).

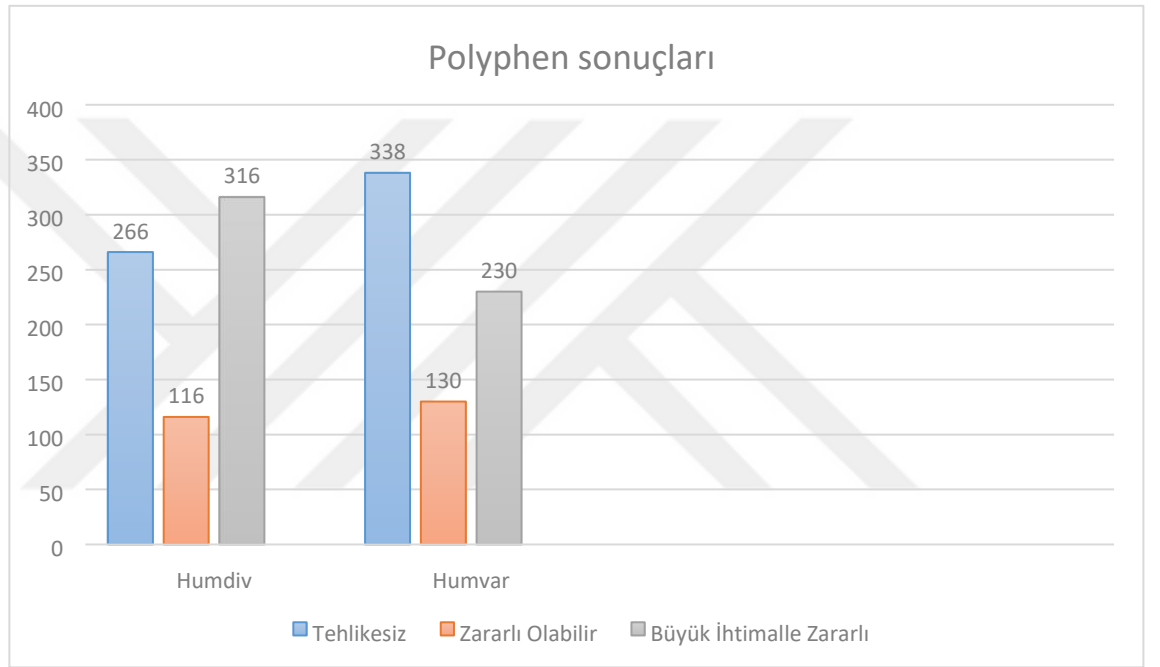


Şekil 7: SIFT yazılım aracı ile elde edilen sonuçların sayısal dağılımı

SIFT yazılım aracı ile yapılan analiz sonrasında tüm referans SNP'ler PolyPhen-2 yazılım aracı ile analiz edilmiştir. PolyPhen-2 yazılım aracının çıktıları "Büyük İhtimalle

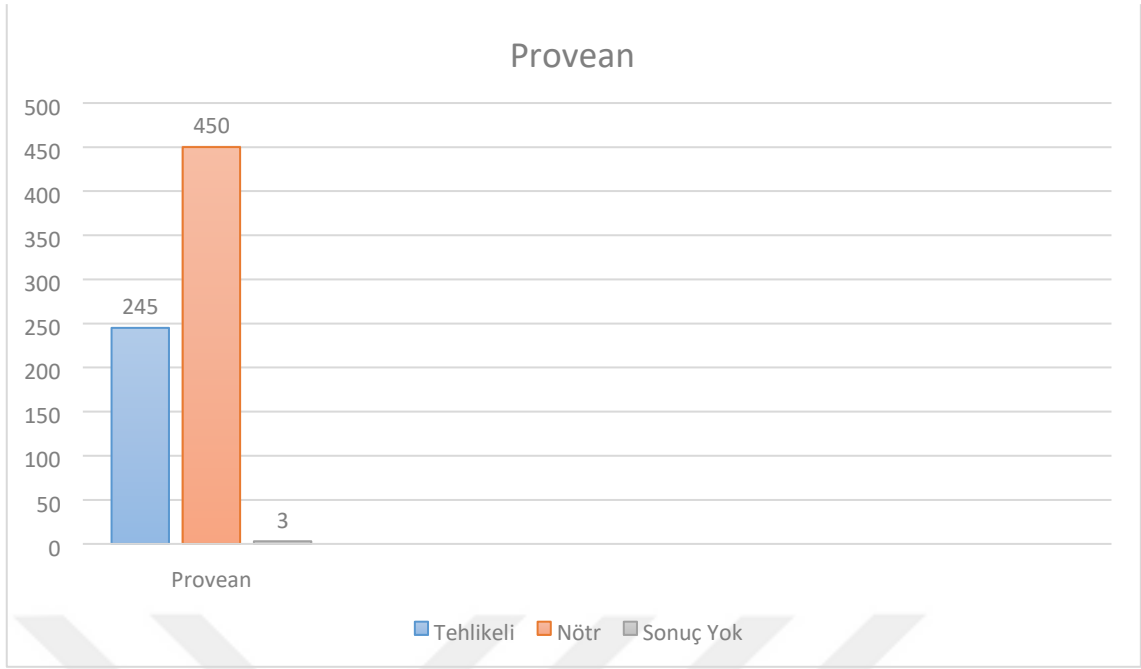
Zararlı (Probably Damaging)”, “Zararlı Olabilir (Possibly Damaging)” ve “Tehlikesiz (Benign)” olmak üzere üç farklı şekilde sonuç vermektedir.

Referans SNP’lerin, PolyPhen-2 yazılım aracındaki HumDiv ve HumVar olmak üzere iki kategoride inceleme yapılarak sonuçları elde edilmiştir. HumDiv analiz sonuçlarına göre 266 varyant “Tehlikesiz”, 116 varyant “Zararlı Olabilir”, 316 varyant “Büyük İhtimalle Zararlı” olarak tahmin edilmiştir. Humvar kategorisindeki incelemelerde, 338 adet varyant “Tehlikesiz”, 130 adet varyant ”Zararlı Olabilir”, 230 adedi ise “Büyük İhtimalle Zararlı” olarak tahmin edilmiştir (Şekil 8).



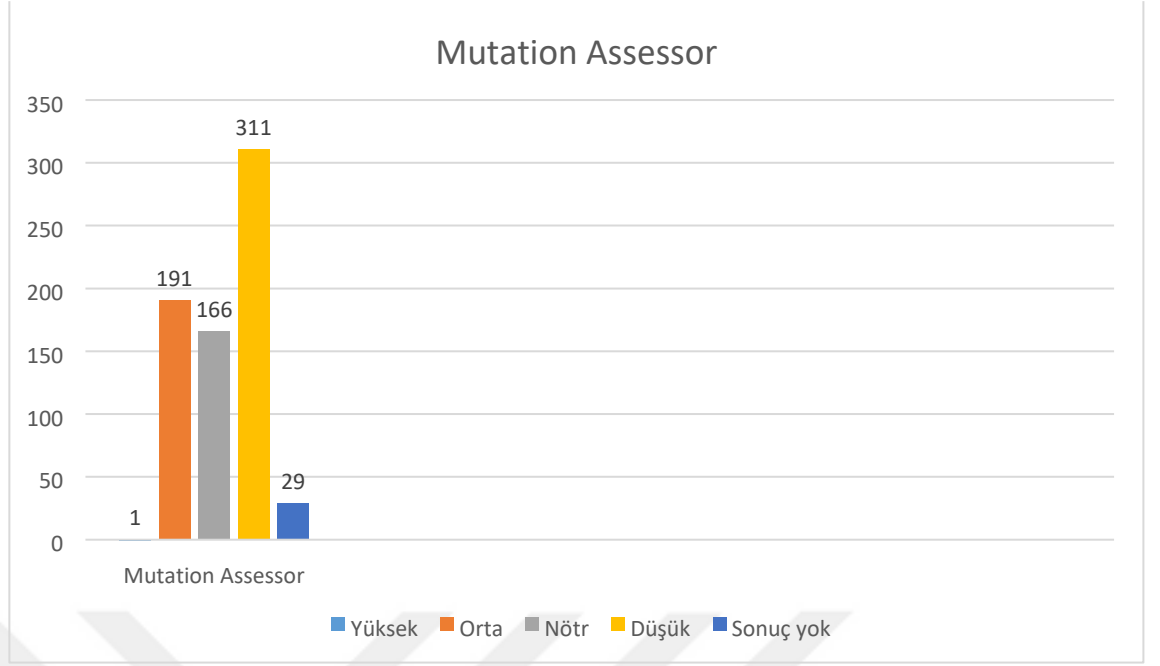
Şekil 8: PolyPhen-2 tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı

PolyPhen-2 yazılım aracı ile yapılan analizden sonra tüm referans SNP’lere ait amino asit değişimi bilgileri ve protein dizisi bilgileri ‘PROVEAN’ programına girerek analiz edilmiştir. PROVEAN programından elde edilen sonuçlarda SNP’lerin olası etkileri ‘Zararlı (Deleterious)’ veya ‘Nötral (Neutral)’ olarak sınıflandırılmıştır. PROVEAN skorlarına göre 245 adet varyant zararlı, 450 adet varyant ise nötral olarak tahmin edilmiştir. Bunun yanı sıra 3 adet varyant için ise sonuç alınamamıştır (Şekil 9).



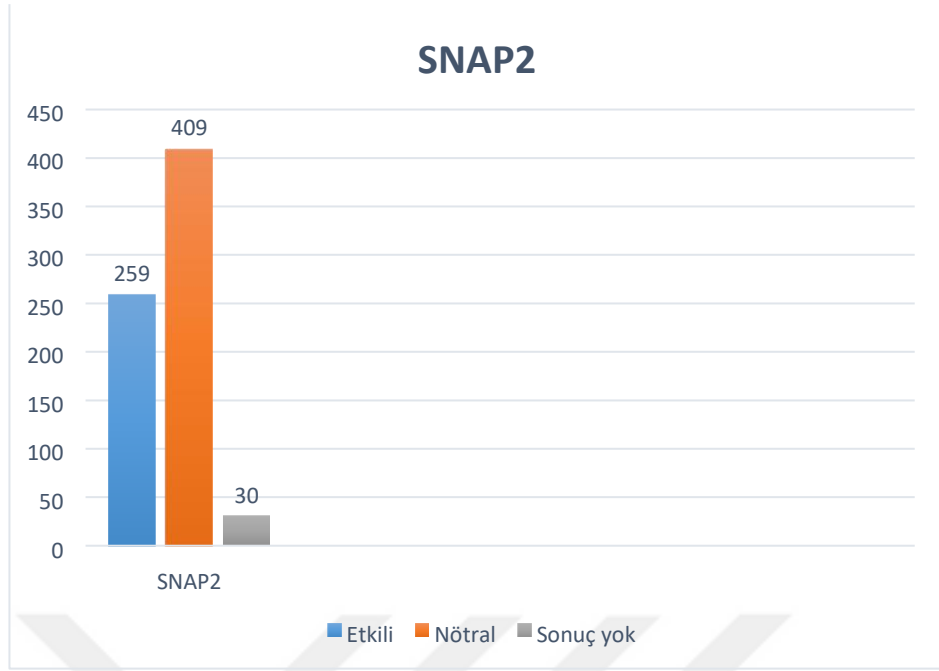
Şekil 9: PROVEAN tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı

PROVEAN programının analizlerinden sonra elde edilen veriler Mutation Assessor yazılım aracı ile analiz edilmiştir. Bu programdan çıkan sonuçlardan aminoasit değişiminin işlev etkisi ve skor sonuçları kaydedilmiştir. Mutation Assessor yazılım aracının tahmin sonuçlarına göre; bir varyantın fonksiyonel etkisi: tahmini fonksiyonel “yüksek, orta”, tahmini fonksiyonel olmayan “düşük, nötr” olmak üzere dört farklı şekilde hesaplanabilmektedir. Buna göre, 1 adet referans SNP’ye (rs761954797) ait aminoasit değişimi (I428T) yüksek işlev etkisine sahip olarak tahmin edilmiştir. 191 adet aminoasit değişimi ise orta derecede işlev etkisine sahip olarak belirlenmiştir. 166 adet aminoasit değişimi ise nötr olarak sonuç vermiştir. 311 adet aminoasit değişimi düşük işlev etkisine sahip olarak belirlenmiştir. 29 adet aminoasit değişiminden ise sonuç alınamamıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Mutation Assessor tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı

Mutation Assessor programı ile yapılan analizler kayıt altına alındıktan sonra mutasyonların fonksiyonel etkilerini tahmin etmek için kullanılan SNAP2 programı ile tüm aminoasit değişimleri hakkında yeni bir analiz gerçekleştirilmiştir. SNAP2 yazılım aracında her bir varyant için elde edilen değerler öngörülen etki (etkili ya da nötral), skor ve doğruluk değerleridir. SNAP2 programından elde edilen verilerde 259 adet varyantın etkili olduğu ve 409 adet varyantın ise nötral olduğu tespit edilmiştir. 30 adet varyant için ise sonuç alınamamıştır (Şekil 11).



Şekil 11: SNAP2 tahmin sonuçlarının sayısal dağılımı.

Tüm referans SNP'ler ile ilgili altı farklı yazılım aracından elde edilen bilgilerden; SIFT yazılım aracında belirlenen zararlı olan SNP'ler, Polyphen-2 yazılım aracından elde edilen “Zararlı Olabilir” ve “Büyük İhtimalle Zararlı” SNP'ler, PROVEAN yazılım aracından elde edilen zararlı SNP'ler, Mutation Assessor yazılım aracından elde edilen tahmini fonksiyonel (yüksek, orta) SNP'ler ve SNAP2 programından elde edilen sonuçlarda ise etkili olan SNP'lerin sebep olduğu aminoasit değişimleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, SNP'lerin olası etkilerinin tahmininde kullanılan yazılım araçlarının hepsinde birden zarar verici/etkili olabileceği tahmin edilen toplam 10 adet SNP olduğu belirlenmiştir. Bu SNP'ler rs41315637, rs55903738, rs56051231, rs369459709, rs111757839, rs150410292, rs199594538, rs374415488, rs374480150 ve rs375118877'dir. Tahmin sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. Tablo 1 'de SNP numaraları, nükleotid değişimi (N.D), amino asit değişimi, SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP2 sonuçları yer almaktadır.

Tablo 1:SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, Mutation Assessor ve SNAP2 yazılım araçlarına ait sonuçlar

SNP ID	N.D.	Amino Asit Değişimi	SIFT Tahmini	SIFT SKOR	PolyPhen-2 Humdiv	Skor	PolyPhen-2 Humvar	Skor	PROVEAN	Skor	Mutation Assesor İşlev Etkisi	Gİ.Skor	SNAP2 Tahmin	Skor	Beklenen Doğruluk
rs41315637	A/G	S192P	Zararlı	0.005	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Büyük İhtimale Zararlı	0.999	Zararlı	-4,405	Orta	2,675	Etkili	42	71%
rs55903738	G/T	H89Q	Zararlı	0.024	Zararlı Olabilir	0.907	Zararlı Olabilir	0.484	Zararlı	-5,419	Orta	2,19	Etkili	46	71%
rs56051231	T/G	H89P	Zararlı	0.005	Büyük İhtimale Zararlı	0.978	Zararlı Olabilir	0.811	Zararlı	-7,531	Orta	2,19	Etkili	85	91%
rs369459709	G/C	L174V	Zararlı	0.005	Büyük İhtimale Zararlı	0.999	Büyük İhtimale Zararlı	0.999	Zararlı	-2,573	Orta	2,765	Etkili	27	63%
rs111757839	T/C	T600A	Zararlı	0.004	Büyük İhtimale Zararlı	0.996	Büyük İhtimale Zararlı	0.992	Zararlı	-4,713	Orta	2,11	Etkili	72	85%
rs150410292	G/A	R824C	Zararlı	0.003	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Büyük İhtimale Zararlı	0.996	Zararlı	-5,538	Orta	2,36	Etkili	12	59%
rs199594538	G/C	L501V	Zararlı	0.005	Büyük İhtimale Zararlı	0.972	Zararlı Olabilir	0.652	Zararlı	-2,828	Orta	2,4	Etkili	19	59%
rs374415488	G/A	R919W	Zararlı	0.001	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Büyük İhtimale Zararlı	0.999	Zararlı	-6,989	Orta	2,36	Etkili	66	80%
rs374480150	C/T	D254N	Zararlı	0.01	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Zararlı	-4,02	Orta	2,23	Etkili	1	53%
rs375118877	T/C	E338G	Zararlı	0.004	Büyük İhtimale Zararlı	1.000	Büyük İhtimale Zararlı	0.999	Zararlı	-6,339	Orta	2,565	Etkili	91	95%

4.3. SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmin Sonuçları

Tüm yazılım araçları tarafından fonksiyonel etkili olabileceği tahmin edilen 10 SNP için I-Mutant 2.0 ve MuPro yazılım araçları ile analiz yapılmıştır.

I-Mutant 2.0 yazılımından elde edilen bulgular, SNP'lerin 3 tanesinde amino asit değişiminin protein stabilizasyonunu artırdığı, diğer 7 SNP'de ise azalttığı şeklindedir. MUpro programında tüm SNP'lerin protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. SNP'lerin protein stabilizasyonu üzerine etkilerinin tahmin sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: SNP'lerin protein stabilizasyonu üzerine etkilerinin tahmin sonuçları.

SNP ID	Nükleotid Değişimi	Amino Asid Değişimi	I-Mutant 2.0	GI (Kcal/mol)	MUpro	ddG
rs41315637	A/G	S192P	Artan	2	azalan	-0.9853294
rs55903738	G/T	H89Q	Azalan	4	azalan	-0.74908928
rs56051231	T/G	H89P	artan	8	azalan	-0.96752536
rs369459709	G/C	L174V	azalan	8	azalan	-0.61633066
rs111757839	T/C	T600A	azalan	8	Azalan	-11.787.946
rs150410292	G/A	R824C	artan	0	azalan	-0.99853164
rs199594538	G/C	L501V	azalan	8	azalan	-0.78482771
rs374415488	G/A	R919W	azalan	6	azalan	-0.92140329
rs374480150	C/T	D254N	azalan	5	azalan	-1.0269999
rs375118877	T/C	E338G	azalan	9	azalan	-1.576691

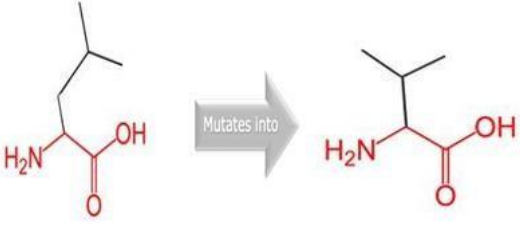
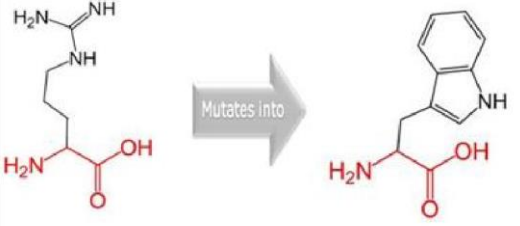
GI:Güvenilirlik İndeksi. ddG:Serbest Enerji Değişimi Değeri

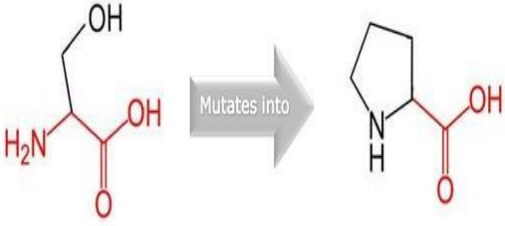
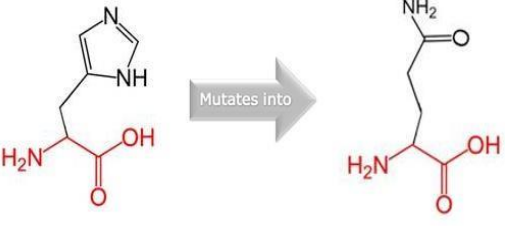
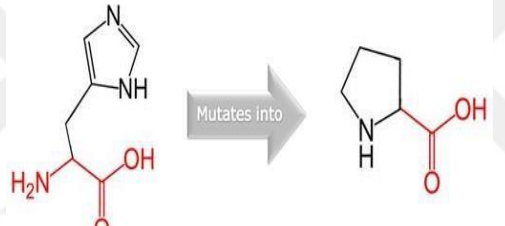
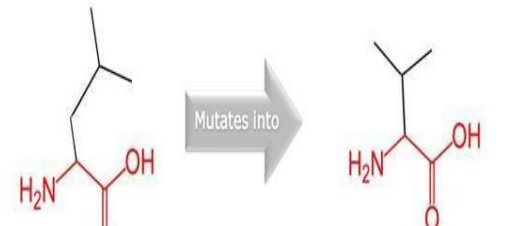
4.4 Zararlı SNP'lerin Project HOPE ile Modellenmesi

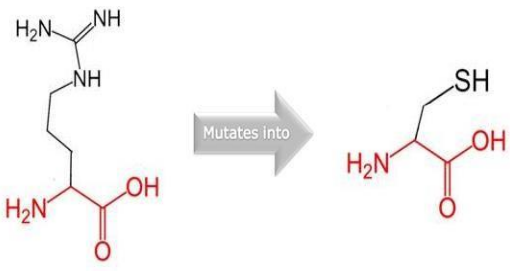
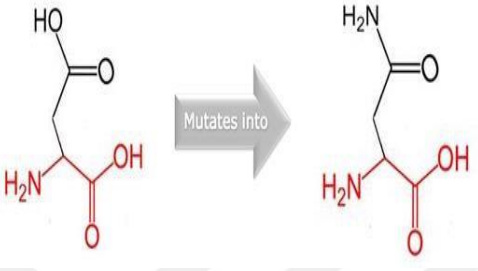
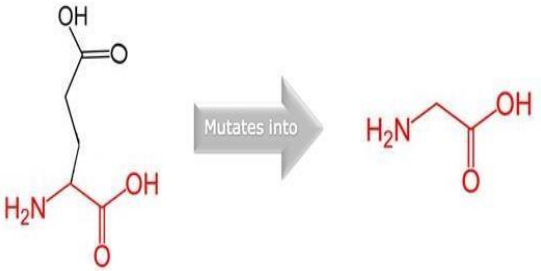
Tüm aminoasitlerin kendine özgü boyutu, yükü ve hidrofobiklik değeri vardır. Bu değerler göz önüne alındığında, yabani tip rezidü ile mutant rezidünün genellikle bu hususlar bakımından farklı olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada Project HOPE programında analiz gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlarda analize giren referans

SNP'lerin sebep olduğu aminoasit değişiminden 10 adedinin zararlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Bunların 3 tanesinden Project HOPE yazılım aracı ile model elde edilmiştir. Bunlar; rs374415488 (R919W), rs199594538 (L501V), rs111757839 (T600A) polimorfizmleridir. Model elde edilmeyen SNP'ler ise rs41315637 (S192P), rs55903738 (H89Q), rs56051231 (H89P), rs369459709 (L174V), rs150410292 (R824C), rs374480150 (D254N), rs375118877 (E338G) polimorfizmleridir. Tablo 3'de SNP'lerin sebep olduğu amino asit değişimleri özetlenmiştir.

Tablo3: SNP'lerin sebep olduğu aminoasit değişimleri

SNP NO	Amino Asitler Yabaml rezidü—Mutant rezidü	Açıklama
rs199594538		rs199594538 polimorfizminin sebep olduğu 501. pozisyondaki bir lösin amino asidinin bir valin amino asidine dönüşümüdür.
rs374415488		rs374415488 polimorfizminin 919. konumunda bir arjinin amino asidinin bir triptofan aminoasidine dönüşmesidir.
rs111757839		rs111757839 polimorfizminin 600. pozisyonda bir treonin aminoasidinin alanin aminoasidine dönüşümüdür

rs41315637		rs41315637 polimorfizminin 192. pozisyonunda serin aminoasidinin prolin aminoasidine dönüşümüdür.
rs55903738		rs55903738 polimorfizminin 89. pozisyonunda histidin aminoasidinin glutamin aminoasidine dönüşümüdür.
rs56051231		rs56051231 polimorfizmi 89. pozisyonunda bir histidinin proline dönüşümüdür.
rs369459709		rs369459709 polimorfizminin 174. pozisyonundaki lösin aminoasidinin valin aminoasidine dönüşümüdür.

rs150410292		rs150410292 polimorfizminin 824. pozisyonunda bir arjininin sisteine dönüşümüdür.
rs374480150		rs374480150 polimorfizminin 254. pozisyonunda bir aspartik asidin asparajine dönüşümüdür.
rs375118877		rs375118877 polimorfizminin 338. pozisyonunda bir glutamik asidin glisine dönüşümüdür.

Aşağıda her bir amino asit substitüsyonu için Project HOPE yazılım aracından elde edilen bulgular özetlenmiştir:

S192P, R919W pozisyonlarındaki mutant rezidü, yabanıl tip rezidüden daha büyüktür (Tablo 4).

L501V, T600A, H89Q, H89P, L174V, E338G, R824C pozisyonlarındaki mutant rezidü, yabanıl tip rezidüden daha küçüktür (Tablo 4).

R919W, T600A, S192P, H89P, R824C, E338G pozisyonlarındaki mutant rezidü yabanıl tip rezidüye göre daha hidrofobiktir (Tablo 4).

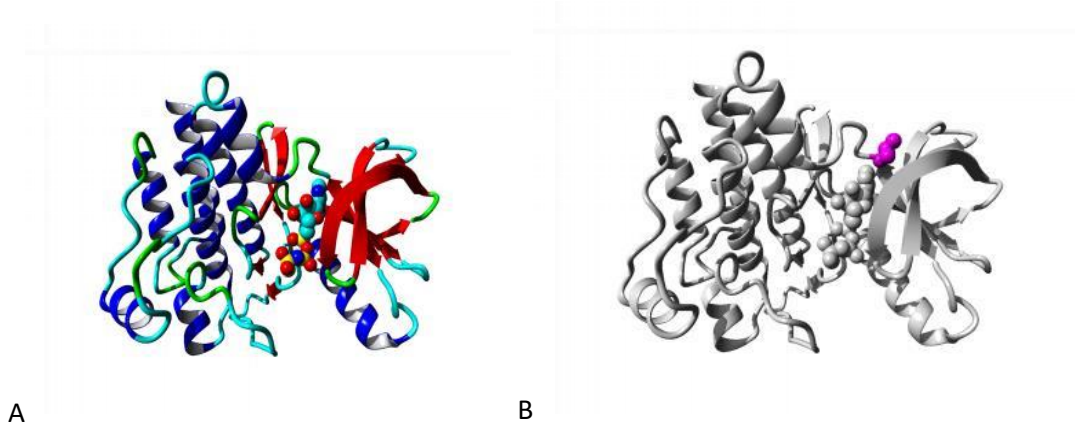
R919W, D254N, E338G ile R824C pozisyonlarındaki mutant rezidü yabancı tip rezidüye göre yük kaybına uğramıştır ve nötr'dür (Tablo 4).

L501V pozisyonundaki rezidü protein kinaz domaini içerisinde bulunmaktadır. S192P, H89Q, L174V, D254N, E338G pozisyonlarındaki rezidü FERM alanı içerisinde bulunur.

Tablo 4: Yabancı ve mutant tip amino asitlerin Project HOPE yazılımına göre belirlenen özellikleri

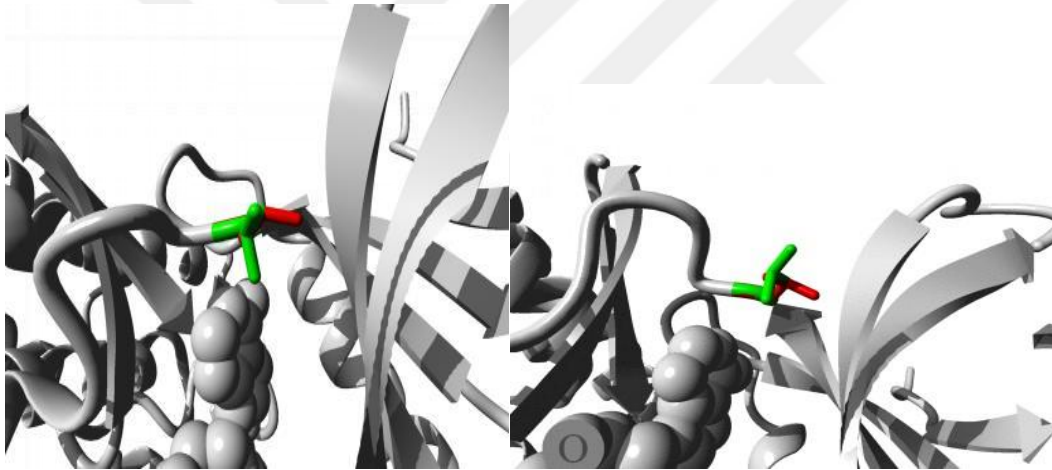
SNP NO	Aminoasit Değişikliği	Yabancı Tip Özellikleri			Mutant Tip Özellikleri		
		Boyut	Yük	Hidrofobiklik	Boyut	Yük	Hidrofobiklik
rs199594538	L501V	>	-	-	<	-	-
rs374415488	R919W	<	+ yük	<	>	Nötr	>
rs111757839	T600A	>	-	<	<	-	>
rs41315637	S192P	<	-	<	>	-	>
rs55903738	H89Q	>	-		<	-	-
rs56051231	H89P	>	-	<	<	-	>
rs369459709	L174V	>	-	-	<	-	-
rs150410292	R824C	>	+yük	<	<	Nötr	>
rs374480150	D254N	-	- yük	-	-	Nötr	-
rs375118877	E338G	>	- yük	<	<	Nötr	>

Project HOPE programında edilen sonuçlarda analize giren referans SNP'lerin sebep olduğu aminoasit değişiminden 3 tanesinden model elde edilmiştir. L501V, R919W, T600A aminoasit değişimlerine ait proteinin üç boyutta gösterimleri sırasıyla Şekil 12, Şekil 14 ve Şekil 16'de verilmiştir. Polimorfizm bölgesinin yakından gösterimleri ise sırasıyla Şekil 13, Şekil 15 ve Şekil 17 de verilmiştir.



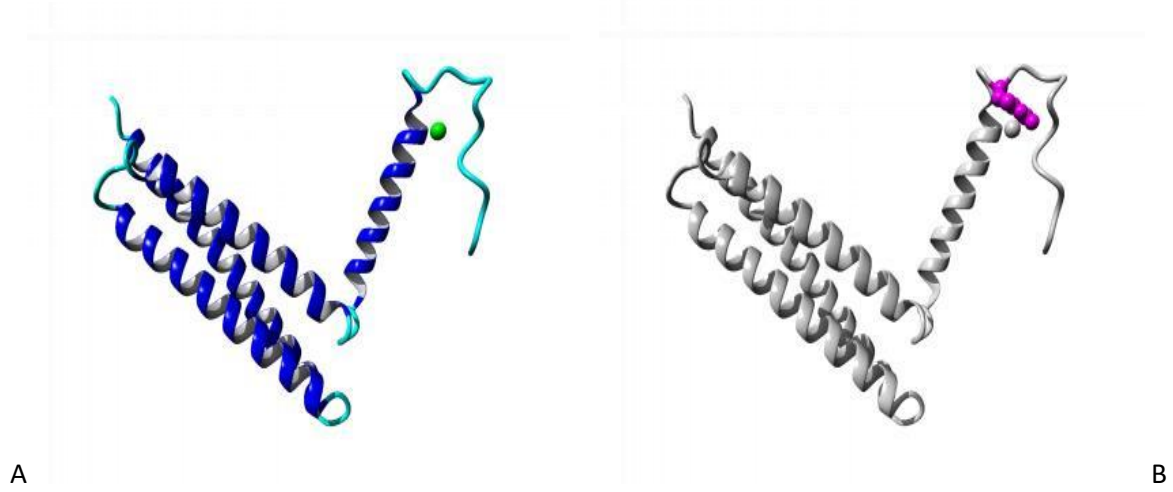
Şekil 12. Üç boyutlu gösterimde 501. pozisyonda bir lösinin bir valine dönüşümü (L501V)

A) Protein yapısında α -sarmal = mavi, β -sarmal = kırmızı, dönüş = yeşil, 3/10 sarmal = sarı ve düzensiz sarmal = camgöbeği. Kompleksteki diğer moleküller ise gri renklidir. B) Protein gri renklidir, mutasyona uğramış rezidünün yan zinciri magenta rengindedir ve küçük toplar şeklinde gösterilmiştir.



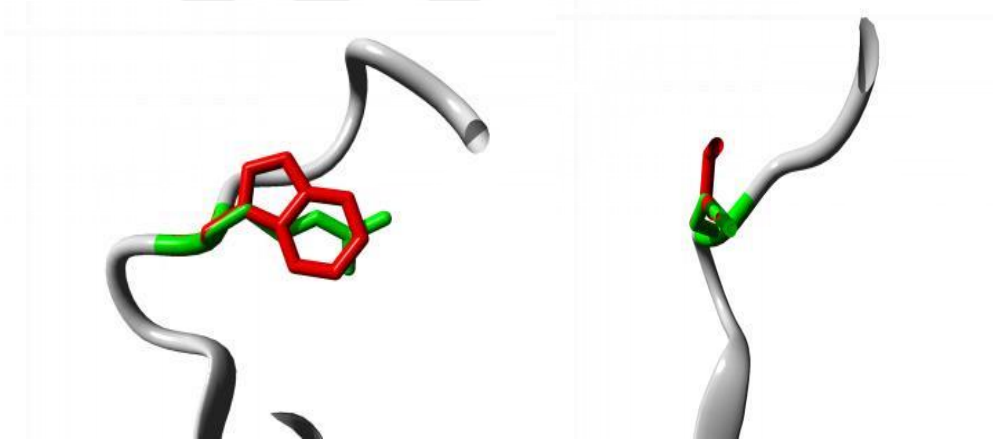
Şekil 13. L501V polimorfizm bölgesinin yakından görünümü

Protein gri renklidir, yabanıl tip ve mutant tip rezidünün yan zincirleri sırasıyla yeşil ve kırmızı renk ile gösterilmektedir.



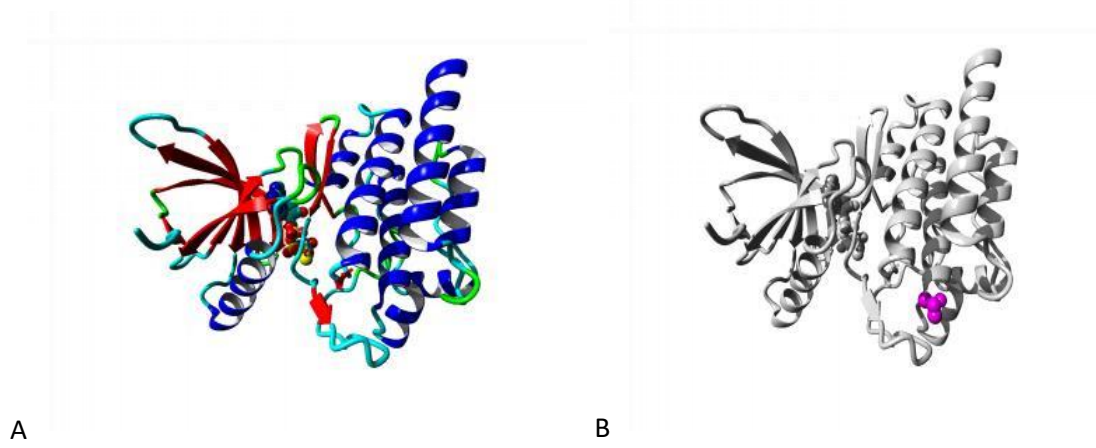
Şekil 14. Üç boyutlu gösterimde 919. pozisyonundaki arjinin amino asidinin bir triptofan amino asidine dönüşmesi (R919W)

A) Protein yapısında α -sarmal = mavi, dönüş = yeşil ve düzensiz sarmal = camgöbeği. Kompleksteki diğer moleküller ise gri renklidir. B) Protein gri renklidir, mutasyona uğramış rezidünün yan zinciri magenta rengindedir ve küçük toplar şeklinde gösterilmiştir.



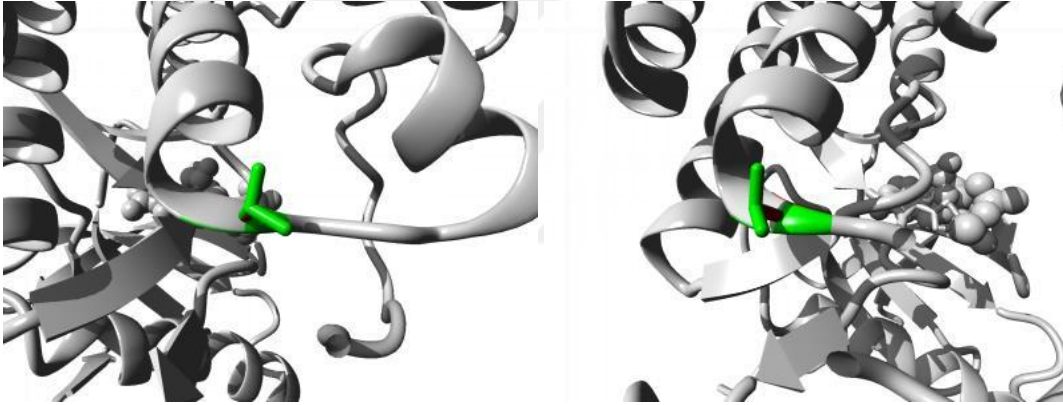
Şekil 15. R919W polimorfizm bölgesinin yakından görünümü

Protein gri renklidir, yabancıl tip ve mutant tip rezidünün yan zincirleri sırasıyla yeşil ve kırmızı renk ile gösterilmektedir.



Şekil 16. Üç boyutlu gösterimde 600. pozisyonda bir treonin aminoasidinin alanin aminoasidine dönüşümü (T600A)

A) Protein yapısında α -sarmal = mavi, β -sarmal = kırmızı, dönüş = yeşil, 3/10 sarmal = sarı ve düzensiz sarmal = camgöbeği. Kompleksteki diğer moleküller ise gri renklidir. B) Protein gri renklidir, mutasyona uğramış rezidünün yan zinciri magenta rengindedir ve küçük toplar şeklinde gösterilmiştir.ptk



Şekil 17. T600A polimorfizm bölgesinin yakından görünümü

Protein gri renklidir, yabanıl tip ve mutant tip rezidünün yan zincirleri sırasıyla yeşil ve kırmızı renk ile gösterilmektedir.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP2, I-Mutant 2.0, MUpro ve Project HOPE yazılım araçları kullanılarak *PTK2* geninde bulunan yanlış anlamlı SNP'lerin protein yapısı, fonksiyonu ve stabilizasyonu üzerine olası etkileri değerlendirilmiştir. Proteinin yapısı ve stabilizasyonuna zarar verebilecek bir etkiye sebep olan hedef SNP'lerin in silico yollarla ortaya çıkarılması genotipleme çalışmalarında oldukça önem taşır (ÖZKAN OKTAY,2019). Çalışmamızda, *PTK2* genindeki toplam 85899 SNP'den 634 adedinin aminoasit değişimine sebep olduğu (yanlış anlamlı); bunlardan da rs374415488 , rs199594538 , rs111757839, rs41315637, rs55903738, rs56051231, rs369459709, rs150410292, rs374480150 ve rs375118877 polimorfizmlerinin zararlı etkilerinin olabileceği tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarından elde edilen bulgulara göre zararlı olan on SNP'ye ait yapılan literatür taramalarında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bir polipeptit zinciri üretildikten sonra, meydana gelen SNP'ler (amino asit değişimine sebep olan) in vivo aktiviteyi iki ana yoldan etkileyebilir: proteinin moleküler fonksiyonunun yönlerini, özellikle ligand bağlanması, kataliz, post-translasyonel modifikasyon veya allosterik mekanizmaları etkileyebilir (Yue ve ark.2005). SNP'lerin in vivo aktiviteyi etkileyebileceği ikinci yol, protein konsantrasyonunun azaltılmasıdır. Bu, stabilitede bir azalmanın neden olduğu başarısız bir katlanma veya katlanmamış protein fraksiyonundaki bir artışla gerçekleşebilir. Bu nedenle, polimorfizmler sonucu oluşan stabilite kaybı ile hastalık oranları artabilir (Yue ve ark.2005). Çalışmamızda kullandığımız I-Mutant 2.0 ve MUpro yazılım araçları ile elde ettiğimiz protein stabilizasyonu tahmin sonuçlara göre her iki yazılım aracında da H89Q, L174V, T600A, L501V, R919W, D254N ve E338G pozisyonlarındaki aminoasit değişimlerinin proteinde stabilizasyonun azalmasına sebep olabileceği belirlenmiştir.

İlave olarak, tek bir baz değişikliğinin in vivo bir proteinin işlevini etkileyebileceği farklı birçok mekanizma vardır. Gen düzenleyici bölgelerdeki değişiklikler, değiştirilmiş transkripsiyon oranlarına yol açabilir; transkripsiyonu yapılan mesajdaki değişiklikler, değişmiş işlemeye, özellikle birleştirmeye yol açabilir; mesaj değişiklikleri, örneğin

ikincil yapı özelliklerini değiştirerek çeviriyi etkileyebilir (Shen ve ark.1999)(Pelletier ve ark.1987).

SNP sonucu oluşan amino asit değişimleri, homooligomerlerin birleşmesine veya ayrılmasına neden olabilir (Nishi ve ark. 2010). Homooligomer arayüzlerindeki amino asit değişimleri, bir proteinin fonksiyonel aktivitesini değiştirebilir ve çeşitli hastalıklarda rol oynayabilir. Örneğin, fruktoz intoleransına yol açan mutasyonların, fruktoz-1,6bifosfat aldolaz A enziminin tetramerini stabilize ettiği ve böylece aktivitesini azalttığı gösterilirken (Malay ve ark.2005), glutamat reseptörlerindeki bazı değişimler dimer arayüzlerini stabilize edebilir ve duyarsızlaşmayı azaltabilir (Sun Y. Ve ark.2002).

Amino asitlerin boyutlarında önemli bir varyasyon vardır (yani, yan zincir kalıntılarının uzunluğu ve hacmi). Boyut, yapının hangi bölümlerinin hangi diğer bölüme uyduğunun belirlenmesinde de önemli bir rol oynar; bununla birlikte, boyut ve şekil özellikleri çoğu zaman birçok rezidü tarafından oluşturulan daha büyük protein alanlarıyla ilişkilendirilir (Biro ve ark.2006). Bu çalışmada analiz edilen S192P ve R919W pozisyonlarındaki mutant rezidü, yabancı tip rezidüden daha büyük olduğu için bu durum proteinde çıkıntılara neden olabilir ve bağlantı ve etkileşimleri olumsuz etkileyebilir. Bu çalışmada değerlendirilen L501V, T600A, H89Q, H89P, L174V, E338G ve R824C pozisyonlarındaki mutant rezidü ise yabancı tip rezidüden daha küçüktür ve bu da etkileşim kaybına neden olan bir diğer faktör olabilir (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

Hidrofobiklik, yan zincirlerin sudan ne kadar güçlü itildiğinin bir ölçüsüdür. Bir sayı ne kadar pozitifse, amino asit rezidüsü sulu ortamda o kadar fazla olmama eğiliminde olacaktır. Negatif sayılar, hidrofilik yan zincirleri gösterir; daha fazla negatif sayı, su için daha fazla afiniteyi gösterir (Eisenberg ve ark., 1982; Biro, 2006). Bir protein yapısını bir arada tutan ana kuvvetin hidrofobik etkileşim olduğu tahmin edilmektedir; bir dizide aynı hidropatiye sahip birçok rezidü, başka bir dizide aynı hidropatiye sahip birçok rezidüyle etkileşime girer (Yue ve ark.2005). Bu çalışmada değerlendirilen R919W, T600A, S192P, H89P, R824C ve E338G pozisyonlarındaki mutant rezidü yabancı tip rezidüye göre daha

hidrofobiktir. Bu durum, hidrojen bağlarının kaybına ve/veya düzgün şekilde katlanmanın yapılamamasına neden olabilir (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

Bu çalışmada analiz edilen, R919W ve R824C pozisyonlarındaki polimorfizmler sonucu pozitif yüklü olan yabancı rezidü yükünü kaybederek nötr olan mutant rezidüye dönüşmüştür. R919W polimorfizmindeki yabancı rezidü 918. ve 922. pozisyonlardaki aspartik asit ile tuz köprüsü oluşturmaktadır. Yük farkı, orijinal, yabancı tip rezidünün yaptığı iyonik etkileşimi bozabilecektir. D254N ve E338G pozisyonlarındaki polimorfizmler sonucu negatif yüklü olan yabancı tip rezidü yükünü kaybederek nötr olan mutant rezidüye dönüşmüştür. Benzer şekilde, R824C, D254N ve E338G pozisyonlarındaki yabancı tip rezidünün yük kaybı, diğer moleküller veya rezidülerle etkileşim kaybına neden olabilecektir (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>). Hidropati ve yük özelliklerinin, protein yapılarındaki rezidülerin konumlarının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Neher E,1994).

S192P, H89Q, H89P, L174V, D254N ve E338G polimorfizmleri proteinin FERM domaininde bulunduğundan dolayı oldukça önemlidir. Polimorfizm, bu domaini bozabilecek ve işlevini ortadan kaldırabilecek farklı özelliklere sahip bir amino asit ortaya çıkarmaktadır (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>). FAK'ın N-terminal alanı F1, F2 ve F3 alt alanlarından oluşan FERM domainini içermektedir. P53, Mdm-2 ve büyüme faktörü reseptörleri gibi birçok düzenleyici protein, FAK-FERM alanına bağlanır. Bu sebeplerden dolayı FERM alanında oluşabilecek olası bir SNP proteinin fosforillenmesi, katalitik aktivitesi, P53 ve büyüme faktörlerinin bağlanması gibi önemli noktalarda olumsuzluklara sebep olabileceği düşünülmektedir (Golubovskaya ve ark.2005) (Golubovskaya ve ark.2008)(Lim ST ve ark.2008) .

L501V polimorfizmi, bir protein kinaz domaininin içerisinde lokalize olduğu için polimorfizm, bu alanı bozabilecek ve işlevini ortadan kaldırabilecek farklı özelliklere sahip bir amino asit ortaya çıkarabilir. Kinaz alanı, FAK'ın kinaz aktivitesi için kritik olan Y576 / Y577 tirozinlerine sahiptir (Hyunho Yoon ve ark. 2015). Ek olarak, L501V pozisyonunda yabancı tip ve mutant tip rezidüler arasındaki farklılıklar, nükleotid

("ATP") ile etkileşimlerin kolayca kaybına neden olabilir. Bu değişim, proteinin işlevini doğrudan etkileyebilir (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

Gen-gen etkileşim sonuçlarına göre PTK2 geninin 20 gen ile ilişkisine bakıldığında, bu genler arasında 325 bağlantı olduğu tespit edilmiştir. GeneMANIA yazılımından elde edilen gen-gen etkileşim sonuçları, PTK2 geninin en fazla etkileşimde olduğu ilk 5 genin PXN, BCAR1, RAP1B, VCL ve UNC5C olduğunu göstermiştir (<https://genemania.org/search/homo-sapiens/ptk2/>). GeneMANIA ile elde edilen bilgilerin de ışığında PTK2 geni ve PTK2 geninin yakın etkileşimde olduğu genler hücrematris yapışması ve hücre-hücre yapışması ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda PTK2 geninde oluşabilecek yanlış anlamlı tek nükleotit polimorfizmleri hakkında bilgi elde etmek hücre-hücre ve hücre matris yapışmaları ve aynı zamanda metastaz yapan kanser hücrelerinin adezyon mekanizması hakkında yapılacak çalışmalara fayda sağlayabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amino asit değişimlerinin protein fonksiyonu ve yapısındaki etkilerini açığa çıkarmak, tek nükleotid polimorfizmlerinin oluşturduğu insan hastalıklarına yatkınlıkla ilgili karışık mekanizmaları çözmek için büyük öneme sahiptir. Bir protein içindeki önemli bölgelerde ortaya çıkan amino asit değişimleri, tuz köprülerinin bozulması, etkileşim ağıının değiştirilmesi, hidrojen bağlarının kırılmasına da neden olan bir dizi konformasyon değişikliği ile sonuçlanabilmektedir. Bu değişimler, proteinin enerji seviyelerinin bozulmasına, proteinin katlanma kinetiğinin etkilenmesine, proteinin kümeleşmesine ve proteinin stabilizasyonunun dağılmasına neden olabilmektedir. Özellikle tek gen hastalıklarının çoğunda amino asit değişimlerine sebep olan tek mutasyonların neden olduğu ve protein stabilitesi değişikliğinin hastalıklara sebep olan ortak bir mekanizma olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar PTK2 geni ile alakalı yapılacak olan genotipleme araştırmalarına, SNP seçimi ve deney tasarımı aşamalarında faydalı olabileceği düşünölmektedir. Literatür incelendiğinde genlerdeki SNP'lerin in silico analizlerine ait yapılan tahmin çalışmalarının kısıtlı olduğu ve bu nedenle, gelecek zamanda gerek deneysel gerekse in silico çalışmaların yapılması gerektiği düşünölmektedir. Bu tez çalışmasında tüm programlar tarafından protein yapısı, fonksiyonu ve stabilizasyonu üzerine 10 SNP'nin yüksek riskli olabileceği tahmin edilmiştir. Gelecekte, bu SNP'lerin etkilerinin araştırılması için deneysel çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulazeez, S., Sultana, S., Almandil, N. B., Almohazey, D., Bency, B. J., & Borgio, J. F. (2019). The rs61742690 (S783N) single nucleotide polymorphism is a suitable target for disrupting BCL11A-mediated foetal-to-adult globin switching. *PLOS ONE*, 14(2), e0212492.

A Kadir Devrim, Necati KAYA. Genetik Polimorfizm ve Mikrosatellitler. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2004, 10(2): 215-220

Alberts B. The Cell. In: *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edit. Garland Science; :118200.
André E, Becker-André M (January 1993). "Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 190 (1): 140–7.

Bayat A. Science, medicine and the future: Bioinformatics. *BMJ*, 2002; 324 p: 10181022.
Barrett, J.C., Tsutsui, T., Oshimura, M., "In Genetic Mechanisms in Carcinogenesis and Tumor Progression", *Cancer Research*, 3, (2001) 97.

Biro, J. (2006). *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3(1), 15. doi:10.1186/17424682-3-15

Bromberg, Y. and Rost, B. (2007) SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* 35, 3823–3835

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, et al. 1999. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat. Genet.* 22:231–38

Cary LA, Chang JF, Guan J-L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 108:1787-1794.

Capriotti, Fariselli & Casadio (2005) Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(Web Server):W306–W310

Cheng, J., Randall, A., & Baldi, P. (2005). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 62(4), 1125–1132.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP: Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLOS ONE* 2012, 7(10):e46688.

Collins DW, Jukes TH. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*. 1994;20(3):386-396. doi:10.1006/geno.1994.1192.
Corsi JM, Houbron C, Billuart P, Brunet I, Bouvree K, Eichmann A, Girault JA, Enslen H. Autophosphorylation-independent and -dependent functions of focal adhesion kinase during development. *J Biol Chem* 2009; 284: 34769 – 76.

Donbak L. The short tandem repeat loci in forensic DNA analysis. *T Klin J Med Sci* 2002;22:233-8

Ebru ÖZKAN OKTAY , Tuğba KAMAN , Ömer Faruk KARASAKAL, Korkut ULUCAN , Muhsin KONUK , Nevzat TARHAN.(2019)Alzheimer Hastalığı ile İlişkilendirilen APH1A Genindeki Zararlı SNP’lerin In Silico Yöntemler ile Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ; 23, 2

Edwards A,Hammond HA,Jin L, Caskey T,Chakraborty R.Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats.*Genomics* 1992;12:241-53.

Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC, Wilcox W. Hydrophobic moments in protein structure. *Faraday Symp Chem Soc.* 1982;17:109–120. doi: 10.1039/fs9821700109.
Erskine, R. M., Williams, A. G., Jones, D. A., Stewart, C. E., & Degens, H. (2012). Do PTK2 gene polymorphisms contribute to the interindividual variability in muscle strength and the response to resistance training? A preliminary report. *Journal of Applied Physiology*, 112(8), 1329–1334.

Garatachea, N., Fuku, N., He, Z., Tian, Y., Arai, Y., Abe, Y., ... Lucia, A. (2014). PTK2 rs7460 and rs7843014 Polymorphisms and Exceptional Longevity: A Functional Replication Study. *Rejuvenation Research*, 17(5), 430–438.

Gomolka M, Hundrdeser J,Nürnberg P,Roewerl,Epplen JT,Epplen C.Selected di-and tetranucleotide microsatellites from chromosomes 7,12,14, and Y in various Eurasian populations.*Hum Genet* 1994;93:592-6.

Golubovskaya VM, Finch R, Cance WG. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J Biol Chem* 2005; 280: 25008 – 21.

Golubovskaya VM, Finch R, Zheng M, Kurenova EV, Cance WG. The 7-amino-acid site in the proline-rich region of the N-terminal domain of p53 is involved in the interaction with FAK and is critical for p53 functioning. *Biochem J* 2008; 411: 151 – 60.

Golubovskaya VM, Virnig C, Cance WG. TAE226-induced apoptosis in breast cancer cells with overexpressed Src or EGFR. *Mol Carcinog.* 2008;47(3):222–234.

Golubovskaya VM, Nyberg C, Zheng M, Kweh F, Magis A, Ostrov D, Cance WG. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the Y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J Med Chem.* 2008;51(23):7405–7416.

Hafize Seda VATANSEVER. Epitelial Mezenkimal Transition Türkiye Klinikleri Radyasyon Onkolojisi.2016

Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, et al. 1999. Patterns of singlenucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat. Genet.* 22:239–47

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011, 144, 646–674

- Hanahan D., and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000
- Hanka Venselaar, Tim AH te Beek, Remko KP Kuipers, Maarten L Hekkelman, Gert Vriend. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. Venselaar et al. *BMC Bioinformatics* 2010, 11:548
- Hyunho Yoon, Joshua P. Dehart, James M. Murphy, Ssang-Taek Steve Lim. Understanding the Roles of FAK in Cancer. *J Histochem Cytochem*. 2015 Feb; 63(2): 114–128.
- İbrahim H. Güllü, İbrahim Akalın. Metastaz biyolojisi. *Üroonkoloji Bülteni*. 2005.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420 – 8.
- Kaur T, Thakur K, Singh J, Kamboj SS, Kaur M. 2017. Identification of functional SNPs in human LGALS3 gene by in silico analyses. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 18(4):321– 328.
- Klug W S, Cummings M R & Spencer, C A (2011). *Genetik kavramlar*, (Çeviri Ed: Prof Dr. Cihan Öner, Prof. Dr. Sibel Sümer, Prof. Dr. Reyhan Öner, Prof. Dr. Ay Ögüş, Prof. Dr. Leyla Açık), Palme Yayıncılık, Ankara
- Kreso, A. and Dick, J.E. (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14, 275–291.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 2008; 29: 9 – 22. 68. Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin
- Lisa M Coussens, Zena Werb. Inflammation and cancer. *Nature* 2002 Dec 19; 420(6917):860-7.
- Livingston RJ, von Niederhausern A, Jegga AG, Crawford DC, Carlson CS, et al. 2004. Pattern of sequence variation across 213 environmental response genes. *Genome Res*. 14:1821–31
- Luleyap HU. [Fundamentals of Molecular Genetics.] Adana Nobel Press, 2008.
- Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? An introduction and overview. *Yearbook of Medical Informatics* 2001; s:83-85.
- Malay AD, Allen KN, Tolan DR. Structure of the thermolabile mutant aldolase B, A149P: molecular basis of hereditary fructose intolerance. *J Mol Biol* 2005; 347:135–44.

- Meacham, C.E. and Morrison, S.J. (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501, 328–337.
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J.F., O'Mahony, M., Whyte, P., Fanning, S., 2007.
- Neher E: How frequent are correlated changes in families of protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:98-102
- Ng, P.C. and Henikoff, S. (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31, 3812–3814
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2006). Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 61–80.
- Nishi H, Ota M. Amino acid substitutions at protein-protein interfaces that modulate the oligomeric state. *Proteins* 2010;78:1563–74.)
- Nithya, P., & ChandraSekar, A. (2019). NBN Gene Analysis and it's Impact on Breast Cancer. *Journal of Medical Systems*, 43(8). doi:10.1007/s10916-019-1328-z
- Nur Şebnem ERSOZ, Yasin GUZEL, Burcu BAKIR-GUNGOR. In-silico Identification of Papillary Thyroid Carcinoma Molecular Mechanisms. 2019
- Özden A, Emir F. Genetik Polimorfizm ve Polimorfizm Çalışmalar. *Güncel Gastroenteroloji*. 2006:24-28.
- Pereira, G. R. C., Tellini, G. H. A. S., & De Mesquita, J. F. (2019). In silico analysis of PFN1 related to amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE*, 14(6), e0215723.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1987). The involvement of mRNA secondary structure in protein synthesis. *Biochem. Cell. Biol.* 65, 576–581.
- Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; 283: 139-146.
- Reeb, J., Wirth, T., & Rost, B. (2020). Variant effect predictions capture some aspects of deep mutational scanning experiments. *BMC Bioinformatics*, 21(1).
- Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky P V., Jackson RB. *Campbell chp 12*. In: *Campbell Biology*. Ninth Edit. Pearson; :275.
- Reid E. Emery's Elements of Medical Genetics. Vol 35. 14th editi. doi:10.1136/jmg.35.9.792-a.
- Reva, Antipin & Sander (2011) Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(17):e118–e118. doi: 10.1093/nar/gkr407.
- Robert M. Erskine, Alun G. Williams, David A. Jones, Claire E. Stewart, and Hans Degens. Do PTK2 gene polymorphisms contribute to the interindividual variability in muscle strength and the response to resistance training? A preliminary report. *J Appl Physiol* 112: 1329 –1334, 2012.
- Roberts WG, Ung E, Whalen P, Cooper B, Hulford C, Autry C, Richter D, Emerson E, Lin J, Kath J, Coleman K, Yao L, Martinez-Alsina L, Lorenzen M, Berliner M, Luzzio M, Patel N, Schmitt E, LaGreca S, Jani J, Wessel M, Marr E, Griffor M, Vajdos F.

Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF562,271. *Cancer Res.* 2008;68(6):1935–1944.

Russell PJ. *iGenetics*. In: *iGenetics*. Third Edit. Pearson; :18-19.

Russell PJ. *iGenetics*. In: *iGenetics*. Third Edit. Pearson; :272-273.

Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* 12(10), 683–91. doi:10.1038/nrg3051 Shen, L. X., Basilion, J. P. & Stanton, V. P., Jr (1999). Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 7871– 7876.)

Song Y, Samulski TD, Van Dyke TA. *Cancer*. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; eds. *Cancer*. 8 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:3-12.

Stebbing, G. K., Williams, A. G., Morse, C. I., & Day, S. H. (2017). Polymorphisms in PTK2 are associated with skeletal muscle specific force: an independent replication study. *European Journal of Applied Physiology*, 117(4), 713–720.

Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms. In *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. IntechOpen.

Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 2002;417:245–53.

Telefoncu A. *Biyoinformatik I. Biyoinformatik Lisansüstü Yaz Okulu*. 2003; s: 3-20, izmir.

Teng S, Madej T, Panchenko A, Alexov E. Modeling effects of human single nucleotide polymorphisms on protein-protein interactions. *Biophysical Journal*. 2009;96(6):2178–2188.

Teng S, Michonova-Alexova E, Alexov E. Approaches and resources for prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphism on protein function and interactions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008;9(2):123–133.

Tuğba KAMAN , Ömer Faruk KARASAKAL , Ebru Özkan OKTAY , Korkut ULUCAN , Muhsin KONUK In silico approach to the analysis of SNPs in the human APAF1 gene. (2019) *Turkish Journal of Biology*. ;43, 6

Van Nimwegen, M. J., & van de Water, B. (2007). Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 73(5), 597–609.

Vita M. Golubovskaya. Focal Adhesion Kinase as a Cancer Therapy Target. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010 December ; 10(10): 735–741

Vivona, S., Gardy, J. L., Ramachandran, S., Brinkman, F. S., Raghava, G. P. S., Flower, D. R., & Filippini, F. (2008). Computeraided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends in biotechnology*, 26(4), 190-200.

Vultur A, Buettner R, Kowolik C, Liang W, Smith D, Boschelli F, Jove R. SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(5):1185–1194

Yachida,S., Jones,S., Bozic,I., Antal,T., Leary,R., Fu,B., Kamiyama,M., Hruban,R.H., Eshleman,J.R., Nowak,M.A. et al. (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467, 1114–1117

Yue, P., Li, Z., & Moulton, J. (2005). Loss of Protein Structure Stability as a Major Causative Factor in Monogenic Disease. *Journal of Molecular Biology*, 353(2), 459–473.

Zeynep KOLÖREN, Elif ÇİL, Emine AYAZ, Ülkü KARAMAN. RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, 2017; 7(2): 215-225

Walsh C, Tanjoni I, Uryu S, Tomar A, Nam JO, Luo H, Phillips A, Patel N, Kwok C, McMahon G, Stupack DG, Schlaepfer DD. Oral delivery of PND-1186 FAK inhibitor decreases tumor growth and spontaneous breast to lung metastasis in pre-clinical models. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(10):778–790.

Wei Fu ,Jessica E.Hall , Michael D.Schaller .Focal adhesion kinase-regulated signaling events in human cancer. *ioMol Concepts*, Vol. 3 (2012), pp. 225–240.

Williams GM. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*; 14:166 (1- 2):3-10.

Williams G M (1979) Review of in vitro test systems using DNA damage and repair for screening of chemical carcinogens. *J Assoc Official Anal Chemists* 62: 857-863.

Williams G M (1985) Genotoxic and epigenetic carcinogens, In: F. Homburger (ed.), *Safety Evaluation and Regulation of Chemicals 2. Impact of Regulations-Improvement of Methods*, Basel: Karger: 251-256.

Williams G M (1987) DNA reactive and epigenetic carcinogens, In: J.C. Barrett, (ed.), *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, Vol 1: Role of Genetic and Epigenetic Changes, Boca Raton, FL: CRC Press, Inc:113-127.

Williams GM (1987) Definition of a human cancer hazard. In: *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis*. New York: Banbury Report 25, Cold Spring Harbor Laboratory: 367-380.

Williams GM (1992) DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Exp Toxicol Pathol* 44: 457-464. [Crossref]

Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., ... & Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D668-D672

(http://provean.jcvi.org/seq_submit.php)

(<http://mutationassessor.org/r3/> <http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>)

<http://pages.genemania.org/faq/#what-is-genemania>

<https://genemania.org/> <https://genemania.org/search/homo->

sapiens/ptk2/ <https://genemania.org/search/homo-sapiens/ptk2/>

<https://roslab.org/owiki/index.php/Snap2>

<https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>

(<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>

