

**BALIK GÖZÜ HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLEN LCAT GENİNDEKİ
ZARARLI SNP'LERİNİN SİLİCO YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ**

Sinan İlhan CEYHAN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Tez No: 2024-008

Afyonkarahisar

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETERİNERLİK MEDİKAL BİYOLOJİSİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALIK GÖZÜ HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLEN LCAT
GENİNDEKİ ZARARLI SNP'LERİN IN SİLİCO YÖNTEMLER İLE
BELİRLENMESİ

Hazırlayan

Sinan İlhan CEYHAN

Danışman

Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Tez No: 2024-008

AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	SİNAN İLHAN CEYHAN
	Numarası	203321011
	Anabilim Dalı	VETERİNERLİK MEDİKAL BİYOLOJİSİ VE GENETİK
	Programı	MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK
	Program Düzeyi	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
Tezin Başlığı		BALIK GÖZÜ HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLEN LCAT GENİNDEKİ ZARARLI SNP'LERİN İN SİLİCO YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ
Tez Savunma Sınav Tarihi		01.02.2024
Tez Savunma Sınav Saati		10:30

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım

Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/02/2024

İmza

Sinan İlhan CEYHAN

ÖZET

BALIK GÖZÜ HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLEN LCAT GENİNDEKİ ZARARLI SNP'LERİN IN SİLİCO YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

Balık gözü hastalığı, lesitin kolesterol açıl transferaz eksikliğinin serum serbest kolesterol seviyesinin yükselmesine yol açan, oldukça nadir görülen bir kolesterol metabolizması hastalığıdır. Günümüzde DNA'da kodlanan bölgelerde ve kodlanmayan bölgelerde bulunan SNP'lerin birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir. Bunlar arasında, yanlış anlamlı SNP'ler insanlarda proteinlerin fonksiyonel çeşitliliği ile sonuçlanan amino asit farklılıklarından sorumlu oldukları için oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında in silico yöntemler kullanılarak bir analiz çalışması yapılmıştır. Balık gözü hastalığı ile ilişkilendirilen LCAT genindeki yanlış anlamlı SNP'lerin in silico analizlerini yapabilmek amacıyla, kullanımı kamuya açık olan veri tabanları ve çevrimiçi yazılım araçları kullanılmıştır. LCAT geninde bulunan SNP'lerin bilgilerine NCBI dbSNP veri tabanından ulaşılmıştır ve 2836 SNP tespit edilmiştir. Bu SNP'lerden yanlış anlamlı olanlar filtrelenmiş ve tespit edilen 795 SNP araştırma için seçilmiştir.

SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assessor, SNAP2 ve PhD-SNP yazılım araçlarının her birinde aynı anda zararlı olduğu tahmin edilen amino asit değişimleri filtrelenmiştir. Toplam 7 adet varyantın tüm programlarda zararlı olduğu tespit edilmiştir.

Daha sonra zararlı olduğu tespit edilen 7 adet varyantın protein stabilizasyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek amacıyla I-Mutant ve MUpro yazılım araçları kullanılmıştır. I-Mutant 3.0 yazılım aracı ile yapılan çalışmada 7 varyantın da protein stabilizasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

LCAT genine ait yanlış anlamlı SNP'ler arasında zararlı/ hastalıkla ilişkili olabileceği belirlenen 7 SNP'nin MUpro çevrimiçi yazılım aracı ile yapılan analiz çalışmasında elde edilen bulgular sonucunda amino asit değişiminin tümünün protein stabilizasyonunu

azalttığı tespit edilmiştir. Bu alışma tanısal ve deneysel çalışmalara yol göstermek amacıyla yapılmıştır.

Yüksek riskli olduğu tahmin edilen SNP'lerin, balık gözü hastalığı ile ilişkili deneysel ve klinik çalışmalarda öncelikli olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.



Anahtar Kelimeler: Balık gözü hastalığı,, İn siliko, LCAT geni, Tek nükleotid polimorfizmi (SNP)

SUMMARY

IDENTIFICATION OF HARMFUL SNPS IN THE LCAT GENE ASSOCIATED WITH FISH-EYE DISEASE USING IN SILICO METHODS

Fish eye disease is an extremely rare disease of cholesterol metabolism in which lecithin cholesterolacyl transferase deficiency leads to increased serum free cholesterol levels. Today, SNPs located in coding regions and non-coding regions of DNA have been shown to be associated with many diseases. Among these, missense SNPs are very important as they are responsible for amino acid differences that result in functional diversity of proteins in humans. In this thesis study, an analysis study was carried out using in silico methods. In order to perform in silico analyzes of missense SNPs in the LCAT gene associated with fish-eye disease, publicly available databases and online software tools were used. Information about SNPs in the LCAT gene was accessed from the NCBI dbSNP database and 2836 SNPs were detected. Among these SNPs, the missense ones were filtered and 795 detected SNPs were selected for research.

Amino acid changes predicted to be deleterious were simultaneously filtered out in each of the SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assessor, SNAP2 and PhD-SNP software tools.

A total of 7 variants have been found to be harmful in all programs. I-Mutant and MUpro software tools were used to predict the possible effects of 7 variants, which were later found to be deleterious, on protein stabilization. In the study conducted with the I-Mutant 3.0 software tool, it was determined that all 7 variants had a reducing effect on protein stabilization.

As a result of the analysis conducted with the MUpro online software tool, it was determined that all of the amino acid changes reduced protein stabilization of 7 SNPs that were determined to be harmful/disease-related among the missense SNPs of the LCAT gene.

This study was conducted to guide diagnostic and experimental studies. It is recommended that SNPs predicted to be high risk be evaluated as a priority in experimental and clinical studies related to fish eye disease.



Keywords: Fish eye disease, In silico, LCAT gene, Single nucleotide polymorphism (SNP),

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
SUMMARY	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER	ix
RESİMLER	x
GRAFİKLER	xi
ÇİZELGELER	xii
1.GİRİŞ	13
2.GENEL BİLGİLER	15
2.1. Balık gözü Hastalığı	15
2.2. Polimorfizm	16
2.2.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi	17
2.3. Biyoinformatik	19
2.3.1. İn Siliko	21
2.4. Lesitin Kolestrol Açıl Transferaz	22
2.5. Lipitler	23
2.5.1. Trigliseritler	23
2.5.2. Kolesterol	23
2.5.2.1. Kolesterol Tarihçesi	24
2.5.2.2. Kolesterol Sentezi	25
2.5.3. Plazma Proteinleri	26

2.5.3.1. Şilomikronlar	26
2.5.3.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler	28
2.5.3.3. Ara Dansiteli Lipoproteinler	31
2.5.3.4. Düşük Dansiteli Lipoproteinler	31
2.5.3.5. Yüksek Dansiteli Lipoproteinler	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Araştırmanın Tipi	35
3.2. Veri Eldesi	36
3.2.1. LCAT İçin Gen-Gen Etkileşimleri	37
3.3. Zararlı SNP'lerin Belirlenmesi	39
3.3.1. Sift	39
3.3.2. Polyphen-2	39
3.3.3. Provean	40
3.3.4. Snps & Go	40
3.3.5. Mutation Assessor	41
3.3.6. Snap 2	41
3.3.7. Phd-SNP	42
3.4. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmini	42
3.4.1. I-Mutant 3.0	42
3.4.2. Mupro	43
3.5. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen Varyasyonların Üç Boyutlu Modellemesi	43

3.5.1. Hope	43
4.BULGULAR	44
4.1. Veri Eldesi	44
4.2. Zararlı SNP'lerin Belirlenmesi	45
4.2.1. Sift Sonuçları	45
4.2.2. Polyphen-2 Sonuçları	48
4.2.3. Provean Sonuçları	52
4.2.4. SNPs & GO Sonuçları	54
4.2.5. Mutation Assessor Sonuçları	56
4.2.6. SNAP 2 Sonuçları	58
4.2.7. Phd-SNP Sonuçları	60
4.3.Olduğu Tahmin Edilen SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkileri	62
4.3.1. I-Mutant 3.0 Sonuçları	65
4.3.2. Mupro Sonuçları	66
4.4. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen Varyasyonların Üç Boyutlu Modellemesi	66
4.4.1. Project Hope	66
5.TARTIŞMA	73
5.1. SNP'lerin Biyoinformatik Analiz Sonuçlarının Tartışılması	73
5.1.1. Protein Stabilizasyonu	74
5.1.2. Amino asit Özellikleri	74
5.1.2.1. Boyut	74
5.1.2.2. Yapı	76

5.1.2.3. Hidrofobiklik	76
5.1.2.4. Yük	77
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	79
7.KAYNAKLAR	80



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

FED: Balık Gözü Hastalığı

LCAT: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi/ Single Nucleotid Polimorfizm

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

m-RNA: Mesajcı RNA

GWAS: Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları

HDL: High Density Lipoprotein/ Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

VLDL: Very Low Density Lipoprotein/ Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

HMG-KoA: 3-Hidroksi-3-Metilglutaril KoA

Å: Ångström

–OH: Hidroksi

IDL: Ara Dansiteli Lipoprotein

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

Lp (a): Lipoprotein a

FIS: Functional Impact Combined Score

TS : Tahmin Skoru

aa: Amino Asit

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 2.1. Gendeki Pozisyona Bağlı Olarak Farklı SNP Türleri	18
Şekil 2.2 Kolesterol Yapısı	24
Şekil 2.3. Şilomikronun Yapısı	27
Şekil 2.4. Şilomikronun Metabolizması	28
Şekil 2.5. VLDL Yapısı	29
Şekil 2.6. VLDL Metabolizması	30
Şekil 2.7. LDL Yapısı	31
Şekil 2.8. LDL Metabolizması	32
Şekil 2.9. HDL Yapısı	33
Şekil 2.10. HDL Metabolizması	34
Şekil 3.11. İş Akış Şeması	35
Şekil 3.12. LCAT Geni İle İlgili Genler Arasındaki Etkileşim Ağı	38

RESİMLER

SAYFA

Resim 2.1. Balık Gözü Hastalığı

15



GRAFİKLER

	SAYFA
Grafik 4.1. SIFT Sonucu	45
Grafik 4.2. PolyPhen-2 HumDiv Tahmin Modeli	48
Grafik 4.3. PolyPhen-2 HumVar Tahmin Modeli	49
Grafik 4.4. Provean Sonuçları	52
Grafik 4.5. SNPs&Go Sonuçları	54
Grafik 4.6. Mutation Assensor Dağılımı	56
Grafik 4.7. SNAP2 Dağılımı	58
Grafik 4.8. PHD-SNP Sonuç Dağılımı	60

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 4.1. Tolere Edilebilir Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar	46
Çizelge 4.2. Zararlı (Düşük Düzeyde) Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar	46
Çizelge 4.3. Zararlı Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar	47
Çizelge 4.4. PolyPhen-2 Sonuçları	49,50,51
Çizelge 4.5. Provean Sonuçları	53
Çizelge 4.6. SNPs&Go Sonuçları	55
Çizelge 4.7. Mutation Assensor Sonuçları	57
Çizelge 4.8. SNAP2 Sonuçları	59
Çizelge 4.9. PhD-SNP Sonuçları	61
Çizelge 4.10. Zararlı Olduğu Tespit Edilen SNPlar	63,64
Çizelge 4.11. I-Mutant 3.0 Sonuçları	65
Çizelge 4.12. Mu-Pro Sonuçları	66
Çizelge 4.13. Project HOPE Modelleme Sonuçları	67,68,69,70
Çizelge 4.14. Project HOPE Sonuçlarına Göre Doğal Tip ve Mutant Kalıntı Amino Asit Özellikleri	71

1. GİRİŞ

Balık gözü hastalığı (FED), lesitin kolesterolaçıl transferaz (LCAT) eksikliğinin serum serbest kolesterol seviyesinin yükselmesine yol açan, oldukça nadir görülen bir kolesterol metabolizması hastalığıdır (Ranawaka vd, 2021). Bilateral kornea opaklığı, FED’i ayırt etmek için önemli bir klinik özelliktir ve ilk kez Carlson ve Philipson tarafından ortaya konulmuştur (Carlson ve Philipson, 1979).

FED, otosomal resesif kalıtıma sahip, bilateral ilerleyen korneada bulanıklık ve dislipoproteinemi ile karakterize bir hastalıktır (Rader ve deGoma, 2012; De Smedt vd., 2001). Kornea opaklığı genç bireylerde görülmekte ve korneanın periferinden başlayıp merkezine doğru ilerleyen, görmede azlığına sebep olan küçük beyaz, sarı ve gri renkli noktalardan oluşmuş olan belirgin kornea bulanıklığı vardır (Cogan vd., 1992; Tateno vd., 2012; Winder ve Borysiewicz., 1982; Gustafson vd., 1979).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), DNA’daki tek bir bazda meydana gelen ve en sık gözlenen değişikliklerdir. Oldukça bol bulunan ve genom boyunca yayılan SNP’ler, popülasyondaki bireysellik, çeşitlilik ve hastalıklara yatkınlık gibi birçok faktörle ilişkilidir. Günümüzde SNP ile ilişkilendirilmiş kanser, diyabet, nörodejeneratif ve nörogelişimsel bozukluklar gibi birçok hastalık olduğu bildirilmiştir; bununla birlikte FED de bunlardan biridir (Shastri, 2002).

SNP, insan genomundaki en yaygın varyasyon kaynaklarından biridir. SNP’lerin biyolojik etkisiyle bir veya birden fazla hastalığa yatkınlık artabilmektedir. Hastalığa yatkın olmayı ve hastalığın seyrine etki eden SNP’lerin tanımlanması, hasta ve sağlıklılarda SNP’lerin genotiplemesi ve frekanslarında sistematik farklılıklar aranmasıyla sağlanmaktadır (Harley ve Narod, 2009; Özkan vd., 2015).

Hastalıklarla ilişkili SNP’lerin belirlenmesi için öncelikle in silico araçlar kullanılarak SNP’lerin muhtemel zararlı etkilerinin belirlenmesi, elde edilen verilere göre genotipleme çalışmalarının planlanması günümüzde terci—h edilmektedir (Poli vd., 2003).

Günümüzde özellikle genetik alanında deneysel süreçlere rehber olmak adına yapılmış birçok in siliko analiz aracı bulunmaktadır. Bu araçlar; genlerin protein kodlayan bölgelerinde oluşan SNP'lerin sonucunda, protein yapısında meydana gelen amino asit değişimlerinin olası etkilerini tahmin edebilmektedirler (Kong vd., 2008).

SNP, DNA molekülünün herhangi bir parçasındaki belirli bir konumunda bulunabilen, sadece tek bir nükleotidin (A, T, G, S) popülasyondaki bireyler arasında farklılık göstermesiyle tanımlanan genetik dizi varyasyonlarıdır (Brookes, 2007). SNP'ler popülasyonda %1'den fazla bir dağılım sıklığı ile insan genomunda bulunabilen en yaygın genetik varyasyon türü olarak kabul edilmektedir (Marcolino vd., 2016; Wang ve Moul, 2001).

Bu sebeple, genellikle tek baz insersiyon/delesyon varyantları SNP tanımına dahil edilmez (Brookes, 1999; Brookes, 2007). SNP'ler DNA'da genlerin kodlanan ve kodlanmayan dizilerinde veya genler arası bölgelerde görülebilir (Kaman vd., 2019). SNP'ler temel olarak kodlanan ve kodlanmayan DNA bölgelerinde bulunmalarına göre iki grupta incelenir. Kodlanan bölgede bulunan SNP'ler de eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan olarak incelenirler (Chen vd., (2010).

Eş anlamlı SNP'ler genin kodladığı protein dizisinde farklılık oluşturmazken, eş anlamlı olmayan SNP'ler protein dizisinde amino asit farklılığına sebep olurlar (Gebert vd., 2020). Nokta mutasyonun eş anlamlı olmayan SNP'lerde amino asit farklılığına sebep olması yanlış anlamlı mutasyona neden olurken, mRNA dizisinde durdurucu kodon oluşturması anlamsız mutasyona neden olmaktadır (Yamaguchi-Kabata vd., 2008).

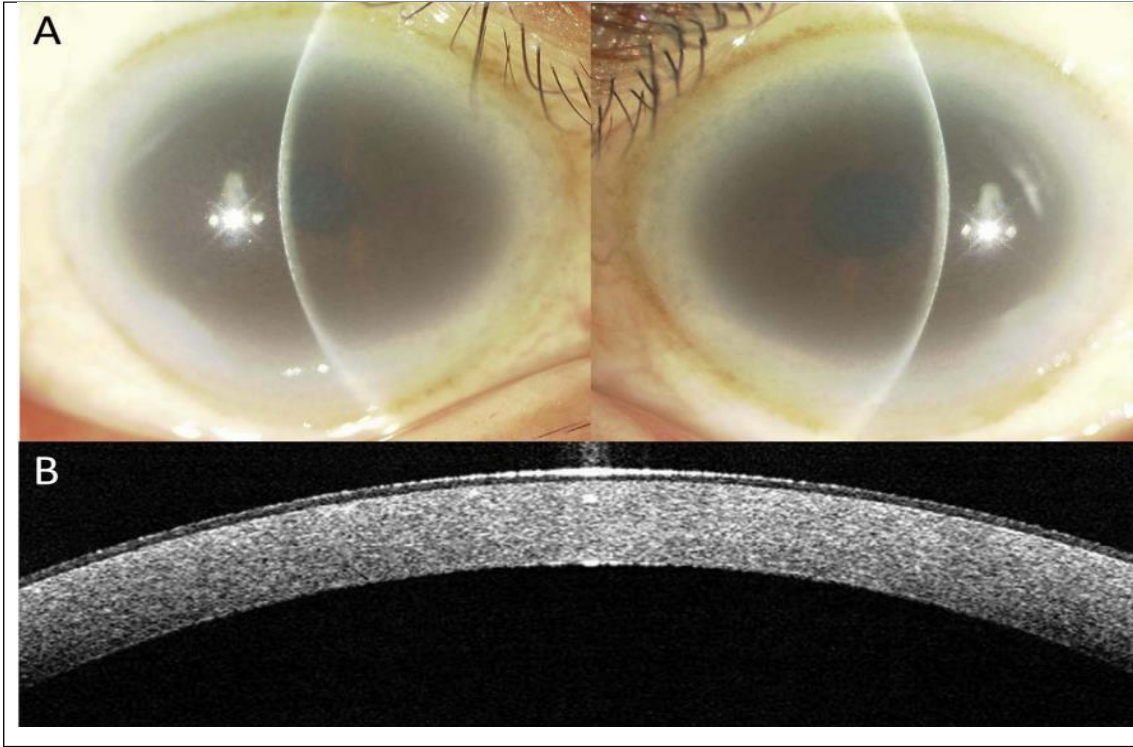
Günümüzde DNA'da kodlanan bölgelerde ve kodlanmayan bölgelerde bulunan SNP'lerin birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir (Deng vd., 2017; Zhu vd., 2018). Bunlar arasında, yanlış anlamlı SNP'ler insanlarda proteinlerin fonksiyonel çeşitliliği ile sonuçlanan amino asit farklılıklarından sorumlu oldukları için oldukça önemlidir (Cargill vd., 1999).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Balık Gözü Hastalığı

Balık Gözü Hastalığı (FED), LCAT eksikliğinin serum serbest kolesterol seviyesinin artmasına neden olan, oldukça nadir görülen bir kolesterol metabolizması hastalığıdır (Ranawaka vd, 2021). Bilateral kornea opaklığı, FED'in ayırıcı önemli bir klinik özelliğidir ve ilk kez Carlson ve Philipson tarafından ortaya konulmuştur (Carlson ve Philipson, 1979). Yoğun kornea opasifikasyonu yavaş ilerler ve 15 yaş ve sonrasında ciddi görme bozukluğuna neden olur (Barchiesi vd, 1991).

FED; otozomal resesif kalıtıma sahip, bilateral ilerleyen kornea bulanıklığı ve dislipoproteinemi görülebilen bir hastalıktır (Rader ve deGoma, 2012; De Smedt vd., 2001). Kornea opaklığı genç kişilerde görülmekte ve kornea periferinden merkezine doğru ilerleyen görme azlığına neden olan küçük sarı, beyaz ve gri renkli noktalardan oluşan kornea bulanıklığıdır (Cogan vd., 1992; Tateno vd., 2012; Winder ve Borysiewicz, 1982; Gustafson vd., 1979).



Resim 2.1. Balık Gözü Hastalığı (Kanai vd.,2018).

FED’de LCAT aktivitesi düşüktür. HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein)’nin serbest kolesterolünün esterleşmemesine ve buna bağlı olarak esterleşmemiş kolesterolün dokularda birikimi söz konusudur. FED, LCAT eksikliğinin kısmi hastalığı olarak bilinmektedir (Rader ve deGoma, 2012; De Smedt vd., 2001). FED’li hastalar HDL partiküllerinde bulunan serbest kolesterolü esterleştiremediğinden, kolesterolün kornea stromasında biriktiği düşünülmektedir. Şeffaflık korneanın temel bir optik özelliğidir ve serbest kolesterol birikmesi bu şeffaflığı azaltarak görme işlevini bozabilir (Tateno vd, 2012).

2.2. Polimorfizm

Polimorfizm Latince kökenli poli (çoklu) ve morfizmos (şekil) kelimelerinin birleşmesi ile oluşan bir kelime olup çok şekillilik anlamına gelmektedir. Coğrafi ve etnik farklılıklar polimorfizmlere neden olabilmektedir. Polimorfizmlerin oluşması etkilediği genin fonksiyonuna göre farklı sonuçlara sebep olmaktadır. Bir gende SNP’ler fonksiyon değişikliğine yol açmışsa aktivite artışı, azalışı veya disfonksiyona sebep olabilmektedir. Polimorfizmler çoğunlukla hastalıklara yatkınlık nedeni olabilmektedirler. Polimorfizmler birçok alanda araştırma konusudurlar. Örneğin; DNA parmak izi çalışmalarında, babalık testinde, pedigrinin belirlenebilmesinde, soyun belirlenebilmesinde, prenatal tanıda, farmogenetik çalışmalarda, genetik haritalama çalışmalarında, immünogenetikte, birçok genetik hastalıkların tanısında vb. konularda polimorfizmlerden yararlanılmaktadır (Bozkaya,2009; Teama, 2018).

Polimorfizm, bireyler arası farklılığın oluşmasını sağlayan çok küçük genetik kod farklılıklarıdır. Kişiye özgü genomların %99,9’u özdeştir (Aksoy ve Soydemir., 2017). Genetik farklılıkların, bir popülasyonda %1’den fazla sıklıkta görülmesi polimorfizm olarak adlandırılmaktadır (Genetik Polimorfizmler ve İlişkili Hastalıklar, n.d.).

DNA polimorfizm oluşma şekilleri; bir veya daha fazla bazda insersiyon (ekleme), delesyon (silme), inversiyon (yeniden düzenleme) veya tek nükleotid değişimidir. Delesyon; DNA dizisinden nükleotid silinmesi, insersiyon; DNA dizisine nükleotid eklenmesi, inversiyon; dizinin tersine çevrilmesi, tek nükleotid polimorfizmi ise; dizideki bir bazın değiştiği durumlarda gözlenmektedir. Polimorfizmler, bireyler arasında

varyasyonlara sebep olabilmektedir. Bazılarının sebep olduğu gen kopyalanması veya silinmesiyle birlikte hastalıklara sebep olabilmektedir (Wright, A. F. 2005).

2.2.1 Tek Nükleotid Polimorfizmi

Bireyler arasında DNA’da tek bir baz dizilimindeki değişiklikler, tek nükleotid polimorfizmi ya da kısaca SNP olarak adlandırılmaktadır (SNP. (n.d.). Nature.)

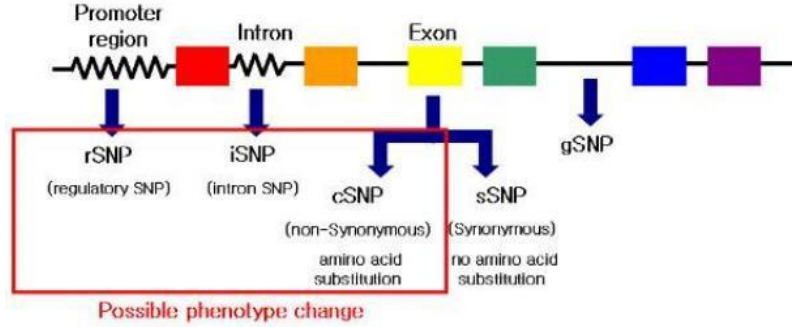
Tek Nükleotid Polimorfizimleri (SNP), DNA molekülünün herhangi bir bölümündeki spesifik bir konumda bulunabilen, sadece tek bir nükleotidin (A, T, G, S) popülasyondaki bireyler arasında farklılık göstermesiyle tanımlanan genetik dizi varyasyonlarıdır. Bu nedenle, genellikle tek baz insersiyon/delesyon varyantları (indeller) resmi olarak SNP tanımına dahil edilmez (Brookes, 2007). Bu alellerin frekansının o toplumda % 1 veya daha fazla olması gerekmektedir, % 1’den az olan aleller SNP olarak kabul edilmez (Lonetti ve ark., 2016).

SNP’lerdeki nükleotid değişim biçimleri; transisyon ve transversiyon şeklindedir. Transisyon; bir pürin bazının pürin bazına (A,G) veya bir pirimidin bazının pirimidin bazına (C,T) değişimidir. Transversiyon ise; bir pürin bazının pirimidin bazına veya pirimidin bazının pürin bazına dönüşümüdür. G>A, C>T transisyonları, insan genomundaki SNP’lerin %25’ini oluşturmaktadır (Sönmezoğlu, 2010).

SNP’ler DNA’da genlerin kodlanan ve kodlanmayan dizilerinde veya genler arası bölgelerde görülebilir (Kaman vd, 2019). En sık gözlenen SNP’lerin çoğu (%75), insan genomunda kodlanmayan bölgelerde (non-coding region SNPs) oluşmaktadır. %25’i gen kodlama bölgelerinde (coding region SNPs) oluşur. Bunların sinonim olmayan ve sinonim olmak üzere 2 tipi gözlenmektedir. Sinonim olmayan SNP’ler amino asit dizisini veya düzenleyici dizinin işlevini değiştirerek gen fonksiyonunu etkilerken, sinonimlerin amino asit dizileri üzerinde etkileri görülmemektedir (Harley ve Narod, 2009).

SNP’ler temel olarak kodlanan ve kodlanmayan DNA bölgelerinde bulunmalarına göre iki grupta incelenir. Kodlanan bölgede bulunan SNP’ler de eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan olarak sınıflandırılır (Chen vd, 2010). SNP’ler ifade edilen ve ifade edilmeyen

DNA bölgelerinde bulunabilmektedirler (KARCICIO, 2006). SNP'lerin birçok çeşidi bulunmaktadır .



Şekil 2.1. Gendeki Pozisyona Bağlı Olarak Farklı SNP Türleri (Sönmezoğlu, Ö. A.2010)

Eş anlamlı SNP'ler genin kodladığı protein dizisinde değişiklik oluşturmazken, eş anlamlı olmayan SNP'ler protein dizisinde amino asit değişimine sebep olurlar (Gebert vd, 2020).

Günümüzde DNA'da kodlanan bölgelerde ve kodlanmayan bölgelerde bulunan SNP'lerin birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir (Deng ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2018). Bunlar arasında, yanlış anlamlı SNP'ler insanlarda proteinlerin fonksiyonel çeşitliliği ile sonuçlanan amino asit değişimlerinden sorumlu oldukları için oldukça önemlidir (Cargill ve ark., 1999). Fonksiyonel varyasyonlar protein yapısı veya fonksiyonu üzerinde nötr etki edebilir veya bu varyasyonlar zararlı etkileri nedeniyle patolojiye yol açabilir (Capriotti ve Altman, 2011). İnsan genom projesi çalışmaları sonucunda insanlarda yaklaşık 3 milyon SNP bulunduğu bildirilmiştir (Russell, 2001).

Oldukça bol bulunan ve genom boyunca yayılan SNP'ler, popülasyondaki bireysellik, çeşitlilik, hastalıklara yakınlıkla ilişkilidir. Tek-çift yumurta ikizleri ve kardeşler ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, genetik varyasyonların birçok hastalığa yakınlıkla ilişkili faktörlerden biri olduğunu göstermektedir (Shastri, 2002).

SNP'lerin genom veya proteinler üzerindeki etkileri hastalık oluşma riskini arttırabilmektedir (Özkan ve ark, 2015). Tek nükleotid polimorfizmleri, hastalığın asıl nedeni olmadan yatkınlık oluşturarak veya birikimli etki göstererek hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır (Battaloğlu ve Başak, 2010).

GWAS (Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları) araştırmalarında, 200'den fazla hastalık incelemesi yapılmış ve toplamda 4000'den fazla hastalık-polimorfizm ilişkisi bulunmuştur. Çalışmaların artmasıyla birlikte birçok hastalıkla ilişkili risk genleri bulunmuştur. Oluşan polimorfizmlerin, özellikle protein kodlayan genlerde oluşan SNP'lerin protein işlevini değiştirmesinin, insan üzerindeki etkileri yadsınmamaktadır (Aksoy ve Soydemir, 2017).

SNP'ler genlerin ifade edildiği bölgelerinde bulunuyor ise ve amino asit dizilerinde farklılığa sebep oluyor ise fenotipik farklılıklara yol açabilmektedirler (Sunyaev vd, 1999). Zarar verici etkiler nedeniyle gen regölasyonu değişebilir, protein yapısı kararsızlaşabilir, protein translasyonu, dinamiği, stabilitesi, yükü, geometrisi, hidrofobikliği ve proteinler arası etkileşimler etkilenebilir (Yates ve Sternberg, 2013; Petukh ve ark., 2015; Arshad ve ark., 2018).

2.3 Biyoinformatik

Biyoinformatiğin ilk kez ortaya çıktığı tarih tam bilinemesi de Pauling ve Corey'in 1951 yılında proteinlerin sekonder yapısının tahmini için yapmış oldukları çalışma başlangıç sayılmaktadır. Scientific American dergisinde 1966 yılında yayımlanan çalışma ile verilerin daha doğru göröltenenebilmesi için bilgisayarda moleköler grafiklerin çizilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır. Paulien Hogeweg ve Ben Hesper bilim insanları tarafından 1970 yılında "biyotik sistemlerde bilişimsel süreçlerin incelenmesi" adlı makale ile biyoinformatik kelimesi kullanılmıştır (Lapidus, t.y.).

Biyoinformatik; biyoloji, bilişim teknolojileri ve bilgisayar bilimlerinin disiplinler arası çalışmasını gerektiren bir bilim dalıdır. Gelecek zamanda DNA dizilerinde bulunan genom düzeyinde saklanan ve gerektiği zaman kullanılan yaşam şifresi biyoinformatik bilimindeki çalışmalar ile daha hızlı çözöllebilir ve bu sayede kanserin tanı ve tedavisine

kadar bir çok biyolojik olayın altında yatan mekanizmalar çözümlenebilir (Scherer, 2001).

Biyoinformatiğin asıl amacı ilk başta, biyolojik veri tabanlarının oluşturulması ve verilerin kategorize edilerek muhafaza edilmesi ile ilgili çalışmalar yapmak iken, günümüz koşullarında çeşitli biyolojik verilere ulaşım, yeni verilerin veri tabanına girişi veya mevcut verilerin değiştirilmesi ile ilgili veri tabanlarının oluşturulması ile gelişmiş ve kapsamı genişlemiştir. Mevcutta bulunan biyolojik verilerin normal fizyolojik şartlarda ve hastalık sırasında hücresel olayların düzenlenmesinde kullanılması amacıyla birçok biyoinformatik analiz yöntemleri geliştirilebilmektedir. Biyoinformatik bilimindeki gelişmeler daha çok bu verilerin analizi ve yorumlanması yönündedir. Nükleotid ve amino asit dizi analizi, proteinlerin işlevsel alt birimleri ve protein yapı analizleri bilişimsel biyoloji ile çözümlenmektedir. Bu çalışmalar başlıca çeşitli türlerdeki biyolojik bilgilere verimli olarak erişim, kullanım ve idaresi için gereken yazılımların geliştirilmesi ve uygulanmasını ve bu çalışmalar ile gerçekleştirilen büyük veri kümeleri arasındaki ilişkilerin değişik algoritmalar ve istatistiksel yöntemler ile açığa çıkarılmasını kapsamaktadır (Baxevanis, 2001).

Biyoinformatik; moleküler biyoloji, medikal biyoloji ve genetik bilgi birikimlerinden yararlanılıp oluşturulan bilgisayar programları kullanılarak sonuçlar çıkarmamıza ve böylelikle tahminler yapabilmemize olanak sağlamaktadır. Temel amacı, genomu verilen organizma ile ilgili tüm fonksiyonların anlaşılmasını sağlamaktır. Biyoinformatik yöntemler, daha az maliyetli olmasıyla ve kısa sürede verilerin son derece etkin toplanıp sonuca giden adımları hızlandırması nedeniyle laboratuvar çalışmalarına kıyasla büyük avantaj sağlamaktadır (Polat ve Karahan, 2009).

Bilimsel çalışmaları yapmak bazı durumlarda uzun zaman ve maliyet almaktadır. Bioinformatik veritabanlarının karşılaştırmalı bilgilerinin kullanılması, araştırmanın spesifikliğini arttırarak zaman ve maliyet kazancı sağlamıştır. Bu kapsamda biyoloji dünyasında in siliko terimi gelişmiştir. İn siliko terimi “bilgisayar veya bilgisayar simülasyonları kullanılarak gerçekleştirilen” anlamındadır. Biyolojik çalışmalarda ise kimyasal maddelerin veya DNA dizi değişikliklerinin etkileri ile ilgili hesaplamalar yaparak verilerin bilimsel analiz edilmesi ve organizasyonu anlamına gelmektedir.

İn siliko terimi ilk kez 1987 yılında Christopher Langton tarafından, Los Alamos Ulusal Laboratuvarı'ndaki Doğrusal Olmayan Çalışmalar Merkezi'nde yapay yaşamı tanımlamak için bir çalıştayın duyurusunu iletirken kullanılmıştır (Hameroff, S.R., 2014).

2.3.1 İn Siliko

İn siliko çalışmalar, bilgisayar ve simülasyon çalışmalarını ifade eden biyoinformatik biliminin alt dalıdır. İn siliko teknikler, gen çalışmaları, protein tasarımı, hücre davranış modellemesi gibi alanlarda uygulanabilmektedir. İn siliko teknikler SNP'lerin olası etkilerinin tahmininde de kullanılmakta ve deneysel çalışmalar öncesinde önemli veriler sağlamaktadır (Altuntaş ve Gök., 2020). İn siliko terimi yazılı olarak ise bir Fransız ekip tarafından 1990 yılında kullanılmıştır (Danchin vd., 1991). İn siliko teriminin bulunduğu ilk referans kitap bölümü ise Hans B. Sieburg tarafından 1990 yılında yayımlanmıştır (Sieburg., 1990).

İn siliko teriminin güncel olarak kullandığımız tanımı 1989 yılında Meksika Ulusal Otonomi Üniversitesinde görev alan Pedro Miramontes tarafından New Mexico'daki "Hüresel Otomata: Teori ve Uygulamalar" seminerinde yapılmıştır (Miramontes.,1992). Hastalıklarla ilişkili olan SNP'lerin belirlenmesi için in siliko araçlar kullanılarak SNP'lerin olası zararlı etkilerini belirlenmesi ve elde edilen bulgulara göre genotiplleme çalışmalarının planlanması günümüzde tercih edilen yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Poli vd, 2003).

Günümüzde özellikle genetik alanında deneysel süreçlere kılavuz olmak adına yapılmış birçok in siliko analiz aracı mevcuttur. Bu araçlar; genlerin protein kodlayan bölgelerinde gerçekleşen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) sonucu olarak, protein yapısında meydana gelen amino asit 2 değişimlerinin olası etkilerini tahmin edebilmektedirler (Kong vd., 2008).

Hastalıklarla ilgili SNP'lerin belirlenmesi, ilaçların ve diğer kimyasal maddelerin vücuttaki etkilerinin bilgisayar modelleri ile tahmin edilmesi işleminde in siliko metotlar kullanmak maliyet, zaman, hız bakımından büyük avantaj kazandırmaktadır. Çok fazla verinin aynı anda, doğruluk değeri yüksek olarak analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Yavuz ve Marangoz,2018).

2.4 Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz

Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz (LCAT) geni, hücre dışı kolesterol esterleştirici enzim olan lesitin kolesterol asiltransferazı kodlar. 1. kromozomun uzun kolunda konumlanmıştır (16q22.1) ve 440 amino asitlik bir proteini kodlar. Kolesterolün taşınması için kolesterolün esterleşmesi gereklidir. Bu gendeki mutasyonların FED'e ve LCAT eksikliğine neden olduğu bulunmuştur (NCBI).

LCAT enzimi, serbest kolesterolü kolesterol esterlerine dönüştürerek olgunlaşmış HDL oluşumunu sağlar. LCAT geninde 40'tan fazla çok mutasyon tanımlıdır. Bu mutasyonlara göre klasik LCAT eksikliği (tam eksiklik) veya FED (kısmi eksiklik) olmak üzere iki hastalıktan biri ortaya çıkar. FED hastalarında korneada bulanıklık en önemli bulgudur (Kastelein vd, 1992; Bourcier vd. 2005).

LCAT, çevre dokularda yer alan artık kolesterolün karaciğere gönderilme hızını arttıran bir enzimdir. Bu enzimdeki fonksiyonların herhangi bir defekti kolesterolün dokularda birikmesine sebep olur. Buna bağlı olarak kornea bulanıklığı, kornea arkusu, ateroskleroz ve böbrek yetmezliği oluşabilir. Korneayı etkileyen serum lipoproteinlerinin anormal düzeyde azalması; LCAT eksikliği, Tangier ve FED hastalıklarında görülmektedir (Cogan vd., 1992; Tatenno vd.,2012).

LCAT insan plazmasındaki kolesterol esterlerinin sentezinden sorumludur. LCAT eksikliği nadir görülen otozomal resesif kalıtımla geçen bir hastalıktır. Hastalarda LCAT aktivitesinin azalması, HDL eksikliği, hemolitik anemi, proteinüri, böbrek yetmezliği gibi durumlar görülebilir (Calabresi ve Franceschini, 2010).

2.5. Lipitler

Lipitler, insan hücreleri ve plazma lipoproteinlerinde kritik rol oynayan bileşenlerdir. Lipitler, basit yapılı veya kompleks yapılı olarak ayrılabilir. İnsan plazmasında yer alan başlıca lipitler; trigliseritler, fosfolipitler, kolesterol ve esterlerdir (Gotto, 2011; Thompson, 1991).

2.5.1 Trigliseritler

Trigliserit, gliserol ve buna bağlı üç yağ asidinden meydana gelmektedir. Yağ asitleri doymuş, tekli doymamış veya çoklu doymamış olabilir. Trigliseritlerin büyük miktarı lipoproteinler aracılığıyla taşınmaktadır (Dayspring ve Pokrywka, 2010).

Trigliseritler vücutta en çok bulunan kompleks lipitlerdir ve yağ dokusunda büyük lipid damlacıkları olarak depolanmaktadır. Ayrıca trigliseritten zengin lipoproteinler olan şilomikron ve Very Low Density Lipoprotein (VLDL) içinde yapı taşı olarak da bulunurlar. Trigliseritler hidrolize edilerek yağ asitlerine dönüştürülüp, enerji sağlamak için vücut tarafından kullanılabilirler (Mahley, 1993.)

Fosfolipitler, yapısal olarak trigliseritler ile benzerlerdir. Trigliseritlerdeki gliserolün 3. karbonundaki yağ asiti bir fosfat ve ilaveten alkol gibi bir polar grupla yer değiştirilmiştir. Fosfolipitler akciğer sürfaktan maddenin ana bileşeni ve safranın esas komponentidir (Laker, 1998).

2.5.2. Kolesterol

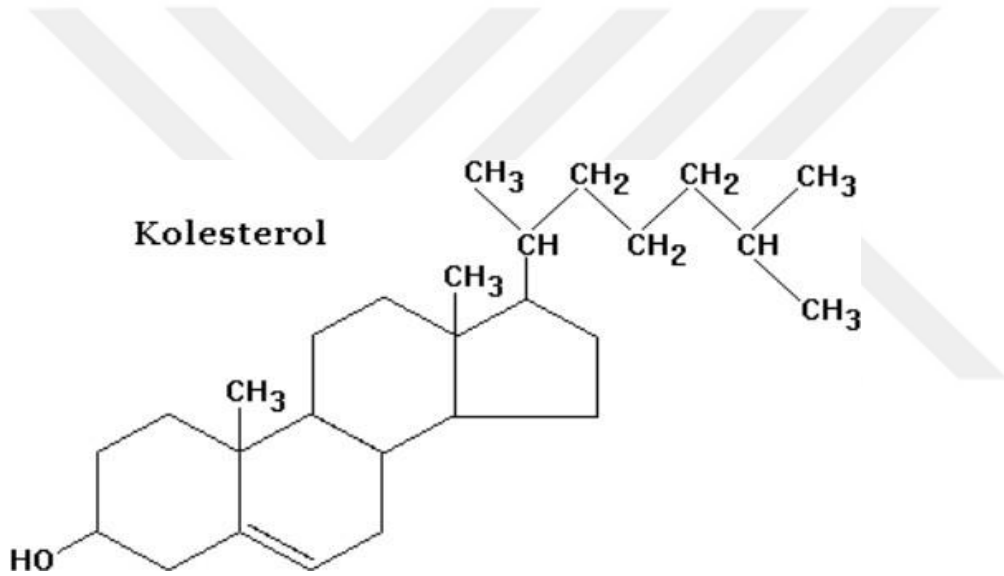
İnsan ve hayvan dokularında yer alan temel steroller olarak tanımlanır. Kolesterol, polar bir başa ile apolar hidrokarbon gövdeye sahiptir. Kolesterolün polar başındaki 3. karbondaki -OH grubu 5. ve 6. karbonları arasındaki çift bağ, kolesterolün reaktif kısımlarıdır. Kolesterol 3. karbonundaki -OH grubu esansiyel yağ asitleri özellikle linoleik asit ile esterleşir. Bu esterleşmeyi LCAT enzimi katalizler. Besinlerle alınan kolesterol bağırsak mukoza hücreleri, karaciğer ve böbrek korteksinde esterleşir. Kolesterol, organizmada karaciğer, safra, bağırsak mukozası, beyin, sinir dokusu, deri ve plazmada bulunmaktadır. Sağlıklı kişilerde total kolesterolün plazma düzeyi 150-200

mg/100mL'dir. Plazmada total kolesterolün 3/4'ü ester, 1/4 'ü ise serbest şekilde yer almaktadır (Gürdol, 2006).

2.5.2.1. Kolesterol Tarihçesi

Kolesterol ilk kez Fransız kimyacı M.E. Chevreul tarafından 1815 yılında insan safra taşındaki bir bileşen olarak bulunmuş ve kolesterin olarak adlandırılmıştır. Moleküler formülü 1888 yılında F. Reinitzer tarafından $C_{27}H_{46}O$ olarak belirlenmiştir.

1932 yılında kolesterolün gerçek yapısı tam olarak ortaya konulmuştur. Kolesterolün biyosentezi 1952 yılında Kondrad Bloch tarafından özetlenmiş ve 1964'te Nobel ödülü almıştır (Vance ve Van den Bosch, 2000).



Şekil 2.2. Kolesterol Yapısı

(https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1027/mod_resource/content/1/9.%20Lipid%20Metabol%20%28Kolesterol%20Metabolizmas%C4%B1%29.pdf).

Lipitler vücutta enerji dengesi, üreme ve organ fizyolojisi ve hücre biyolojinin devamı için mutlaka gereklidir. Lipitler çok hassas dengeler üzerinde olup bu dengenin bozulması obezite, kalp hastalığı, enflamasyon ve diyabet gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Lee vd., 2003).

Kolesterol steroid ve alkolün birleşiminden oluşan ve kanda taşınan bir moleküldür. Ayrıca hücre membran bileşeni olmasının yanı sıra; steroid hormon, Vitamin D ve safra tuzlarının sentezinde öncül moleküldür. Diyetle alınabildiği gibi, vücutta da sentezlenebilir. Kolesterol biyosentezinin ana merkezi karaciğer ve santral sinir sistemidir. Dokulardan emilmeyen kolesterol safra tuzları şeklinde, bağırsaktan ve deriden atılabilmektedir. Günlük fekal yolla atılım 550 mg, safra tuzları olarak 250 mg, deriden 100 mg civarındadır. Bir günde 900 mg kolesterolün endojen olarak sentezi ve eksojen olarak alınması gereklidir (Levy vd., 2007).

2.5.2.2. Kolesterol Sentezi

Kolesterol sentezlenmesi dört evreden oluşmaktadır. Birinci evrede üç asetat altı karbonlu mevalonatı oluşturmak üzere yoğunlaşmaktadır. İkinci evre mevalonatın aktif izopren birimlerine çevirilmesini içerir. Üçüncü evre ise 30 karbonlu doğrusal yapıda skualen oluşturmak için altı adet beş karbonlu izopren biriminin polimerleşmesini içerir. Dördüncü evrede skualen halkasal bir yapıya dönüşür ve steroid çekirdeğin 4 halkası oluşur. Sonrasında; oksidasyon, metil gruplarının uzaklaşması, yer değiştirmesi gibi birtakım değişiklikler sonucunda son ürün olan kolesterol oluşmaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

Kolesterol sentezlenebilmesi için asetil KoA başlangıç substratıdır. 2 molekül asetil KoA birleşerek asetoasetil KoA'yı oluşturur. Üçüncü asetil KoA molekülü yapıya kondanse olarak 3-Hidroksi-3-Metilglutaril KoA (HMG-KoA) meydana gelir.

HMG-KoA maddesi HMG-KoA redüktaz enzimi ile mevalonik aside dönüşür. Mevalonik asit birçok reaksiyon sonrasında kolesterole dönüşür. Hücre içinde kolesterol miktarı arttıkça HMG-KoA redüktaz enzimi üzerinde negatif feedback oluşur ve HMG-KoA redüktaz aktivitesi düşerek kolesterol sentezi azalır (Rudney ve Fanini, 1993). Kolesterol vücutta parçalanarak eliminasyon yapılamayan bileşiklerden biridir ve kullanım haricinde yalnızca karaciğer yoluyla atılabilir.

Karaciğerden kolesterol ya doğrudan bağırsağa atılır veya safra asitlerine çevrilerek safra ile bağırsağa atılabilmektedir (Grundy, 1990).

Bağırsağa doğrudan atılan kolesterolün yarısı emilim yoluyla dolaşıma girerken, diğer yarısı dışkıyla atılır. Safra asitleri içinde barsağa atılan kolesterolün %97'si

bağırsaklardan geri emilir, portal sisteme girer ve karaciğer tarafından tutulur. Safra asitlerinin geri alınımı azaltılarak safra asidi kaybı sağlanırsa, karaciğerde safra asidi yapımı ve kolesterol kullanımı artar, böylece plazma kolesterol düzeyinde azalma olur (Stone vd., 1985).

2.5.3. Plazma Lipoproteinleri

Plazma lipoproteinleri lipit ve proteinden oluşan karmaşık moleküllerdir ve suda çözünmeyen kolesterol, trigliserit gibi makromoleküllerin vucut sıvılarında taşınması lipoproteinlere bağlıdır (Gotto, 2011; Yalçın ve Çetin, 2001).

Lipoproteinler ilk kez Machebouf tarafından 1920'li yıllarda tanımlanmıştır. Machebouf, lipoproteinleri ayırmak için amonyum sülfat kullanmıştır. 1940'larda ise Onclay ve arkadaşları lipoproteinleri fraksiyonlandırmada Cohn yöntemini kullanmıştır. Goffman ve arkadaşları ise ultra santrifüj yöntemini kullanmışlardır. Sonrasında geliştirilmesiyle beraber standart bir yöntem oluşmuştur. Hatch ve arkadaşları ise lipoproteinlerin ayrılmasında elektroforez tekniğini kullanmışlardır (Kızıldağ, 1997).

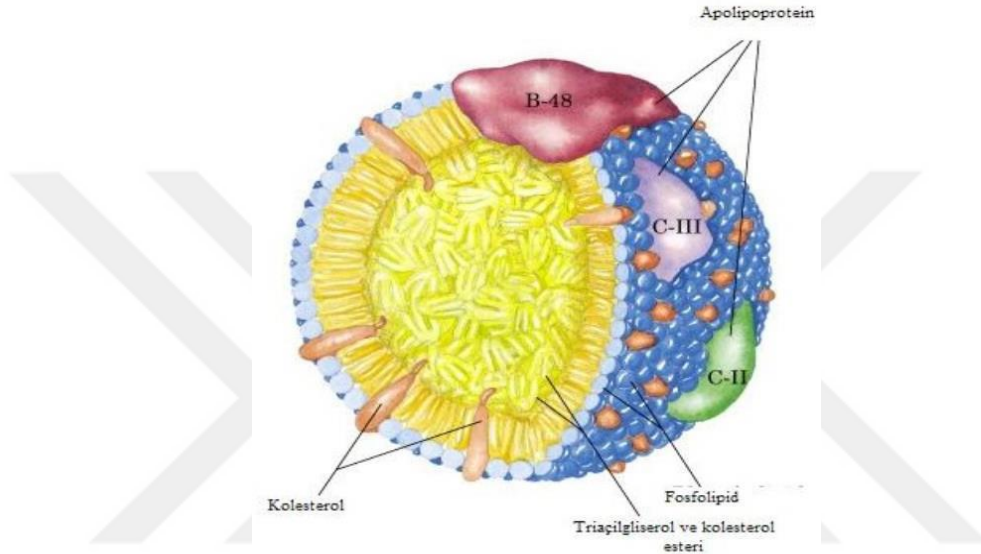
Lipoproteinler ultra santrifüjleme tekniği ile yoğunluklarına göre şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, HDL ve Lipoproteina (Lp(a)) olmak üzere altı gruba ayrılırlar.

Kolesterolün büyük bir kısmı LDL vasıtasıyla taşınmakta; endojen trigliseridler ise asıl olarak VLDL ile taşınırlar. Karaciğerin dışındaki dokulardan karaciğere tersine taşınması ise HDL ile gerçekleştirilir (Tamer ve ark, 2011).

2.5.3.1. Şilomikronlar

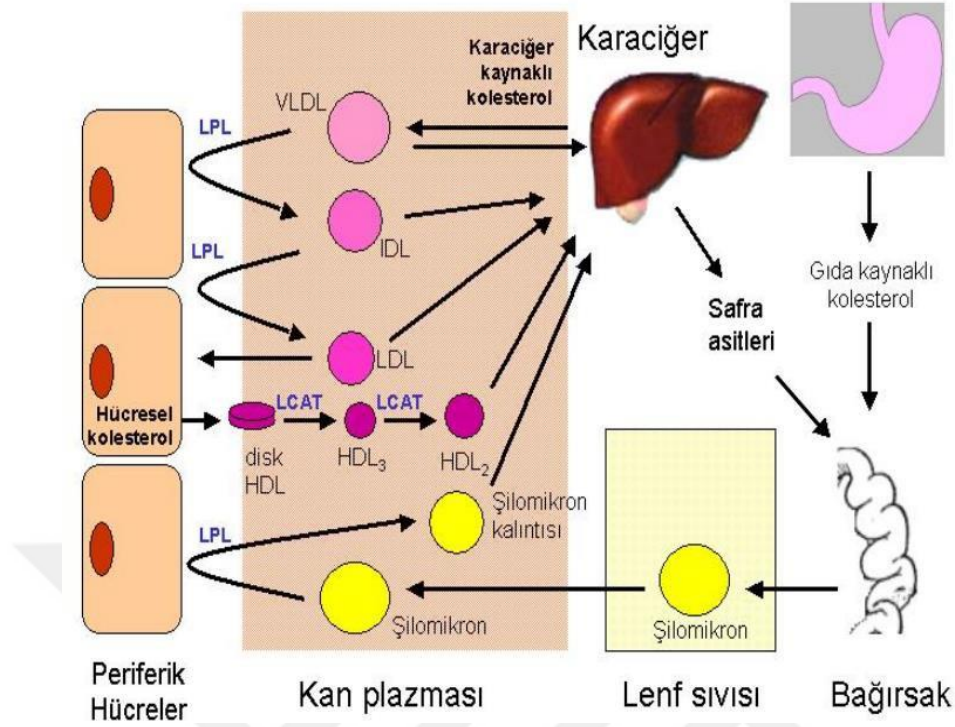
Şilomikronlar ince bağırsak mukoza hücreleri tarafından üretilmektedir. Besin maddelerindeki moleküller, bağırsaklar tarafından şilomikronlara dönüştürülerek bağırsaktan karaciğere ve periferik hücelere taşınır. Şilomikronlar esas olarak trigliseritlerden oluşmakta olup yapısına kolesterol, fosfolipit, Apo B-48 ve Apo A'da dahildir. Elektroforezde hareket yetenekleri yoktur ve çoğu zaman santrifüje gerek kalmadan plazmanın üstünde toplanırlar (Komşuoğlu, 1992).

Yemeklerden sonra kandaki şilomikron miktarının artmasına bağlı kan serumunda bulanık bir görüntü oluşmaktadır (Stein ve Myers, 1994; Bhagavan, 1992). Şilomikronların plazmadan temizlenme süresi çok hızlı olup yarılanma ömürleri bir saatten azdır. 12 saatlik açlık sonrasında kanda hiç şilomikrona rastlanmaz. Elektroforetik mobilitesine göre plazma lipoproteinleri incelendiğinde, plazmanın en büyük lipoprotein molekülü şilomikronlardır (Telefoncu ve ark, 2008).



Şekil 2.3. Şilomikronun Yapısı (Telefoncu ve ark, 2008).

Şilomikronlar besinlerle alınan yağ asitlerini kullanılacakları ya da depolanacakları dokulara taşırlar. Şilomikron kalıntıları kan dolaşımı ile karaciğere taşınırlar. Bu kalıntıların içinde neredeyse hiç triaçilgliserol kalmamasına karşın; kolesterol, apoE, apoB-48 bulunmaktadır. Karaciğerde bulunan reseptörler şilomikron kalıntılarındaki apoE'ye bağlanırlar ve onları endositoz yardımıyla hücre içine alırlar. Karaciğere ulaştıktan sonra kalıntılarda olan kolesterol serbest bırakılır ve lizozomlar tarafından parçalanır (Mahley vd., 1984; Nelson ve Cox, 2013).



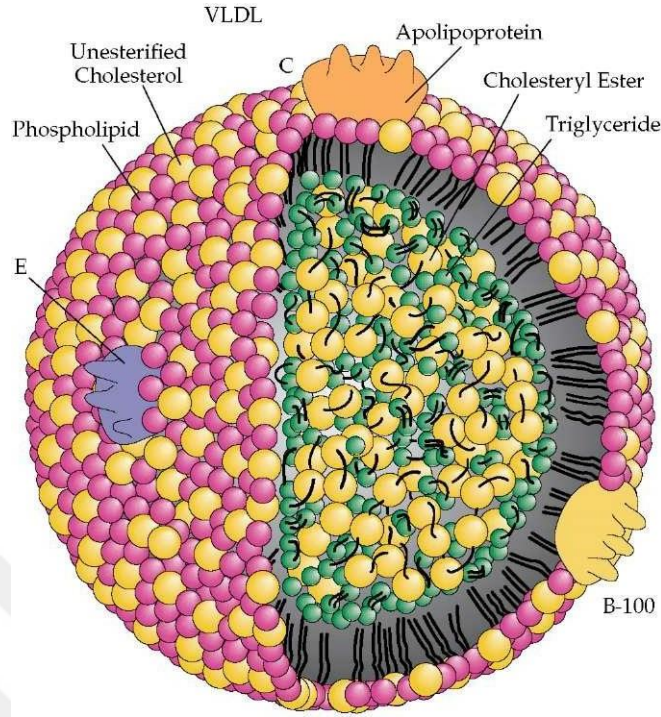
Şekil 2.4. Şilomikron Metabolizması

(https://tr.wikipedia.org/wiki/Lipoproteinler#/media/Dosya:Lipoprotein_trafik2_tr.png)

(Erişim Tarihi:17.10.2022)

2.5.3.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler

Şekil ve içerik olarak şilomikronlara benzeyen, VLDL trigliserit içeriği daha az, kolesterol, fosfolipit ve protein miktarı daha fazla olması yönüyle farklılıklar gösterir. Yapısında Apo C, Apo E ve Apo B-100 bulunmaktadır. Sentez yeri ve taşıdıkları trigliseritlerin türü VLDL ve şilomikron arasındaki esas farklılıklardır (Tanrıkulu,2004).



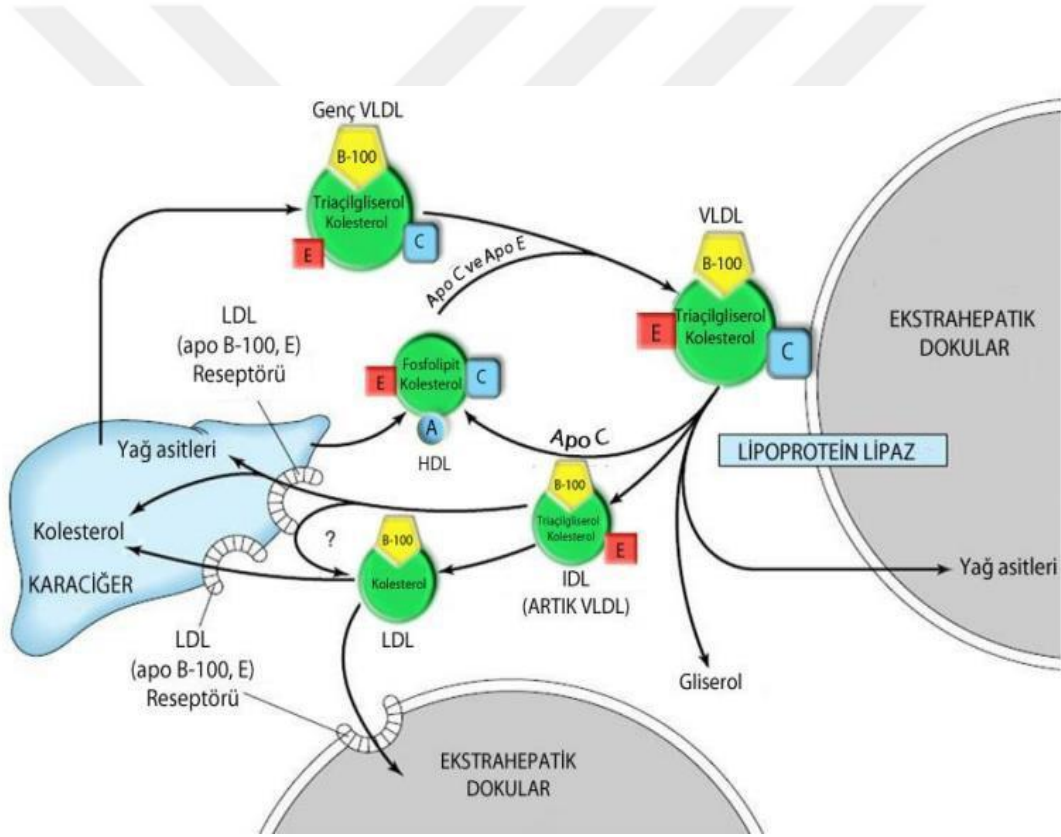
Şekil 2.5. VLDL Yapısı (<http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp8625.jpg>)(Erişim tarihi: 29.10.2022)

En çok karaciğerde sentezlenen VLDL'in temel görevi dokular için gerekli endojen kaynaklı lipitleri taşımaktır. Bazı VLDL'ler ise ince bağırsakta sentezlenir ve safra kökenli yağ asitleri ve endojen kolesterolün reabsorbsiyomunda görev alır. Aşırı karbohidrat alımına bağlı olarak endojen yağ asitlerinin hepatik sentez hızının ve karaciğere serbest yağ asitlerinin giriş hızının artmasına bağlı VLDL sentezinde artış izlenmiştir (Baykara,2003).

Yağ asitlerinin büyük bir kısmı enerji ihtiyacını karşılamak için karaciğerde oksidasyona uğrar. Trigliseritlerin bir kısmı ise esterleşmeyi engellemek için karaciğerden salgılanmaktadır. Tüm bu reaksiyonlar VLDL sayesinde olmaktadır. HDL'nin Apo C'yi VLDL'ye vermesinden sonra, VLDL ekstrahepatik kapiller LPL ile reaksiyona girerek serbest yağ asitlerine dönüşür. Bu arada HDL'den alınan Apo C, HDL'ye geri

verilir. VLDL kalıntıları ise karaciğerde Apo E reseptörleri aracılığı ile hepatik lizozomlara alınır ve safra ile atılır.

İnsanlarda VLDL yıkımı esnasında LDL'ye geçiş IDL yoluyla olmaktadır. IDL nispeten daha kısa ömre sahiptir. ApoE ve C'nin ayrılmasından sonra VLDL, sırasıyla IDL'ye ve LDL'ye dönüşür. Bu esnada IDL, hepatik LDL ile reaksiyona girerek serbest yağ asitlerine dönüşür. Ekstrahepatik dokular tarafından hidrolize edilen VLDL'nin yıkımı sırasında Apo B normal olarak kalırken, Apo C'nin tamamına yakını HDL'ye tekrar transfer olur. HDL, Apo C ve esterleşmemiş kolesterol için reseptör görevi yapmaktadır. Apo C, HDL'den yeni sentezlenen şilomikronlara veya VLDL'ye geçerek başka bir döngü oluşturur (Dalgıç, 1985).



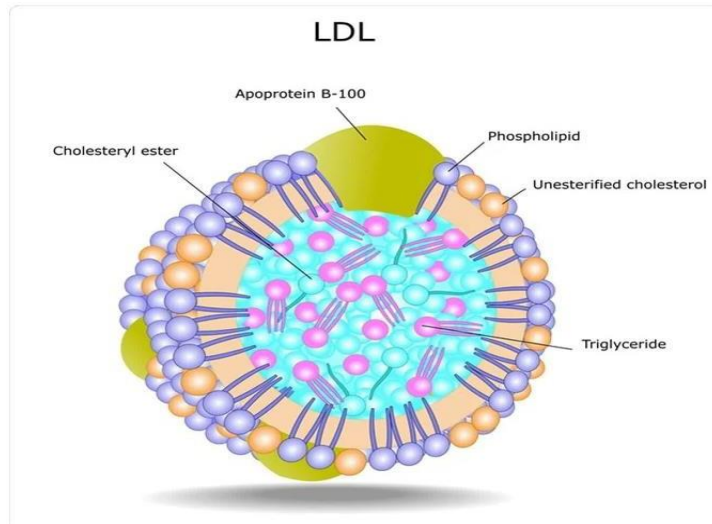
Şekil 2.6. VLDL Metabolizması (Berber, 2013).

2.5.3.3. Ara Dansiteli Lipoproteinler

Ara Dansiteli Lipoproteinler (IDL), LDL öncüsüdür ve plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Lipazların etkisiyle plazmada oluşturulan VLDL katabolizması ürünlerinden biridir (Rosenson,2004). VLDL dolaşımında yıkılır ve oluşan katabolizma ürünlerinden IDL'nin önemli bir kısmı karaciğer tarafından alınır. Geri kalan kısımdan ise serbest yağ asitleri ayrılır ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oluşur (Smith vd, 1978). VLDL'nin LDL'ye dönüşümünde ara ürün olarak meydana oluşan IDL'e VLDL kalıntısı (remnant) da denilebilir. Başlıca protein yapı taşları Apo B-100 ve Apo E'dir. Dolaşımdan LDL reseptörlerince temizlenir ya da hepatik lipoprotein lipaz enzimi ile LDL oluşumuna katılırlar (Kızıldağ, 1997).

2.5.3.4. Düşük Dansiteli Lipoprotein

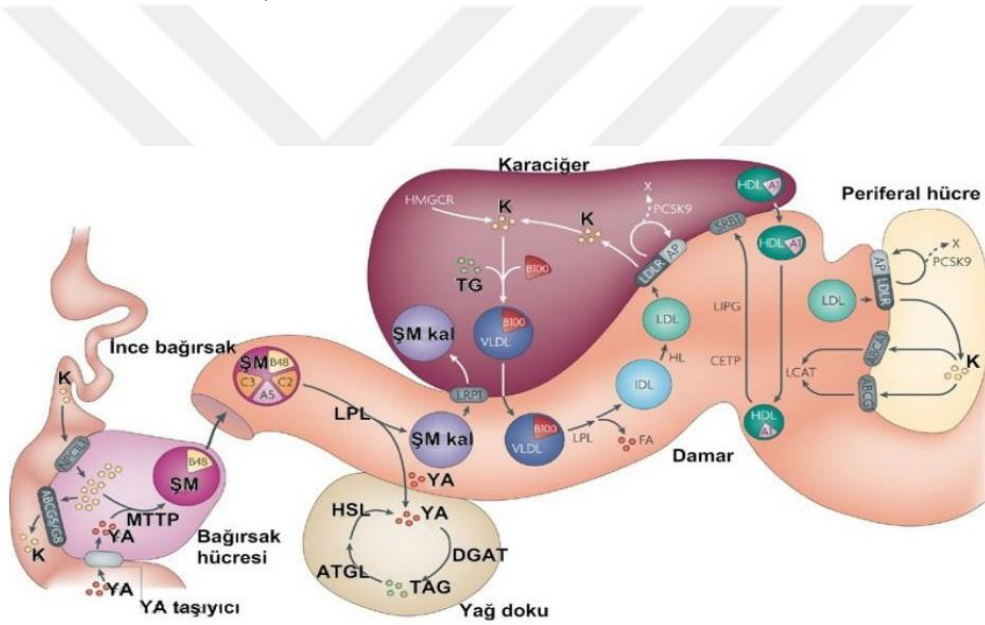
Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL) yaklaşık olarak 1.019 ile 1.063 g/mL arası yoğunluğa ve 200 Å çapa sahip LDL yüzde 75 oranında lipit içermektedir. Plazmada esas kolesterol taşıyıcı lipoprotein olup temel görevi kolesterolün karaciğerden periferik dokulara taşınmasını sağlamaktır. Plazmadaki LDL'nin büyük kısmı VLDL'nin yıkımından sonra oluşan artık ürünlerden olduğu düşünülmektedir. LDL'nin tek apoliproteini ApoB-100 dür (Yalçın ve Çetin, 2001).



Şekil 2.7. LDL Yapısı (<https://www.news-medical.net/health/LDL-Cholesterol-and-Heart-Disease.aspx>).

Fibroblast, lenfosit ve arteriyel düz kas hücre kültürleri ve karaciğerde yapılan çalışmalar sonucunda LDL'in spesifik bağlanma reseptörünün Apo B-100 olduğunu tespit edilmiştir. Plazmadaki LDL, Apo B-100 ile doku reseptör proteinlerine bağlanır ve endositoz ile hücre içine alınır.

Hücre içinde lizozom ile birleşen LDL'deki apoproteinler hücre içi hidrolitik enzimler tarafından amino asitlerine ayrılır. Kolesterol esterleri ise lipaz enzimi aracılığı ile serbest kolesterol ve yağ asitlerine parçalanır. Oluşan serbest kolesterol ise hücre içerisinde değişik amaçlarla kullanılır. Serbest kolesterol fazlalığında ise açıl KoA kolesterol transferaz enzimi aktive edilerek serbest kolesterol, ester kolesterole çevrilir ve bu şekilde depolanır (Telefoncu ve ark, 2008).



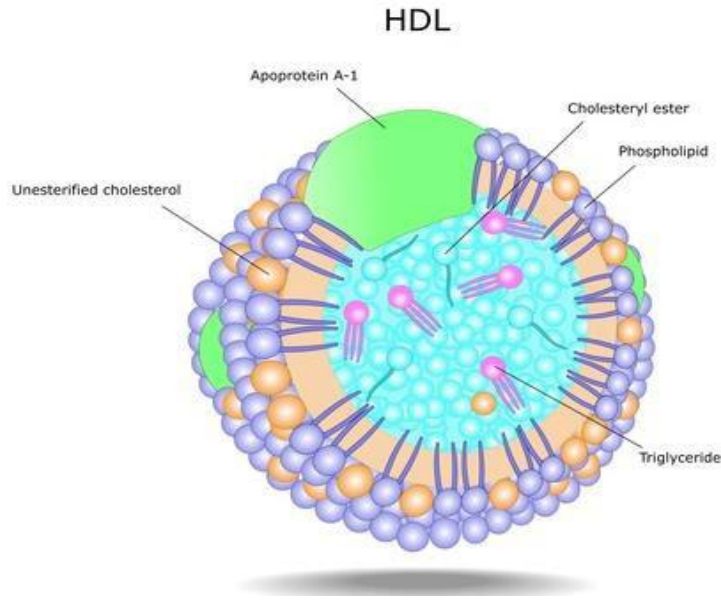
Şekil 2.8. LDL Metabolizması (Bilici, 2010).

Plazmadaki LDL'den alınan kolesterol yeterli seviyeye ulaştığında, hücre içerisinde aşırı kolesterolün birikmesini engellemek amacıyla kolesterol sentez hızı azaltılır (Nelson ve Cox, 2013).

2.5.3.5. Yüksek Dansiteli Lipoprotein

Yaklaşık olarak 1.063-1.21 g/mL yoğunluğa ve 70-120 Å çapa sahip Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)'in kütlesinin yaklaşık yarısı proteinlerden oluşur. HDL'nin temel görevi kolesterolün periferik hücrelerden karaciğere taşınmasını sağlamaktır. Yoğunluklarına göre HDL₁, HDL₂ ve HDL₃ olmak üzere üçe ayrılır. HDL₁ total plazma Apo E'sinin yarısına sahiptir (Yalçın ve Çetin, 2001).

Plazmadaki kolesterolünün yaklaşık üçte ikisi ile beşte dördü LDL içindedir. Küçük bir miktar ise VLDL içinde bulunmaktadır. Kalan kolesterolün büyük bir kısmı HDL içinde bulunmaktadır. HDL, dokulardan fazla kolesterolü alır ve karaciğere veya VLDL gibi diğer lipoproteinlere taşınmasını sağlar (Durrington ve Sniderman, 2004).

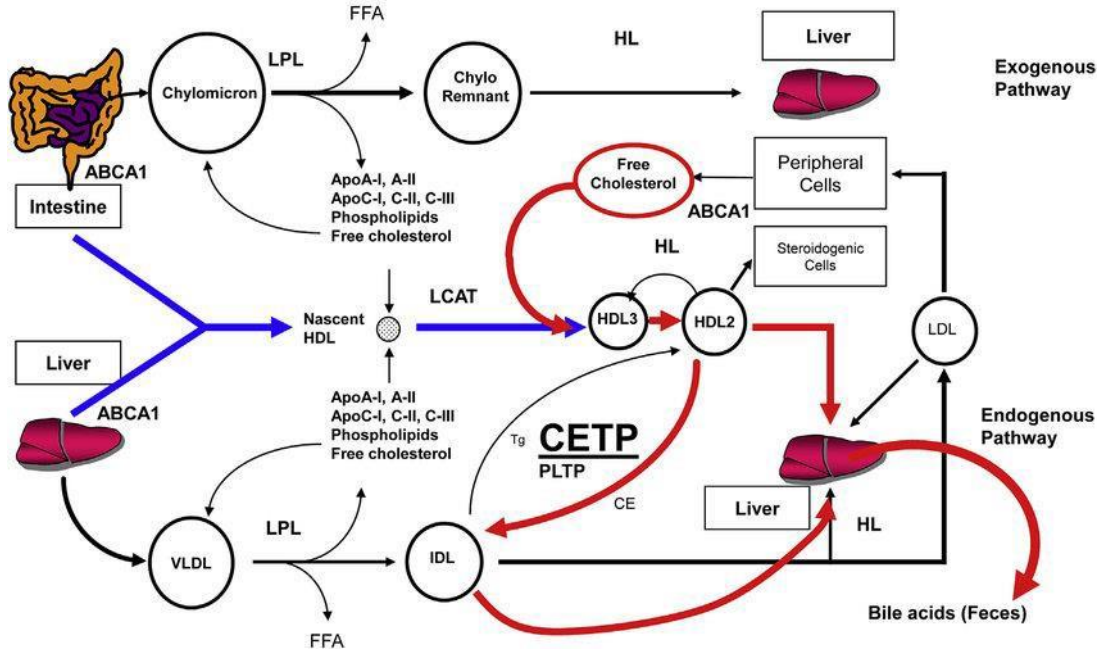


Şekil 2.9. HDL Yapısı (<https://medlineplus.gov/genetics/condition/familial-hdl-deficiency/>).

HDL'in yapısında temel apoprotein Apo AI olmakla beraber ayrıca Apo AII ve Apo AIV'de içerir. HDL taneciklerinin protein kütlesinin yüzde 70 'ini Apo AI, yüzde 20'sini Apo AII geriye kalanı ise Apo C'ler Apo E, D ve Apo J gibi diğer apoproteinler tarafından

oluşmaktadır. Plazmada Apo E'nin büyük kısmı HDL'de bulunduğu için HDL, Apo E deposu olmak gibi ek işlevleride bulunmaktadır (Tanrikulu,2004).

High-Density Lipoprotein Metabolism



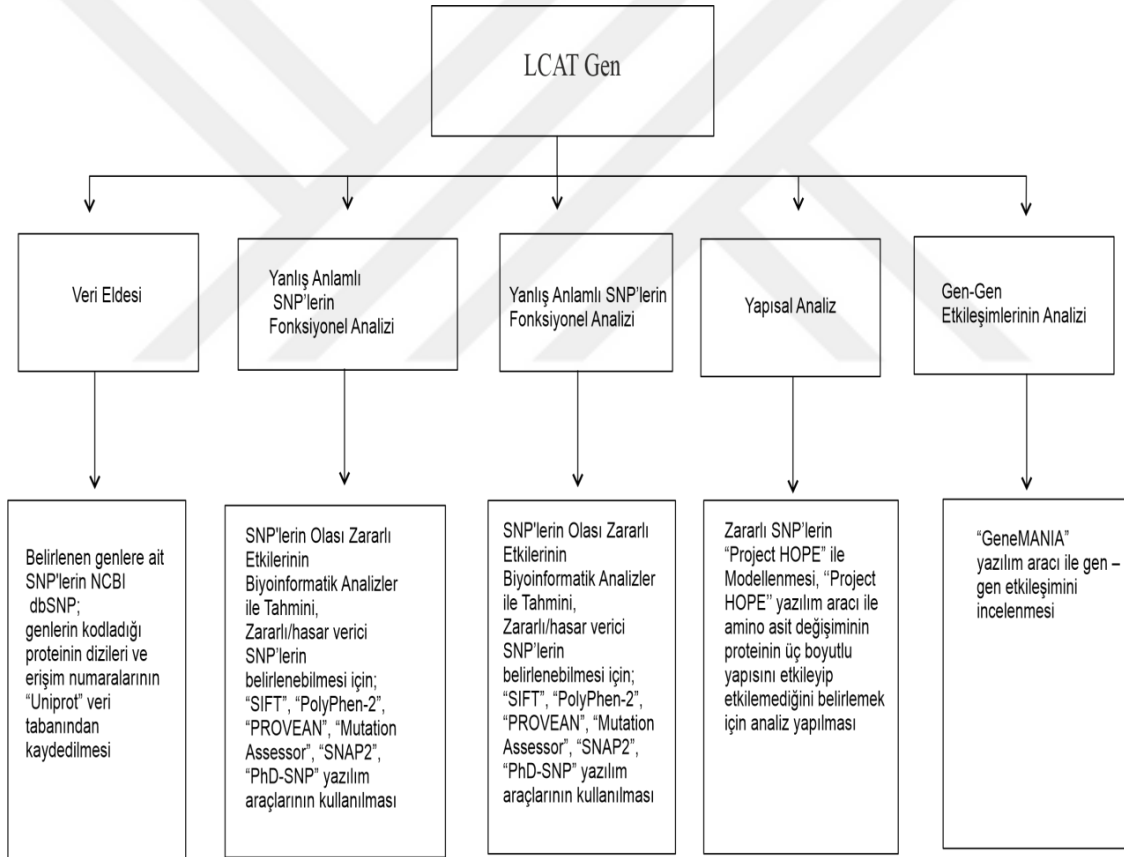
Şekil 2.10. HDL Metabolizması (Hong ve ark, 2017).

Plazmadaki HDL ve VLDL konsantrasyonları arasında karşılıklı bir ilişki vardır. Yüksek karbohidratlı diyet alımı sonucunda görülen HDL konsantrasyon düşmesinin, artmış katabolizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Thomson, 1990).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez çalışmasında in siliko yöntemler kullanılarak bir analiz çalışması yapılmıştır. Balık gözü hastalığı ile ilişkilendirilen LCAT genindeki yanlış anlamlı SNP'lerin in siliko analizlerini yapabilmek amacıyla, kullanımı kamuya açık olan veri tabanları ve çevrimiçi yazılım araçları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerin iş akışı şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. İş Akış Şeması

3.2. Veri Eldesi

LCAT genindeki SNP'lere NCBI dbSNP veri tabanından erişilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Bu SNP'ler arasından yanlış anlamlı (missense) SNP'ler seçilmiştir. Çevrimiçi analiz araçlarında kullanmak amacıyla seçilen yanlış anlamlı SNP'lere ait referans numaraları, doğal ve mutant tip nükleotid bilgileri, doğal ve mutant tip amino asit bilgileri ve pozisyonları kayıt altına alınmıştır. LCAT geninin kodladığı protein dizileri ve erişim kodları, NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) ve Uniprot veritabanlarından (<http://www.uniprot.org/>) elde edilmiştir.

Araştırmamızda herhangi bir insan/hayvan örneği kullanılmamıştır ve kullanılan analiz araçlarının erişimi halka açık olduğu için çalışmamız etik kurul onayı gerektirmemektedir (Su ve ark. 2019).

Balık gözü hastalığı ile ilişkili LCAT genindeki SNP'leri belirlemek için NCBI dbSNP veri tabanından LCAT [All Field] filtresi kullanılarak 2836 SNP belirlenmiştir.

The screenshot displays the NCBI dbSNP search results for the LCAT gene. The search criteria are set to 'SNP' and 'LCAT'. The results are sorted by 'SNP_ID' and show 2836 variants. The first variant, rs5922, is selected and its details are shown. The variant is a G>A substitution on chromosome 16 (GRCh38) at position 16,679,425. It is a missense variant, changing the amino acid from Alanine to Aspartic acid. The variant is found in the LCAT gene, which encodes the lecithin:cholesterol acyltransferase protein. The variant is associated with the disease 'Familial hypercholesterolemia' (OMIM: 144300). The variant is also found in the LCAT gene, which encodes the lecithin:cholesterol acyltransferase protein. The variant is associated with the disease 'Familial hypercholesterolemia' (OMIM: 144300).

Analiz edilen LCAT geninin NCBI Gene veri tabanındaki erişim numarası (Gene ID) 3931'dir. LCAT genine ait toplam 2836 SNP tespit edilmiştir ve tespit edilen SNP'lerden LCAT [All Fields] AND (missense variant [Function_Class] OR non coding transcript variant [Function_Class] Or synonymous variant [Function_Class]) filtreleri kullanılarak belirlenen 795 SNP araştırma için seçilmiştir.

The screenshot shows the NCBI dbSNP search results for LCAT. The search criteria are LCAT[All Fields] AND (missense variant[Function_Class] OR non coding transcript variant[Function_Class] OR synonymous variant[Function_Class]). The results show two SNPs: rs5922 and rs5923. The interface includes a sidebar with filters, a main results area, and a right sidebar with search filters and a list of active filters.

dbSNP SNP LCAT[All Fields] AND (missense variant[Function_Class] OR non coding transcript variant[Function_Class] OR synonymous variant[Function_Class]) Arama

Uyarı oluştur Gelişmiş Yardım

Klinik Önem
iyi huylu
muhtemelen iyi huylu
muhtemel patojenik
patojenik

Doğrulama
Durumu
ALFA tarafından
yan küme
yan frekans

yayın
LitVar Açıklamalı
PubMed'den alıntı
PubMed Bağlantılı

İşlev Sınıfı
intron
yanlış anlama
eşanlamlı

Dipnot
somatik

Küresel MAF
Özel seri...

kromozomlar
Özellikle ...

Kromozom Aralığı
Özel seri...

Arama alanları
Seçmek ...

Hepsini temizle
Ek filtreleri göster

Görüntü ayarları: Özet, sayfa başına 20, SNP_ID'ye göre sıralandı

Gönderildi: Filtreler: Filtreleri Yönet

İlgili verileri bulun
Veri tabanı: Seçme

Öğeleri bul

Ayrıntıları ara

LCAT[All Fields] AND (missense variant[Function_Class] OR non coding transcript variant[Function_Class] OR synonymous variant[Function_Class])

Arama Daha fazla gör...

Son Etkinlik

Kapat Temizlemek

Q LCAT[Tüm Alanlar] VE (hatalı değişken[Fonksiyon_Sınıfı] VEYA kodsuz SNP

Q LCAT AND ((hatalı değişken[Function_Class] VEYA eşanlamlı değişken... (795) SNP

Q LCAT AND (hatalı değişken[Function_Class] (505) SNP

Q LCAT (2836) SNP

Q LCAT AND ((hatalı değişken[Function_Class] VEYA eşanlamlı değişken... (2240) SNP

Daha fazla gör...

Arama Sonuçları
Öğeler: 1 ila 20 / 795

<< İlk < Önceki Sayfa 1 40 Sonraki > Son >>

☐ rs5922 [Homo sapiens]

1.

Varyant türü: SNV
aleller: G>A [Kanatları Göster]
Kromozom: 16.67942514 (GRCh38)
16.67976417 (GRCh37)
Kanonik SPDI: NC_000016.10:67942513:G:A
Gen: LCAT (Varview)
İşlevsel Sonuç: coding_sequence_variant,eşanlamlı_variant
Klinik önemi: belirsiz-önemli
Doğrulandı: frekansa göre, alfaya göre, kümeye göre
MAF: A=0.000427/6 (ALFA)
A=0.000068/17 (GnomAD_exomes)
A=0.000075/9 (ExAC)

HGVs: NC_000016.10:g.67942514G>A, NC_000016.9:g.67976417G>A, NG_033098.1:g.31181C>T, NG_009778.1:g.6599C>T, NM_000229.2:c.597C>T, NM_000229.1:c.597C>T

PubMed LitVar

☐ rs5923 [Homo sapiens]

2.

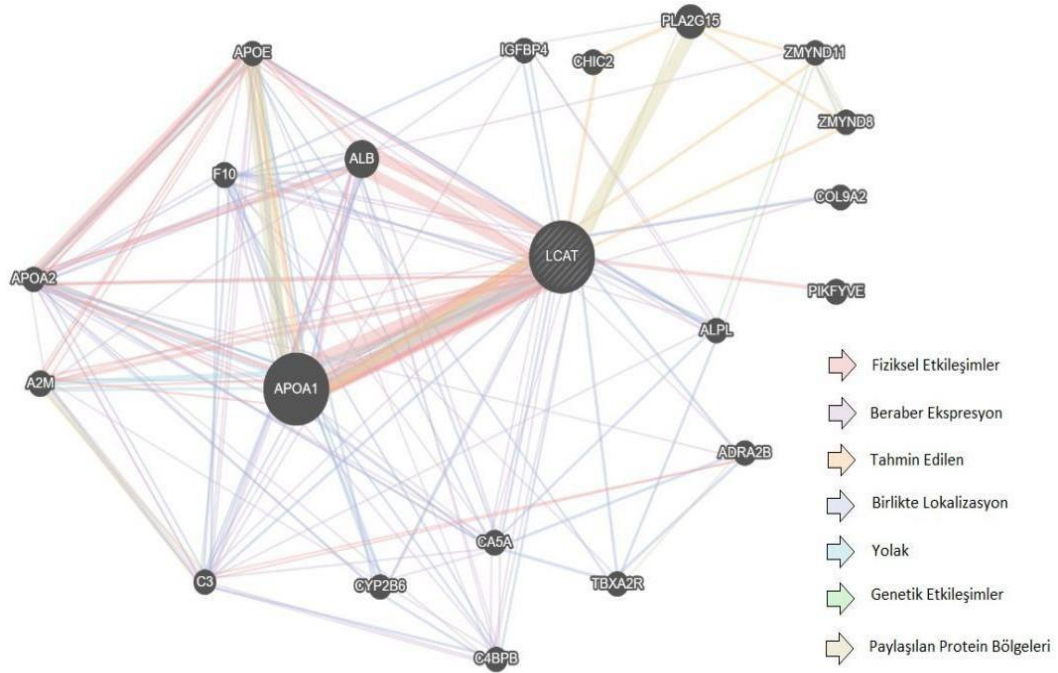
Varyant türü: SNV
aleller: G>A [Kanatları Göster]
Kromozom: 16.67940050 (GRCh38)
16.67973953 (GRCh37)
Kanonik SPDI: NC_000016.10:67940049:G:A
Gen: LCAT (Varview)
İşlevsel Sonuç: coding_sequence_variant,eşanlamlı_variant
Klinik önemi: iyi huylu
Doğrulandı: frekansa göre, alfaya göre, kümeye göre
MAF: A=0.05222/16881 (ALFA)

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=LCAT%5BAll%20Fields%5D%20AND%20%28missense%20variant%5BFunction_Class%5D%20OR%20non%20coding%20transcript%20variant%5BFunction_Class%5D%20OR%20synonymous%20variant%5BFunction_Class%5D%29&cmd=DetailsSearch) (Erişim Tarihi:09.11.2022).

3.2.1. LCAT İçin Gen- Gen Etkileşimleri

GeneMANIA yazılım aracından elde edilen LCAT genine ait gen-gen etkileşimleri Şekil 12'de gösterilmektedir. En fazla görülen etkileşim şekli (%77,64) fiziksel etkileşimdir. LCAT geni APOA1, APOA2, APOE, A2M, ALB, PIKFYVE genleri ile fiziksel etkileşim içerisinde bulunmaktadır.

APOA1, APOA2, APOE, ALPL, ADRA2B, CA5A, C3, C4BPB, COL9A2, CYP2B6 ve F10 genleri ile birlikte ifade edilmektedir. APOA1, CHIC2, ZMYND8, ZMYND11 geni arasında fonksiyonel etkileşim olduğu tahmin edilmektedir. ADRA2B, ALPL, CA5A, C3, C4BPB, COL9A2, CYP2B6, F10, IGFBP4, TBXA2R genleri ile birlikte konumlanmaktadır. APOA1 geni ile aynı yolakta bulunmaktadır. PLA2G15 geni ile ortak protein bölgesi bulundurmaktadır (<https://genemania.org/search/homo-sapiens/LCAT/>).



Şekil 3.12. LCAT Geni İle İlgili Genler Arasındaki Etkileşim Ağı

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

3.3. Zararlı SNP'lerin Belirlenmesi

LCAT genindeki yanlış anlamlı SNP'lerin protein yapısı ve fonksiyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek amacıyla SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assessor, SNAP2 ve PhD-SNP yazılım araçları kullanılmıştır. Kullanılan yazılım araçlarının her birinde zararlı olduğu tahmin edilen varyantlar ileri analiz çalışmaları için seçilmiştir.

3.3.1. Sift

SIFT, Çevrimiçi yazılım aracı ile tespit edilen SNP'lerin protein yapısı ve fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için her bir SNP'ye ait referans numaraları kullanılmıştır. Veri girişi yapıldığında, SIFT Çevrimiçi yazılım aracı amino asit varyasyonlarının tahmini etkileri için zararlı (deleterious) ve tolere edilebilir (tolerated) olmak üzere iki sonuca ulaşılmaktadır. Bu iki sonuç, amino asit varyasyonlarının SIFT skoruna göre oluşmaktadır. SIFT skoru 0 ile 1 arasında değişir. Skor $<0,05$ olduğunda amino asit değişimi zararlı olarak tahmin edilirken, skor $\geq 0,05$ olduğunda amino asit değişimi tolere edilebilir olarak tahmin edilir. Bu sonuçlar incelenip LCAT genine ait SNP'lerin SIFT tahmini ve SIFT skoru her bir varyasyon için kayıt altına alınmıştır. Ek olarak SIFT, her bir SNP referans numarası için ilgili genin kodladığı protein dizisi dışında genin diğer isoform protein dizilerine ait sonuçlarını da göstermektedir. Bu nedenle, diğer isoform protein dizilerine ait sonuçlardan diziye ait sonuçları ayıklayabilmek için protein dizisine ait protein erişim numarası kullanılmıştır.

3.3.2. PolyPhen-2

PolyPhen-2 çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein yapısı ve fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait UniProtKB erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve doğal ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Her bir amino asit değişimi için PolyPhen-2 yazılımının sunduğu HumDiv ve HumVar tahmin modellerinin her ikisi de kullanılmıştır. Yazılım, yanlış pozitif oran eşik değerlerine dayalı olarak varyasyonları; “İyi Huylu” (Benign), “Büyük İhtimalle Zararlı” (Probably Damaging) veya “Muhtemelen Zararlı” (Possibly Damaging) olarak niteliksel olarak değerlendirir.

Eşik değerleri HumDiv için %5 ve %10 iken HumVar için %10 ve %20'dir. Birinci eşik değerlerindeki veya altındaki yanlış pozitif oranlar büyük ihtimalle zarar verici olarak, ikinci eşik değerlerindeki veya altındaki yanlış pozitif oranlar muhtemelen zarar verici olarak, ikinci eşik değerleri üstündeki yanlış pozitif oranlar ise iyi huylu olarak değerlendirilmektedir. Ek olarak yazılım amino asit değişikliğinin zarar verme olasılığına ait 0 ile 1 arasında bir skor sunmaktadır. Veri girişleri sonunda niteliksel tahminler ve zarar verme olasılığına asit skorlar kayıt altına alınmıştır.

3.3.3. Provean

PROVEAN çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait UniProtKB erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve doğal ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Bu yazılım aracı amino asit varyasyonlarının tahmini etkilerini PROVEAN skoruna göre oluşturmaktadır. PROVEAN skorunun eşik değeri -2.5'dir. PROVEAN skoru bu eşik değere eşit veya bunun altındaysa, protein varyantının zararlı (deleterious) bir etkiye sahip olduğu tahmin edilir. Eğer bu skor eşiğin üzerindeyse, varyantın nötr (neutral) bir etkiye sahip olduğu tahmin edilir. Bunlar göze alındığında LCAT genine ait SNP'lerin PROVEAN tahminleri ve PROVEAN skorları kayıt altına alınmıştır.

3.3.4. SNPs & Go

SNPs&GO çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait UniProtKB/Swiss-Prot erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve doğal ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Bu yazılım aracı amino asit varyasyonlarının tahmini etkilerini olasılık skoruna göre oluşturmaktadır. SNPs&GO yazılım aracı Hastalık olasılık skoru >0.5 olduğunda hastalık (disease) sonucunu verirken, bu skor 0.5'ten küçük veya 0.5'e eşit olduğunda ise nötr (neutral) sonucunu vermektedir. Ek olarak SNPs&GO her bir varyasyon için bir güvenilirlik indeksi oluşturmaktadır. Buna göre her bir varyasyon için SNPs&GO tahmini, olasılık skoru ve güvenilirlik indeksi kayıt altına alınmıştır.

3.3.5. Mutation Assessor

Mutation Assessor çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait UniProtKB/Swiss-Prot erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve doğal ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Bu yazılım aracı amino asit varyasyonlarının etkilerini; tahmini işlevsel olarak yüksek (high) veya orta (medium), tahmini işlevsel olmayan olarak düşük (low) veya nötr (neutral) şeklinde 4 sonuçta vermektedir. Program bu tahmin sonuçlarını vermek için fonksiyonel etki birleşik skorunu (FIS (Functional impact combined score)) kullanmaktadır. Fonksiyonel etki birleşik skoru; ≤ 0.8 ise varyasyon nötr etkili, $0.8 < FIS \leq 1.9$ ise varyasyon düşük etkili, $1.9 < FIS \leq 3.5$ ise varyasyon orta düzeyde etkili ve $FIS > 3.5$ ise varyasyon yüksek etkili olarak tahmin edilmektedir. İlgili verilerin önemine göre tüm varyasyonlar için Mutation Assessor tahmin sonuçları ve Fonksiyonel etki birleşik skorları kayıt altına alınmıştır.

3.3.6. SNAP2

SNAP2 çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait FASTA formatındaki protein dizileri kullanılmıştır. SNAP2 amino asit değişimlerinin tahminini, etkili (effect) ve nötr (neutral) olmak üzere 2 sonuçta vermektedir. Program tahmin sonuçlarını vermek için tahmin skorunu kullanmaktadır. Tahmin skoru (TS) -100 ile 100 arasında değişmektedir. Tahmin skoru $-100 \leq TS \leq 0$ ise sonuç nötr olurken, $0 < TS \leq 100$ ise sonuç etkili olmaktadır. Bunun dışında SNAP2 her bir varyasyon için beklenen doğruluk oranlarını da sunmaktadır. SNAP2 protein dizisindeki her pozisyonundaki amino asit için 20 amino asit değişimi yaparak sonuç vermektedir.

Bu nedenle sadece ilgili amino asit değişimleri için tahmin sonuçları, skorları ve beklenen doğruluk oranları kayıt altına alınmıştır.

3.3.7. PhD-SNP

PhD-SNP çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmek için LCAT proteinine ait UniProtKB/Swiss-Prot erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. PhD-SNP yazılımı amino asit değişimlerinin tahminini, hastalık (disease) ve nötr (neutral) olmak üzere 2 sonuçta vermektedir. Bununla birlikte yazılım her bir varyasyon için güvenilirlik indeksi bilgisini de sunmaktadır. Her bir varyasyon için tahmin sonuçları ve güvenilirlik indeksi sonuçları kayıt altına alınmıştır.

3.4. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkilerinin Tahmini

Bu aşamada, ilk olarak her bir amino asit değişimi için; SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assessor, SNAP2 ve PhD-SNP yazılım araçlarının her birinde aynı anda zararlı olduğu tahmin edilen varyantlar tespit edilmiştir. İkinci aşamada ise tespit edilen bu varyantların protein stabilizasyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek amacıyla I-Mutant 3.0 ve MUpro yazılım araçları kullanılmıştır.

3.4.1. I-Mutant 3.0

I-Mutant 3.0 çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla amino asit değişimlerinin protein stabilizasyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek için LCAT proteinine ait tek harfli amino asit kodlarından oluşan protein dizileri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. I-Mutant, veri girişi yapıldığında niteliksel olarak artan (increase) veya azalan (decrease) olmak üzere iki farklı sonuçtan birisini vermektedir. Bu sonuçlar amino asit değişiminin proteinde ortaya çıkardığı serbest değişim enerjisi değerine göre belirlenmektedir.

Serbest değişim enerjisi değeri 0 ise stabilizasyonun arttığını göstermektedir. Bu değerlere ek olarak güvenilirlik indeksi de sonuçlarda sunulmaktadır. Veri girişleri yapıldıktan sonra sunulan bilgilerden, her bir varyasyon için niteliksel değerler, serbest değişim enerjisi değerleri ve güvenilirlik indeksleri kayıt altına alınmıştır.

3.4.2. MUpro

MUpro çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla amino asit değişimlerinin protein stabilizasyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek için LCAT proteinine ait tek harfli amino asit kodlarından oluşan protein dizileri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve doğal ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Yazılıma veri girişi yapıldığında serbest enerji değişim değeri ve bu değerin protein stabilizasyonu üzerindeki etkisi sonuç ekranında karşımıza çıkmaktadır. Serbest enerji değişimi için 0'dan küçük bir değer, mutasyonun protein stabilitesini azalttığı anlamına gelirken, 0'dan büyük bir değer, mutasyonun protein stabilitesini arttırdığı anlamına gelmektedir. Buna göre veri girişleriyle elde edilen sonuçlardan serbest değişim enerjisi değerleri ve niteliksel değerler kayıt altına alınmıştır.

3.5. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen Varyasyonların Üç Boyutlu Modellemesi

3.5.1. Hope

HOPE çevrimiçi yazılım aracı yardımıyla protein yapısında ortaya çıkan mutasyonun etkisini belirlemek için her iki proteine ait UniProtKB erişim kimlikleri, amino asit varyasyonlarının gerçekleştiği pozisyonlar ve mutant tip amino asit bilgileri kullanılmıştır. Yazılımın kullanımı sonucunda; doğal ve mutant tip amino asitlere ait gösterimler, doğal ve mutant tip amino asitlerin özellikleri hakkında bilgiler, mutasyonların bulunduğu bölgelere ait veriler, mutant proteinlere ait üç boyutlu modeller ve amino asit değişimlerinin bulunduğu bölgelerin yakından üç boyutlu gösterimleri elde edilmiş olup bu veriler kayıt altına alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Veri Eldesi

İncelenen LCAT geninin NCBI gene veri tabanındaki erişim numarası (Gene ID) 3931’ dir. 440 amino asit (aa) uzunluğa sahip olan genin ifade ettiği protein dizisine ait UniProtKB kodu P04180 ve UniProtKB/Swiss-Prot kodu LCAT_HUMAN’dır.

Sekansⁱ

Sıra durumuⁱ Tamamlamak Sıra işlemeⁱ Görüntülenen sekans, uygun bir forma dönüştürülmek üzere daha fazla işlenir.

Aletler ⁱ İndirmek Ekle Vurgulamak Sırayı kopyala

Uzunluk 440
Kütle (Da) 49.578

Son güncelleme 1987-03-20 v1
sağlama toplamıⁱ B315EF118AA7A378

MGPPGSPWQW 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
VTLLLLGLLLP PAAPFWLLNV LFPPTTPKA ELSNHTRPVI LVPGLGNQL EAKLDKPDVV NMWCYRKTED FFTINLDLNM FLPLGVDCNI DNTRVVVYIRS SGLVSNAPGV QIRVPGFGKT ysveyldssk LAGYLHTLVQ NLVNIQYVRD

ETVRAAPYDW 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320
RLEPGQEEY YRKLAGLVEE MHAAYGKPVF LIGHSLGCLH LLYFLLRQPQ AMKDRFIDGF İSLGAPWGG İKPLVLASG DİQGPINSS İKLKEEKRIIT TTSPWMPFSR MAMPEDHVFİ SPSFNYTGR DFQRFFADLH FEEGHWYWLQ

SRDLLAGLPA 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440
PGVEVYCLYG VGLPTPTTYI YDHGFPYTDV VGVLYEDGDD TVATRSTELC GLWQGRQPQP VHLLPLHGİQ HLNMFVSNİLT LEHINAILLG AYRQGPASP TASPEPPPPPE

Hesaplamalı olarak eşlenmiş potansiyel izoform dizileriⁱ

Bu girişe eşlenen 6 potansiyel izoform var

ÜFLEME Hizala Ekle Hepsini gör

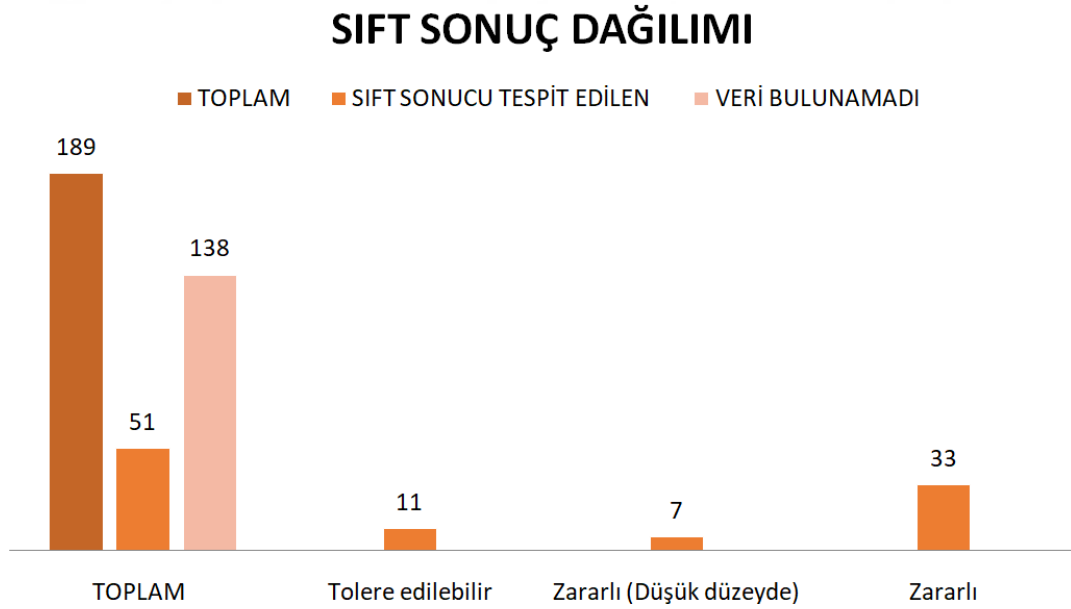
giriş	giriş adı	gen adı	Uzunluk
☐ I3L3R0	I3L3R0_İNSAN	LCAT	93
☐ I3L215	I3L215_İNSAN	LCAT	61
☐ I3L1Q6	I3L1Q6_İNSAN	LCAT	107
☐ I3L0J6	I3L0J6_İNSAN	LCAT	80
☐ J3QKT0	J3QKT0_İNSAN	LCAT	138
☐ J3OSE5	J3OSE5_İNSAN	LCAT	255

LCAT geninde bulunan SNP’lerin bilgilerine NCBI dnSNP veri tabanından ulaşılmıştır ve 2836 SNP tespit edilmiştir. Bu SNP’lerden yanlış anlamlı olanlar filtrelenmiş ve tespit edilen 795 SNP araştırma için seçilmiştir.

4.2. Zararlı SNP'lerin Belirlenmesi

4.2.1. Sift Sonuçları

SIFT çevrimiçi yazılım aracına LCAT genine ait yanlış anlamlı 795 SNP'nin referans numaraları girilmiştir ve girilen 795 SNP için 189 sonuç elde edilmiştir. SIFT elde edilen 189 sonuçtan 131 tanesi için "Bulunamadı" (not found) bilgisini vermiştir ve 7 varyasyon için ise SIFT skoru bilgisine ulaşamamıştır. Yazılım ile yapılan analizler sonucu 11 adet varyasyonun için "Tolere edilebilir" olduğu, 7 adet varyasyon için "Zararlı (Düşük düzeyde)" olduğu, 33 adet varyasyon için ise "Zararlı" olduğu saptanmıştır.



Grafik 4.1. Sift Sonuç Dağılımı

Çizelge 4.1. Tolere Edilebilir Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar

SNP	Referans Alel	Alternatif Alel	Amino asit değişimi	SIFT Skoru	SIFT Tahmini
rs202180445	T	C	K170R	0.072	Tolere edilebilir
rs202180445	T	C	K242R	0.076	Tolere edilebilir
rs28942087	A	G	L161P	0.057	Tolere edilebilir
rs28942087	A	G	L233P	0.064	Tolere edilebilir
rs4986970	A	T	S54T	0.133	Tolere edilebilir
rs28940886	C	T	A26T	0.063	Tolere edilebilir
rs28940886	C	T	A117T	0.199	Tolere edilebilir
rs28940886	C	T	A45T	0.272	Tolere edilebilir
rs151178077	G	A	L136L	1	Tolere edilebilir
rs151178077	G	A	L45L	1	Tolere edilebilir
rs151178077	G	A	L64L	1	Tolere edilebilir

Çizelge 4.2. Zararlı (Düşük Düzeyde) Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar

SNP	Referans Alel	Alternatif Alel	Amino asit değişimi	SIFT Skoru	SIFT Tahmini
rs370803551	G	A	R423C	0.001	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs202180445	T	C	K64R	0	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs28942087	A	G	L55P	0.002	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs376973514	A	G	I24T	0.002	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs199560940	C	T	G37S	0	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs199717050	C	T	R32H	0.013	Zararlı (Düşük Düzeyde)
rs140068549	G	A	R32C	0	Zararlı (Düşük Düzeyde)

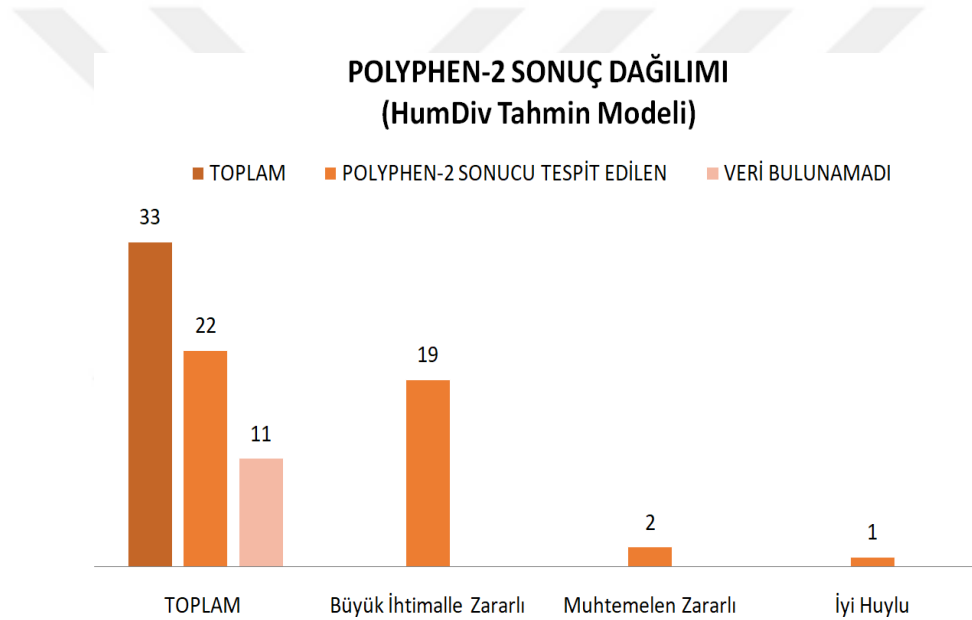
Çizelge 4.3. Zararlı Olarak Tespit Edilen Varyasyonlar

SNP	Referans Alel	Alternatif Alel	Amino asit değişimi	SIFT Skoru	SIFT Tahmini
rs149991087	A	G	V391A	0	Zararlı
rs200506753	G	A	R375C	0.014	Zararlı
rs121908053	G	A	T371M	0	Zararlı
rs199711526	G	T	P360T	0.002	Zararlı
rs57506973	C	T	D352N	0.017	Zararlı
rs28940888	G	A	T345M	0	Zararlı
rs112299487	C	A	G340C	0.002	Zararlı
rs375740669	A	G	Y339H	0.011	Zararlı
rs121908048	C	T	M317I	0	Zararlı
rs121908048	C	T	M245I	0	Zararlı
rs121908054	A	T	M276K	0.001	Zararlı
rs121908054	A	T	M204K	0.001	Zararlı
rs121908049	G	T	N252K	0.005	Zararlı
rs121908049	G	T	N180K	0.008	Zararlı
rs4986970	A	T	S232T	0.006	Zararlı
rs4986970	A	T	S160T	0.006	Zararlı
rs376973514	A	G	I130T	0.001	Zararlı
rs376973514	A	G	I202T	0.002	Zararlı
rs28940887	G	A	R159W	0	Zararlı
rs28940887	G	A	R87W	0	Zararlı
rs121908057	T	C	N155D	0.018	Zararlı
rs121908057	T	C	N83D	0.02	Zararlı
rs121908050	G	A	T147I	0.003	Zararlı
rs121908050	G	A	T75I	0.005	Zararlı
rs199560940	C	T	G128S	0.003	Zararlı
rs199560940	C	T	G56S	0.003	Zararlı
rs199717050	C	T	R51H	0.017	Zararlı
rs199717050	C	T	R123H	0.018	Zararlı
rs140068549	G	A	R123C	0	Zararlı
rs140068549	G	A	R51C	0	Zararlı
rs267607211	A	G	W170R	0	Zararlı
rs267607211	A	G	W98R	0	Zararlı
rs121908051	G	A	P34L	0.004	Zararlı

4.2.2. Polyphen-2 Sonuçları

Polyphen-2 çevrimiçi yazılım aracına LCAT genine ait 189 SNP için SİFT yazılım aracında zararlı (deleterious) olduğu tespit edilen 33 adet varyasyonun referans numaraları girilmiştir. HumDiv ve HumVar tahmin modelleri kullanılmıştır.

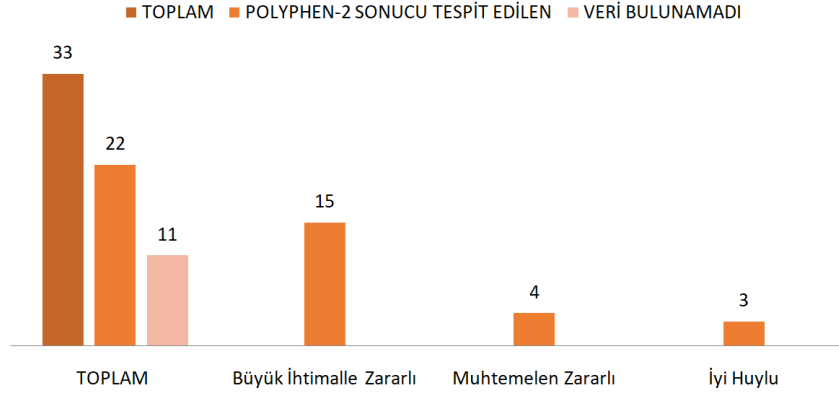
Polyphen-2 yazılım aracına tarafından yapılan tahmin analizine göre HumDiv tahmin yöntemi SİFT yazılım aracında zararlı (deleterious) olduğu tespit edilen 33 adet varyasyon için 19 varyasyonun “Büyük İhtimalle Zararlı (Probably Damaging)” olduğu, 2 varyasyon için Muhtemelen Zararlı (Possibly Damaging)” olduğu, 1 varyasyon için ise “İyi Huylu” (Benign) olduğu ve 11 varyasyon için ise hata yanıtını vermiştir.



Grafik 4.2. PolyPhen-2 HumDiv Tahmin Modeli

Polyphen-2 yazılım aracına tarafından yapılan tahmin analizine göre HumVar tahmin yöntemi SİFT yazılım aracında zararlı (deleterious) olduğu tespit edilen 33 adet varyasyon için 15 varyasyonun “Büyük İhtimalle Zararlı (Probably Damaging)” olduğu, 4 varyasyon için “Büyük İhtimalle Zararlı (Probably Damaging)” olduğu, 3 varyasyon için ise “İyi Huylu” (Benign) olduğu ve 11 varyasyon için ise hata yanıtını vermiştir.

POLYPHEN-2 SONUÇ DAĞILIMI
(HumVar Tahmin Modeli)



Grafik 4.3. PolyPhen-2 HumVar Tahmin Modeli

Çizelge 4.4. PolyPhen-2 Sonuçları

Amino asit değişimi	HumDiv		HumVar	
	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin
V391A	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı
R375C	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.994	Büyük İhtimalle Zararlı
T371M	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.972	Büyük İhtimalle Zararlı
P360T	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.999	Büyük İhtimalle Zararlı
D352N	0.998	Büyük İhtimalle Zararlı	0.926	Büyük İhtimalle Zararlı
T345M	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.999	Büyük İhtimalle Zararlı

Çizelge 4.4. (Devam.)

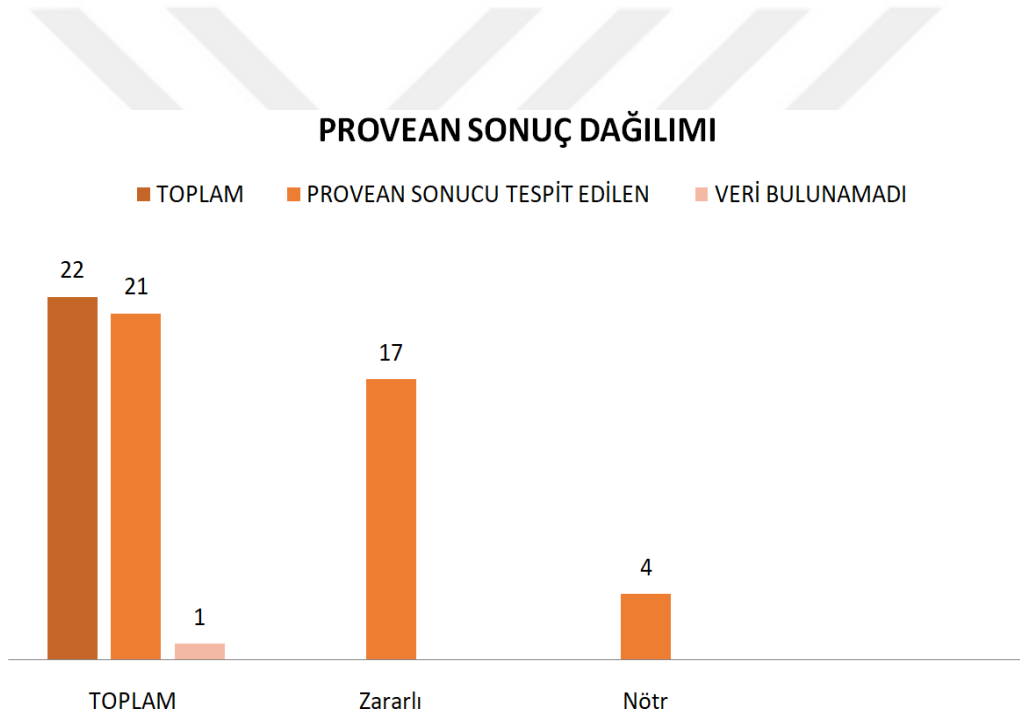
Y339H	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı
G340C	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.989	Büyük İhtimalle Zararlı
M317I	0.993	Büyük İhtimalle Zararlı	0.984	Büyük İhtimalle Zararlı
M245I	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
M276K	0.434	İyi huylu	0.346	İyi huylu
M204K	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
N252K	0.991	Büyük İhtimalle Zararlı	0.730	Muhtemelen Zararlı
N180K	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
S232T	0.831	Muhtemelen Zararlı	0.265	İyi huylu
S160T	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
T130I	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.999	Büyük İhtimalle Zararlı
I202T	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.993	Büyük İhtimalle Zararlı
R159W	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.997	Büyük İhtimalle Zararlı
R87W	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok

Çizelge 4.4. (Devam.)

N155D	0.982	Büyük İhtimalle Zararlı	0.754	Muhtemelen Zararlı
N83D	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
T147I	0.997	Büyük İhtimalle Zararlı	0.734	Muhtemelen Zararlı
T75I	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
G128S	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.999	Büyük İhtimalle Zararlı
G56S	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
R51H	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
R123H	0.986	Büyük İhtimalle Zararlı	0.510	Muhtemelen Zararlı
R123C	1.000	Büyük İhtimalle Zararlı	0.999	Büyük İhtimalle Zararlı
R51C	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
W170R	0.997	Büyük İhtimalle Zararlı	0.958	Büyük İhtimalle Zararlı
W98R	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok	Sonuç yok
P34L	0.952	Muhtemelen Zararlı	0.244	İyi huylu

4.2.3 Provean

PROVEAN çevrimiçi yazılım aracına LCAT genine ait 189 SNP için Polyphen-2 yazılım aracında HumDiv ve HumVar tahmin modellemesine göre ‘‘Büyük İhtimalle Zararlı (Probably Damaging)’’, ‘‘Muhtemelen Zararlı (Possibly Damaging)’’ ve ‘‘İyi Huylu (Benign)’’ olduğu tespit edilen 22 amino asit değişimin her biri için LCAT proteininin UniProtKB erişim kimliği, ilgili amino asit değişiminin pozisyonu ve doğal ve mutant tip amino asit bilgisi girilmiştir. Provean yazılım aracı sonuçlarına göre; 17 adet varyasyonun ‘‘Zararlı’’ (Deleterious) olduğunu, 4 adet varyasyonun ise ‘‘Nötr’’ (Neutral) olduğu tahmin etmiştir. 1 varyasyon için ise sonuç bulunamamıştır.



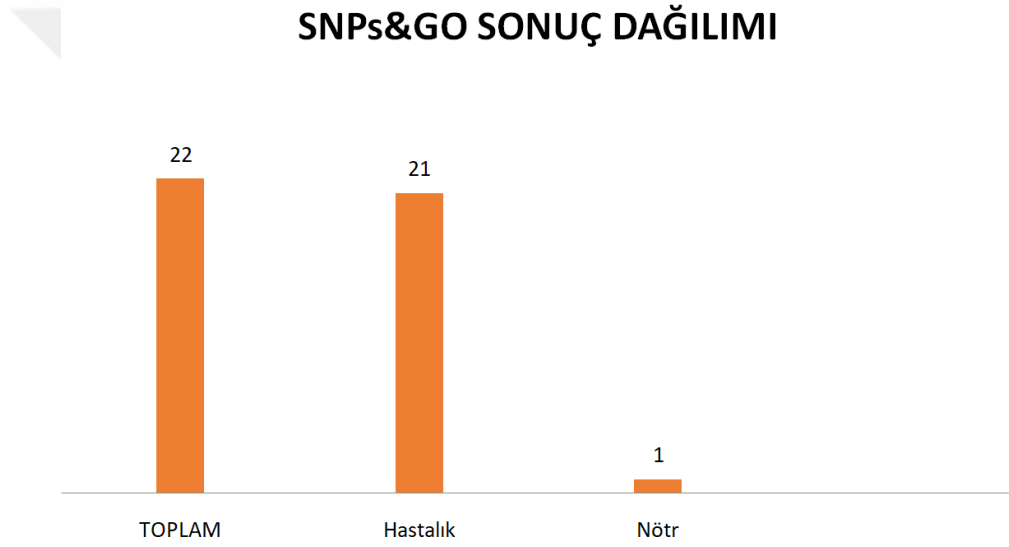
Grafik 4.4. Provean Sonuç Dağılımı

Çizelge 4.5. Provean Sonuçları

Varyant	PROVEAN puanı	Tahmin (kesme noktası= -2.5)
V391A	-3.503	Zararlı
R375C	-5.700	Zararlı
T371M	-5.425	Zararlı
P360T	-5.445	Zararlı
D352N	-2.210	Nötr
T345M	-5.471	Zararlı
G340C	-8.160	Zararlı
Y339H	-2.857	Zararlı
M317I	-3.181	Zararlı
M276K	-4.592	Zararlı
N252K	-4.119	Zararlı
S232T	-1.550	Nötr
I202T	-3.763	Zararlı
R159W	-6.859	Zararlı
N155D	-1.265	Nötr
T147I	-3.637	Zararlı
G128S	-5.172	Zararlı
R123H	-3.704	Zararlı
R123C	-6.379	Zararlı
W170R	-8.777	Zararlı
P34L	-2.143	Nötr

4.2.4. SNPs & Go Sonuçları

SNPs&GO çevrimiçi yazılım aracına, LCAT genine ait ve provean yazılım aracında “Zararlı” (Deleterious) ve “Nötr” (Neutral) olduğu tespit edilen 21 amino asit değişimi için LCAT proteininin UniProtKB/Swiss-Prot erişim kimliği, ilgili amino asit değişiminin pozisyonu ve doğal ve mutant tip amino asit bilgisi girilmiştir. SNPs & GO yazılım aracı sonuçlarına göre; 20 adet varyasyonun “Hastalık” (Disease) oluşturduğu, 1 adet varyasyonun ise “Nötr” (Neutral) olduğu tespit edilmiştir.



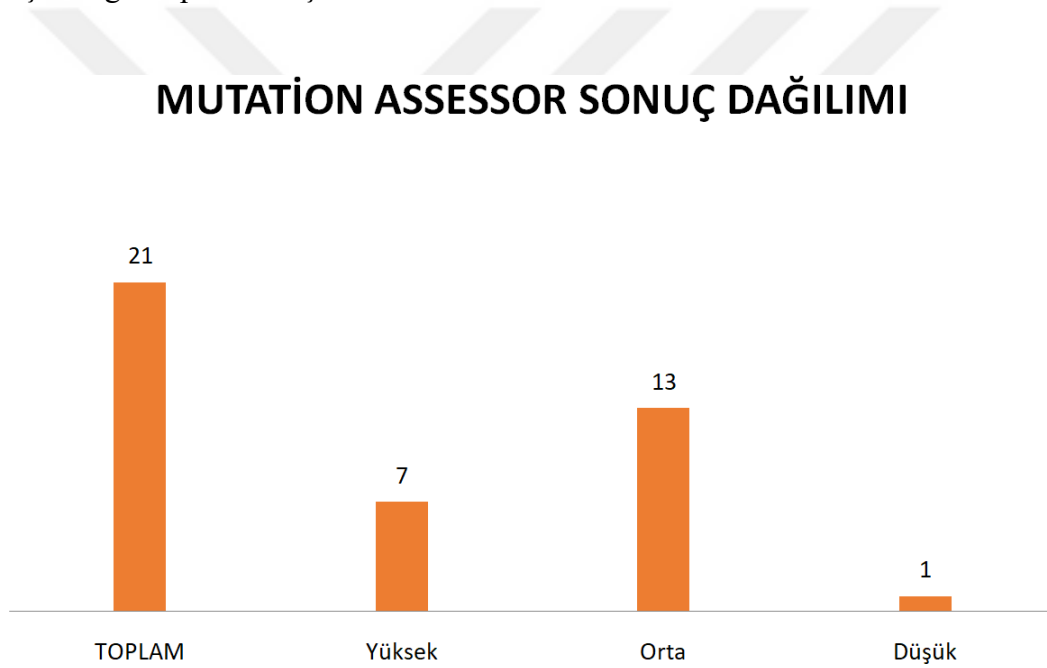
Grafik 4.5. SNPs & Go Sonuç Dağılımı

Çizelge 4.6. SNPs & Go Sonuçları

Pozisyon	Doğal Tip Proteinde Kalıntı	Mutasyona Uğramış Kalıntı	Etki	Güvenilirlik İndeksi
391	V	A	Hastalık	7
375	R	C	Hastalık	8
371	T	M	Hastalık	8
360	P	T	Hastalık	2
352	D	N	Hastalık	1
345	T	M	Hastalık	8
340	G	C	Hastalık	8
339	Y	H	Hastalık	8
317	M	I	Hastalık	7
276	M	K	Hastalık	7
252	N	K	Hastalık	8
232	S	T	Nötr	1
202	I	T	Hastalık	6
159	R	W	Hastalık	9
155	N	D	Hastalık	4
147	T	I	Hastalık	2
128	G	S	Hastalık	9
123	R	H	Hastalık	5
123	R	C	Hastalık	7
170	W	R	Hastalık	9
34	P	L	Hastalık	4

4.2.5 Mutation Assessor

Mutation Assessor çevrimiçi yazılım aracına,LCAT genine ait ve provean yazılım aracında “Zararlı” (Deleterious) ve “Nötr” (Neutral) olduğu tespit edilen 21 amino asit değişimi için LCAT proteininin UniProtKB/Swiss-Prot erişim kimliği, ilgili amino asit değişiminin pozisyonu ve doğal ve mutant tip amino asit bilgisi girilmiştir. Mutation Assessor tahmini fonksiyonel etki birleşik skorlarına göre, LCAT proteinindeki 13 adet amino asit değişiminin protein işlevinde “Orta düzeyde” (Medium) etki oluşturduğu, 1 adet amino asit değişiminin protein işlevinde “Düşük düzeyde” (Low) etki oluşturduğu, 7 adet amino asit değişiminin protein işlevinde “Yüksek düzeyde” (High) etki oluşturduğu tespit edilmiştir.



Grafik 4.6. Mutation Assessor Dağılımı

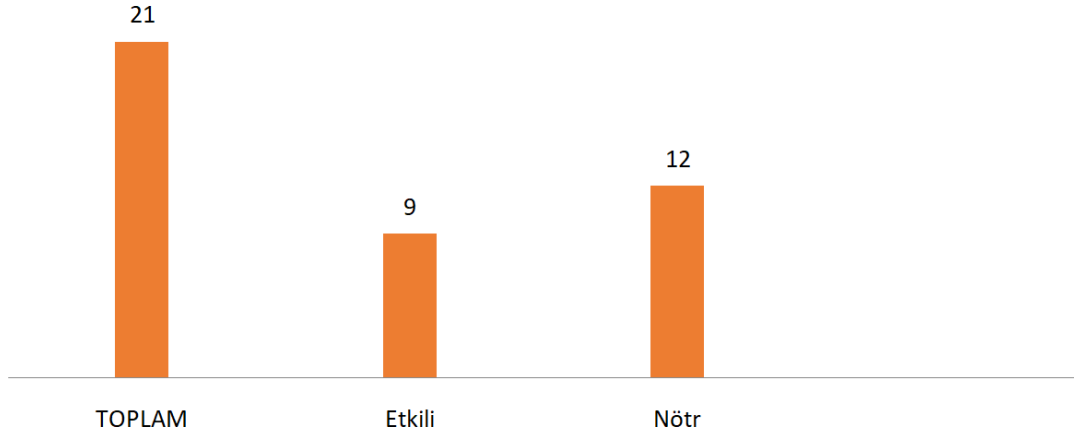
Çizelge 4.7. Mutation Assessor Sonuçları

Varyant	Fonksiyonel etki	İşlevsel etki birleşik puanı (FI)	Varyant koruma puanı (VC)	Varyant özgüllük puanı (VS)
T371M	Yüksek	3.69	4.61	2.77
T345M	Yüksek	3.735	4.64	2.83
G340C	Yüksek	3.725	4.62	2.83
R159W	Yüksek	3.555	4.28	2.83
G128S	Yüksek	3.72	4.61	2.83
R123H	Yüksek	3.59	4.41	2.77
R123C	Yüksek	3.59	4.41	2.77
V391A	Orta	3.165	3.50	2.83
R375C	Orta	2.715	2.87	2.56
P360T	Orta	2.975	3.18	2.77
D352N	Orta	2.125	1.61	2.64
Y339H	Orta	2.365	1.90	2.83
M317I	Orta	2.675	2.58	2.77
M276K	Orta	3.005	3.18	2.83
N252K	Orta	2.77	2.83	2.71
S232T	Orta	1.97	1.23	2.71
I202T	Orta	2.33	3.16	1.50
T147I	Orta	3.12	3.47	2.77
W170R	Orta	3.38	3.93	2.83
P34L	Orta	2.08	2.08	2.08
N155D	Düşük	1.525	0.75	2.30

4.2.6. SNAP2

SNAP2 çevrimiçi yazılım aracına, LCAT genine ait ve mutation assessor yazılım aracında high (yüksek), medim (orta etkili) ve low (düşük etkili) olduğu tespit edilen 21 varyasyon için LCAT proteinine ait ve UniProt veri tabanından elde edilen FASTA formatındaki protein dizisi girilmiştir. İncelenen varyasyonlar için SNAP2 yazılım aracı 12 varyant için Nötr, 9 varyant için Etkili sonucu vermiştir.

SNAP2 SONUÇ DAĞILIMI



Grafik 4.7. SNAP2 Sonuç Dağılımı

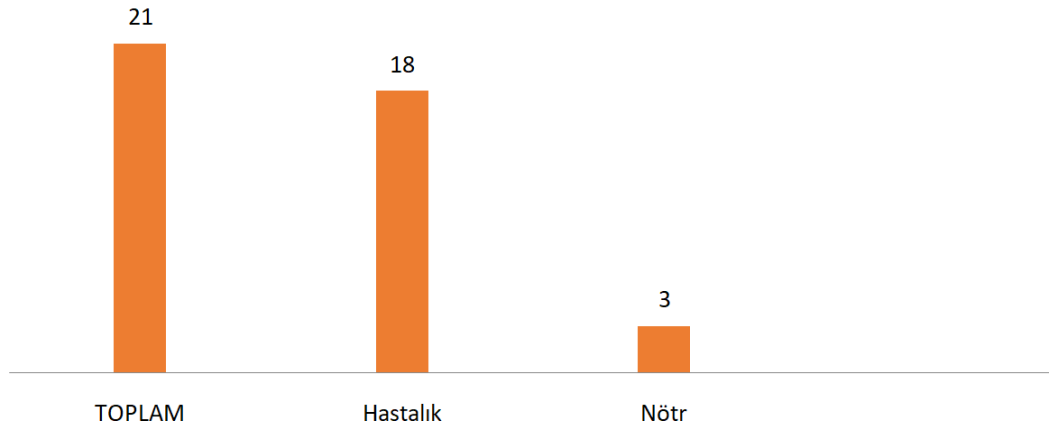
Çizelge 4.8. SNAP2 Sonuçları

Doğal Tip Proteinde Kalıntı	Pozisyon	Mutasyona Uğramış Kalıntı	Öngörülen Etki	Puan	Beklenen Doğruluk
T	371	M	Nötr	-19	57%
T	345	M	Nötr	-27	61%
G	340	C	Etkili	51	75%
R	159	W	Etkili	62	80%
G	128	S	Nötr	-13	57%
R	123	H	Etkili	23	63%
R	123	C	Etkili	54	75%
V	391	A	Nötr	-46	72%
R	375	C	Etkili	51	75%
P	360	T	Nötr	-19	57%
D	352	N	Etkili	45	71%
Y	339	H	Etkili	29	63%
M	317	I	Nötr	-68	82%
M	276	K	Nötr	-20	57%
N	252	K	Nötr	-26	61%
S	232	T	Nötr	-51	78%
I	202	T	Nötr	-9	53%
T	147	I	Nötr	-19	57%
W	170	R	Etkili	44	71%
P	34	L	Etkili	14	59%
N	155	D	Nötr	-5	53%

4.2.7. PhD-SNP Sonuçları

PhD-SNP çevrimiçi yazılım aracına, LCAT proteinine ait ve SNAP2 yazılım aracında Etkili ve Nötr olarak tespit edilen 21 adet varyasyonun amino asit değişiminin pozisyonu ve mutant tip amino asit bilgisi girilmiştir. PhD-SNP yazılım aracı sonuçlarına göre 18 adet varyasyon için “Hastalık” (Disease) oluşturduğunu, 3 adet varyantın ise “Nötr” (Neutral) olduğu tespit edilmiştir.

PHD-SNP SONUÇ DAĞILIMI



Grafik 4.8. PhD-SNP Sonuç Dağılımı

Çizelge 4.9. PhD-SNP Sonuçları

Doğal Tip Proteinde Kalıntı	Pozisyon	Mutasyona Uğramış Kalıntı	Tahmin	Güvenilirlik İndeksi
T	371	M	Hastalık	6
T	345	M	Hastalık	9
G	340	C	Hastalık	8
R	159	W	Hastalık	8
G	128	S	Hastalık	8
R	123	H	Hastalık	7
R	123	C	Hastalık	9
V	391	A	Hastalık	3
R	375	C	Hastalık	3
P	360	T	Hastalık	4
D	352	N	Hastalık	4
Y	339	H	Hastalık	8
M	317	I	Hastalık	6
M	276	K	Hastalık	7
N	252	K	Hastalık	7
S	232	T	Nötr	6
I	202	T	Nötr	2
T	147	I	Hastalık	2
W	170	R	Hastalık	6
P	34	L	Hastalık	2
N	155	D	Nötr	4

4.3. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen SNP'lerin Protein Stabilizasyonu Üzerine Etkileri

Sift, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assessor, SNAP2 ve PhD-SNP yazılım araçlarının her birinde aynı anda zararlı olduğu tahmin edilen amino asit değışimleri filtrelenmiştir. Toplam 7 adet varyantın tüm programlarda zararlı olduğu tespit edilmiştir. Bu 7 adet varyanta ait SNP referans numaraları ve ilgili amino asit değışiklikleri; rs200506753(R375C), rs112299487(G340C), rs375740669(Y339H), rs28940887(R159W), rs199717050(R123H), rs140068549(R123C), rs267607211(W170R) olarak saptanmıştır. Her bir SNP'ye ait tahmin sonuçları çizelgede gösterilmiştir. Daha sonra zararlı olduğu tespit edilen 7 adet varyantın protein stabilizasyonu üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek amacıyla I-Mutant ve MUpro yazılım araçları kullanılmıştır.

Çizelge 4.10. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen SNP'ler

SNP ID	rs200506753	rs112299487	rs375740669	rs28940887	rs199717050	rs140068549	rs267607211
Amino Asit Değişimi	R375C	G340C	Y339H	R159W	R123H	R123C	W170R
SIFT Sonucu	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı
SIFT Skoru	0.014	0.002	0.011	0	0.018	0	0
PolyPhen-2 Sonucu (HumDiv)	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı
PolyPhen-2 Skoru (HumDiv)	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	0.997
PolyPhen-2 Sonucu (HumVar)	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Muhtemelen Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı	Büyük İhtimalle Zararlı
PolyPhen-2 Skoru (HumVar)	0.994	0.989	1.000	0.997	0.510	0.999	0.958
PROVEAN Sonucu	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı
PROVEAN Skoru	-5.700	-8.160	-2.857	-6.859	-3.704	-6.379	-8.777
SNPs&GO Sonucu	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık

Çizelge 4.10. (Devamı.)

SNPs&GO Güvenilirlik Değeri	8	8	8	9	5	7	9
MutationAssessor Sonucu	Orta	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
MutationAssesor FI Skoru	2.715	3.725	2.365	3.555	3.59	3.59	3.38
MutationAssesor VC Skoru	2.87	4.62	1.90	4.28	4.41	4.41	3.93
MutationAssesor VS Skoru	2.56	2.83	2.83	2.83	2.77	2.77	2.83
SNAP-2 Sonucu	Etkili	Etkili	Etkili	Etkili	Etkili	Etkili	Etkili
SNAP-2 Skoru	51	51	29	62	23	54	44
SNAP-2 Beklenen Doğruluk	75%	75%	63%	80%	63%	75%	71%
PhD-SNP Sonucu	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık	Hastalık
PhD-SNP Skoru	3	8	8	8	7	9	6

4.3.1. I-Mutant 3.0 Sonuçları

LCAT genine ait yanlış anlamlı SNP'ler arasında zararlı/ hastalıkla ilişkili olabileceği belirlenen 7 adet SNP olduğu tespit edilmiştir. I-Mutant 3.0 yazılım aracı ile yapılan çalışmada 7 varyantın da protein stabilizasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. I-Mutant 3.0 Sonuçları

SNP ID	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	I-Mutant 3.0 Tahmini	DDG (Kcal/mol) (Serbest Enerji Değişimi Değeri)	Rİ (Güvenilirlik İndeksi)
rs200506753	G>A	R375C	Azalan	-0.54 Kcal/mol	1
rs112299487	C>A	G340C	Azalan	-0.93 Kcal/mol	4
rs375740669	A>G	Y339H	Azalan	-1.35 Kcal/mol	7
rs28940887	G>A	R159W	Azalan	-0.57 Kcal/mol	7
rs199717050	C>T	R123H	Azalan	-1.51 Kcal/mol	9
rs140068549	G>A	R123C	Azalan	-1.19 Kcal/mol	4
rs267607211	A>G	W170R	Azalan	-0.77 Kcal/mol	6

4.3.2 Mupro

LCAT genine ait yanlış anlamlı SNP'ler arasında zararlı/ hastalıkla ilişkili olabileceği belirlenen 7 SNP'nin MUpro çevrimiçi yazılım aracı ile yapılan analiz çalışmasında elde edilen bulgular sonucunda amino asit değişiminin tümünün protein stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Mupro Sonuçları

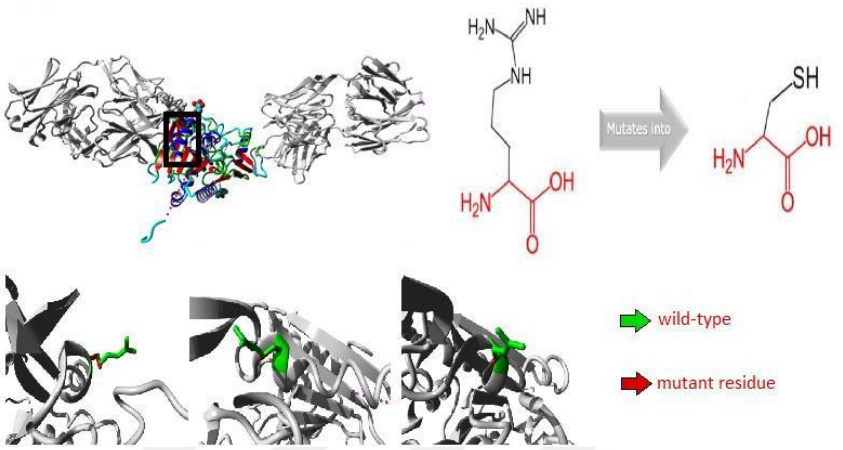
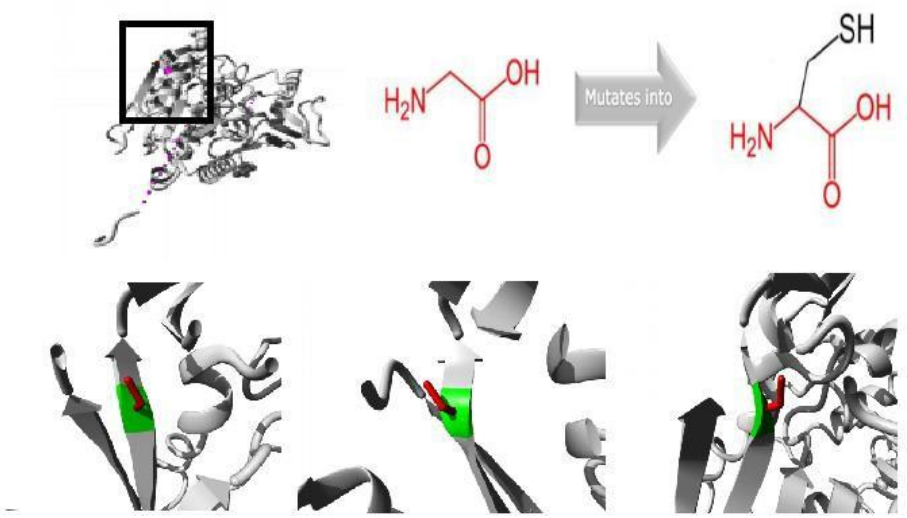
SNP ID	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	MUpro Tahmini	DDG (Kcal/mol) (Serbest Enerji Değişimi Değeri)
rs200506753	G>A	R375C	Azalan	-0.246748
rs112299487	C>A	G340C	Azalan	-0.58661922
rs375740669	A>G	Y339H	Azalan	-1.5033121
rs28940887	G>A	R159W	Azalan	-0.85932354
rs199717050	C>T	R123H	Azalan	-1.2106116
rs140068549	G>A	R123C	Azalan	-0.68322658
rs267607211	A>G	W170R	Azalan	-1.272353

4.4. Zararlı Olduğu Tahmin Edilen Varyasyonların Üç Boyutlu Modellemesi

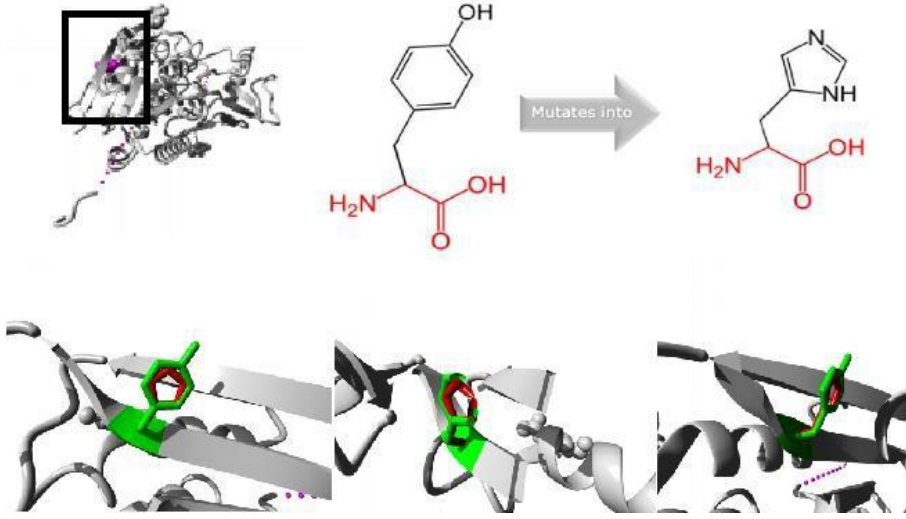
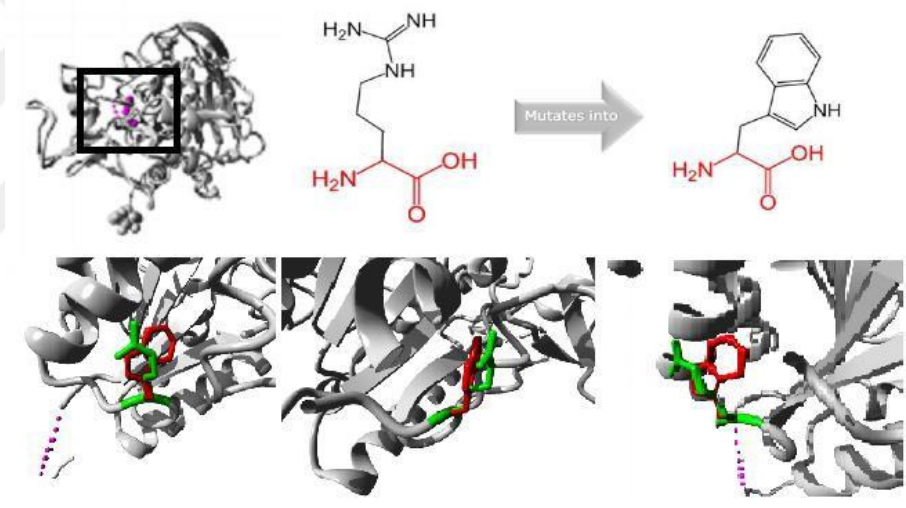
4.4.1. Project Hope

Tüm çevrimiçi yazılım araçlarında fonksiyonel olarak zararlı olabileceğini tahmin edilen 7 varyasyon için HOPE yazılım aracı ile analiz yapılmıştır. HOPE çevrimiçi yazılım aracına, LCAT proteinindeki 7 amino asit değişimin her biri için; LCAT proteininin UniProtKB erişim kimliği, amino asit değişiminin pozisyonu ve mutant tip amino asit bilgisi girilmiştir.

Çizelge 4.13. Project Hope Modelleme Sonuçları

SNP ID	MODELLEME
rs200506753 (R375C)	 Açıklama:Polimorfizmin sonucu olarak 375.pozisyondaki Arginin amino asidi Sistein amino asidine dönüşmüştür.
rs112299487 (G340C)	 Açıklama:Polimorfizmin sonucu olarak 340.pozisyondaki Glisin amino asidi Sistein amino asidine dönüşmüştür.

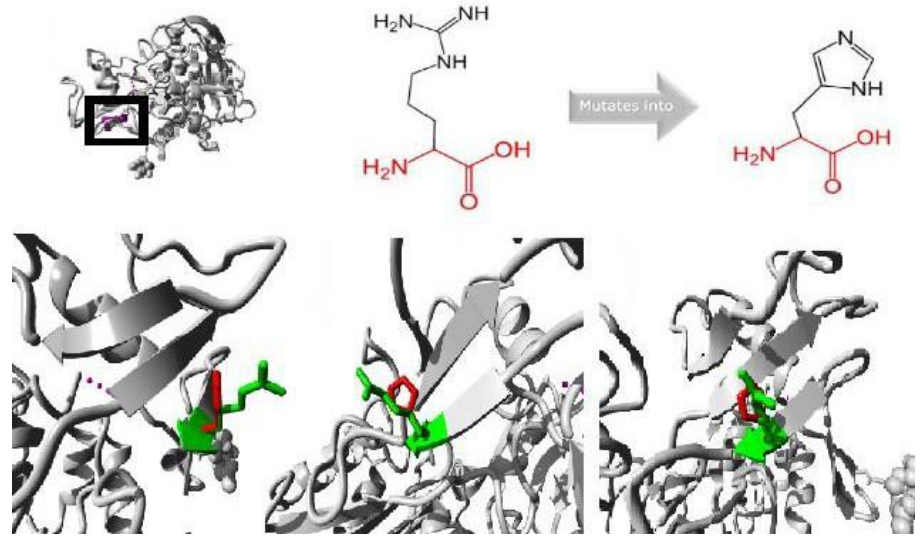
Çizelge 4.13. (Devamı.)

rs375740669 (Y339H)	 Açıklama: Polimorfizmin sonucu olarak 339.pozisyondaki Tirozin amino asidi Histidin amino asidine dönüşmüştür.
rs28940887 (R159W)	 Açıklama: Polimorfizmin sonucu olarak 159.pozisyondaki Arginin amino asidi Triptofan amino asidine dönüşmüştür.

Çizelge 4.13. (Devamı.)

rs199717050

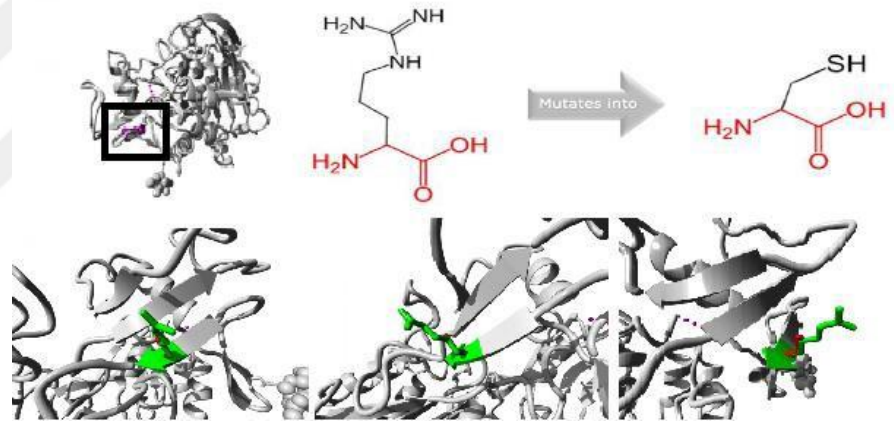
(R123H)



Açıklama: Polimorfizmin sonucu olarak 123.pozisyondaki Arginin amino asidi **Histidin** amino asidine dönüşmüştür.

rs140068549

(R123C)

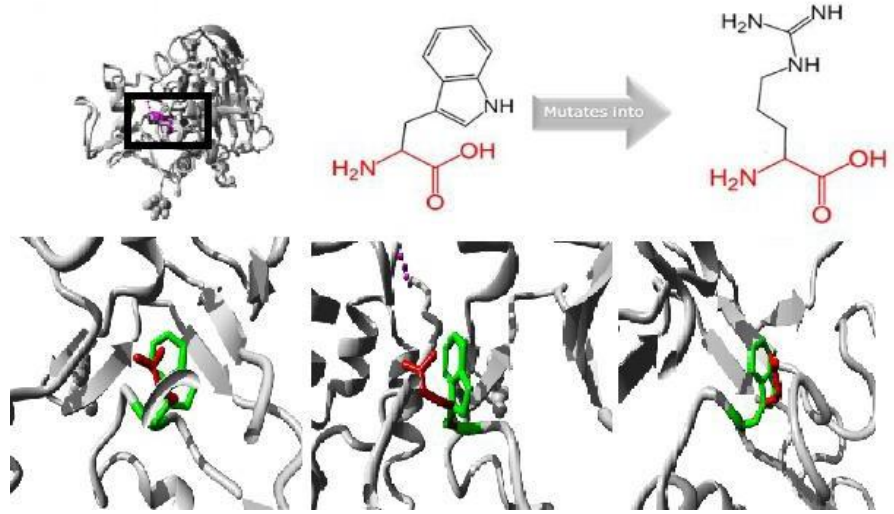


Açıklama: Polimorfizmin sonucu olarak 123.pozisyondaki Arginin amino asidi **Sistein** amino asidine dönüşmüştür.

Çizelge 4.13. (Devamı.)

rs267607211

(W170R)



Açıklama:Polimorfizmin sonucu olarak 170.pozisyondaki Triptofan amino asidi Arginin amino asidine dönüşmüştür.

Çizelge 4.14. Project Hope Sonuçlarına Göre Doğal Tip ve Mutant Kalıntı Amino Asit Özellikleri

SNP ID	AMİNO ASİT DEĞİŞİMİ	DOĞAL TIP KALINTI ÖZELLİKLERİ			MUTASYONA UĞRAMIŞ KALINTI ÖZELLİKLERİ		
		BOYUT	YÜK	HİDROFOBİKLİK	BOYUT	YÜK	HİDROFOBİKLİK
rs200506753	R375C	>	Pozitif	<	<	Nötr	>
rs112299487	G340C	<	-	<	>	-	>
rs375740669	Y339H	>	-	>	<	-	<
rs28940887	R159W	<	Pozitif	<	>	Nötr	>
rs199717050	R123H	>	Pozitif	-	<	Nötr	-
rs140068549	R123C	>	Pozitif	<	<	Nötr	>
rs267607211	W170R	>	Nötr	>	<	Pozitif	<

Amino asit değişimleri boyutsal olarak karşılaştırıldığında; G340C(rs112299487) ve R159W(rs28940887) pozisyonlarındaki mutant kalıntılar, doğal tip kalıntılara göre boyutsal olarak daha büyüktür. R375C(rs200506753), Y339H(rs375740669), R123H(rs199717050), R123C(rs140068549) ve W170R(rs267607211) pozisyonlarındaki mutant kalıntılar, doğal tip kalıntılara göre boyutsal olarak daha küçüktür.

Amino asit değişimleri sahip oldukları elektriksel yük baz alınarak karşılaştırıldığında; W170R(rs267607211) pozisyonundaki mutant kalıntının elektriksel yükü pozitif iken doğal kalıntının elektriksel yükünün nötr olduğu tespit edilmiştir. R375C(rs200506753), R159W(rs28940887), R123H(rs199717050) ve R123C(rs140068549) pozisyonlarındaki mutant kalıntının elektirisel yükü nötr iken doğal tip kalıntının elektriksel yükü pozitifir. G340(rs112299487) ve Y339H(rs375740669) pozisyonlarındaki mutant kalıntılar ile doğal tip kalıntılar için elektriksel yük olarak bir fark bildirilmemiştir.

Amino asit değişimleri sahip oldukları hidrofobiklik değerleri baz alınarak karşılaştırıldığında; R375C(rs200506753), G340C(rs112299487), R159W(rs28940887) ve R123C(rs140068549) pozisyonlarındaki mutant kalıntıların, doğal tip kalıntılara göre daha fazla hidrofobik olduğu tespit edilmiştir.Y339H(rs375740669) ve W170R(rs267607211) pozisyonlarındaki mutant kalıntıların, doğal tip kalıntılara göre daha az hidrofobik olduğu belirtilmiştir. R123H(rs199717050) pozisyonunda ise mutant kalıntılar ile doğal tip kalıntılar için hidrofobik değerleri açısından bir fark bildirilmemiştir.



5.TARTIŞMA

Birçok genetik hastalığın ya da multifaktöriyel hastalıkların tanımlanmasında, erken tanısında veya hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde SNP'ler önemli polimorfizm çeşitleridir. NCBI dbSNP veritabanında bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 44 milyon insan SNP'leri yer almaktadır (NCBI, 2015).

SNP'lerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi çok zaman alıcı ve maliyetli olabilmektedir (Akhoundi ve ark., 2016; Chen ve Sullivan, 2003).

Bu nedenle zararlı SNP'lerin tahmin edilmesi için in siliko yöntemlerin kullanılması büyük avantaj sağlamaktadır. Günümüzde SNP'lerin olası zararlı etkilerinin öngörülmesinde birçok genin etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar yayınlanmıştır (Kaman ve ark., 2019; Özkan Oktay ve ark., 2019; Cabrera-Serrano ve ark., 2018).

Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, zararlı yanlış anlamalı SNP'leri tahmin etmek için in siliko araçlarının kullanılması, deneysel prosedürlerden daha az zaman ve maliyet gerektiren verimli bir yaklaşım olmuştur ve ön taramalı zararlı yanlış anlamalı SNP'ler, sonraki fonksiyonel doğrulama deneyleri için adaydır (Zhang ve ark., 2020).

Bu çalışmada balık gözü hastalığı ile ilişkili LCAT genindeki zararlı SNP'lerin in siliko yöntemlerle belirlenmesi sağlanmıştır.

5.1. SNP'lerin Biyoinformatik Analiz Sonuçlarının Tartışılması

LCAT geni ile ilgili 2836 snp belirlenmiştir ve bunlardan yanlış anlamalı olan 795 snp araştırma için seçilmiştir. SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNPs&GO, Mutation Assesor, SNAP2 ve PhD-SNP yazılım araçları kullanılarak yapılan analizler sonucunda ortak olarak zarar verici etkiye sahip olanlar seçilmiş olup; rs200506753 (R375C), rs112299487 (G340C), rs375740669 (Y339H), rs28940887 (R159W), rs199717050 (R123H), rs140068549 (R123C), rs267607211 (W170R) referans numaralarına sahip SNP'lerin yüksek riskli SNP'ler olabileceği tespit edilmiştir. Zararlı olduğu tahmin edilen bu yedi yanlış anlamalı SNP için literatür çalışması yapıldığında, bu SNP'ler için herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

5.1.1. Protein Stabilizasyonu

Protein dizisindeki amino asit değişiminin meydana getirdiği stabilitedeki azalma nedeniyle gerçekleşen, yeterince başarılı olmayan katlanmalar veya katlanmamış protein bölümlerindeki artış, proteinin yoğunluğunu azaltabilir (Yue ve ark., 2005).

Protein yapıları etkileyici bir dizi stabilize edici etkileşim içerir; bunlar hidrofobik ve paketlenme etkileşimlerini, hidrojen bağlarını ve tuz köprülerini içerir. Stabilizasyonun azalması proteinin yapısını değiştirebilir, çözünürlüğüne etki edebilir, aktivitesinin azalmasına veya kaybına neden olabilir (Pakula ve Sauer, 1989). Mutasyonla meydana gelen stabilite kaybı ile hastalıklar arasında tutarlı bir ilişki bulunmaktadır (Yue ve ark., 2005).

LCAT geni için; I-Mutant 3.0 ve MUpro yazılım araçlarının sonuçlarının her ikisinde de rs200506753 (R375C), rs112299487 (G340C), rs375740669 (Y339H), rs28940887 (R159W), rs199717050 (R123H), rs140068549 (R123C), rs267607211 (W170R) referans numaralarına sahip SNP'lerin proteinin stabilizasyonunu azalttığı tespit edilmiştir.

5.1.2. Amino Asit Özellikleri

5.1.2.1. Boyut

Boyutsal açıdan bakıldığında amino asitler arasında önemli bir çeşitlilik vardır ve bir amino asidin moleküler ağırlığı, büyüklüğü ile kabaca orantılıdır. Daha küçük kalıntılar, tercihen daha büyük kalıntılarla birlikte yerleşirken, küçük-küçük ve büyük-büyük birlikte yerleşimler tercih edilmez. Protein yapısının hangi bölgelerinin hangi bölgelere uyduğunu saptamada amino asitlerin boyutlarının önemli bir rolü vardır; ancak çoğunlukla, boyut ve şekil özellikleri daha büyük protein alanları ile ilişkilidir (Biro, 2006).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs112299487 (G340C) ve rs28940887 (R159W) pozisyonlarındaki mutant kalıntıların, doğal tip kalıntılardan daha büyük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Doğal tip kalıntıların proteinin çekirdeğine gömülü olması nedeniyle mutant tip kalıntılar proteinin çekirdeğine muhtemelen sığmayabilir (Venselaar ve ark., 2010).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs200506753 (R375C), rs375740669 (Y339H), rs199717050 (R123H), rs140068549 (R123C), rs267607211 (W170R) pozisyonlarındaki mutant kalıntıların, doğal tip kalıntılardan daha küçük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum da varyasyonlarının oluşturduğu proteinlerin çekirdeklerinde boş bir alana ve olası bir dış etkileşim kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs28940887 (R159W) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 134.pozisyonunda glutamik asit ile ve 150.pozisyonunda glutamin ile bir hidrojen bağı oluşturur.

rs200506753 (R375C) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 282. pozisyonunda alanine ile ve 366.pozisyonunda glutamik asit ile bir hidrojen bağı oluşturur ve ayrıca mutant kalıntı bir multimer kontağında bulunur. Mutant kalıntının küçük olması nedeniyle multimer temasları yapmasını engelleyebilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs375740669 (Y339H) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 378. pozisyonunda glutamik asit ile bir hidrojen bağı oluşturur.

rs199717050 (R123H) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 61. pozisyonunda glutamik asit bir hidrojen bağı oluşturur.

rs140068549 (R123C) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 61. pozisyonunda glutamik asit bir hidrojen bağı oluşturur.

rs267607211 (W170R) pozisyonundaki doğal tip kalıntı 58. pozisyonunda asparagin bir hidrojen bağı oluşturur.

Doğal tip ve mutant kalıntılar arasındaki boyut farkları, mutant kalıntıların doğal tip kalıntıların yaptığı gibi aynı hidrojen bağlarını yapmak için doğru konumda olmamalarına neden olacaktır (Venselaar ve ark., 2010).

5.1.2.2. Yapı

rs112299487 (G340C) pozisyonundaki doğal tip kalıntının tüm tortuların en esneki olan bir glisindir. Bu esneklik, proteinin işlevi için gerekli olabilir. Bu glisinin mutasyonu bu işlevi ortadan kaldırabilir. Glisin için burulma açıları olağandışıdır ve sadece glisin bu burulma açılarını yapacak kadar esnektir, başka bir kalıntıya değişim yerel omurgayı yanlış bir yapıya zorlayacak ve yerel yapıyı bozacaktır (Venselaar ve ark., 2010).

rs375740669 (Y339H) ve rs267607211 (W170R) pozisyonundaki doğal tip kalıntının tercih edilen ikincil yapısında, bir β -şeritinde yer aldığı görülebilir. Mutant tortu, başka bir ikincil yapıda olmayı tercih eder, bu nedenle yerel konformasyon biraz kararsız hale gelir.

5.1.2.3. Hidrofobiklik

Genel olarak hem hidrofobik hem de hidrofilik etkiler, protein katlanması, nükleik asit stabilitesi, moleküler tanıma ve bağlanma gibi çeşitli biyokimyasal süreçler için baskın itici güçlerdir (Damodharan ve Pattabhi, 2004). Protein dizilerindeki amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik özellikleri, protein yapısını ve katlanmasını yönetir (Di Rienzo ve ark., 2021). Benzer hidropatiye sahip moleküller birbirine afiniteye sahiptir, uyumludurlar; farklı hidropatiye sahip moleküller birbirini iter ve uyumlu değildirler (Biro, 2006).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs375740669 (Y339H) ve rs267607211 (W170R) pozisyonundaki mutant kalıntıların, doğal tip kalıntılara göre daha az hidrofobik olduğunu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum protein varyasyonlarının çekirdeklerinde hidrofobik etkileşimlerin kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs200506753 (R375C), rs112299487 (G340C), rs28940887 (R159W), rs140068549 (R123C) pozisyonundaki mutant kalıntıların ise doğal tip kalıntılara göre daha fazla hidrofobik olduğunu tespit edilmiştir. Bu durum proteinin çekirdeğindeki hidrojen bağlarının kaybına neden olabilir ve sonuç olarak doğru katlamayı bozabilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs200506753 (R375C) pozisyonundaki mutasyon bu pozisyonunda daha küçük bir tortu ortaya çıkarır. Yeni kalıntı, multimer temasları yapmak için çok küçük olabilir. Burada daha hidrofobik bir tortu eklenir. Doğal tip kalıntı tarafından diğer monomerlere yapılabilecek herhangi bir hidrojen bağı şimdi kaybolacak ve multimerik temasları etkileyecektir.

5.1.2.4. Yük

Proteinlerdeki tuz köprüleri, elektrostatik çekimi deneyimlemek için birbirine yeterince yakın olan zıt yüklü kalıntılar arasındaki bağlardır. Protein yapısına ve proteinlerin diğer biyomoleküllerle etkileşiminin özgüllüğüne katkıda bulunurlar (Bosshard ve ark., 2004).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs267607211 (W170R) pozisyonundaki doğal kalıntının nötr olmasına karşın mutant kalıntının pozitif olduğunu bildirmiştir. Bu durumda mutant kalıntı, gömülü kalıntıda protein katlama sorunlarına yol açabilir (Venselaar ve ark., 2010).

LCAT geni için yapılan araştırmada; rs200506753 (R375C), rs28940887 (R159W), rs199717050 (R123H), rs140068549 (R123C) pozisyonundaki doğal kalıntının pozitif olmasına karşın mutant kalıntının nötr olduğunu tespit etmiştir. Doğal ve mutant tip kalıntı tarafından yapılan yükteki farklılık, iyonik etkileşimi bozacaktır (Venselaar ve ark., 2010).

rs200506753 (R375C) pozisyonundaki doğal kalıntı 366. pozisyonunda glutamik asit ile bir tuz köprüsü oluşturur. Doğal kalıntının değişimi ile meydana gelen yükteki değişim, iyonik etkileşimi bozacaktır. Bu durum diğer moleküllerle etkileşim kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs28940887 (R159W) pozisyonundaki doğal kalıntı 134. Pozisyonunda glutamik asit ile ve 160. pozisyonunda aspartik asit ile bir tuz köprüsü oluşturur. Doğal kalıntının değişimi ile meydana gelen yükteki değişim, iyonik etkileşimi bozacaktır. Bu durum diğer moleküllerle etkileşim kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs199717050 (R123H) pozisyonundaki doğal kalıntı 61. pozisyonunda glutamik asit ile bir tuz köprüsü oluşturur. Doğal kalıntının değişimi ile meydana gelen yükteki değişim, iyonik etkileşimi bozacaktır. Bu durum diğer moleküllerle etkileşim kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).

rs140068549 (R123C) pozisyonundaki doğal kalıntı 61. pozisyonunda glutamik asit ile bir tuz köprüsü oluşturur. Doğal kalıntının değişimi ile meydana gelen yükteki değişim, iyonik etkileşimi bozacaktır. Bu durum diğer moleküllerle etkileşim kaybına neden olabilir (Venselaar ve ark., 2010).



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

İn siliko çalışmalar sayesinde günümüzde in vivo ve in vitro çalışmalar öncesinde zaman ve paradan tasarruf edilerek en doğru ve güvenilir sonuçlar alınıp, deneysel çalışmalara ön veriler sağlanabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda balık gözü hastalığı ile ilişkilendirilen LCAT genindeki zararlı SNP'lerin olası etkileri in siliko yöntemler ile incelenmiştir.

Buna göre; LCAT genindeki yanlış anlamlı SNP'ler; rs200506753(R375C), rs112299487(G340C), rs375740669(Y339H), rs28940887(R159W), rs199717050(R123H), rs140068549(R123C), rs267607211(W170R) polimorfizmlerinin tahminen yüksek riskli olabileceği tespit edilmiştir.

Bu çalışma tanısal ve deneysel çalışmalara yol göstermek amacıyla yapılmıştır. Yüksek riskli olduğu tahmin edilen SNP'lerin, FED ile ilişkili deneysel ve klinik çalışmalarda öncelikli olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

7.KAYNAKLAR

- Akhoundi, F., Parvaneh, N., Modjtaba, E.B. (2016). In silico analysis of Zararlı single nucleotide polymorphisms in human BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B gene. *Meta Gene.*, 9: 142–50.
- Aksoy, B. Z., Soydemir, E. (2017). Polimorfizm. <http://guncel.tgv.org.tr/journal/69/pdf/100514.pdf>.
- Altuntaş, V., Gök, M. (2020). Protein-Protein Etkileşimi Tespit Yöntemleri, Veri Tabanları ve Veri Güvenilirliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 19, ss.722–733.
- Arshad, M., Bhatti, A., John, P. (2018). Identification and in silico analysis of functional SNPs of human TAGAP protein: A comprehensive study. *PloS one*, 13(1), ss.1801-43.
- Barchiesi, B.J., Eckel, R.H., Ellis, P.P. (1991). The cornea and disorders of lipid metabolism. *Surv Ophthalmol*, 36(1): ss.1–22.
- Battaloğlu, E., Başak, A.N. (2010). Kompleks Hastalık Genetiği Güncel Kavramlar ve Nörolojik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Genomik Yöntemler. *Klinik Gelişim Dergisi*. 23 (1), ss.128–133.
- Baxeavanis, A. D. and Ouellette, B. F. F. (2001). "Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins" 2nd Ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 356.
- Berber, A. A., 2013, Statin Grubu Kolesterol İlaçlarından Rosuvastatin'in Genotoksitesisi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 142s, Sakarya.
- Bhagavan, N.V. (1992). Medical Biochemistry, Jones and Barlett Publishers, London,: ss.447-467.
- Bilici, M., 2010, Lipit Ve Lipoprotein Alt Sınıf Düzeylerinin Sağlıklı Kişilerde Ve Koroner Kalp Hastalarında İncelenmesi, Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49 s, Rize.
- Biro J. C. (2006). Amino acid size, charge, hydropathy indices and matrices for protein structure analysis. *Theoretical biology & medical modelling*, (3), 15.
- Bosshard, H. R., Marti, D. N., Jelesarov, I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of molecular recognition* : JMR, 17(1), 1–16.
- Bourcier, T., Chibane, S., Boutboul, S., Abitbol, M., Borderie, V., Laroche, L., Héron, E. (2005). Fish eye disease revealing a partial LCAT deficiency. *Rev Med Interne*, (26): 518-519.
- Bozkaya, Ö. (2009). Klinisyenler İçin Mutasyon ve Polimorfizm. *Türkiye Klin Pediatr Derg*, 18(2):47-53.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2),177–186.

Calabresi, L., Franceschini, G. (2010). Lecithin cholesterol acyltransferase, highdensity lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med.* (20):50-3.

Capriotti, E., & Altman, R. B. (2011). Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC bioinformatics*, 12 Suppl 4(Suppl 4), 3.

Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G. Q., Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*, 22(3), 231–38.

Carlson, L.A., Philipson, B. (1979). Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinemia, *Lancet*; 2 (8149): 922–24.

Chen, X., Sullivan, P.F. (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J.*, 3(2):77–96.

Chen, R., Davydov, E. V., Sirota, M., Butte, A. J. (2010). Non-synonymous and synonymous coding SNPs show similar likelihood and effect size of human disease association. *PloS one*, 5(10), 13574.

Cogan, D.G., Kruth, H.S., Datilis, M.B., Maritin, N. (1992). Corneal opacity in LCAT disease. *Cornea*.;11:595-9.

Dalgıç, N., Yetkin, D. (1985). Lipoproteinler, Yapı ve Fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri*, 5(2): ss.117-122.

Damodharan, L., Pattabhi, V. (2004). Hydropathy analysis to correlate structure and function of proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(3), 996–1002.

Danchin, A., Médigue, C., Gascuel, O., Soldano, H., Hénaut, A. (1991). From data banks to data bases. *Research in Microbiology*, 142 (7–8): 913–916.

Dayspring ve Pokrywka G. (2010). Impact of triglyceride s on lipid and lipoprotein biology in women. *Gend Med* ; 7:189-205.

Deng, N., Zhou, H., Fan, H., Yuan, Y. (2017). Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8(66),110635–49.

De Smedt, M., Van Ginderdeuren, R., De Vos, R., Mertens, A., Muls, E., Foets, B. (2001). Corneal opacifications in a low high density lipoprotein syndrome: suspicion of fish eye disease: a case report. *Bull Soc Belge Ophtalmol.*; 282, 25–30.

Di Rienzo, L., Miotto, M., Bò, L., Ruocco, G., Raimondo, D., Milanetti, E. (2021). Characterizing Hydropathy of Amino Acid Side Chain in a Protein Environment by Investigating the Structural Changes of Water Molecules Network. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 626837.

Durrington, P., Sniderman, A. (2004).Hiperlipidemi. Çeviren: Genç B., 1. Basım, And Yayıncılık, İstanbul.

Gebert, M., Jaśkiewicz, M., Moszyńska, A., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2020). The Effects of Single Nucleotide Polymorphisms in Cancer RNAi Therapies. *Cancers*, 12(11), 3119.

İnt. Kay. 1., <http://genemania.org/>, 14.11.2022

Gotto, A., Pownall, H. (2011). Lipid Bozuklukları El Kitabı. Çeviren: Keleş, İ., 1. Basım.: İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.

Grundy, S.M. (1990). Cholesterol and atherosclerosis. Diagnosis and Treatment. Philadelphia: *JB Lippincot*, 2, 110-30.

Gustafson, A., WcConathy, W.J., Alaupovic, P., Curry, M.D., Persson, B. (1979). Identification of lipoprotein families in a variant of human plasma apolipoprotein A deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*.39:377-87.

Harley, I., S. Narod, (2009). Single nucleotide polymorphisms–variation on a theme. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116(12), 1556-1557.

Hong Y. Choi, Schwertani, A., Genest, J. (2017). Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler: Biyoloji, Epidemiyoloji ve Klinik yönetimi. *Kanada kardiyoloji dergisi*:33,325-333.

İnt. Kay. 2.,
https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1027/mod_resource/content/1/9.%20Lipid%20Metabol%20%28Kolesterol%20Metabolizmas%C4%B1%29.pdf/ 19.10.2022

İnt. Kay. 3., <https://genemania.org/search/homo-sapiens/LCAT/> 14.11.2022

İnt. Kay. 4., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3931/> 14.10.2022

İnt. Kay. 5., <https://medlineplus.gov/genetics/condition/familial-hdl-deficiency/> 05.11.2022

İnt. Kay. 6., <https://www.news-medical.net/health/LDL-Cholesterol-and-Heart-Disease.aspx/> 30.10.2022

İnt. Kay. 7.,
https://tr.wikipedia.org/wiki/Lipoproteinler#/media/Dosya:Lipoprotein_trafik2tr.png/ 17.10.2022

İnt. Kay. 8., <http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp8625.jpg/> 29.10.2022

Kaman, T., Karasakal, Ö. F., Özkan Oktay, E., Ulucan, K., & Konuk, M. (2019). In silico approach to the analysis of SNPs in the human APAF1 gene. *Turkish journal of biology*, 43(6), 371–381.

Kanai, M., Koh,S., Masuda,D., Koseki, M., Nishida,K. (2018). Clinical features and visual function in a patient with Fish-eye disease: Quantitative measurements and optical coherence tomography.*American Journal of Ophthalmology Case Reports Volume 10*, 137-141.

Kastelein, J.J., Pritchard, P.H., Erkelens, D.W., Kuivenhoven, J.A., Albers, J.J., Frohlich, J.J. (1992). Familial high-density-lipoprotein deficiency causing corneal opacities (fish eye disease) in a family of Dutch descent. *J Intern Med*, 231: 413-419.

Kızıldağ, S., 1997, Anjiyografi İle Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Konulmuş Kişilerde Serum Lipid, Apoprotein, Lipoprotein ve HDL Subfraksiyonlarının İncelenmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80s, İzmir.

Komşuoğlu, B. (1992). Hipertrigliseridemjlerin Riski ve Tedavisi. *Türk Kardiyol Dern Arş* 20: 264-272.

Kong, G. K., Miles, L. A., Crespi, G. A., Morton, C. J., Ng, H. L., Barnham, K. J., McKinstry, W. J., Cappai, R., Parker, M. W. (2008). Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *European biophysics journal* : EBJ, 37(3), 269–279.

Laker, M.F. (1998). Klinik Biyokimya. Çeviren: Ulukaya, E., Güneş Nobel Basımevi. 1. Basım, Bursa.

Lee, C.H., Olson, P., Evans, R.M. (2003). Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology*. ;144:2201-07.

Levy, E., Spahis, S., Sinnett, D., Peretti, N., Maupas-Schwalm, F., Devlin, E., Lambert, M., Lavoie, M.A. (2007). Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol*. ; 18, 310-318.

Lonetti, A., Fontana, M.C., Martinelli, G., Iacobucci, I. (2016). Single Nucleotide Polymorphisms as Genomic Markers for Yüksek-Throughput Pharmacogenomic Studies. Eds.: Li PCH, Sedighi A, Wang L, Microarray Technology, 1.baskı içinde, Canada, Humana Press. p:143-159.

Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C. Jr. and Weisgraber, K.H., (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function, *J. Lipid Res.*, 25, 1277–94.

Marcolino, A. C., Porto, W. F., Pires, ÁS. ., Franco, O. L., Alencar, S. A. (2016). Structural impact analysis of missense SNPs present in the uroguanylin gene by long-term molecular dynamics simulations. *Journal of theoretical biology*, 410, 9–17.

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2013). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (5. Baskıdan çeviri), Ed: Elçin, Y.M., Palme Yayıncılık, Ankara.

Özkan-Oktay, Karasakal T., Ulucan Ö. F., Konuk, K., Tarhan, N. (2019). Alzheimer Hastalığı ile İlişkilendirilen APOE4 Genindeki Zararlı SNP'lerin İn siliko Yöntemler ile Belirlenmesi. *Journal of Natural and Applied Sciences* .4, 154-75.

Özkan, E., Erdemir Üstündağ, A., Torer, B. D., Taşçı, A. I., Başbınar, Y., Ellidokuz, H., Balık, D., (2015). Genotyping and analysis of rs7501939 polymorphism for prostate cancer. *Sigma journal of engineering and natural sciences*, 6(1):101-107.

- Petukh, M., Kucukkal, T. G., Alexov, E. (2015). On human disease-causing amino acid variants: statistical study of sequence and structural patterns. *Human mutation*, 36(5), 524–534.
- Polat, M., Karahan, A. G. (2009). Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları. *Dergipark*, 16(3), 41–50.
- Poli, M., Gatta, L.B., Archetti, S., Padovani, A., Albertini, A., Finazzi, D. (2003). Association analysis between anterior-pharynx defective-1 genes polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 350(2):77-80.
- Rader, D.J., deGoma, E.M. (2012). Approach to the patient with extremely low HDL-cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab.*;97(10):3399–3407.
- Ranawaka, P., Erger, F., Dayasiri, K., Altmüller, J., Jayasundara, K., Gamage, M., Chathurangana, P., Herath, I., Siderius, L., Beck, B. (2021) Fish-eye disease: A rare cause of steroid resistant nephrotic syndrome, *Kidney International Reports*, 6, 1–62.
- Rosenson, R.S. (2004). Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, 173: 1-12.
- Rudney, H., Fanini, S.R. (1993). Cholesterol biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*; 4: 230-37.
- Russell, P. J. (2001). Genetics. *Benjamin Cummings*, 3, 25-38.
- Scherer, S. W., J. Cheung (2001). "Discovery of the Human Genome Sequence in the Public and Private Databases." *Curr Biol* 11(20): 808-11.
- Shastri, B. S. (2002). SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of Human Genetics*, 47(11), 561–566.
- Sieburg, H.B. (1990). Physiological Studies in siliko. *Studies in the Sciences of Complexity*, 12: 321–342.
- Smith, L.C., Pownall, J., Gotto, A.M. Jr. (1978). The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu Rev Biochem.*47: 751-7.
- Sorensen, L.P., Gormsen, L.C. , Nielsen, S. (2009). VLDL–TG kinetics: a dual isotope study for quantifying VLDL–TG pool size, production rates, and fractional oxidation in humans *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297 , 1324-30.
- Sönmezoğlu, Ö. A., Yıldırım, A., Güleç, T. E. (2010). Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* (2), 55-66.
- Stein, A.E., Myers, L.G. (1994). Lipids, Lipoproteins and apolipoproteins. In: Brus A, Ashwood ER (eds). Tietz textbook of clinical chemistry, W. B. Saunders Co. Philadelphia. ; 1002-93.

Sunyaev, S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J., Bork, P. (1999). Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human Hastalıkla İlişkili-associated genes. *J. Mol. Med.*, 77, 754–760.

Tamer, İ., Dabak, R., Tamer, G., Orbay, E., Sargın, M. (2011). Güncel klavuzlar ışığında hiperlipidemi. *Aile hekimliği dergisi*. 2,3: 25-28.

Tanrikulu, S., 2004, Koroner Arter Hastalığı olgularında Kolesterol Ester Transfer Protein Polimorfizminin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 75s, İstanbul.

Tateno, H., Taomoto, M., Jo, N., Takahashi, K, Uemura, Y. (2012). Clinical and histopathological features of a suspected case of fish-eye disease. *Jpn J Ophthalmol.* 56:453-457.

Telefoncu, A., Değer, O., Kılınç, A., Çolak, A. (2008). Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Bozukluklar, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova-İzmir, 112-113

Thompson, G.R. (1991). Hiperlipidemi El Kitabı. Çeviren: Tamuğur E. Uycan Yayınları, 1. Basım. İstanbul.

Vance, D.E., Van den Bosch H., (2000). Cholesterol in the year 2000, *Biochim. Biophys. Acta-Molec. Cell Biol. Lipids*, 1529, 1–8.

Venselaar, H., Te Beek, T. A., Kuipers, R. K., Hekkelman, M. L., Vriend, G. (2010). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC bioinformatics*, 11, 548.

Wang, Z., Moul, J. (2001). SNPs, protein structure, and disease. *Human mutation*, 17(4), 263–270.

Winder, A.F., Borysiewicz, L.K. (1982). Corneal opacification and familial disorders affecting plasma high density lipoprotein. *Birth Defects Orig Artic Ser*; 18: 433-40.

Wright, A.F. (2005). Genetik Çeşitlilik: Polimorfizmler ve Mutasyonlar. *eLS'de*, 2, 1-10.

Yalçın, A., Çetin, M. (2001). Plazma Lipoproteinleri ve Klinik Önemi. *J Fac Vet Med*; 20: 123-29.

Yamaguchi-Kabata, Y., Shimada, M. K., Hayakawa, Y., Minoshima, S., Chakraborty, R., Gojobori, T., Imanishi, T. (2008). Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes. *PloS one*, 3(10), 3393.

Yates, C. M., Sternberg, M. J. (2013). The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions. *Journal of molecular biology*, 425(21), 3949–63.

Yue, P., Li, Z., Moul, J. (2005). Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *Journal of molecular biology*, 353(2), 459–473.

Zhang, M., Huang, C., Wang, Z., Lv, H., Li, X. (2020). In silico analysis of non- synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) in the human GJA3 gene associated with congenital cataract. *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 12.

Zhu, Z., Zheng, Z., Zhang, F., Wu, Y., Trzaskowski, M., Maier, R., Robinson, M. R., McGrath, J. J., Visscher, P. M., Wray, N. R., and Yang, J. (2018). Causal associations between risk factors and common diseases inferred from GWAS summary data. *Nature communications*, 9(1), 224.

