



**T.C.
İSTANBUL ATLAS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TGF β 1 GENİNİN NON-SİNONİM TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN
SANAL FONKSİYONEL PROFİLİ**

Berna TÜRKMEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

İSTANBUL, 2025



**T.C.
İSTANBUL ATLAS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TGF β 1 GENİNİN NON-SİNÖNİM TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN
SANAL FONKSİYONEL PROFİLİ**

Berna TÜRKMEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

İSTANBUL, 2025

T.C.
İSTANBUL ATLAS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY SAYFASI

ÖĞRENCİ ADI -SOYADI	Berna TÜRKMEN	
ÖĞRENCİ NUMARASI	232112001	
PROGRAM ADI	Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans	
İstanbul Atlas Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Berna TÜRKMEN tarafından hazırlanan “TGFβ1 Geninin Non-Sinonim Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Sanal Fonksiyonel Profili” adlı tez çalışması jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.		
Tez Savunma Tarihi: 18/06/2025		
Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı	Çalıştığı Kurum	İmzası
Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU	İstanbul Atlas Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba TEKER	İstanbul Atlas Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi Ayla ARSLAN	Üsküdar Üniversitesi	

İstanbul Atlas Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hafize UZUN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bulguların sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilmeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; çalışmamın İstanbul Atlas Üniversitesinde kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” ile tarandığını ve öngörülen standartları karşıladığını beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Berna TÜRKMEN

İTHAF

Bu tezimi, hayatımda her zaman en büyük ilham kaynağım olan eğitim hayatım boyunca desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen canım babama ithaf ediyorum. Kansere verdiği zorlu mücadelede gösterdiği gücün, benim için hep örnek teşkil edeceğini biliyorum. Babamın sevgisi, son ana kadar pes etmemeyi öğretmesi ve desteği, bu süreçte bana yol gösterdi. Babamın hatırası, bu tez çalışmasının her sayfasında yaşamaya devam edecek. Seni her zaman sevgiyle anacağım. Işıklar içinde uyu, babacığım.

BÜTÇE DESTEKLERİ

TGFβ1 GENİNİN NON-SİNONİM TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN SANAL FONKSİYONEL PROFİLİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi esnasında benden değerli rehberliğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na, biyoinformatik alanında edindiğim kıymetli bilgiler için Dr. Öğr. Üyesi Ayla ARSLAN'a ve diğer tüm emeği geçen hocalarıma, eğitim sürecimde en büyük destekçim olan babam Şenel TÜRKMEN'e, yoğun çalışmalarım sırasında hep sabır gösteren ve motive eden annem Necla TÜRKMEN'e ve diğer tüm aile üyelerime, bu süreçte bana arkadaş olan köpeğimiz Tarçın'a, bana inanan ve güvenen tüm sevdiklerime bu süreçte yanımda oldukları için teşekkür ediyorum.

Haziran, 2025

Berna

TÜRKMEN

Metin girmek için buraya tıklayın veya dokununuz.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK.....	-
ONAY SAYFASI.....	-
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
BÜTÇE DESTEKLERİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. GENETİK POLİMORFİZM.....	3
2.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs).....	4
2.1.1.1. Non-sinonim (Non-synonymous) Polimorfizmleri.....	6
2.2. TGF-B: SİNYAL İLETİM MEKANİZMASI, BİYOSENTEZİ VE HASTALIK İLİŞKİSİ.....	8
2.2.1. Gelişimsel Bozukluklarda TGF-β Sinyal İletimi.....	10
2.2.2. Yara İyileşmesindeki Bozukluklar ve Fibrotik Hastalıklarda TGF-β Sinyal İletimi.....	11
2.2.3. İnflamatuar ve Enfeksiyon Hastalıklarında TGF-β Sinyal İletimi.....	11
2.2.4. Tümör Oluşumunda TGF-β Sinyal İletimi.....	12
2.3. TGFB1 GENİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI VE HASTALIK İLİŞKİSİ.....	14
2.4. KİŞİSELLEŞTİRİLMİŞ TIP.....	16
2.5. ACMG/AMP KRİTERLERİ.....	18
2.6. BİYOİNFORMATİK ANALİZ.....	21

2.6.1. Veri Tabanları.....	22
2.6.2. İn Siliko Araçlar İle Patojenite Tahmini.....	23
2.7. CONSURF ANALİZİ.....	26
2.8. ERIS ANALİZİ.....	27
2.9. HOPE ANALİZİ.....	28
2.10. MUTPRED-2 ANALİZİ.....	29
2.11. I-TASSER PROTEİN YAPI TAHMİNİ.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. VERİ MADENCİLİĞİ.....	32
3.2. ULUSAL BİYOTEKNOLOJİ BİLGİ MERKEZİ (NCBI).....	32
3.2.1. nsSNP Verilerinin ClinVar Veritabanından Alınması.....	32
3.2.2. Proteinin Yapı ve İşlev Bilgilerinin Uniprot Veritabanından Alınması.....	33
3.3. TGFB1 nsSNP VERİLERİNİN İN SİLİKO ARAÇLARLA PATOJENİTE TAHMİNİ ANALİZİ.....	33
3.3.1. SIFT İn Siliko Aracı ile Analiz.....	34
3.3.2. PROVEAN İn Siliko Aracı ile Analiz.....	34
3.3.3. PolyPhen-2 İn Siliko Aracı ile Analiz.....	35
3.3.4. Fathmm-xf İn Siliko Aracı ile Analiz.....	35
3.3.5. SNP&GO İn Siliko Aracı ile Analiz.....	35
3.4. EVRİMSEL KORUNMA, FONKSİYON, STABİLİTE, YAPI MODELLEMESİ ANALİZİ.....	36
3.4.1. ConSurf Amino Asit Evrimsel Korunmuşluk Analizi.....	36
3.4.2. ERIS Protein Stabilite Analizi.....	37
3.4.3. HOPE Yapısal Etki Analizi.....	37
3.4.4. MutPred-2 Fonksiyonel Bozulma ve Patojenite Analizi.....	38
3.4.5. I-TASSER 3B Yapı Tahmini.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. BULGULARIN GENEL ÖZETİ.....	39
4.2. VERİ MADENCİLİĞİ.....	40
4.3. TGFB1 nsSNP'LERİNİN BELİRLENMESİ.....	40
4.3.1. İn Siliko Araçlarla 170 TGFB1 nsSNP'nin Değerlendirilmesi.....	41
4.4. CONSURF EVRİMSEL KORUNMUŞLUK ANALİZİ.....	42
4.5. ERIS PROTEİN STABİLİTE ANALİZİ.....	45
4.6. HOPE ANALİZİ.....	45
4.7. MUTPRED-2 ANALİZİ.....	47

4.8. I-TASSER ANALİZİ.....	49
5. TARTIŞMA.....	50
5.1. TARTIŞMA.....	50
5.2. ÇALIŞMANIN SINIRLILIĞI.....	51
5.3. SONUÇ.....	51
5.4. ÖNERİLER.....	60
6. KAYNAKLAR.....	61
7.EKLER.....	70
EK-1: İNTİHAL RAPORU.....	70
EK-2: FASTA DİZİSİ.....	71
EK-3: nsSNP ANALİZ VERİLERİ.....	72
EK-4: SIFT VE PROVEAN ANALİZ VERİLERİ.....	77
EK-5: POLYPHEN-2 ANALİZ VERİLERİ.....	80
EK-6: FATHMM-XF ANALİZ VERİLERİ.....	89
EK-7: SNP&GO ANALİZ VERİLERİ.....	92
EK-8: HOPE ANALİZ VERİLERİ.....	98
EK-9: MUTPRED-2 ANALİZ VERİLERİ.....	98
8.ÖZGEÇMİŞ.....	100

SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

TGFβ1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-1
EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
LLC	Büyük Latent Kompleks
SLC	Küçük Latent Kompleks
LTBP	Latent TGFβ Bağlayıcı Protein
ECM	Ekstraselüler Matriks
MMP	Matriks Metalloproteinaz
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
AMP	Amerikan Moleküler Patoloji Derneği
CAP	Amerikan Patologlar Derneği
ACMG	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
VUS	Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant
PSIC	Pozisyona Özgü Bağımsız Sayılar
HGMD	İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı

ŞEKİL VE RESİMLER LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 2.1: Genetik Mutasyon.....	4
Şekil 2.2: Tek nükleotid varyantının protein yapısında oluşturduğu yapısal değişim...	5
Şekil 2.3: Tek Nükleotid Polimorfizmi Alt Tipleri.....	5
Şekil 2.4: Missense mutasyon.....	7
Şekil 2.5: TGF β sinyal yolağı.....	9
Şekil 2.6: Hastalık durumunda TGF- β sinyal iletimi.....	10
Şekil 2.7: TGF- β sinyal yolağının kanser üzerindeki etkisi.....	13
Şekil 2.8: TGF β 1 geninin yapısal ve fonksiyonel özellikleri	14
Şekil 2.9: TGF β 1 LAP yapısının oluşumu	16
Şekil 2.10: Standart Tıp ile Kişiselleştirilmiş Tıp arasındaki tedavi farkları.....	17
Şekil 2.11: ConSurf Analizinde Evrimsel Korunmuşluk Seviyesi	26
Şekil 2.12: HOPE çalışma akışına genel bakış.....	29
Şekil 2.13: MutPred-2 çalışma akışına genel bakış.....	30
Şekil 2.14: I-TASSER çalışma akışına genel bakış.....	31
Şekil 4.1: TGF β 1 Genine Ait nsSNP Varyantlarının İn Siliko Analiz Süreci.....	39
Şekil 4.2: TGF β 1 Proteinin Varyantlarının Evrimsel Korunmuşluk Analizi.....	43

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa no
Tablo 2.1: TGF β 1 geninin transkriptleri	15
Tablo 2.2: ClinVar, UniProt veri tabanları.....	23
Tablo 2.3: İn siliko analiz araçlarının temel işleyiş prensipleri.....	25
Tablo 2.4: ConSurf analizinin adımları.....	27
Tablo 2.5: ERIS metodunun özellikleri, eşik değerleri.....	28
Tablo 2.6: I-TASSER aracında kullanılan metrikler, özellikleri.....	31
Tablo 4.1: Kullanılan in siliko araçlarla analiz edilen ve yüksek patojeniteye sahip olduğu belirlenen varyantların skorları.....	42
Tablo 4.2: ConSurf sunucusu tarafından tahmin edilen TGF β 1 geninin 11 patojenik varyanta ait kalıntılarının korunma skorları.....	44
Tablo 4.3: ERIS protein analizi bulguları.....	45
Tablo 4.4: HOPE analiz bulguları.....	46
Tablo 4.5: Varyantların TGF β 1 geninde bulunduğu domain kısımları.....	47
Tablo 4.6: Varyantların MutPred-2 skorları.....	48
Tablo 4.7: I-TASSER analiz bulguları.....	59
Tablo 5.1: AlphaMissense veritabanının varyantlar üzerindeki patojenite tahmini.....	52

ÖZET

Türkmen, B. (2025). TGFβ1 Geninin Non-Sinonim Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Sanal Fonksiyonel Profili. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Atlas Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.

TGF-β sinyal yolağındaki mekanizmalar, birçok patolojik durumda önemli roller üstlenebilir. Enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar hastalıklar, fibrotik hastalıklar, anormal yara iyileşmesi, gelişimsel bozukluk, tümörler gibi birçok hastalığın oluşmasına neden olabilir. Bu tez çalışmasında, TGFβ1 geninin üzerindeki patojenik olan nsSNP'lerinin in siliko araçlarla çıkarılıp yapısal ve fonksiyonel analizlerini hesaplamalı yaklaşımlar ile gerçekleştirerek protein yapısı, fonksiyonu ve hastalık ilişkisi üzerindeki etkilerine bakılması amaçlanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında TGFβ1 geni nsSNP'leri ClinVar veritabanından elde edilip in siliko araçlarla (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO) patojenitesi en yüksek varyantlar eşik değere bakılarak V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S belirlenmiştir. Bu 11 varyant ConSurf analiziyle protein üzerindeki korunmuşluk skorları incelenip en korunmuş bölgede yer alan I49S, R50C, L298P, H312Y, Y328C, P363R, M382T, C387G, C387S varyantları belirlenmiştir. ERIS protein stabilite analizleri sonucunda C387G, C387S, I49S, V339D, L260P, L298P, M382T, R50C varyantlarının protein stabilitesini bozduğu belirlenmiştir. HOPE analizi sonucunda 11 varyantın boyutlarında, akımlarında ve hidrofobiklik durumlarında değişim gözlenmiştir. MutPred-2 analizinde belirlenen 11 varyantın hepsinde biyokimyasal olarak kayıplar ve kazanımlar olmuştur. I-TASSER sonuçlarında her nsSNP varyant için en yüksek C-skoruna sahip varyant L260P (-0.31) seçilmiştir.

Anahtar kelimeler: TGFβ1, Non-sinonim tek nükleotid varyantlar, İn siliko araçlar

ABSTRACT

Türkmen, B. (2025). The Virtual Functional Profile of Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms of the TGF β 1 Gene. Master's Thesis, Istanbul Atlas University, Graduate School of Education, Department of Molecular Biology and Genetics, Istanbul.

It is evident that mechanisms within the TGF- β signalling pathway can assume pivotal functions in a multitude of pathological conditions. These factors have been demonstrated to be associated with a multitude of pathological conditions, including, but not limited to, infectious diseases, inflammatory diseases, fibrotic diseases, abnormal wound healing, developmental disorders, and tumours. The objective of this thesis study is to examine the effects of pathogenic nsSNPs on the TGF β 1 gene. To this end, the aim is to identify them using in silico tools and to perform structural and functional analyses using computational approaches. This will allow investigation of their impact on protein structure, function, and disease association. In this thesis study, nsSNPs of the TGF β 1 gene were obtained from the ClinVar database and analysed using in silico tools (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO). The variants with the highest pathogenicity were determined to be V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, and C387S. These 11 variants were analysed using ConSurf to examine their conservation scores on the protein. The variants I49S, R50C, L298P, H312Y, Y328C, P363R, M382T, C387G, and C387S were identified as being located in the most conserved region. ERIS protein stability analyses revealed that the C387G, C387S, I49S, V339D, L260P, L298P, M382T, and R50C variants disrupt protein stability. The application of the HOPE (Hierarchical Organization of Protein Expression) analysis revealed alterations in the size, current, and hydrophobicity of the 11 variants. In the MutPred-2 analysis, all 11 variants exhibited biochemical losses and gains. In the I-TASSER results, the variant with the highest C-score for each nsSNP variant, L260P (-0.31), was selected.

Keywords: TGF β 1, Non-synonymous single-nucleotide polymorphisms, In silico tool

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik polimorfizm, popülasyonda %1'den daha fazla oranda görülen gendeki nükleotid değişimlerini ifade etmektedir (Gummadi ve Guddati, 2021). Genetik polimorfizmler arasında olan non-sinonim tek nükleotid polimorfizmi (*ing.* Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism, nsSNP), genin ekzon bölgesinde tek baz değişikliği sonucuyla gerçekleşen ve proteinlerin amino asit dizisinde farklılık yaratan bir polimorfizm çeşitidir. Non-sinonim tek nükleotid varyantlar, proteinin genotipinde ve/veya fenotipinde farklılık yaratarak kanser gibi birçok hastalığa neden olabilirler (Hassan ve ark., 2019; Petrosino ve ark., 2021).

Literatürde yer alan bilgilere göre tahminen her bireyin genomunda 13.000 kadarında ekzonik SNP bulunduğu düşünülmektedir ve bu SNP'lerin ortalama %58 oranında non-sinonim SNP'ler yer almaktadır (Yates ve Sternberg, 2013a). Protein yapısında farklılık yaratsa bile işlevinde herhangi bir sorun yaratmayan SNP'ler bulunmaktadır ve bu SNP'lere tolerant SNP denilmektedir. Tolerant ve zararlı nsSNP ayrımı yapmak oldukça önemlidir çünkü hastalıkların patogenezi anlamak, genetik açıdan bakıldığında insan hastalıklarında genetik mekanizmaları kavrayabilmek için oldukça önemli bilgiler vererek fenotipteki etkileri incelenebilmektedir (Wang ve ark., 2009).

TGF β , embriyo, beyin, kalp, karaciğer, böbrekler, kaslar tükürük bezleri gibi birçok dokuda üretilmekte olan bir sitokin olup en fazla yaygın olduğu doku grubu trombositlerdir (Deng ve ark., 2024). TGF β geni ailesi üç ana izoformdan (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) oluşmaktadır. TGF β 1 en fazla çalışılan formu ve neredeyse tüm insan dokusu hücrelerinde eksprese edilmektedir. TGF- β sinyal yolağındaki mekanizmalar, birçok patolojik durumda önemli roller üstlenebilir. Enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar hastalıklar, fibrotik hastalıklar, anormal yara iyileşmesi, gelişimsel bozukluk, tümörler gibi birçok hastalığın oluşmasına neden olabilir (Deng ve ark., 2024).

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-1 (TGF β 1) geni; hücre sağ kalımı düzenleme, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozis gibi biyolojik görevlerde yer almasından dolayı meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde değerlendirilen bir gen olup, aynı zamanda TGF- β sinyal yolağında yer almaktadır. TGF- β sinyal yolağı kanser üzerindeki ilerleyici etkisi zıt yönlüdür. Karsinogenezin erken evrelerinde, TGF- β tümör baskılayıcı olarak görev görürken

ileri evrelerde durum tam tersi olarak, TGF- β tarafından indüklenen Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve kanser hücrelerinin invazyonuyla birlikte metastazı gerçekleştirerek tümör oluşumu hızlandırıcı etki göstermektedir.

Hastalık yaratabilecek nsSNP'lerin in vitro çalışmalarla ortaya çıkarılması zahmetli ve oldukça zaman alıcı olduğundan elverişli değildir. Bunun için birçok hesaplama yöntemi geliştirilerek daha elverişli SNP çalışmaları yapılabilmektedir. SIFT, PolyPhen, SNAP gibi dizi hesaplaması için kullanılan yöntemlerin geliştirilerek nsSNP'lerin fenotipteki etkisini protein yapılarına ve sekanslarına bakarak tahmin edilebilmektedir (Yates ve Sternberg, 2013b). Bu tür genetik polimorfizmlerin ortaya çıkarılması hem malignite patogenezinin anlaşılmasında hem de kişiselleştirilmiş tıp içinde oldukça uygun bir adımdır (Matsuda, 2017; Gummati ve Guddati, 2021).

Bu tez çalışmasının amacı, TGF β 1 genindeki zararlı olan non-sinonim tek nükleotid polimorfizmler in siliko araçlarla çıkarılıp, yapısal ve fonksiyonel analizlerini hesaplamalı yaklaşımlar ile gerçekleştirerek protein yapısı, fonksiyonu ve hastalık ilişkisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu yapılan in siliko analizler sonucunda, kişiselleştirilmiş tıp açısından da önemli olabilecek SNP'lerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, bilgisayar ortamında yürütülmüş olan TGF β 1 geninin sekans ve FASTA dizisi verileri kullanılarak, klinik önemi belirsiz varyantları hakkında analizi gerçekleştirilmiştir ve bu süreçte ClinVar ve UniProt veritabanları kullanılmıştır. ClinVar veritabanından elde edilen nsSNP bilgileri ve UniProt veritabanından elde edilen FASTA dizisi ile patojenik varyantları belirlemek için in siliko araçlarda (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO) analizleri gerçekleştirilmiştir. Patojenik olarak belirlenen TGF β 1 geninin nsSNP'lerin her biri tek tek ConSurf analizinde evrimsel korunmuşluk düzeylerine, ERIS sunucusunda protein stabilite analizlerine, HOPE sunucusunda yapısal olarak değişimlerine, MutPred aracında patojenite tahmini ve fonksiyonel bozulmalarına, I-TASSER aracı ile mutant varyantların 3B yapısındaki değişimi incelenerek analizleri gerçekleştirilmiştir.

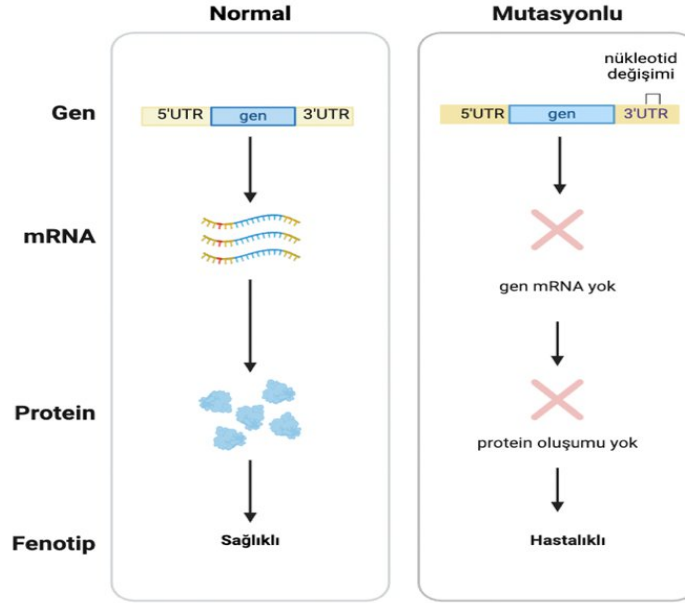
2. GENEL BİLGİLER

2.1. GENETİK POLİMORFİZM

Gregor Mendel'in 1866 yılında bezelye çaprazlamaları üzerine yapmış olduğu çalışmasıyla genetik bilimi başlandı. Bu gelişmeleri takiben genetik biliminde pek çok yeni gelişme ortaya çıkmıştır. Genetik biliminin zaman içerisinde ilerlemesiyle Hershey ve Chase yapmış olduğu çalışmalar neticesinde genlerin DNA'dan oluştuğu bulunmuştur. Ardından, Watson ve Crick ise proteinleri oluşturmaktan DNA'nın sorumlu olduğunu keşfederek genetik bilimine önemli katkılar sağlamışlardır. Bu katkılar neticesinde DNA'daki değişimlerin bireyler üzerinde fizyolojik etkiler yaratılacağı düşünülürken bu düşünceyi kanıtlar niteliğinde "İnsan Genom Projesi" başlatıldı. Bu proje kapsamında bireyler arasında genomun %99.5'inin korunmuş olduğunu ve geri kalan %0.5'inin bireyler arasında değişiklik gösterdiği ortaya çıkarıldı.

Genetik polimorfizm, bu değişimlerin popülasyonda %1'den daha fazla oranda görülmesine denir. Eğer bireyler arasındaki bu değişim %1'den az oranda görülüyorsa buna da genetik mutasyon adı verilir. Genetik polimorfizmler kendi içinde uzunluk, konum ve tekrar sayılarına göre değişiklik göstererek tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs), tandem tekrar polimorfizmleri (*ing.* Tandem Repeat Polymorphisms, TRPs), kısa tandem tekrarlar (*ing.* Short Tandem Repeats, STRs), kopya sayısı polimorfizmleri (*ing.* Copy Number Polymorphisms, CNPs) olmak üzere 4 başlık altında incelenirler (Gummadi ve Guddati, 2021). Genetik polimorfizmler bir gen üzerindeki kodlama bölgelerinde tek bir tane nükleotidin yer değiştirmesiyle bile protein yapısı ve işlevinde değişiklik yaratabilirler. Bu nükleotid değişimi bir mRNA'nın 3' çevrilmeyen bölgesinde (3'UTR) meydana geldiğinde ise mRNA stabilitesinde değişim yaratarak gen ifadesinde artış ya da azalış gözlemlenebilmektedir (Iannuzzi ve ark., 2002) (Şekil 2.1). Genetik polimorfizmler radyasyon gibi dış etkenlerden kaynaklı ya da kendiliğinden gerçekleşebilir. Her ne tür etkenden olursa olsun her türlü genetik polimorfizm önem taşımaktadır; çünkü hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilir ve hasta bireylerin kullandıkları ilaçlara verdiği tepkilerin farklılıklarını açıklamaya yardımcı olabilir. Genetik polimorfizmlerin ilaçlar üzerindeki etkilerinin araştırılması kişiselleştirilmiş tıp içinde oldukça uygun bir adımdır (Gummadi ve Guddati, 2021).

Genetik Mutasyon

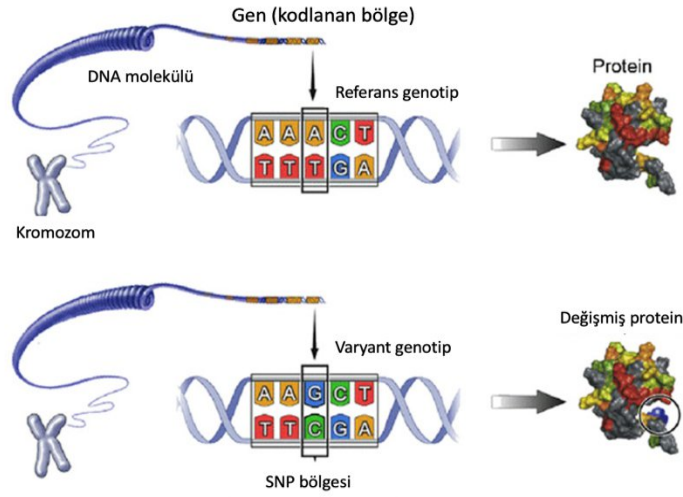


Şekil 2.1: Genetik mutasyon. Şekil, BioRender (bkz. <https://www.biorender.com/>) kullanılarak oluşturulmuştur. İçerik, Iannuzzi ve ark. (2002)'den uyarlanmıştır.

2.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs)

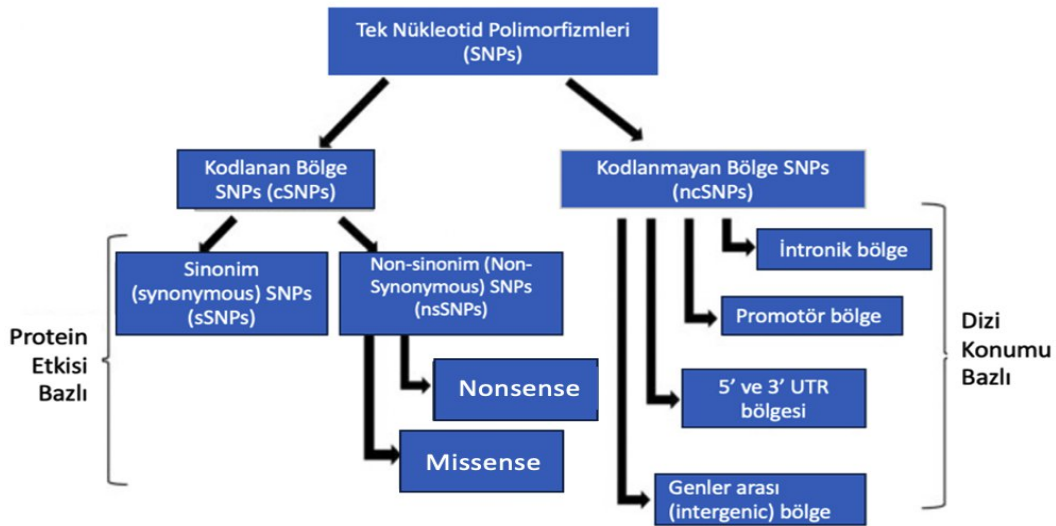
Bir nükleotidin diğer üç tür nükleotidden birine dönüşmesine tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ya da tek nükleotid mutasyonları denir (Matsuda, 2017) (Şekil 2.2.). Tek nükleotid polimorfizmleri (ing. Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) ya da tek nükleotid varyasyonları (ing. Single Nucleotide Variant, SNV) genetik polimorfizmler arasında en sık görülen (insanlarda oluşan DNA polimorfizmin %90'ı kadar) polimorfizm olmakla beraber aynı zamanda bireyler arasında DNA varyasyonlarının da en basit formu kabul edilmektedir (Shastri, 2009; Dabhi ve Mistry, 2014; Petrosino ve ark., 2021).

Tek nükleotid polimorfizmleri genomda neredeyse her 100-300 baz çiftinde (bp) bir meydana geldiği öngörülmüştür ve şimdiye kadar 11 milyondan fazla tek nükleotid polimorfizm belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda, eşit olarak dağılmış şekilde insan genomunun kodlama bölgelerinde yaklaşık 165.000 tek nükleotid polimorfizm ortaya çıkarılmıştır (Chorley ve ark., 2008).



Şekil 2.2: Tek nükleotid varyantının (SNV) protein yapısında oluşturduğu yapısal değişim. Şekil, Iglesias ve Grzelczak (2020)'den alınmıştır.

SNP, kodlanan (ekzonlar), kodlanmayan (intronlar) ve promotörlerdeki lokasyonlarına göre değişiklik göstermektedir (Granevitze ve ark.,2014) (Şekil 2.3.). Proteinin kodlayan bölgesinde yer alan SNV'ler insan genomunda bulunan tüm SNV'lerin toplamının sadece %2'sini oluştursa da en fazla göze çarpan SNV çeşitidir (Petrosino ve ark., 2021).



Şekil 2.3: Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) alt tipleri. Şekil, Sukumar ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır.

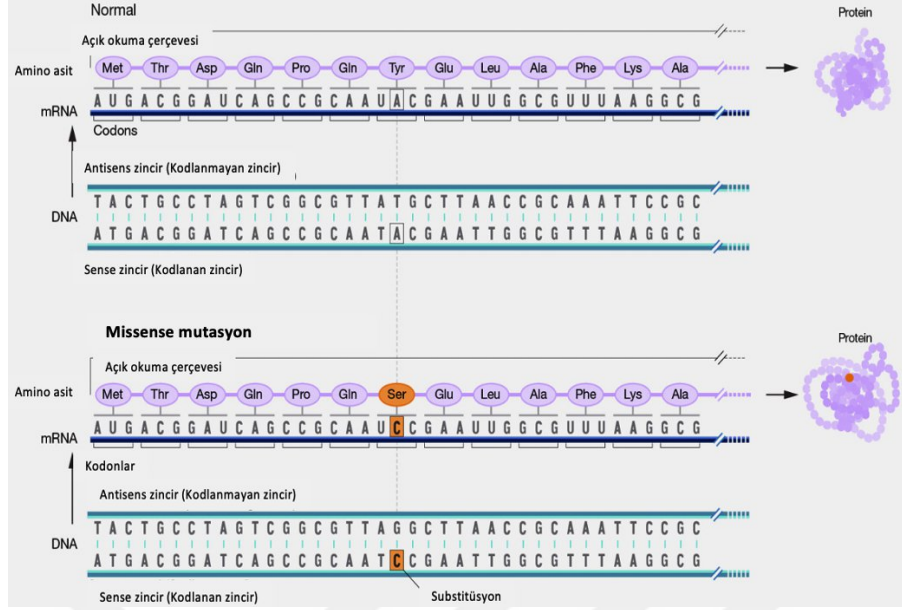
Tek nükleotid polimorfizmlerin, insan genomunda hastalıkla ilişkili moleküler bağlantılar için önemli biyobelirteçler olarak kullanılabileceği ve bir hastalığın altında yatan genin tanımlanmasında önemli etken olabileceği bilinmektedir (Chaudhary ve ark., 2015). Ayrıca nükleotid değişiklikleri ilaç yanıtında, malignite patogenezinde önemli ipuçları vermektedir ve kişiselleştirilmiş tıp alanında önemlidirler (Matsuda, 2017). Bu nedenden ötürü SNP'lerin ortaya çıkarılması hastalığın tedavisi ve prognozu için önemlidir (Dakal ve ark., 2017).

Artık zamanla, matematikte kullanılan algoritmalar, fizik alanındaki teoriler, biyokimya alanında kullanılan terimlerin bilgisayar bilimiyle birleştirilmesi ile daha anlamlı bilimsel düşüncelerin ortaya çıkarılması sağlandı. Hesaplamalı biyoloji alanı, bu bilgisayar tabanlı faaliyetler sonucunda gelişen alanlardan biridir. Artık SNP'lerin belirlenmesi deneysel olarak zor olsa da ilerleyen hesaplamalı biyoloji ve biyoinformatik alanındaki çalışmalarla in silico araçların gelişmesi sağlanarak kısa zamanda ve az maliyetle SNP'ler belirlenebilmektedir (Dakal ve ark., 2017; Zenebe ve ark., 2023).

2.1.1.1. Non-sinonim (Non-synonymous) Polimorfizmleri

Non-sinonim tek nükleotid polimorfizmi (nsSNP), genin kodlanan bölgesinde tek baz değişikliği neticesinde oluşan bir polimorfizmdir ve bu durum proteinlerin amino asit dizisinde farklılık yaratmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda tahminen her bireyin genomunda 13.000 kadarında ekzonik/kodlanan SNP bulunduğu düşünülmektedir ve bu SNP'lerin ortalama %58 oranında non-sinonim SNP'ler yer almaktadır (Yates ve Sternberg, 2013a).

Bir genin kodlama bölgesinde gerçekleşen nsSNP'ler iki alt tipi bulunmakla beraber bu alt tipler amino asit dizisinde farklılıklar gerçekleştirirler. Bu alt tiplerden biri olan missense SNP'ler amino asit dizisinde yarattığı değişim dolayısıyla farklı bir kodona dönüşerek polipeptid zincirinde değişime uğramış bir amino asit dizisine yol açtıklarından proteinin yapısında ve/veya işlevinde farklılıklarla sonuçlanabilir (Şekil 2.4.). Bu nedenden ötürü, missense SNP'ler proteinin fonksiyonu bakımından zararlı/zararsız, nötr gibi sonuçlar verebilir. Bakıldığında, hastalığa neden olan mutasyonların %50 oranında missense SNP'ler olduğu anlaşılmıştır. Diğer kodlama bölgesinde gerçekleşen anlamsız (nonsense) SNP'ler ise “stop” kodonuna neden olarak polipeptid zincirinde kısalma yaratır (Sukumar ve ark., 2021).



Şekil 2.4: Missense mutasyon. Şekil, Uluslararası İnsan Genom Araştırma Enstitüsü (ing. International Human Genome Research Institute NIH, 2025)'ten alınmıştır.

Proteinin yapısında birinci dereceden farklılık yapsa bile protein işlevinde farklılık yaratmayan nsSNP'ler bulunmaktadır ve bu tür nsSNP'lere tolerant nsSNP'ler denilmektedir (Yates ve Sternberg, 2013b). Bu tolerant nsSNP'leri, hastalık edici etkisi olan zararlı nsSNP'lerden ayırmak gerekir. Çünkü hâla çoğu varyantın fenotipte nasıl bir etki yarattığı bilinmemektedir (Petrosino ve ark., 2021). Tolerant ve zararlı nsSNP ayrımı ile hastalıkların patogenezi anlamak, bireysel olarak hastalığı duyarlılığı kavrayabilmek, genetik açıdan bakıldığında insan hastalıklarında genetik mekanizmaları kavrayabilmek için oldukça önemli bilgiler verilmesi sağlanarak fenotipteki etkileri incelenebilmektedir (Wang ve ark., 2009). Fakat tüm nsSNP'lerin laboratuvar ortamında çıkarılması elverişli olmadığından bunun için birçok hesaplama yöntemi geliştirilmiştir. SIFT, PolyPhen, SNAP gibi dizi hesaplaması için kullanılan yöntemlerin geliştirilerek nsSNP'lerin fenotipteki etkisini yapı ve dizi bilgilerine göre tahmin edilmektedir (Yates ve Sternberg, 2013b).

2.2. TGF-B: SINYAL İLETİM MEKANİZMASI, BİYOSENTEZİ VE HASTALIK İLİŞKİSİ

TGF β , embriyo, beyin, kalp, karaciğer, böbrekler, kaslar tükürük bezleri gibi birçok dokuda üretilmekte olan bir sitokin olup en fazla yaygın olduğu doku grubu trombositlerdir (Deng ve ark., 2024).

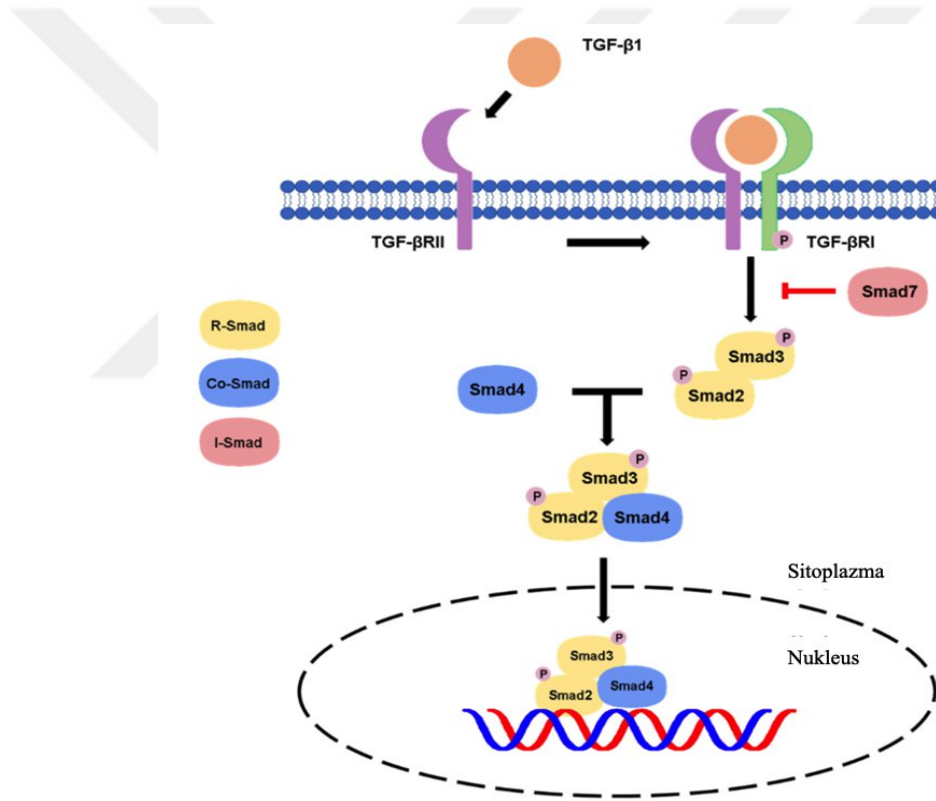
TGF β geni ailesi üç ana izoformdan (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) oluşmaktadır. TGF β 1 en fazla çalışılan formu ve neredeyse tüm insan dokusu hücrelerinde eksprese edilmektedir. TGF β 2 izoformu embriyonik gelişimde ve TGF β 3 izoformu doku onarımında yer almaktadırlar. TGF β izoformları herhangi bir uyarana almadığı sürece inaktif formda bulunur ve Büyük Latent Kompleks (*ing.* Large Latent Complex, LLC) adı verilen bir yapıyla bağlantılıdır. Aktivasyon farklı uyarılar (düşük pH, oksidatif stres, proteolitik enzim vs.) ile gerçekleşir (Vitiello ve ark., 2021)

TGF β öncül bir molekül olup üç bileşenden oluşmaktadır:

- 1) C-terminal TGF β homodimer (aktif olan kısım)
- 2) Gecikme ilişkili peptid (*ing.* Latency-Associated Peptide, LAP) (inaktivasyondan görevli)
- 3) N- terminal sinyal peptidi (hücre dışına salınım sağlanmasından görevli)

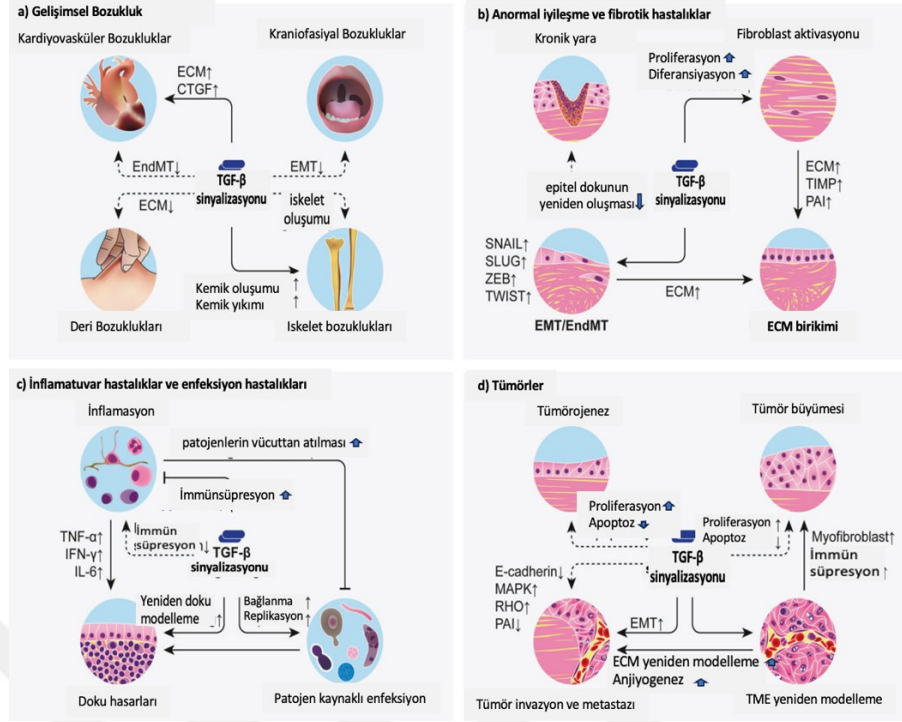
Aktivasyon gerçekleştiğinde ilk olarak TGF β , sinyal peptidini proteolitik kesilme ile kaybederek küçük latent kompleks (*ing.* Small Latent Complex, SLC) yapısının oluşmasını sağlar (Şekil 2.9). Bu kompleks yapıda TGF β homodimer ile LAP bölgesi yer almaktadır. SLC, latent TGF β bağlayıcı protein (*ing.* Latent TGF- β Binding Protein, LTBP) ile disülfid bağı oluşturarak LLC yapısının ortaya çıkmasını gerçekleştirir. LLC yapısı, ekstraselüler matrikse (*ing.* Extracellular Matrix, ECM) bağlanma gerçekleştirerek inaktif durumda depolama yapar. Matriks Metalloproteinazı (*ing.* Matrix Metalloproteinase, MMP), integrinler gibi bileşenler LLC yapısını parçalayarak TGF β homodimer yapısının serbest kalmasını sağlarlar ve TGF β homodimeri ilgili reseptörlerine (TGF β R1, TGF β R2, TGF β R3) bağlanma gerçekleştirip iletimini başlatır. TGF β aktif hale gelip ilgili reseptörlerine bağlandığında ilk olarak TGF β R2 reseptörüne ve sonrasında TGF β R1 reseptörüne bağlanır ve fosforilasyon ile TGF β R1 reseptörü R-Smad'lara (Smad2/Smad3) sinyal iletimini gönderir.

Fosforile olan R-Smad molekülleri TGF β R1 reseptöründen ayrılarak CO-Smad (Smad4) heterotrimerik yapı oluşturarak erken endozom ile birlikte birleşip çekirdeğe transloke olur. Çekirdekte bir arada olan Smad kompleksi transkripsiyon faktörleri (FoxH1, FAST vb.), kromatin bağlayıcı proteinlerle (p300/CBP) ve transkripsiyon ko-aktivatör/ko-reseptörlerle iletişim sağlar. Ayrıca çekirdekteki Smad kompleksi hedef genlerin promotor bölgelerine bağlama gerçekleştirir. Bağlanma durumuna göre hedef genlerin gen aktivasyonunu veya transkripsiyon açısından ifadesini baskılar. R-Smad ve CO-Smad kompleksinden ayrı olarak I-Smad (Smad7) inhibitörü de negatif geri dönüş sağlayarak TGF β R1 reseptörünün kinaz aktivitesini bloke ederek ubiquitin ligazların reseptör degradasyonunu gerçekleştirir. (Şekil 2.5) (Chung ve ark., 2021).



Şekil 2.5: TGF β sinyal yolağı. Şekil Chung ve ark., 2021'den alınmıştır.

Bozulan TGF- β sinyal yolağındaki mekanizmalar, birçok patolojik durumda önemli roller üstlenebilir. Enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar hastalıklar, fibrotik hastalıklar, anormal yara iyileşmesi, gelişimsel bozukluk, tümörler gibi birçok hastalığın oluşmasına neden olabilir (Deng ve ark., 2024) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Hastalık durumunda TGF- β sinyal iletimi. a) TGF- β sinyal iletiminde herhangi bir azalma ve artış durumlarında kardiyovasküler, kraniofasial, deri ve iskelet dokularına bağlı gelişimsel bozukluk gerçekleşebilir. b) TGF- β sinyalinin yetersizliğinde kronik olarak yara oluşumu gerçekleşirken; fazla TGF- β sinyal durumunda fibroblast aktivasyonu ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT)/endotel-mezenkimal geçiş (EndMT) ile ekstraselüler matriks birikimi ile kronik yara gerçekleşebilir. c) TGF- β sinyalinin bozulmuş durumunda inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıklarına bağlı olarak patojen enfeksiyonu gerçekleşerek yeniden doku yapılanması sağlanarak doku hasarı yaratabilir. d) TGF- β sinyalinin anormal durumu gerçekleştiğinde tümörde tüm aşamalarda rol alır; proliferasyon artışı ve apoptoz azalışıyla birlikte tümöröjenez (tümör oluşumu), tümör büyümesi, invazyon, metastaz, tümör mikroçerçevesi (TME) yeniden şekillenmesi durumları bu rollere dahildir. Şekil Deng ve ark., 2024'ten alınmıştır.

2.2.1. Gelişimsel Bozukluklarda TGF- β Sinyal İletimi

TGF- β sinyal iletiminde bir bozulma durumu gerçekleştiğinde bu durum embriyonik gelişim sırasında problemlere neden olabilir. TGF- β yolağındaki genlerde ortaya çıkan mutasyonlar Loeys-Dietz sendromuna sebep olabilir. Loeys-Dietz Sendromu, kalp-damar ve iskelet sistemi bozuklukları ile uyumludur. Ayrıca, TGF- β sinyal yolağının fazla aktivasyonu da gelişimsel bozukluklara neden olabilir. Örneğin, Camurati-Engelmann hastalığına bakıldığında, TGF β 1 geninin aşırı aktivite olması durumunda kemik yapım-yıkım dengesinde problem yaratarak kemiklerde kalınlaşmaya sebep olur. Hem yetersiz hem de fazla TGF- β sinyalleme gelişimsel bozuklukların ana temelinde yer alabilir. Diğer yandan, TGF- β ya da SMAD proteinlerinin fazla ifade edilmesi de farklı doku ve organ tiplerinde gelişimsel bozukluklara sebep olabilir. Farelerde yapılan çalışmalara göre, TGF- β ya da SMAD

proteinlerinin aşırı sinyalizasyonunda deri, meme bezi, tükürük bezi, kemik, göz, akciğer, ve merkezi sinir sistemi gibi farklı dokularda bozuk durumu yaratabileceği görülmüştür (Deng ve ark., 2024).

2.2.2. Yara İyileşmesindeki Bozukluklar ve Fibrotik Hastalıklarda TGF- β Sinyal İletimi

TGF- β sinyal yolunun düzensizliği, yara iyileşmesi durumlarında ve fibrotik hastalıkların oluşmasında oldukça önemli görevler üstlenir. Kronik yara durumunda TGF- β ve reseptörlerinin düşük seviyedeki ifadesi, yara iyileşmesinin gecikmesine veya tedavi edilememesine sebep olurken; aşırı aktif halde olan TGF- β sinyali hipertrofik skar ve keloid oluşumunda anormal doku iyileşmesine sebep olur. Bu bahsedilen durumlar, kollajen birikimi ve fibroblast aktivitesinde artışıyla uyumludur. Fibrotik hastalıklara bakıldığında ise TGF- β sinyalizasyonunun fazla aktivitesi birçok farklı dokuda fibrozise yol açabilmektedir. Örneğin; akciğer dokusunda idiopatik pulmoner fibrozis ve kistik fibrozis hastalıklarında TGF β 1 geninin akciğer dokusundaki alveoler epitel hücrelerinde EMT'yi tetikleyerek fibroblast aktivasyonunu yükseltir. Yine benzer şekilde, böbrek dokusunda glomerülonefrit, diyabetik nefropati ve kronik red gibi hastalıklarda artan TGF β 1 gen ekspresyonu, ECM bileşenlerinin oluşmasını ve fibrozisi desteklemektedir. Karaciğer dokusunda yine TGF β 1 geni, hepatosit apoptozu ve merkezi sinir sisteminde bulunan yıldız hücrelerinin (astrosit) aktivasyonu yoluyla fibrogeneze sebebiyet verir. Kardiyovasküler sistemde bakıldığında ise TGF- β , miyokard fibrozisi ve damar sertliği gibi durumlarda fibroblastlardan myofibroblastlara dönüşümünü ve EndMT'yi destekler (Deng ve ark., 2024).

2.2.3. İnflamatuvar ve Enfeksiyon Hastalıklarında TGF- β Sinyal İletimi

TGF- β sinyalizasyonun bozulması durumunda, inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların oluşmasında önemli bir zemin hazırlanır. TGF- β sinyal yolağı, bağışıklık sistemi yanıtlarını baskılayarak immünite dengesini korur; bu nedenden ötürü TGF- β eksikliği otoimmün hastalıklara sebep olabilir. TGF β 1 geni eksik olan farelerde sistemik inflamasyon, organ yetmezliği ve erken ölümün gerçekleştiği bilinmektedir. Otoimmün hastalıklarda (sistemik lupus eritematozus, skleroderma, romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi) TGF- β seviyeleri bu hastalıkların şiddetiyle bağlantılı olabilir; bu bağlantı bazen düşük üretim olarak, bazen de cevap vermeyen bozulmuş hücresel cevap üzerinden sağlanır. TGF- β , alerjik hastalıklarda örnek olarak astım, alerjik rinit, besin alerjisi, atopik dermatit, hem inflamasyonu indükleyebilir hem de hava yolu yeniden şekillenmesi, EMT ve ECM üretimini teşvik ederek patogeneze görev alabilir. Diğer inflamatuvar hastalıklar olan bronşit, glomerülonefrit, diyabet,

Alzheimer hastalığına da TGF- β sinyal yolağı katkı sağlamaktadır. Enfeksiyon hastalıklarında TGF- β incelendiğinde, bazen koruyucu, bazen de zararlı olmak üzere zıt etkiler gösterebilmektedir. Bazı viral ve bakteriyel enfeksiyon durumlarında TGF- β , bağışıklık sistemini dengede tutarak doku hasarını önlemeye yardımcı olurken; bazı durumlarda ise immün sistemin baskılanmasını gerçekleştirerek patojenlerin etrafa yayılımını kolaylaştırmaktadır. Özellikle HIV, HCV, HTLV-I, Zika ve Rubella gibi virüs türlerinde TGF- β , bağışıklık sisteminde yanıtı baskılayarak oluşan enfeksiyonun ilerlemesine yardımcı olur. Ayrıca bazı paraziter enfeksiyonlar olan Toxoplasma, Leishmania, Plasmodium vb. gibi durumlarda TGF- β , immünsüpresif yanıtlarında artış gerçekleştirerek parazitin konak hücre içinde hayatta kalmasını sağlar. Bu nedenden ötürü, TGF- β sinyalizasyonu hem inflamatuvar durumlarda hem de enfeksiyon türü hastalıkların yanıtlarının oluşmasında önemli bir görev üstlenmektedir (Deng ve ark., 2024).

2.2.4. Tümör Oluşumunda TGF- β Sinyal İletimi

TGF- β sinyal iletimi; tümör oluşumu, ilerlemesinde oldukça önemli ve karmaşıktır (Deng ve ark., 2024). Bu sinyal yolu, hastalığın erken evrelerinde tümör baskılayıcı rol alırken; hastalığın ilerleyen evrelerinde ise tümör destekleyici bir rol almaktadır (Xie ve ark., 2018) (Şekil 2.7). Yapılan hayvan modelleri ve klinik çalışmalar neticesinde, TGF- β ve özellikle TGF β 1 geninin farklı doku tiplerinde tümör gelişimini baskın duruma getirdiğini göstermiştir. Bu baskılayıcı etki birçok moleküler mekanizma ile (hücre döngüsünü durdurma, apoptozu indüklemeye, prematür hücre yaşlanması (senesens), genomik stabiliteyi koruma ve aşırı inflamasyonu baskılama) sağlanmaktadır.

TGF β 1 geninin ifadesi ve reseptörleri olan TGF β R1 ve TGF β R2 başta meme dokusu epiteli olmak üzere farklı tip dokularda kanserojenlere karşı koruma gerçekleştirmektedirler. Fakat, TGF- β sinyal bileşenlerinde mutasyonlardan kaynaklı meydana gelen kayıplar —örnek olarak TGF β R veya SMAD mutasyonları— birçok farklı kalıtsal kanser sendromunda ve solid tümörde kanser oluşumuna yatkınlık göstermektedir. TGF β 1 geninin bu kanserojenlere olan bu koruyucu etkileri, proliferasyonu sınırlı duruma getirerek transformasyon olasılığını azaltmaktadır.

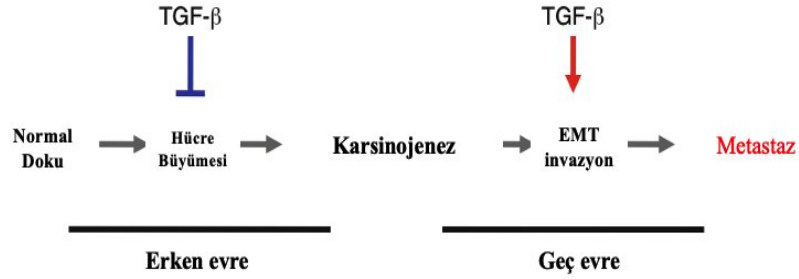
İleri evre tümör durumlarında ise TGF- β sinyalizasyonu yön değiştirerek apoptoz indüklenerek invazyon ve metastaz durumu gerçekleşir. TGF- β , özellikle EMT'yi baskılayarak, hücrelerin adezyon ve invaziv özelliklerini arttırmaktadır. Ayrıca TGF- β sinyalizasyonu, pro-

invaziv ve pro-metastatik etkenlerin üretiminde artış gerçekleştirerek tümör hücrelerinin çevresel destek ile birlikte büyümesini kolaylaştırmaktadır.

TGF- β sinyalizasyonu, TME’de önemli bir yeniden şekillenme gerçekleştirir. TGF- β , sağlıklı fibroblastların kanserle ilişki gösteren fibroblastlara (CAF) dönüşümünü sağlarken, bu hücrelerden salınan TGF- β , VEGF, HGF ve diğer büyüme faktörleriyle tümör oluşumunu sağlar. Endotelial hücrelerde EndMT’yi uyarak anjiyogenez ve damar geçirgenliğinde artış gerçekleştirir. Tüm bu süreçler hem tümörün beslenmesi için uygun ortam sağlar hem de metastaza istenilen ortam oluşturur.

TGF- β , bağışıklık sisteminde de tümöre karşı olan tepkiyi indükleyerek immün kaçışa ortam hazırlar. Önemli bağışıklık hücreleri olan Sitotoksik T hücreleri (CTL), NK hücreleri, makrofajlar ve nötrofillerin tümöre karşı olan ilişkisinde azalma olurken; Treg hücre aktivitesi artış sağlanır.

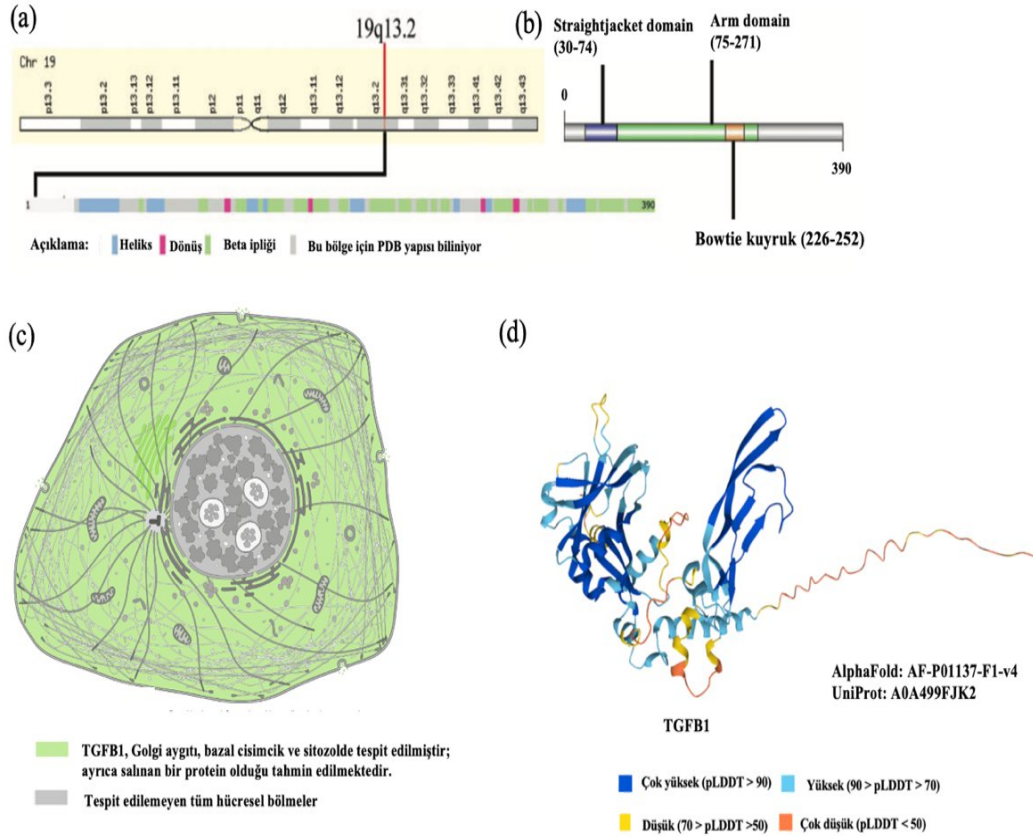
Sonuç olarak, TGF- β /SMAD sinyal yolu üzerinde, özellikle TGF- β 1 geninin , hem hücre içi hem de hücre dışı düzeyde çok sayıda moleküler mekanizmayı düzenleyen rolü bulunmaktadır. (Deng ve ark., 2024).



Şekil 2.7: TGF- β sinyal yolağının kanser üzerindeki etkisi. Şekil Xie ve ark., 2018’den alınmıştır.

2.3. TGFB1 GENİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI VE HASTALIK İLİŞKİSİ

Dönüştürücü Büyüme Faktörü 1 (TGF β 1), TGF beta süper ailesinin bir üyesi olup aynı zamanda CED, LAP, DPD1, TGF β , IBDIMDE, TGF-beta, TGF-beta 1 olarak da farklı adlandırmalarla görülmektedir (Vitiello ve ark., 2021). TGF β 1, kromozom üzerinde 19q13.2 lokalizasyonunda yer almaktadır (Chen ve ark., 2024) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: TGF β 1 geninin yapısal ve fonksiyonel özellikleri. (a) TGF β 1 geninin kromozom üzerindeki konumu ile genin ikincil yapısı. (b) TGF β 1 protein yapısında bulunan fonksiyonel domainler (c) TGF β 1 gen ürününün hücre içindeki lokalizasyonu (d) TGF β 1 proteininin çözölmüş üç boyutlu (3B) yapısı. Şekil, Chen ve ark. (2024), The Human Protein Atlas (2025) ve AlphaFold (2025) verilerinden yararlanılarak hazırlanmıştır.

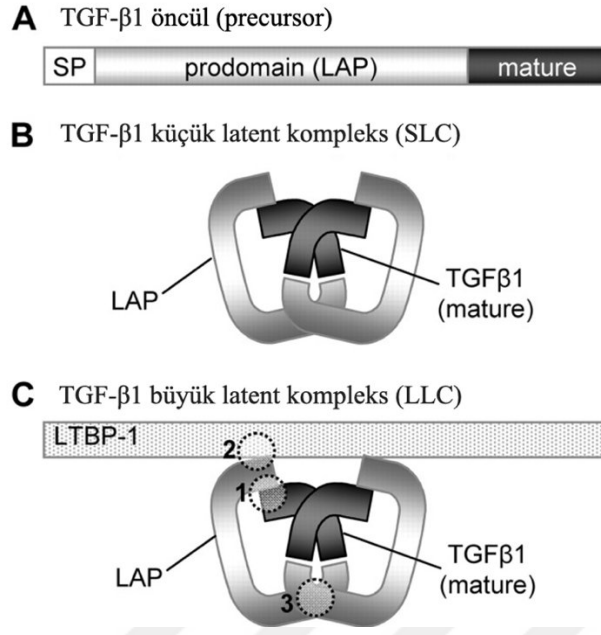
TGF β 1 geni, birçok biyolojik rolde (hücre sağ kalımı düzenleme, proliferasyon, farklılaşma, büyüme, apoptoz vs.) yer almaktadır ve Ensembl veritabanında bilinen üç bulunmaktadır (Tablo 2.1). Aynı zamanda Interferon-gamma ve Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu ve aktivite durumunu düzenlemektedir ve sentezlenmesi hem sağlıklı epitelial hücrelerden hem de tümör hücrelerinden gerçekleşmektedir (Kim ve ark., 2018; Vitiello ve ark., 2021; Chen ve ark., 2024; Pal ve ark., 2024; NCBI, 2024; Ensembl, 2024).

Tablo 2.1: TGFβ1 geninin transkriptleri. Tablo bilgileri NCBI, 2024; Ensembl, 2024'den uyarlanmıştır.

Ensemble ID	İsim	Baz uzunluğu (bp)	Amino asit uzunluğu (aa)	Biyotip	Ekzon sayısı
*ENST00000221930.6	TGFB1-201	2780	390	Kodlayan protein	7
ENST00000600196.2	TGFB1-204	1250	370	Kodlayan protein	6
ENST00000677934.1	TGFB1-205	1084	306	Kodlayan protein	5

*: kanonik transkript

TGFβ1 proteinin yapısı; N-terminal (1-29), straightjacket domain (30-74), arm domain (75-271) ve bowtie tail (226-252), LAP (246-248), C-terminal (246-390) olarak altı bölge ve bir “hücre bağlanma yeri” (cell attachment site) motifinden oluştuğu bilinmektedir. Straightjacket ve arm kısımları, TGFβ1 proteinin monomerlerini sararak Lys-56 ile Tyr-103/Tyr-104 arasındaki sıkı bağlarla birbirlerine bağlanmayı gerçekleştirir. Hücre bağlanma yeri motifi, TGFβ1 geninin arm domainin ve bowtie tail kısmında yer alan ve integrin homodimerlerle bağlanma gerçekleştiren bölgedir. Bu integrin homodimerlerin bağlanması, bowtie tail kısmında farklı yapısal biçimde sabitlenmeyi gerçekleştirerek TGFβ1 geninin aktivasyonunda rol alırlar. Bu aktivasyon hücre iskeletinde bulunan aktin filamentler sayesinde mekanik bir kuvvet uygulanarak gerçekleşir. Bu mekanik kuvvet ile LTBP1, LRRC32 (GARP) ve/veya LRR33 (NRROS) gibi ortamda bulunan moleküllerin direnci ile karşılaşarak TGFβ1 genine bağlı olan prodomain şeklinin değişmesine ve bu değişim sonucunda aktif hale gelen TGFβ1’in salınmasının gerçekleşmesini sağlarlar (Shi et al., 2011; UniProt, 2024).



Şekil 2.9: TGF β 1 LAP yapısının oluşumu. A) TGF β 1 SP (sinyal peptidi), LAP ve mature (öncül) yapısından oluşan öncül yapısı. B) TGF β 1 SLC yapısı. C) TGF β 1 LLC yapısı. 1,2,3 numaralı bölgelerin literatürde LLC yapısının birleştirilmesinde ve stabilitesinde görev aldığı gösterilmiştir. Şekil Walton ve ark., 2017’den alınmıştır.

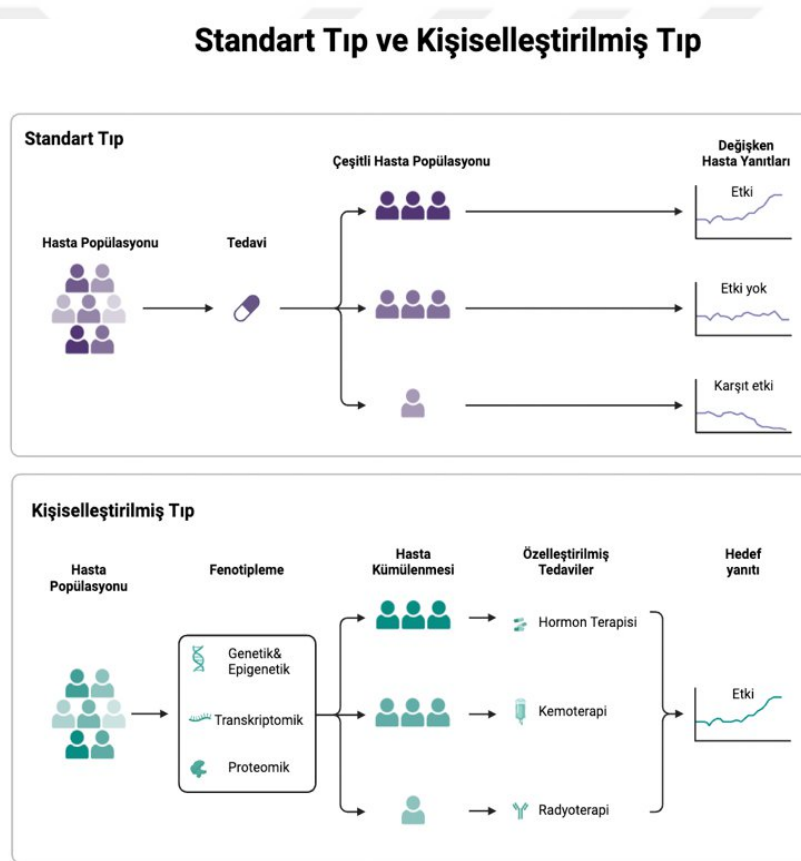
2.4. KİŞİSELLEŞTİRİLMİŞ TIP

Kişiselleştirilmiş tıp, bireyin birçok profiline dayalı (genomik, epigenomik, proteomik vs.) ve klinik bilgiler neticesinde kişiye özgü tedavi geliştirme stratejilerine yönelik bir kavramı ifade etmektedir. Kişiselleştirilmiş tıp, günümüzde tıp ve sağlık branşlarında oldukça önemli bir konu olmakla beraber geleneksel olan tıp anlayışına kıyasla daha doğru ve güvenilir tahmin sonuçları hedefleyebilmektedir (Mathur ve Sutton, 2017) (Şekil 2.10). Kanseri ve diyabet hastalıklarında kişiselleştirilmiş tıp daha çok hastalığın ilerlemesini engelleyici bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımın yanı sıra sağlıklı bireylerinde risk sınıflandırması amaçlı kullanılabilir (Tsuchida ve ark., 2019).

Şu anki yüzyılda kişiselleştirilmiş tedavinin vizyonu tamamen ‘doğru hastaya doğru vakitte doğru tedavinin doğru dozda’ uygulanmasını gerçekleştirmektir. Bu doğruluğun sağlanması için en uygun hedefe yönelik terapötik ürünlerin oluşturulması gerekir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (*ing.* U.S. Food and Drug Administration, FDA) bu doğru ürünlerin oluşturulmasında oldukça önemli bir kuruluş olup amaçları tedavi ve önlemeyi doğru hedeflerle doğru hastalara uygulayarak riskleri düşük seviyelere getirmektir.

Kişiselleştirilmiş tıp, doğru bir tedavi anlayışı olmakla birlikte, geliştirilmesi açısından birtakım engeller içermektedir. Bunlar arasında bazı hastalıkların moleküler düzeydeki mekanizmalarının tam anlaşılabilmesinden doğan eksikliklerden dolayı doğru biyobelirteçin belirlenememesi, maliyetin uygun düşürülmesi için oluşturulmak istenen teknoloji ve operasyonel sistemlerin belirlenmesinden doğan ekonomik sorunlar, araştırma alanında bazı özel bilgilerin korunma altına alınması gibi engeller yer almaktadır.

Zamanla DNA dizileme için ihtiyaç duyulan maliyet ve süre büyük bir hızla azalmaya devam ederken, bu süre zarfında hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilecek mutasyonlarda keşfedilmektedir ve böylece kişisel tıp daha önemli hale gelmektedir (Yates ve Sternberg, 2013b).



Şekil 2.10: Standart Tıp ile Kişiselleştirilmiş Tıp arasındaki tedavi farkları. Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur (bkz. <https://www.biorender.com/>). Şekil Mathur ve Sutton, 2017'den uyarlanmıştır.

İnsan Genom Projesinin 2003 yılında tamamlanmasıyla birlikte kanser alanında yeni bir dönem başladı. Bu proje ile oluşturulmuş olan referans genom ile kanser patogenezinde ilerlemeler sağlanmıştır (Mathur ve Sutton, 2017). 2006 yılında ticari olarak kullanılmaya başlanan Yeni Nesil Dizileme (*ing.* Next-Generation Sequencing, NGS)'nin gelişimi ile de

tümör DNA'sının daha hızlı ve etkili bir şekilde dizilimleri gerçekleştirilerek "Genomik bir dönem" başlamış oldu. Böylelikle Yeni Nesil Dizileme ile kişiselleştirilmiş tıp alanında ilerlemeler sağlanmış oldu (Morganti ve ark., 2019).

2.5. ACMG/AMP Kriterleri

Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin ilerlemesi ile genetik testler gitgide artmaktadır. Artmakta olan bu genetik testler zamanla karmaşığa neden olmaktadır. Bu nedenden ötürü bu testlerdeki gen dizisi varyantlarının yorumlanması gittikçe zorluk yaratmaktadır. Bu zorluk neticesinde, 2013 yılında Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (*ing.* American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), Moleküler Patoloji Derneği (*ing.* Association for Molecular Pathology, AMP) ve Amerikan Patologlar Koleji (*ing.* College of American Pathologists, CAP) temsilcileri ile oluşturulan bir çalışma grubu toplanmıştır ve bu çalışma grubu sonucunda bu paydaşların (ACMG, AMP, CAP) fikirleri alınarak bir rapor hazırlanmıştır. Bu rapordaki fikir ve görüşler klinik laboratuvarında çalışılan tüm testler (tek gen analizi, genotipleme, ekzom, genom, gen panelleri) kapsamaktadır.

Bu çalışma raporunda, Mendel kalıtımı sergileyen hastalıklarda gözlemlenen genetik varyantların tasnifi için standart kullanılacak kavramların uygulanması teklif edilmiştir:

- Patojenik (*ing.* Pathogenic)
- Muhtemelen patojenik (*ing.* Likely Pathogenic)
- Klinik anlamı belirsiz/ Klinik anlamı belirsiz varyant (*ing.* Variant of Uncertain Significance, VUS)
- Muhtemelen iyi huylu (*ing.* Likely Benign)
- İyi huylu/zararsız (*ing.* Benign)

Genetik testlerin analiz ve yorumlama kısmı, belirli kriterler altında incelenir ve patojenik/zararsız kriterler temelinde tasnifi yapılır.

1) Çok Güçlü Patojenite Kanıtı

PVS: Çok Güçlü Patojenite (*ing.* Pathogenic Very Strong)

PVS1: Null varyantlar (nonsense, splice konumundaki farklılıklar) gendeki fonksiyonu bozabilir ancak patojenik denilmeden önce varyantın lokalizasyonu ve hastalığın mekanizması değerlendirilmelidir.

2) Patojenik Yansımanın Güçlü Kanıtları

PS: Güçlü Patojenite (*ing.* Pathogenic Strong)

PS1: Farklı nükleotid değişiklikleri aynı amino asit değişikliği yapabilir. Bu durum patojenik olarak değerlendirilmelidir fakat DNA seviyesindeki etkiler de dikkate alınmalıdır.

PS2: Aile öyküsü olmadığı halde bir bireyde hastalığın görülmesi.

PS3: Fonksiyonel çalışmalar doğrultusunda gene veya genin herhangi bir materyaline zarar veren etkileri olan in vitro ya da in vivo durumlar.

PS4: Bir genetik varyantın sağlıklı bireylere göre hasta bireylerde daha sık görülmesi o varyantın o hastalık üzerindeki patojeniteyi arttırması.

3) Patojenik Yansımanın Orta Seviye Kanıtları

PM: Orta Seviye Patojenite (*ing.* Pathogenic Moderate)

PM1: Hot-spot (mutasyonların daha aktif olduğu bölge) noktalarındaki mutasyonlar.

PM2: Bir genetik varyantın Ekzon Sekans Projesi, 1000 Genom veya ExAC gibi bilinen büyük projeler içerisinde yer almaması.

PM3: Resesif hastalık durumlarında, trans konumda bir genetik varyantın tespit edilmesi.

PM4: Çerçeve içi delesyon ya da insersiyonla ilgili proteinin boyunda kısalma görülmesi.

PM5: Patojenik kabul edilen missense varyantın yine aynı amino asit kalıntısında farklı missense görülmesi. Splice bölgesinde olup olmadığına dikkat edilmelidir.

PM6: Aile öyküsü olmadan de novo kabul görmesi.

4) Patojeniteyi Güçlendiren Kanıtlar

PP: Patojenite Destekleyici (*ing.* Pathogenic Supporting)

PP1: Ailede çok sayıda hastalık yapıcı olduğu bilinen bir genin görülmesi.

PP2: Missense olan varyantın iyi huylu olmayıp gende değişiklik yapması.

PP3: Birçok in silico (hesaplamalı) aracın patojenik olarak göstermesi.

PP4: Hastanın fenotipi belirli bir genetik hastalığı göstermesi.

PP5: Varyant patojenik kabul görmüştür fakat laboratuvarında bağımsız değerlendirme için tam kanıt durumunun olmaması.

5) İyi Huylu Yansımanın Bağımsız Kanıtı

BA: Bağımsız Olarak İyi Huylu (*ing.* Benign Stand-Alone)

BA1: Ekzon Sekans Projesi, 1000 Genom veya ExAC gibi büyük projelerde yer alan minör alel frekansı %5'in üzerindedir.

6) İyi Huylu Yansımanın Güçlü Kanıtı

BS: İyi Huylu Destekleyici (*ing.* Benign Supporting)

BS1: Allel frekansı (popülasyonda varyantın görülme sıklığı) eğer hastalık durumu için beklenen olasılıktan fazlaysa.

BS2: Eğer hastalık resesif, dominant, X'e bağlı ve sağlıklı yetişkin bireyde görülüyorsa.

BS3: Güvenilir ıslak laboratuvar çalışmalarının sonucunda ilgili varyantın protein işlevinde veya RNA işlenmesi sürecine zararlı etki etmiyorsa.

BS4: Aile içinde, hastalık durumu olan kişilerde ilgili varyant görülmemişse.

7) İyi Huylu Yansımayı Destekleyen Kanıtlar

BP: İyi Huylu Patojenik (*ing.* Benign Pathogenic)

BP1: İlgili hastalıkta sadece protein kesilmesine neden olan varyant görülmesi beklenirken missense varyant görülmesi.

BP2: Dominant (baskın) bir hastalık durumunda patojenik varyantla *trans* ya da *cis* konumunda bulunulması.

BP3: Herhangi bir fonksiyonu olmayan konumda ve tekrar eden bölgede çerçeve içi delesyon/insersiyon görülmesi.

BP4: Birden çok bilgisayar analiz yöntemlerinin farklı açılardan (korunum, evrimsel analiz, splicing etkisi gibi) zararsız olarak sonuç çıkarması.

BP5: Hastalığa sahip olan bireyin, hastalığı üzerinde başka bir moleküler mekanizma bulunmuşsa.

BP6: Laboratuvar ilgili varyantın analizini yapamıyor fakat güvenilir kaynaktan o varyant zararsız olarak kabul edildiyse.

BP7: Synonymous bir varyant olup splice bölgesinde değişiklik yapmayıp ilgili nükleotid oldukça korunmuş bölgedeyse.

Bu çalışma raporunda belirtilen klinik genetik testlerinden oluşan analiz ve yorumlama sertifikalı klinik moleküler genetikçi, moleküler genetik patolog veya aynı eşdeğer bir uzman tarafından analiz edilmesi tavsiye edilmektedir (Richards ve ark., 2015).

“*in silico*” kavramı, “*in vivo*” (canlı ortamda) ve “*in vitro*” (laboratuvar ortamında) terimlerinden oluşarak türemiştir ve kelime anlamı genel olarak bilgisayar simülasyonları olarak ifade edilir. İn siliko, ıslak laboratuvar ortamının dışında sanal ortamda yapılan deney anlamına gelmektedir.

Genomik çalışmalar neticesinde çıkan birçok varyantın klinik olarak önemi hala bilinmemekte ve biyoloji alanında kullanılan in siliko araçlar bu tür varyantları karakterize etmekte yardımcı olmaktadır. İn siliko araçlar tek başlarına bir varyantı sınıflandırmada tercih edilmemelidir çünkü bir varyantın hastalık edici olduğu kararı sadece in siliko tahmin aracının verdiği sonuca bağlı değildir. Bu aşamada verilen yanlış bir karar hastanın ve ailesinin alacağı tedavi sürecini etkileyebilmektedir (Giorgi ve ark., 2022).

2.6. BIYOINFORMATİK ANALİZ

Moleküler biyoloji dalındaki gelişmeler sonucu oluşan teknikler zamanla erişilebilir hale gelmiştir. Bu gelişmeler neticesinde genetik hastalıklar, DNA/RNA sekanslaması ile ortaya çıkabilmektedir. Gen sekanslama çalışmaları zamanla büyük verilere ulaştıkça yorumlanmaları, analiz edilmeleri uzmanlık derecesinin yanı sıra hesaplama bilgisi ve gücü gerektirmiştir.

Yapılan bu genomik çalışmalar, hastalıkların moleküler düzeydeki mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu DNA dizilemesindeki genomik çalışmalar ilerledikçe hastanın klinik açıdan kararlarını da büyük bir ölçüde etkileyebilmektedir. Gitgide artan bu DNA dizilerinin verilerin içinde kanserle ilgili moleküler düzeyde gerçekleşen değişikliklerde yer almaktadır. Bu veriler ClinVar, UniProt gibi veri tabanlarında depolanarak önemli bir referans olarak kullanılmaktadır.

Genomik çalışmalar sonrasında elde edilen varyantların tasnif edilmesi oldukça hassas bir süreçtir ve güçlü kanıtlar gerektirir. Bu amaç neticesinde kabul görmüş ACMG/AMP kriterleri kullanılmaktadır. Varyantların patojenik ya da iyi huylu olarak değerlendirilmeleri için yapılan dizilemenin kalitesi, popülasyondaki görülme sıklığı, klinik bilgileri, hastalığın biyolojik bilgisi, varyantın gendeki lokalizasyonu, varyantın türü, varyantın sınıflandırmada kullanacağı aracın varyantın tipine uygunluğu oldukça önemlidir (Gargia ve ark., 2022).

2.6.1. Veri Tabanları

ClinVar, insan genetik varyantları ile bu varyantların genetik hastalıklarla ilişkisine dair yorumları yer alan ABD Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (*ing.* National Center for Biotechnology Information, NCBI) tarafından yürütülmekte olan veritabanıdır.

ClinVar veri tabanında; tek nükleotid polimorfizmleri (*ing.* Single nucleotide polymorphism, SNP), kısa eklemeler/silmeler (indel) ve kopya sayısı varyantları (*ing.* Copy number variation, CNV) gibi genetik varyantlar içermektedir. Bu varyantlar, ClinVar veritabanında genomdaki lokalizasyonu, dizisi ve referans genom baz alınarak tanımlanmaktadır.

ClinVar veri tabanına eklenen her varyant, fenotip açısından klinik ilişkisi belirtilerek yüklenmektedir. Bu veriler, belirli kanıtlara dayanmaktadır. Kanıtlar; literatür bilgileri, in vitro deneysel veriler, popülasyonda görülen sıklık bilgisi ve klinik ortamda gözlemlenen bulgular gibi unsurları içermektedir. Varyantlar, bu kanıtlara dayanarak değerlendirilip ClinVar veri tabanına eklenir (Xiao ve ark., 2021).

Evrensel Protein Kaynağı (UniProt), protein dizilerini, yapılarını iç ve fonksiyonlarını içeren ve ücretsiz bir şekilde erişim sunan bir veri tabanıdır. Bu veri tabanının iş birlikleri içerisinde Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (EBI), Protein Bilgi Kaynağı (PIR) ve İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü (SBI) yer almaktadır (Uniprot Consortium, 2008).

UniProt veritabanına in vitro çalışmalar ve literatür bilgileri baz alınarak veriler yüklenmektedir. Eğer gözden geçirilmeyen bir veri olduğunda makine öğrenimi teknikleri kullanarak veritabanına yüklenmektedir.

Bu veritabanı içerisinde proteinlerin yapıları, işlevleri, aktif bölgeleri, ligand bağlanma bölgeleri, post-translasyonel modifikasyonları yer almaktadır.

2022 yılında DeepMind tarafından makine öğrenimi tekniği kullanılarak oluşturulan AlphaFold veri tabanından da alınan proteinlerin yapısal bilgileri UniProt veritabanına eklenmiştir. AlphaFold veri tabanı bir protein amino asit dizisinden 3B tahmin görüntüsü çıkarmaktadır (Uniprot Consortium, 2023).

Tablo 2.2: ClinVar, UniProt veri tabanları özellikleri

Veri Tabanı	Özellik	URL	Kaynak
ClinVar	İnsan genetik varyantları ile bu varyantların genetik hastalıklarla ilişkisine dair yorumlar yer alan veri tabanıdır.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	Xiao ve ark., 2021
UniProt	Protein dizilerini, yapılarını, fonksiyonlarını içeren veri tabanıdır.	https://www.uniprot.org/	Uniprot Consortium, 2008

2.6.2. İn siliko Araçlar ile Patojenite Tahmini

SIFT (*ing.* Sorting Intolerant From Tolerant), SIFT, bir proteinin amino asit dizilerinin zararlı olup olmadığını tahmin ederek varyantlar ve bu varyantların fenotipe olan ilişkisini tahmin eden bir in siliko aracıdır. SIFT, genellikle varyantlar arasında non-sinonim (nonsense, missense) varyantları tahmin etmeye çalışmaktadır.

Proteinde amino asit değişikliği olduğunda bu değişim protein yapısında tolere edilebilir ya da tam tersi tolere edilemeyebilir. SIFT yazılım aracı tahmin sonuçlarını toleranslı veya zararlı olarak sunmaktadır. SIFT her bir SNP'ye ait bir rs numarası vererek skor yaratmaktadır. Bu SIFT skorlarına göre <0.05 değerinde ise amino asit değişimi için “Damaging”, ≥ 0.05 değerine ise amino asit değişimi için “Tolerated” olarak sonuç çıkarılır. Bu SIFT algoritmasının temelinde, homolog dizilerin protein lokalizasyonu ve amino asit değişimi sonucundaki durumu dikkate almaktadır.

SIFT 4G ise , yeni çıkan bir sürüm olarak daha hızlı ve daha çok organizma için tahmin yapmaya yarayan SIFT in siliko aracının versiyonudur. (Ng ve Henikoff, 2001; Ng ve Henikoff, 2003; Vaser ve ark., 2016).

PROVEAN (*ing.* Protein Variation Effect Analyzer), proteinler üzerindeki amino asit değişimlerinin veya indel türü varyantları tahmin etmeye yarayan in siliko aracıdır. Sonuçlar PROVEAN aracının skoruna göre değişmekte olup eşik değer -2.5'tir. Skor ≤ -2.5 ise amino asit değişimi için “Deleterious” , >-2.5 ise “Neutral” olarak sonuç vererek tahmin oluşturmaktadır (Choi ve Chan, 2015).

PolyPhen-2 (*ing.* Polymorphism Phenotyping v2), yapısal değerlendirmeleri baz alarak amino asit değişimlerinin protein yapısı üzerinde kararlılığını ve fonksiyonu üzerindeki etkisini tahmin etmeye yarayan in siliko aracıdır.

Çalışma mekanizmasına bakıldığında ilk olarak SNP'leri kodlayan genlerin transkriplerinin haritalanması ve sonrasında ilgili protein dizisinin yapısal durumunu açıklayarak koruma profilleri oluşturur ve bir sonuç çıkartır. PolyPhen, PSIC skoru farkına (Δ) dayanarak sonuç vermektedir. Pozisyona Özgü Bağımsız Sayılar (*ing.* Position-Specific Independent Counts, PSIC) skoru, amino asit değişikliği sonucunda protein üzerindeki etkisini ölçer ve algoritmanın kendi yaptığı iç hesaplama değildir. PSIC skoruna bağlı olarak “Benign”, “Possibly Damaging”, “Probably Damaging” sonucu vermektedir.

PolyPhen-2 iki farklı tahmin model içermektedir: HumDiv, HumVar. HumDiv, mendel hastalıklarına sebebiyet veren zararlı olan veya zararlı olmayan alellere ait veriler bulunmaktadır. HumVar, tüm insan hastalıklarına sebebiyet veren zararlı ve zararlı olmayan alellere ait veriler bulunmaktadır (Adzhubei ve ark., 2013).

Fathmm-XP (*ing.* Functional Analysis through Hidden Markov Models eXtended Prediction), SNP üzerinde yüksek doğruluk içeren tahminler oluşturan bir in siliko aracıdır. Her bir tahminine bir p-skoru atayarak yorumlama analiz kısımlarında yüksek güvenlik sağlanır. Bu in siliko aracında eşik değer 0.5 olarak kabul edilmektedir. Eğer sonuç > 0.5 ise “Pathogenic”, < 0.5 ise “Benign” olarak sonuç vermektedir (Rogers ve ark., 2018).

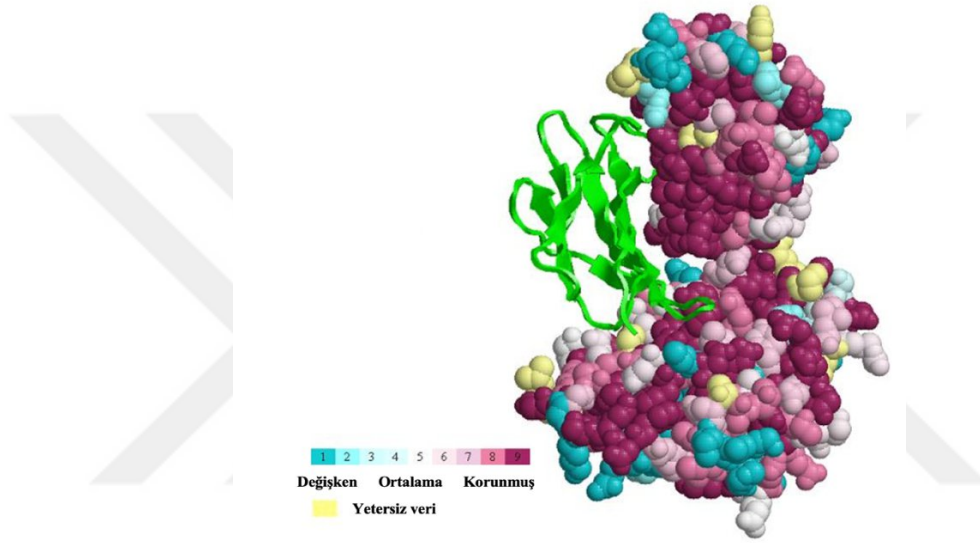
SNP&GO (*ing.* Single Nucleotide Polymorphism&Gene Ontology), SNP üzerinde tahmin yapan ve hastalıklarla olan ilişkiyi tahmin etmeye yarayan bir in siliko aracıdır. UniProt/Swiss-Prot kodu ve amino asit değişimini içeren bilgiler girilerek bir skor oluşturulur. Bu skora göre ≤ 0.5 olduğunda “Benign”, > 0.5 olduğunda ise “Pathogenic” sonucu tahmin edilmektedir (Capriotti ve ark., 2017).

Tablo 2.3: İn siliko analiz araçlarının temel işleyiş prensipleri

Tip	Metod İsmi	Giriş Özellikleri	Varsayılan Eşik Değer	Baz Alınan Eşik Değer	Kaynak
Homoloji	SIFT	Çoklu dizi hizalaması	0.05 > Tolerated 0.05 < Damaging	≤ 0.001	Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022).
Homoloji	PROVEAN	Çoklu dizi hizalaması	-2.5 ≤ Deleterious -2.5 > Neutral	≤ -4.24	Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022).
Çoklu Özellik	PolyPhen-2	Yapı ve dizi bazlı	PSIC Skor Farkı (Δ) ~1: Probably Damaging ~0.5: Possibly Damaging ~0 : Benign	1	Adzhubei ve ark. (2013). Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022).
Çoklu Özellik	FATHMM-XF	31 özellik grubu (evrimsel korunum, epigenomik vb.)	0.5 > Pathogençc 0.5 < Benign	≥ 0.81	Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022). Fathmm-xf web sitesi
Çoklu Özellik	SNP&GO	Mutasyonlara özgü olan 50 özellik (dizi profili, PANTHER analiz veri çıktısı ve GO (Gen Ontolojisi) sınıflandırılması)	0.5 > Pathogenic 0.5 < Benign	≥ 0.86	Capriotti ve ark., (2017). Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022).

2.7. CONSURF ANALIZİ

ConSurf, yaygın olarak kullanılan, homolog diziler arasında amino/nükleik asit değişimleri sonucundaki evrimsel durumu değerlendirerek makromoleküldeki işlevsel bölgeleri meydana çıkaran bir tahmin aracıdır. ConSurf haritalama analiz aracında, çoklu dizilim hizalaması ve filogenetik ağaç adımları gerçekleştirilerek ilgili genin her bir amino asit rezidülerinin evrimsel korunma skoru (1 en az, 9 en çok korunmuş) hesaplanmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11: ConSurf Analizinde Evrimsel Korunmuşluk Seviyesi. Şekil ConSurf, 2024’den alınmıştır.

Sorgu dizilerindeki evrimleşmeye daha az duyarlı olan bölgeler işlevsel açıdan daha önemlidirler ve bundan dolayı ConSurf ile analiz gerçekleştirilmesi, makromoleküllerdeki bu sorgu dizilerinin önemli bölgelerinin belirlenmesini sağlamaktadır.

Bu analiz, yapısı bilinen makromoleküller için geçerli olmaktadır. Çünkü yapısı bilinen bir makromolekülün evrimleşmiş ve evrimleşmemiş bölgelerini ayırt etmesi, ana yapıya bakılarak belirlenebilmektedir.

Fakat sorgu dizisinin yapısı bilinmediğinde de, makromoleküller içinde her pozisyon için gömülü/açıkta olmasına bakılarak tahmin sunulmaktadır; bu, *ConSeq modu* olarak isimlendirilmektedir.

ConSurf analizinin en büyük avantajı, homolog diziler arasındaki filogenetik durumları ve sorgusu gerçekleştirilen dizilerin özgül dinamiği baz alınarak, üst düzey tahminsel evrimsel

model kullanılarak tahmin edilmesinin gerçekleştirilmesidir (Tablo 2.4) (Ashkenazy ve ark., 2016; ConSurf, 2024).

Tablo 2.4: ConSurf analizinin adımları. Tablo bilgileri ConSurf web sitesinden alınmıştır.

Adım No	İşlem
1	PDB ya da UniProt dosyasından sekansın çıkarılması
2	Dizilerin homologlarının bulunması
3	Tekrarlayan ve analize uygun olmayan dizilerin ayıklanması
4	Dizilerin hizalanması
5	En olması muhtemel evrimsel modelin seçilmesi
6	Evrimsel korunmuşluk skorlarının hesaplanması
7	Evrimsel korunmuşluk skorlarının molekül üzerine yerleştirilmesi

2.8. ERIS ANALIZI

Hastalığa neden olan varyantlara bakıldığında, birçoğunun katlanma serbest enerji farkı (ΔG_f) olarak bilinen protein termodinamik stabilitesini değiştirdiği görülmüştür. Mutant ve vahşi tip proteinler arasındaki ΔG farkının ($\Delta\Delta G_f$) *in vitro* olarak belirlenmesi, sorgulanan protein varyantlarının karakter sınıflandırılmasında oldukça önemlidir.

Birçok patojenik varyantta, destabiliteye yol açan mutasyonlar fonksiyon kaybına sebebiyet verebilirken; stabilitedeki daha düşük düzeydeki farklılıklar, protein yapısında bağlanma afinitesinde değişikliklere neden olabilmektedir. Protein stabilite analizi, hassas tıp uygulamaları açısından da oldukça değerli bir bilgi sunmaktadır. *In vitro* veriler temel alınarak geliştirilen ve mutasyon kaynaklı $\Delta\Delta G$ değerlerini yüksek doğrulukla tahmin edebilen hesaplamalı araçlar sayesinde, geniş genomik perspektifte varyant etkilerinin doğru biçimde öngörülmesi artık mümkün hâle gelmiştir (Petrasino ve ark., 2021).

Ancak, mevcut hesaplamalı yöntemler maliyetli olmasının yanı sıra, protein omurgasının esnekliği gibi önemli özellikleri göz ardı eden sınırlamalara da sahiptir.

ERIS, bir varyant üzerinde $\Delta\Delta G$ tahminini doğru ve verimli biçimde gerçekleştiren bir protein stabilite analiz aracıdır. Medusa modelleme paketi kullanımı ile proteinde oluşan mutasyonlar sonucunda indüklenen hale gelen protein kararlılığındaki değişimi ($\Delta\Delta G$)

hesaplar. Bu sistem, fiziksel kuvvet alanı, hızlı yan zincir yerleştirme ve omurga gevşetme algoritmalarını bir arada kullanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, 595 mutasyon üzerinden elde edilen veriler doğrultusunda ERIS aracının yaptığı tahminlerin *in vitro* verilerle yüksek düzeyde uyum gösterdiği görülmüştür (korelasyon katsayısı: 0.75). Bu başarının yanı sıra, ERIS'in sahip olduğu omurga gevşetme özelliği, tahmin doğruluğunu önemli ölçüde artırmaktadır (Yin ve ark., 2007a, 2007b).

Tablo 2.5: ERIS metodunun özellikleri, eşik değerleri

Metod İsmi	Özellik	Eşik Değer	Kaynak
ERIS	Medusa modelleme paketi kullanımı ile proteinde oluşan mutasyonlar sonucunda indüklenen hale gelen protein kararlılığındaki değişimi ($\Delta\Delta G$) hesaplar.	$\Delta\Delta G < 0$: Proteini stabilize eden mutasyon $\Delta\Delta G > 0$: Protein stabilitesini bozan mutasyon	ERIS web sitesi (https://dokhlab.med.psu.edu/eris/login.php)

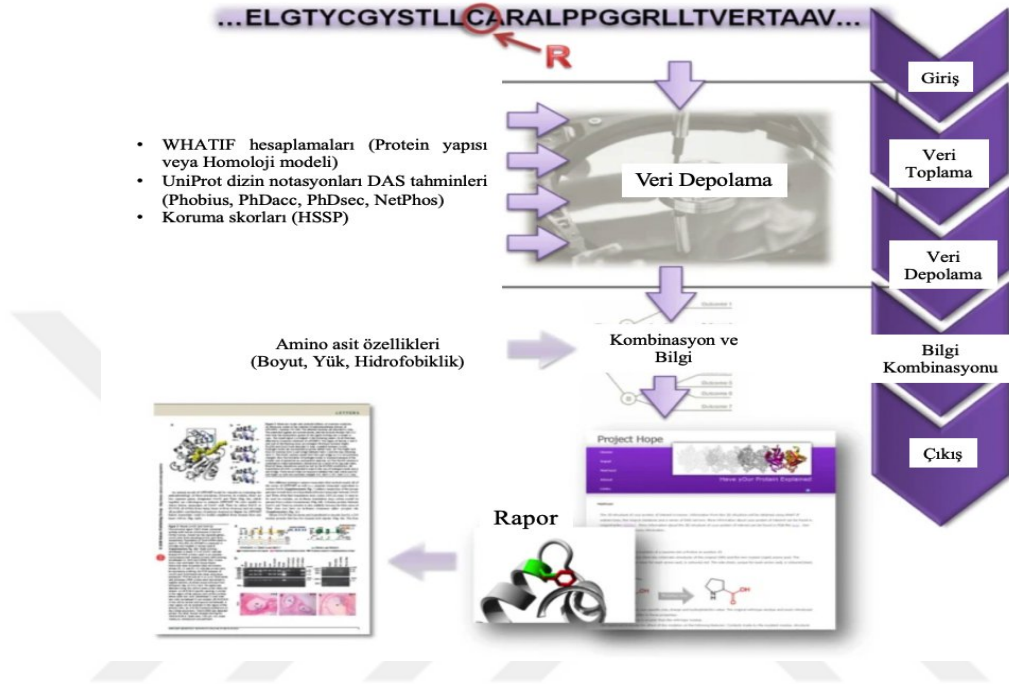
2.9. HOPE ANALIZI

HOPE, insan proteinleri üzerindeki mutasyonların analizini yapmak için tasarlanmış bir web uygulamasıdır. Mutasyonun hastalıkla ilişkisine bağlı olarak, fenotipte oluşan değişikliğin moleküler mekanizmasının açıklanması amacıyla kullanılmaktadır.

HOPE, 3B yapı verilerini PDB veri tabanından alırken, homoloji modellemesini YASARA yazılımı ile oluşturmaktadır. Bu kaynakların yanı sıra, UniProt veri tabanından sekans verilerini; DAS sunucusundan fonksiyonel tahminleri ve HSSP veri tabanından korunmuş bölgelerin bilgilerini alır.

Bu veri tabanlarından alınan bilgiler, sorgulanan proteinin yapısı üzerinde mutasyonun nasıl bir etki yaratacağını değerlendirmek amacıyla kullanılır. Bir mutasyon dizisi gönderildiğinde, ilk olarak birçok veri kaynaklarından bilgi toplanır. Bu kaynaklar arasında PDB veritabanı veya YASARA yazılımı yer almaktadır. Homoloji modellemelerinin hesaplamaları için WHAT IF bulunmaktadır. Koruma skorları için ise kullanılan kaynak HSSP ve sekans tabanlı tahminler içinde DAS-sunucuları yer almaktadır. Dizi anotasyonlarının oluşturulmasında UniProt kullanılmaktadır. Tüm bu kaynaklardan geçen veriler, HOPE bilgi sisteminde depolanarak amino asitleri bilinen bilgileri ile bir şemada birleştirilir ve mutasyonun 3B yapısına özgü rapor çıkartılır (Şekil 2.12).

Avantajları açısından bakıldığında, otomatik ve hızlı çalışması, kolay kullanılabilir bir arayüze sahip olması nedeniyle kullanıcı dostudur. Ayrıca verdiği 3B görseller sayesinde yapısal odaklı analizler sunar. PolyPhen ve SIFT gibi diğer araçlara kıyasla daha kapsamlı bilgiler sağlamaktadır (Venselaar ve ark., 2010).



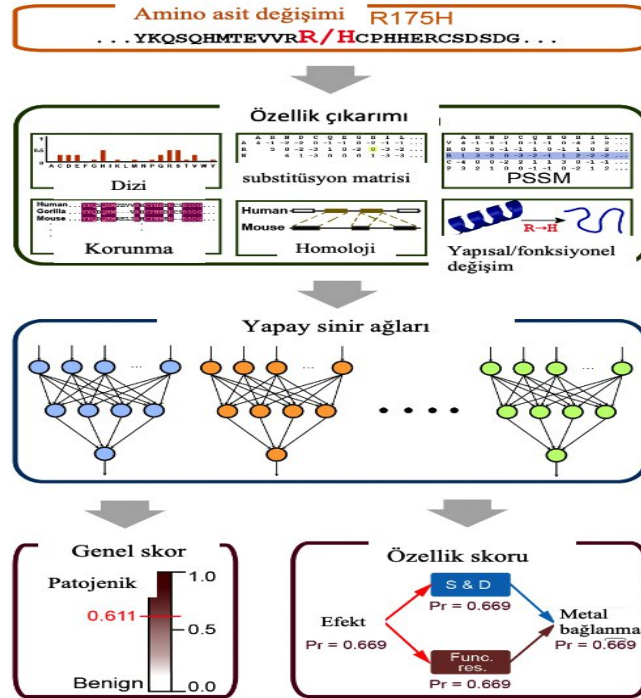
Şekil 2.12: HOPE çalışma akışına genel bakış. Şekil HOPE web sitesinden alınmıştır.

2.10. MUTPRED-2 ANALIZI

MutPred, hastalık fenotipini tahmin ederek ve nsSNP'ler ile oluşan amino asit değişimlerinin sebep olduğu moleküler mekanizmaları belirlemek amaçlı kullanılan bir in siliko aracıdır. MutPred çözünürlük kazanımı veya kaybı durumlarını, moleküler tanıma özellikleri (MoRF'ler), stabilite ve katalitik bölgeler, post-translasyonel modifikasyon bölgeleri gibi analizlerin sonuçların değerlendirilmesine yardımcı olacak bilgiler de sağlamaktadır (Dakal ve ark., 2017). Veriler, İnsan Gen Mutasyon Veritabanı (*ing.* Human Gene Mutation Database, HGMD), SwissVar, dbSNP gibi kaynaklardan elde edilmektedir.

MutPred-2 iş akışına bakıldığında, ilk olarak altı farklı özellik (dizi, substitüsyon matrisi, PSSM, evrimsel korunma, homoloji, yapısal/fonksiyonel değişim) çıkartılır. Aminoasitteki yer değişiminin sebep olduğu yapısal ve fonksiyonel farklılıklar, vahşi tip (*ing.* wild-type, WT) ve mutant dizilerin farklı tabanlı dizi analiz araçlarından geçerek iki skor (MutPred skoru, olasılık)

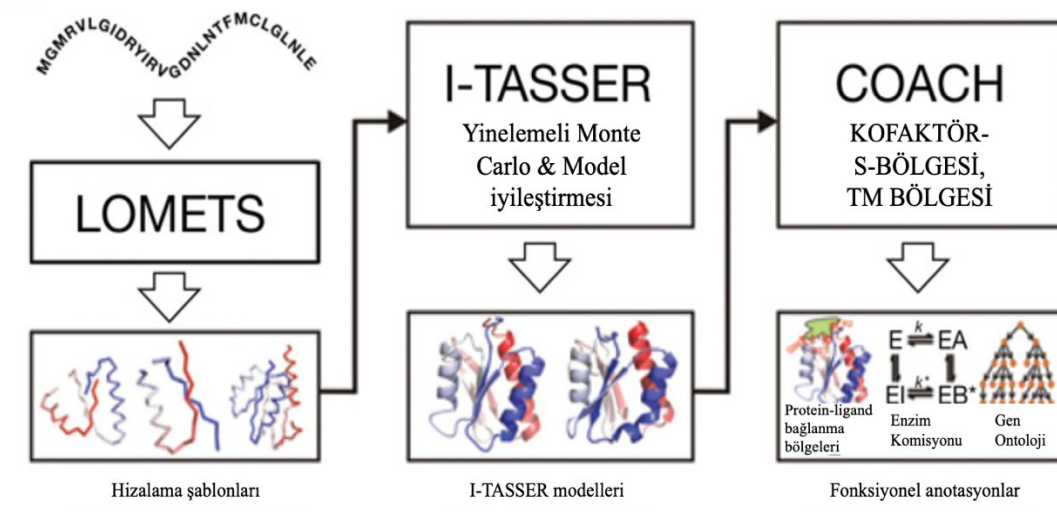
verir. Bu skorlar sonrasında birleştirilip, ilgili proteinin kaybını ve kazanımını gösteren bir sonuç listesi çıkarılır (Pejaver ve ark., 2020) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: MutPred 2 çalışma akışına genel bakış. Şekil Pejaver ve ark., 2020'den alınmıştır.

2.11. I-TASSER PROTEIN YAPI TAHMINİ

I-TASSER, hedef proteinlerin amino asit dizilerini baz alarak protein yapı tahmininde bulunan bir araçtır. Sorgulanan protein üzerinde ilk olarak çoklu hizalama analizi ve sonrasında yapısal montaj simülasyonları kullanılarak atomik düzeyde yapısal modeller oluşturulur. Bu yapısal tahminler, ilgili proteinin biyolojik fonksiyonu, bağlanma bölgeleri, Enzim Komisyonu (EC) numarası, Gen Ontolojisi (GO) terimlerini birleştirerek ve protein işlev veritabanlarına bağlı kalarak dizilim gerçekleştirip yapısal profil karşılaştırması yapmaktadır (Şekil 2.15). I-TASSER çalışma mekanizmasında ilk olarak gönderilen sorgu dizisi LOMETS (*ing.* Local Meta-Threading-Server) yazılımında PDB veritabanındaki en uygun yapı şablonunu seçer ve bir hizalama şablonu oluşturur. Hizalama şablonu oluştuktan sonra I-TASSER programında yapı modellemesi ve iyileştirmesi yapılır. Daha güvenilir uygun yapıya gelen model COACH ve E-EA'ya gönderilerek fonksiyonel özellikler tahmin edilir. Tüm bu aşamalardan sonra kapsamlı bir yapısal ve fonksiyonel anotasyon oluşturulur (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: I-TASSER iş akışına genel bakış. Şekil Yang ve Zhang, 2015’den alınmıştır.

I-TASSER sonuçlarında C-skor, TM-skor ve RMSD sonuçları yer almaktadır (Tablo 2.6) (I-TASSER; Zhang, 2008; Yang ve Zhang, 2015).

Tablo 2.6: I-TASSER aracında kullanılan metrikler, özellikleri

Metrikler	Özellik	Eşik Değer	Kaynak
C-skor (Confidence Score)	I-TASSER aracı tarafından tahmin edilen modelin güvenilirliğini gösterir.	-5 ile 2 arasında C-skor > 1.5 : Genellikle doğru katlanmış protein yapısı	Yang ve ark., 2015
RMSD (Root Mean Square Deviation)	I-TASSER aracı ile tahmin edilen yapı ile referans olarak alınan yapı arasındaki ortalama atomik mesafeyi ölçer.	Düşük olan RMSD= Daha iyi uyum.	Yang ve ark., 2015
TM-skor (Template Modeling Score)	I-TASSER aracı ile tahmin edilen protein yapısının, referans olan yapıya benzerliğini ölçer.	0 ile 1 arasında TM-skor > 0.5 : Doğru katlanmış protein yapısı TM-skor < 0.17 : Gelişigüzel benzerlik düzeyinde.	Yang ve ark., 2015

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, birçok farklı adım izlenerek ve çoklu hesaplamalı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temel olarak yöntem, yedi alt bölüme ayrılmaktadır: TGFβ1 proteinin nsSNP verilerinin alınması, patojenik/zararlı gen varyantlarının in silico araçlarla tahmini, evrimsel koruma analizi, protein stabilite analizi, yapısal etki analizi, fonksiyonel ve yapısal özellik analizi, 3B yapı modelleme.

3.1. VERİ MADENCİLİĞİ

TGFβ1 geninin belirsiz klinik öneme sahip nsSNP'leri hakkında bilgi edinmek için genin MANE tarafından belirlenen referans transkripti ve protein dizisi kullanılmıştır. Genin bu bilgileri şu dört veri tabanında kullanılmıştır: NCBI gen ve nükleotid veri tabanları (Brown ve ark., 2015), ClinVar (Landrum ve ark., 2018) ve UniProt (UniProt Konsorsiyumu, 2023). Bu kaynaklar, genler, transkriptler, protein yapısı, proteinin fonksiyonu gibi farklı türlerdeki mutasyonlar ve moleküler sonuçlar hakkında çok büyük bilgilere erişim sağlamaktadır.

3.2. ULUSAL BIYOTEKNOLOJİ BİLGİ MERKEZİ (NCBI)

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI), Ulusal Sağlık Enstitüleri'ndeki (ing. National Institutes of Health, NIH) Ulusal Tıp Kütüphanesi bünyesindeki bir merkez olan ve biyoteknoloji, moleküler biyoloji, biyoinformatik ve genomik çok çeşitli bilgilere ulaşım sağlayan geniş kapsamlı bir veritabanıdır. NCBI veritabanı 1988 yılında moleküler biyoloji alanı için bilgi sistemleri oluşturmak amacıyla kurulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında, insan TGFβ1 geninin NCBI RefSeq NP_000651.3 (protein), NM_000660.7 (nükleotid) ve ENST00000221930.6 Ensembl ID numaralı transkripti baz alınmıştır (Tablo 2.1) ve TGFβ1 genine (Gen ID: 7040) ait nükleotid sekans bilgileri, NCBI tarafından sürdürülen Entrez Gene veritabanından elde edilmiştir (bkz. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

3.2.1. nsSNP Verilerinin ClinVar Veritabanından Elde Edilmesi

ClinVar veritabanı (bkz. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), insanda bulunan genetik varyantları ile bu varyantların genetik hastalıklarla ilişkisine dair verileri ve yorumları yer alan NCBI tarafından yürütülmekte olan veritabanıdır (Xiao ve ark., 2021). ClinVar veritabanında varyantların çalışması yapılırken belirli filtreleme seçenekleri bulunmaktadır. Bu filtreler şu

şekildedir: Klinik önem derecesine göre olan başlıklar (çelişkili yorumlar, iyi huylu, muhtemelen iyi huylu, belirsiz anlamlılıkta, muhtemelen patojenik ve patojenik), çelişki türlerine göre başlıklar (P/LP vs LB/B, P/LP vs VUS, VUS vs LB/B), moleküler sonuçlarına göre başlıklar (frameshift, missense, nonsense, splice bölgesi, ncRNA, gen yakınında, UTR), varyasyon türüne göre başlıklar (delesyon, duplikasyon, indel, inseryon, tek nükleotid), varyasyon boyutuna göre başlıklar (kısa varyant & yapısal varyant), varyant uzunluğuna göre başlıklar (<1Kb, >1Kb, >1Kb ve birden fazla geni etkileyen) ve inceleme durumuna göre olan başlıklar (uygulama rehberi, uzman paneli, birden fazla gönderen, tek gönderen, en az bir yıldız, çelişkili yorumlar). Bu tez çalışmasında, 18.09.2024 tarihinde TGFβ1 genine ait nsSNP'lerin verilerini almak için ClinVar veritabanı (bkz. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) kullanılmıştır. TGFβ1 geninin NCBI RefSeq NP_000651.3 (protein) numaralı proteini üzerinde çalışılmıştır. Aramalar kısmına TGFβ1 geninin ismi yazılarak, filtreleme kısmından missense, tek nükleotid varyantlar ve klinik önemi belirsiz varyantlar seçilmiştir. Çıkan sonuçlar excel dosyasına indirilmiştir.

3.2.2. Proteinin Yapı ve İşlev Bilgilerinin UniProt Veritabanından Alınması

UniProt veritabanı, protein dizisi, yapısı ve biyolojik işlevi hakkında bilgi veren bir veritabanıdır (bkz. <https://www.uniprot.org/>). Bu veritabanındaki veriler, literatüründen, hesaplamalı analiz yöntemlerinden ve diğer açık erişimli olan veritabanlarından elde edilmektedir (The UniProt Consortium, 2019). UniProt Bilgi Bankası (UniProtKB) iki bölümden oluşmaktadır: Çalışması yapılmış protein kayıtlarının bulunduğu UniProtKB/Swiss-Prot ve otomatik sistemlerle oluşturulan açıklamalara sahip kayıtların bulunduğu UniProtKB/TrEMBL. Swiss-Prot kısmındaki her protein girdisi, deneysel olarak doğrulanmış ya da hesaplamalı analizler doğrultusunda tahmin edilmiş işlevsel bilgiler bulundurmaktadır (The UniProt Consortium, 2019). 28.09.2024 tarihinde İnsan TGFβ1 proprotein yapısına ait amino asit dizisi UniProt tabanından (UniProt ID: P01137) FASTA formatında indirilerek elde edilmiştir (EK-2).

3.3. TGFB1 NSSNP VERİLERİNİN İN SILIKO ARAÇLARLA PATOJENİTE TAHMİNİ ANALİZİ

ACMG kriterlerine göre, eğer çalışmada kullanılan tüm in siliko araçları aynı tahmini çıkarıyorsa, bu uyumun destekleyici bir kanıt olarak kabul edilebileceğini; ancak bu in siliko araçların çıktıları birbiriyle uyumsuzsa, bu tahmin bilgisinin varyant sınıflandırmasında önemsenmemesi gerektiğini belirtmiştir (Amendola ve ark., 2016; Richards ve ark., 2015).

TGF β 1 genine ait nsSNP'lerin in siliko analizlerle patojenik varyantların belirlenebilmesi için beş ayrı in siliko aracı (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO) kullanılmıştır. Bu beş in siliko aracının her birinde Tablo 2.3'te belirtilen baz alınan eşik değerlere göre patojenik sınıflandırması yapılmıştır.

3.3.1. SIFT İn Siliko Aracı ile Analiz

SIFT (*bkz.* <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), bir protein dizisinin değişmesi durumunda patojenik olarak etki edip etmediğinin tahminini yapmaktadır (Ng & Henikoff, 2003). SIFT in siliko aracının çalışma düzeni birçok özelliğe (evrimsel korunmuşluk, dizi homolojisi ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine) dayanmaktadır. Bu in siliko aracında, amino asitte gerçekleşen değişikliğin tolerant mı yoksa zararlı mı olabileceği tahmin edilir. Tahmin sonuçları, 0 ile 1 arasında değişmekte olup bir tolerans indeksi (ing. Tolerance Index, TI) skoru üzerinden gerçekleşmektedir. Bu TI skor 0.05 veya daha düşük olduğu durumlarda ilgili genin amino asitinde gerçekleşen değişiklik “Deleterious” olarak kabul edilir. SIFT sunucusu, iki farklı çalışma grubu için araç sunmaktadır: Genom araçları (tek nükleotid varyantı/SNV ve indel tahmini) ve Tekil protein araçları (SIFT Sequence, SIFT Related Sequence, SIFT Aligned Sequences). Bu sunulan araçların her birinde farklı veri girişleri bulunmaktadır (Sim et al., 2012). Bu çalışmada, 6.10.2024 tarihinde Genom için SIFT aracı kullanılmış, TGF β 1 protein dizisi FASTA formatında yüklenmiş ve ClinVar veritabanından elde edilen amino asit değişimleri SIFT aracına girilmiştir. Çıkan analiz sonuçları Tablo 2.3'te yer alan SIFT eşik değerine göre (≥ 0.001) nsSNP'ler patojenik olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. PROVEAN İn Siliko Aracı ile Analiz

PROVEAN (*bkz.* <http://provean.jcvi.org/index.php>), proteinler üzerindeki amino asit değişimlerinin veya indel türü varyantları tahmin etmeye yarayan in siliko aracıdır. Sonuçlar PROVEAN aracının skoruna göre değişmekte olup eşik değer -2.5'tir. Skor ≤ -2.5 ise amino asit değişimi için “Deleterious” > -2.5 ise “Neutral” sonuç vererek tahmin oluşturmaktadır (Choi ve Chan, 2015). Bu tez çalışmasında, 22.10.2024 tarihinde PROVEAN ara yüzünde “PROVEAN Protein Batch”, “ Human” filtreleme seçeneği üzerinden çalışması yapılmıştır. Giriş bilgilerine ClinVar veritabanından alınan TGF β 1 genine ait istenilen formatta nsSNP varyant bilgileri girilmiştir. Çıkan analiz sonuçları hem PROVEAN hem SIFT sonuçlarını vererek Tablo 2.3'te yer alan PROVEAN baz alınan eşik değerine göre (≥ -4.24) nsSNP'ler patojenik olarak değerlendirilmiştir.

3.3.3. PolyPhen-2 İIn Siliko Aracı ile Analiz

PolyPhen-2 (bkz. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) makine öğrenimi temelli olup nsSNP'lerin protein üzerindeki fonksiyonel etkilerini tahmin etmek için yapısal analiz yapmaktadır. Polyphen-2, iki temel yaklaşımla tahmin yapmaktadır. Bunlardan ilki, homolog protein dizilerini hizalı hale getirip evrimsel açıdan korunmuş amino asit pozisyonlarını belirleyerek, ilgili her varyant için pozisyona özgü bağımsız sayımlar (PSIC) skorlarını belirleyen yaklaşımdır. İkincisi yaklaşım ise, proteinin bilinen 3B yapılarıyla ilgili varyantların protein yapısı ve stabilitesi üzerindeki durumlarını çalışan daha çok yapı tabanlı yaklaşımdır (Adzhubei et al., 2010). PolyPhen-2 her varyant için 0 ile 1 arasında bir skor üreterek burada 1 skoru, en yüksek zararlılığı göstermektedir. PolyPhen-2 aracında tahmin sonuçları kendi algoritmasında iki ayrı modelle sunulur: HumDiv modeli nadir varyantların incelenmesi ve doğal seçilim analizi çalışmaları için ve HumVar modeli ise Mendeliyen hastalıklarında tanı amaçlı kullanılır. Bu çalışmada, 15.11.2024 tarihinde PolyPhen-2 in siliko aracı kullanılarak, TGFβ1 protein dizisi (FASTA formatında, ID: P01137) ve 170 nsSNP'ye ait amino asit değişiklikleri ayrı ayrı girilmiştir. Tablo 2.3'te belirtildiği üzere sadece HumDiv skoru 1 olan varyantlar, patojenik olarak değerlendirilmiştir.

3.3.4. Fathmm-xf İIn Siliko Aracı ile Analiz

Fathmm-xf (bkz. <https://fathmm.biocompute.org.uk/fathmm-xf/>), SNP üzerinde kodlanan bölgelerde yüksek doğruluk içeren (0.88) tahminler oluşturmaktadır. Her bir tahminine bir p-skoru atayarak yorumlama analiz kısımlarında yüksek güvenlik sağlanır. Fathmm-xf in siliko aracında eşik değer 0.5 olarak kabul edilmektedir. Eğer sonuç > 0.5 ise "Pathogenic", < 0.5 ise "Benign" olarak sonuç vermektedir (Rogers ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında, 12.12.2024 tarihinde giriş bilgileri olarak GRCh38/hg38 formatında hazırlanan VCF dosyası kullanılmıştır. Çıkan analiz sonuçları Tablo 2.3'te yer alan Fathmm-xf eşik değerine göre (≥ 0.81) nsSNP'ler patojenik olarak değerlendirilmiştir.

3.3.5. SNP&GO İIn Siliko Aracı ile Analiz

SNPs&GO (bkz. <https://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>), patojenite ile ilişkili varyantları tahmin etmek için kullanılan araçtır. Bu araç, proteinlerin işlevsel anotasyonlarını ve Gen Ontolojisi (GO) verilerini ele alarak tahmin yapan bir Destek Vektör Makinesi (SVM) tabanlıdır. Sonuç çıktıları arasında her varyant için "Benign" ve "Pathogenic" ifadesini belirtir ve bu tahmin sonucunun yanında her tahminle birlikte güven skoru (RI) da sunulur (Capriotti et al., 2013). ClinVar veritabanından alınan nsSNP verilerinin patojenik olan

varyantlarının belirlenmesi için bu in siliko aracı kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında, 29.12.2024 tarihinde TGFβ1 protein dizisi, tüm varyantlarla birlikte SNPs&GO aracına yüklenmiş ve sadece Tablo 2.3'te belirtildiği üzere ≥ 0.86 eşik değerine sahip nsSNP varyantları patojenik olarak değerlendirilmiştir.

3.4. EVRİMSEL KORUNMA, FONKSİYON, STABİLİTE, YAPI MODELLEMESİ ANALİZİ

Genetik varyantlar, proteinde birçok etkeni (protein stabilitesi, fonksiyonel bozulma, yapısal bozulma korunmuşluk vs.) değiştirebilir. Artık değişen bilimle, genetik araştırmalara yardımcı olmak için makine öğrenimi kullanılmaya başlanmıştır. Bu makine öğrenimi yöntemleri, özellikle nadir görülen genetik varyasyonları analiz etmek ve birçok hastalığın patojenik etkilerini belirlemek, klinik önemi bilinmeyen varyantların etkilerini değerlendirmek için faydalı olmaktadır. (Niroula & Vihinen, 2016). Bu nedenle, bu tez çalışmada makine öğrenimi temelli olan MutPred-2 sunucusu ve ERIS, ConSurf, I-TASSER sunucuları TGFβ1 genine ait klinik önemi belirsiz varyantların protein stabilitesi ve fonksiyonel ve yapısal özelliklerin değişimleri üzerindeki etkilerini araştırmak için kullanılmıştır.

3.4.1. ConSurf Amino Asit Evrimsel Korunmuşluk Analizi

Bir proteinin yapı ve fonksiyonu ile amino asit kalıntılarının evrimsel korunması ile sıkı bir ilişkisi olabilir. Bu evrimsel korunma seviyesi, aynı protein ailesine mensup olan üyeler arasında homolog dizilerinden yola çıkarak yapılan pozisyonel korunum çalışmalarıyla da ortaya çıkarılabilir. ConSurf sunucusu (*bkz.* https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php), homoloji dizilerinden yola çıkarak filogenetik bağlantılar üzerinden her bir amino asit (veya nükleik asitlerdeki her bir nükleotid) için evrimsel korunum analizi yapmaya yaramaktadır (Glaser ve ark., 2003). Bu web sunucusuna giriş bilgisi olarak, protein dizisi veya yapısı (PDB formatında) yüklenmektedir. ConSurf analizinin korunma skorlarına bakıldığında, maksimum olasılık (ML) veya ampirik Bayes algoritmalarıyla hesaplaması sağlanır ve bu tür yöntemler, ConSurf sunucusunun diğer yöntemlere göre daha yüksek doğruluk sağlamasında artı olarak görülmektedir (Ashkenazy ve ark., 2016). ConSurf analizinin skorları 1-9 arası verilmektedir. Bu skora göre 9, en yüksek korunum düzeyini belirtir. Bu tez çalışmasında, TGFβ1 proteininin her bir amino asit rezidülerinin korunum düzeyi 15.01.2025 tarihinde ConSurf sunucusu kullanılarak tahmin edilmiştir. Böylece patojenik olarak belirlenen nsSNP'lerin yüksek derecede korunan amino asit rezidülerinde bulunup bulunmadığı analiz edilmiştir.

3.4.2. ERIŞ Protein Stabilite Analizi

ERİŞ (*bkz.* <https://dokhlab.med.psu.edu/eris/login.php>), bir varyant üzerinde $\Delta\Delta G$ tahminini doğru ve verimli biçimde gerçekleştiren bir protein stabilite analiz aracıdır. Medusa modelleme paketi kullanımı ile proteinde oluşan mutasyonlar sonucunda indüklenen hale gelen protein kararlılığındaki değişimi ($\Delta\Delta G$) hesaplar. Bu sistem, fiziksel kuvvet alanı, hızlı yan zincir yerleştirme ve omurga gevşetme algoritmalarını bir arada kullanmaktadır. ERİŞ sunucusu sonucuna göre, $\Delta\Delta G < 0$ ise proteinin stabilitesinde değişkenlik olmadığı, $\Delta\Delta G > 0$ ise protein stabilitesinde değişkenlik olduğunu gösterir (Yin, Ding, & Dokholyan, 2007a, 2007b; Ding & Dokholyan, 2006). Bu tez çalışmasında 29.01.2025 tarihinde TGF β 1 geninin patojenik nsSNP'lerinin protein stabilitesindeki değişimi incelemek amacıyla ERİŞ sunucusu kullanılmıştır. Giriş bilgileri için Alpha Fold veritabanından PDB dosyası (AF-P01137-F1-v4) indirilmiştir. Sorgu gönderiminde tahmin metodu “esnek omurga” ve “omurga ön gevşemesi” kabul edilmiştir. Çıkan analiz sonuçları Tablo 2.5'te yer alan eşik değerlere göre stabilitesi değerlendirilmiştir.

3.4.3. HOPE Yapısal Etki Analizi

HOPE sunucusu (*bkz.* <https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>), insan proteinleri üzerindeki varyantların analiz çalışmalarını yapmak için kullanılan bir biyoinformatik web uygulamasıdır. Varyantın hastalıkla olan ilişkisine bağlı olarak, fenotipte oluşan herhangi bir değişikliğin moleküler mekanizmasının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. HOPE sunucusu, 3B yapı verilerini PDB veri tabanından alırken, homoloji modellemesini ise YASARA yazılımı ile oluşturmaktadır. Bu kaynakların yanı sıra, UniProt veri tabanından sekans verilerini; DAS sunucusundan fonksiyonel tahminleri ve HSSP veri tabanından korunmuş bölgelerin bilgilerini almaktadır (Venselaar ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında 15.02.2025 tarihinde, TGF β 1 geninin hastalıkla ilişkili nsSNP'lerinin vahşi tip varyanta göre yapı büyüklüğü, akımı, polaritesindeki durumunu incelemek amaçlı HOPE aracı kullanılmıştır. Analiz kapsamı sırasında, her bir patojenik olarak belirlenen nsSNP varyant için referans (vahşi tip) ve değişen (mutant) TGF β 1 FASTA dizisi ve UniProt ID: P01137 ile HOPE aracına bilgileri girilmiştir. HOPE aracı, bu giriş bilgileri ile, TGF β 1 geninin patojenik nsSNP varyantlarının yapısında boyutlarındaki, yüklerindeki, polaritesindeki, konformasyonel yapısındaki değişimler üzerinde çalışılarak sonuç çıkarılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen bu sonuçlar, patojenik varyantların vahşi tip varyantlara göre moleküler etkilerinin değişimini açıklamıştır. HOPE analizi ile, ilgili TGF β 1 nsSNP patojenik varyantların yapısal değişimi detaylı çalışılmıştır.

3.4.4. MutPred-2 Fonksiyonel Bozulma ve Patojenite Analizi

TGF β 1 proteininin yapısal ve işlevsel özellikleri üzerindeki nsSNP'lerin yattığı etkiyi analiz etmek amacıyla MutPred2 in siliko aracı (bkz. <http://mutpred.mutdb.org/>) kullanılmıştır. MutPred2 aracı, patojenik etki gösteren varyantları ortaya çıkarmak üzere geliştirilmiştir ve makine öğrenimine dayalı bir web aracıdır. (Pejaver ve ark., 2020). MutPred-2 ayrıca varyantların hastalık etkenlerinin nedeni olabilecek moleküler mekanizmalar hakkında da bilgi vermektedir. MutPred2 aracı tahminlerini yaparken şu özelliklere bakmaktadır: DNA bağlanma lokasyonlarında herhangi bir değişiklik, halka/heliks yapılarının kaybı durumu veya PTM (post-translasyonel modifikasyon) bölgelerinde oluşan kayıp gibi yapısal ve işlevsel özellikler. Bu tez çalışmasında, TGF β 1 proteininin amino asit dizisi (ID: P01137) ve genin nsSNP'lere ait amino asit değişimleri 10.03.2025 tarihinde MutPred2 aracına yüklenmiş ve bu mutasyonların protein fonksiyonları üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır P-değeri 0.05 kabul edilmiştir.

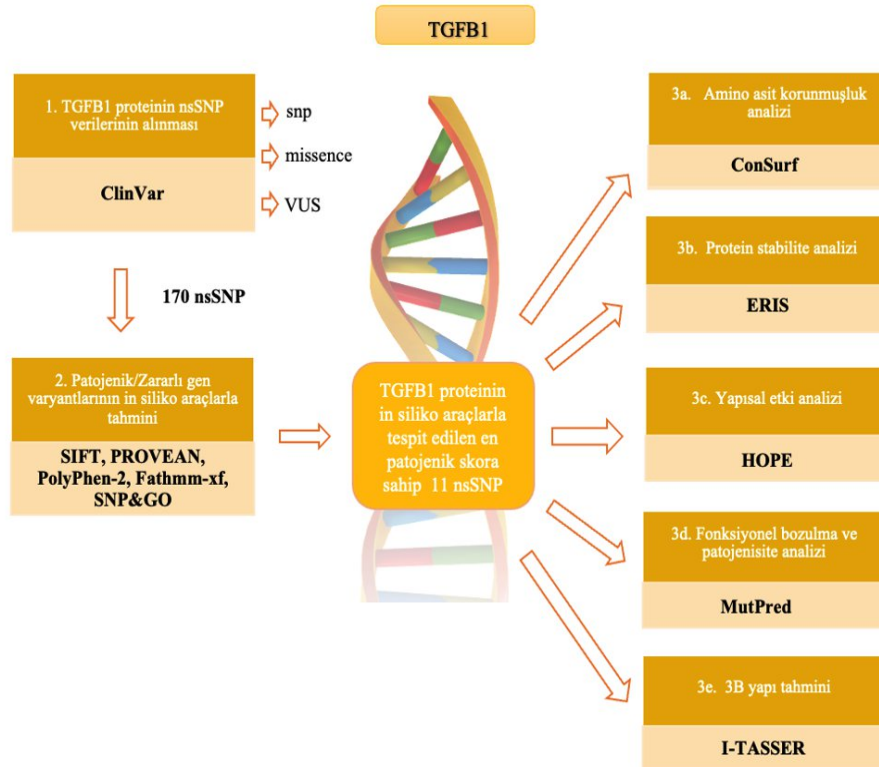
3.4.5. I-TASSER 3B Yapı Tahmini

I-TASSER yapı tahmini aracı (bkz. <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), proteinlerin 3B yapılarının tahmininde kullanılan bir biyoinformatik web sunucusudur. Çalışma mekanizması öncelikle, LOMETS adı verilen çoklu eşleme yöntemiyle Protein Veri Bankası (ing. Protein Data Bank, PDB) veritabanından ilgili yapısal olarak şablonları ayıklar ve sonrasında şablonu baz alarak tam uzunlukta atomik model oluşturmak için parça montaj simülasyonları kullanmaktadır. Elde edilen 3B yapı modelleri kullanılarak BioLip veritabanı ile protein fonksiyonu tahmin edilmektedir (J. Yang & Zhang, 2015). I-TASSER, her bir protein girdisi için 5 farklı yapı sağlamakta olup ve her oluşturulan yapı için -5 ile 2 arasında değişen bir C-skoru çıkartır. Bu C-skoru ne kadar yüksek olursa oluşturulan modelin doğruluğu da o kadar yüksek sonucu anlaşılmaktadır. Bu tez çalışma kapsamında, I-TASSER sunucusuna TGF β 1 proteininin WT ve mutant sekansları ayrı ayrı gönderilmiştir. Ancak bu I-TASSER sunucusu sadece bir sekansın gönderilmesini kabul ettiği için yapısal modelleme süreci 20.04.2025 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BULGULARIN GENEL ÖZETİ

Bu tez çalışmasının bulgularının genel bir özeti olarak, Şekil 4.1. bu çalışmanın analiz sürecini ve patojenik varyantların bulgularını göstermektedir. Çalışmada ilk olarak; NCBI, UniProt, ClinVar veri tabanlarından veri madenciliği yapılarak belirsiz klinik anlam taşıyan varyantlar, TGFβ1 protein dizisi ve MANE transkripti elde edilmiştir. ClinVar veritabanında, missense, SNV ve klinik anlamı belirsiz varyantlar için filtreleme seçildikten sonra, ClinVar veri tabanından TGFβ1 genine ait 170 VUS belirlenmiş olup ve bu nsSNP varyantları farklı amaçlı in siliko analizler için kullanılmıştır. Bu 170 nsSNP, homoloji/yapı/çoklu özellik gösteren in siliko tahmin yöntemleri (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO) ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.1: TGFB1 Genine Ait nsSNP Varyantlarının İn Siliko Analiz Süreci

Bu analiz sonucunda toplam 11 nsSNP'nin patojenik olduğu belirlenmiştir. Bu belirlenen varyantlar AlphaMissence veritabanında da doğrulanmıştır. Bu patojenik olarak belirlenen 11 varyantın fonksiyonel ve yapısal etkileri (HOPE, MutPred-2) protein stabilitesi (ERIS), evrimsel korunmuşluk düzeyi (ConSurf) ve 3B tahmin yapıları (I-TASSER) araçları kullanılmıştır.

4.2. VERİ MADENCİLİĞİ

Veri madenciliği analiz sürecinde, TGFβ1 proteinine ve transkriptine ait tüm bilgiler NCBI-Entrez Gen veri tabanlarından elde edilmiştir. Bu veri tabanlarına göre TGFβ1 geni (ID: 7040), 2.780 baz çifti (bp) uzunluğunda olup 19q13.2 kromozom lokasyonunda yer almaktadır. Genin farklı transkriptleri bulunmakla birlikte, bu tez çalışmasında TGFβ1 bilinen 1 adet izoformu bulunmakta ve buna karşılık gelen transkript varyantı olan NM_000660.7 (2780 nükleotid) baz alınarak çalışılmıştır. Bu transkript 7 ekzon içermektedir ve toplamda 390 amino asit uzunluğunda olan TGFβ1 proteini (NP_000651.3) sentezlenmektedir. TGFβ1 proteininin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine dair bilgi edinmek için UniProtKB veri tabanı kullanılmış ve proteinin 30-74. pozisyonları arasında straightjacket domain, 75-271 arasında arm domain, 226-252 aralıklarında bowtie tail, 244-246 arasında hücre bağlanma bölgesi olduğu tespit edilmiştir. TGFβ1 genine ait klinik anlamı belirsiz genetik varyantlar, 18 Eylül 2024 tarihinde ClinVar veri tabanından elde edilmiştir. Varyantlar filtreleme seçeneklerinden missense, tek nükleotid varyant, VUS seçilmiştir ve in siliko analiz için 170 nsSNP seçilmiştir. Elde edilen TGFβ1 protein dizisi (P001137) ve bu 170 nsSNP, tez çalışmasında TGFβ1 genine ait patojenik potansiyel varyantları belirlemek amacıyla kullanılan tüm analizlerde temel veri setini oluşturmuştur. Patojenik varyantlar belirlenirken baz alınan eşik değerlerin optimizasyon çalışması yapılmadan her in siliko aracında da ortak patojenik çıkacak eşik değerler manuel olarak belirlenip Tablo 2.3'te belirtilmiştir.

4.3. TGFβ1 nsSNP'LERİNİN BELİRLENMESİ

TGFβ1 genine ait 170 nsSNP içerisinde, beş farklı in siliko aracıyla (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO) patojenik varyantlar seçilmiştir ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Bu havuzdaki nsSNP varyantları daha ileri ek analizlerde incelenecektir. Bu yapılan analiz sonucu elde edilen tüm 170 varyantlara ait bilgiler EK-3 kısmında tablo hâlinde sunulmuştur.

4.3.1. İn Siliko Araçlarla 170 TGFβ1 nsSNP'nin Değerlendirilmesi

ClinVar veritabanından elde edilen 170 nsSNP, in siliko tahmin araçları olan SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO aracına analiz için gene ve varyanta ait bilgiler gönderilmiştir. Bu in siliko araçlardan SIFT, 82 varyantı “Damaging” olarak tahmin etmiştir. SIFT in siliko aracı tahminlerini yaparken 0 ile 1 arasında değişen tolerans indeksi (TI) skorlarına göre yapmaktadır. Bu belirtilen değerin 0.05 veya daha düşük olması, ilgili varyantın zararlı olduğunu göstermektedir. PROVEAN aracı, 60 nsSNP’yi “Deleterious” olarak tahmin etmiştir. PROVEAN aracının skorunun eşik değeri -2.5’tir. $\text{Skor} \leq -2.5$ ise amino asit değişimi zararlı >-2.5 ise nötr olarak değerlendirilir. PolyPhen-2 aracı, 78 nsSNP’yi “Probably damaging” ve 21 nsSNP’yi “Possibly damaging” olarak belirlemiştir. PolyPhen-2 aracı, her varyant için 0 ile 1 arasında bir tahmin skoru üretir; tahmin skoru 1’e yakın olan varyantlar "Probably damaging", 0.5 civarı olanlar "Possibly damaging", skoru sıfıra yakın olanlar ise "Benign" olarak değerlendirilir. Fathmm-xf aracı, 63 nsSNP’yi “Pathogenic” olarak tahmin etmiştir. Fathmm-xf in siliko aracında eşik değer 0.5 olarak kabul edilmektedir. Eğer analiz sonucu >0.5 ise “Pathogenic”, <0.5 ise “Benign” olarak sonuç vermektedir. SNPs&GO analizinde ise varyantlar “Benign” ya da “Pathogenic” olarak sınıflandırılmış ve her biri için tahminin güvenilirliğini belirten bir Güvenilirlik İndeksi (RI) verilmiştir. Bu araçlarla yapılan analizde SNPs&GO, 84 nsSNP’yi “Pathogenic” olarak tahmin etmiştir. Bu çalışmada, SNPs&GO ≥ 0.081 skorlar değerlendirilmiştir.

Bu araçların tahminlerine göre, SIFT skoru 0.001, PROVEAN skoru, ≥ -4.24 , PolyPhen-2 skoru 1, Fathmm-xf skoru ≥ 0.81 ve SNP&GO skoru olarak ≥ 0.86 patojenik varyantlar olarak seçilmiştir. Belirlenen bu kriterler sonucunda, başlangıçtaki 170 varyanttan 11 nsSNP, zararlı TGFβ1 nsSNP’lerine dahil edilmiştir (Tablo 4.1). Bu 11 nsSNP şunlardır: V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S. Tüm bu varyantlar Tablo 2.3’te de belirtildiği üzere eşik değerlerin optimizasyon çalışması yapılmadan in siliko araçlarında ortak olarak yüksek patojenite skoru veren varyantlar seçilmiştir.

Tablo 4.1:Kullanılan in siliko araçlarla analiz edilen ve yüksek patojeniteye sahip olduğu belirlenen varyantların skorları

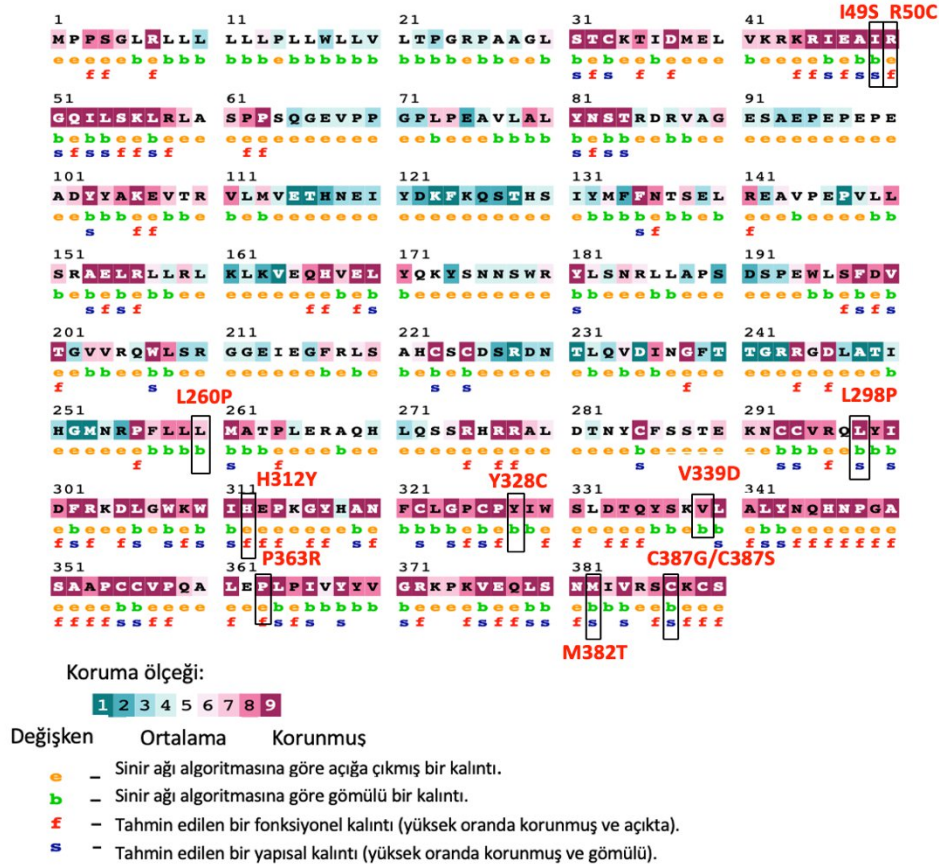
Varvasyon ID	Varyant	SIFT	PROVEAN	Polyphen-2 HumDiv	Fathmm-xf	SNP&GO	Hastalık İlişkisi
2113033	V339D	0.000	-5.18	1.000	0.96	0.95	belirtilmemiş
1916238	P363R	0.001	-7.00	1.000	0.92	0.86	belirtilmemiş
1908752	M382T	0.000	-4.50	1.000	0.88	0.95	belirtilmemiş
2073996	C387G	0.000	-8.48	1.000	0.93	0.93	belirtilmemiş
1061718	H312Y	0.000	-5.07	1.000	0.92	0.93	belirtilmemiş
1506364	L298P	0.000	-6.10	1.000	0.90	0.98	belirtilmemiş
1490438	L260P	0.000	-4.34	1.000	0.85	0.95	belirtilmemiş
2760940	Y328C	0.000	-7.29	1.000	0.82	0.95	belirtilmemiş
2983733	R50C	0.000	-5.66	1.000	0.85	0.93	belirtilmemiş
1956397	I49S	0.000	-4.24	1.000	0.94	0.95	belirtilmemiş
2696192	C387S	0.000	-7.12	1.000	0.81	0.95	belirtilmemiş

4.4. CONSURF EVRİMSEL KORUNMUŞLUK ANALIZI

ConSurf sunucusu, UniProt kimliği P01137 olan TGFβ1 gen dizisinin gönderilmesiyle analizi yapılmış ve her bir varyantın amino asit kalıntısının evrimsel korunmuşluk seviyesiyle ilgili sonuçlar elde edilmiştir. ConSurf sunucusunun analiz çıktıları, TGFβ1 proteinine ait 390 amino asit kalıntısının her biri için 0 ile 9 arasında evrimsel koruma skoru verilmiş ve farklı renklerle gösterilmiş bir korunmuşluk profili sunmakta olup bu skora ise “korunmuşluk düzeyi skoru” denilmektedir (Şekil 4.2).

Ayrıca, ConSurf sunucusu her bir varyantın amino asit için rezidüsünün lokasyonu ile ilgili bilgi de sağlamaktadır. Eğer rezidü protein yüzeyindeyse “açığa çıkmış kalıntı (exposed

residue) (e)", nukleusta yer alıyorsa "gömülü kalıntı (buried residue)" (b)", hem yüksek korunmuş hem de yüzeydeyse "yüksek derecede korunmuş ve açıkta (highly conserved and exposed)" (f)", hem yüksek korunmuş hem de gömülü konumdaysa ise "yüksek derecede korunmuş ve gömülü (highly conserved and buried) (s)" olarak sınıflandırılmaktadır. Ortalama olarak evrimsel korunmuşluk skoru 5 olarak belirlenip, 9 korunmuşluk skoru yüksek derecede korunmuş kalıntıları belirtmektedir.



Şekil 4.2: TGFβ1 Protein Varyantlarının Evrimsel Korunmuşluk Analizi

İn siliko araçlarla patojenik tespit edilen 11 varyantın bulunduğu TGFβ1 proteinine ait kalıntıların evrimsel korunmuşluk skorları Tablo 4.2’de belirtilmiştir. Bu tabloya göre, bu 11 varyanttan 3’ü, 7 ve 8 yüksek korunmuşluk skoruna sahip konumlarda yer almaktadır. V339D, Y328C 8 skoruna ve L260P varyantı ise 7 korunmuşluk skoruna sahip olup protein çekirdeğinde konumlanmış kalıntılardır. Geriye kalan patojenik varyantlar ise 9 korunmuşluk skoruna sahiptir ki bu, ConSurf web sunucusu tarafından belirlenen en yüksek korunmuşluk skorunu belirtmektedir. Bu skordaki varyantlar, yüksek korunmuş ve yüzeyde konumlanan kalıntılar (P363R, H312Y, R50C) ile yüksek korunmuş ve gömülü konumdaki kalıntılar (M382T, C387G, L298P, I49S, C387S) olarak sınıflandırılması yapılmıştır.

Tablo 4.2. ConSurf sunucusu tarafından tahmin edilen TGF β 1 geninin 11 patojenik varyanta ait kalıntılarının korunma skorları

Varyant	Korunma Skoru	Tahmin
V339D	8	Gömülü amino asit kalıntısı
P363R	9	Yüksek oranda korunmuş ve açıkta
M382T	9	Yüksek oranda korunmuş ve gömülü
C387G	9	Yüksek oranda korunmuş ve gömülü
H312Y	9	Yüksek oranda korunmuş ve açıkta
L298P	9	Yüksek oranda korunmuş ve gömülü
L260P	7	Gömülü amino asit kalıntısı
Y328C	8	Gömülü amino asit kalıntısı
R50C	9	Yüksek oranda korunmuş ve açıkta
I49S	9	Yüksek oranda korunmuş ve gömülü
C387S	9	Yüksek oranda korunmuş ve gömülü

4.5. ERIS PROTEIN STABİLİTE ANALİZİ

TGF β 1 genine ait belirlenen patojenik varyantların protein stabilitesi üzerindeki etkileri, $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) değerleri ve yapısal özellikleri ERIS sunucusunda değerlendirilmesi yapılmıştır. Yapısı bilinen proteinlerde omurga yapıları yani α -karbon ve peptit bağlarının tamamı katı halde değildir; belirli bir esneklikte de olsa az seviyede konformasyonel farklılıklara izin vermektedir. ERIS sunucusu, bu bahsedilen doğal esnekliği simüle etmek amacıyla omurga yapısını "esnek" olarak modelleyerek daha güvenilir analiz sonuçları vermektedir. Ayrıca, ERIS sunucusunda "ön gevşeme" seçeneği bulunmaktadır ve bu seçenek proteinlerin yapısal modelleme simülasyonlarında ve stabilite analiz tahminlerinde kullanılan bir ön işlem sürecidir. Bu "ön gevşetme" işlemi, ilgili proteinin primer yapısının enerji durumunu minimizasyon yaparak atomların üst üste binmesi gibi durumları ve yapay gerilimlerin ortadan kalkmasını sağlamaktadır. Böylece daha güvenilir ve fiziksel olarak bakıldığında anlamlı bir başlangıç olarak konformasyon elde edilmektedir. ERIS sunucusunun eşik değeri 0 olarak bilinmektedir; $\Delta\Delta G > 0$ durumunda ilgili proteininde varyantın stabiliteyi değiştirdiği, $\Delta\Delta G < 0$ durumunda ise ilgili proteininde varyantın stabiliteyi değiştirmediği sonucuna ulaşılmaktadır. Bu çalışma sürecinde, omurga yapısı ve ön gevşetme seçenekleri esas

alınarak stabilite çalışması yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, yüksek derece TGF β 1 geninin stabiliteyi etkileyen varyantları C387G (>10), C387S (>10), I49S (>10) varyantlarıdır. Orta derecede stabilite kaybı olan varyantlara bakıldığında V339D (7.28), L260P (6.60), L298P (2.83), R50C (2.48) ve M382T (2.51) varyantları olduğu görülmektedir. Stabiliteyi arttıran varyant ise, H312Y (-6.07) varyantı, protein stabilitesini artırabilecek potansiyele sahip olduğu görülmüştür. P363R (-0.03) ve Y328C (-0.08) patojenik varyantları protein stabilitesi üzerinde az bir etki göstermektedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: ERIS protein analizi bulguları

Varyant	Omurga (Backbone)	Ön gevşetme (pre-relax)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
V339D	esnek	evet	7.28
P363R	esnek	evet	-0.03
M382T	esnek	evet	2.51
C387G	esnek	evet	>10
H312Y	esnek	evet	-6.07
L298P	esnek	evet	2.83
L260P	esnek	evet	6.60
Y328C	esnek	evet	-0.08
R50C	esnek	evet	2.48
I49S	esnek	evet	>10
C387S	esnek	evet	>10

4.6. HOPE ANALIZI

HOPE sunucu ile analizi değerlendirilen 11 patojenik varyantın çoğunda, amino asit değişimi sonrasında protein yapısını ve işlevini değiştirebilecek seviyede biyokimyasal açıdan değişimler gerçekleşmiştir. Özellikle boyut olarak değişiklikler göz önüne alındığında, mutant V339D, P363R, M382T, C387G, Y328C, R50C varyantlarının WT'ye göre daha küçük boyuta geldiği görülmektedir. H312Y varyantında ise tam tersi olarak, mutant varyantın daha büyük boyuta ulaştığı gözlemlenmiştir. Elektrik yükü (akım) açısından incelendiğinde, bazı varyantlar akım özelliklerinde önemli değişiklikler göstermiştir; örneğin, V339D patojenik varyantı nötr

yükken negatif yüke, P363R patojenik varyantı ise nötr yükken pozitif yüke geçmiştir. Hidrofobiklik durumu açısından incelendiğinde, V339D, P363R, M382T, C387G varyantlarının hidrofobiklik durumlarında azalma gözlemlenmiştir. Diğer yandan, H312Y ve Y328C varyantlarında tam tersi olarak hidrofobiklik durumunun arttığı görülmüştür. L298P, L260P, C387S varyantlarında ise bazı parametreler incelemek için analiz verisi bulunmamaktadır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: HOPE analiz bulguları

Varyant	Vahşi Tip			Mutant Tip		
	Boyut	Akım	Hidrofobiklik	Boyut	Akım	Hidrofobiklik
V339D	Daha küçük	Nötr	Daha fazla hidrofobik	Daha büyük	Negatif	Daha az hidrofobik
P363R	Daha küçük	Nötr	Daha fazla hidrofobik	Daha büyük	Pozitif	Daha az hidrofobik
M382T	Daha büyük	-	Daha fazla hidrofobik	Daha küçük	-	Daha az hidrofobik
C387G	Daha büyük	-	Daha fazla hidrofobik	Daha küçük	-	Daha az hidrofobik
H312Y	Daha küçük	-	Daha az hidrofobik	Daha büyük	-	Daha fazla hidrofobik
L298P	Daha büyük	-	-	Daha küçük	-	-
L260P	Daha büyük	-	-	Daha küçük	-	-
Y328C	Daha büyük	-	Daha az hidrofobik	Daha küçük	-	Daha fazla hidrofobik
R50C	Daha büyük	Pozitif	Daha az hidrofobik	Daha küçük	Nötr	Daha fazla hidrofobik
I49S	Daha büyük	-	Daha fazla hidrofobik	Daha küçük	-	Daha az hidrofobik
C387S	-	-	Daha fazla hidrofobik	-	-	Daha az hidrofobik

4.7. MUTPRED-2 ANALIZI

Seçilen 11 patojenik TGFβ1 nsSNP’sinin, işlevsel ve yapısal özelliklerini incelemek için MutPred2 sunucusu kullanılmıştır. MutPred2 analizinde bu 11 patojenik nsSNP, birçok farklı moleküler mekanizmalar açısından (Düzenli ve Düzensiz Arayüz Değişimi, Transmembran Değişimi, Allosterik Bölge Kazancı, DNA Bağlanma Değişimi, Çözücüyle Temas Kazancı, Metal Bağlanma Değişimi, Stabilite Değişimi, Glikozilasyon/Fosforilasyon Bölgesi Kazancı, Katalitik Bölge Kazancı, Doğal Düzensizlik Kazancı, Sülfatlanma Kaybı ve Heliks Kazancı/Kaybı) değerlendirilmiştir. MutPred2 sunucusu, tüm 11 varyantın protein işlevsel özelliklerini değiştirebileceğini tahmin etmiş ve her bir varyant için için MutPred2 skorları EK-9’da verilmiştir.

Tablo 4.5: Varyantların TGFβ1 geninde bulunduğu domain kısımları

Varyant	Domain
V339D	Olgun TGFβ1
P363R	Olgun TGFβ1
M382T	Olgun TGFβ1
C387G	Olgun TGFβ1
H312Y	Olgun TGFβ1
L298P	Olgun TGFβ1
L260P	Arm domain
Y328C	Olgun TGFβ1
R50C	Straightjacket
I49S	Straightjacket
C387S	Olgun TGFβ1

Skor eşiğı olarak 0.5 alınmıştır ve bu eşik değerin üzerindeki tüm varyantlar yüksek MutPred2 skoru olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Her bir varyant için anlamlı sonuç veren moleküler mekanizmalar ve P-değerleri (≤ 0.05) EK-9’da detaylı şekilde verilmiştir. Bu bağlamda, en yüksek MutPred-2 skoru olan ve arm domainde yer alan L260P varyantında, moleküler mekanizmada “stabilitede değişiklik (olasılık = 0.30, P-değeri = 5.5e-03)” tespit edilmiştir. Seçilen varyantlara ait domain bilgileri Tablo 4.5’da gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Varyantların MutPred-2 skorları

Varyant	MutPred-2 Skor
V339D	0.846
P363R	0.880
M382T	0.918
C387G	0.915
H312Y	0.868
L298P	0.934
L260P	0.943
Y328C	0.843
R50C	0.670
I49S	0.834
C387S	0.894

Diğer MutPred2 skoru olan ve olgun TGF β 1 bölgesinde yer alan L298P varyantı da zincir kaybı (olasılık = 0.27, P = 0.02) ve C293'te disülfid bağı kazanımı (olasılık = 0.19, P = 0.02) göstermiştir. Olgun TGF β 1 bölgesinde yer alan diğer varyantlar sırasıyla MutPred-2 skoru 0.846 olan V339D moleküler mekanizmada “helix kazanımı (olasılık = 0.29, P = 0.02), zincir kaybı (olasılık = 0.28, P = 0.01), Y336'da sülfatlanma kazancı (olasılık = 0.04, P = 0.01)”, MutPred-2 skoru 0.880 olan P363R varyantında “P-363'te ADP-ribozilasyonunun kazancı (olasılık = 0.021, P = 0.03)”, MutPred-2 skoru 0.918 olan M382T varyantında “çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.32, P = 4.9e-03)”, MutPred-2 skoru 0.915 olan C387G varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.35, P = 0.02), çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.32, P = 4.3e-03), MutPred-2 skoru 0.868 olan H312Y varyantında “çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.33, P = 4.3e-03), W308'te allosterik bölge kazancı (olasılık = 0.26, P = 0.01), Y317'de katalitik bölge kaybı (olasılık = 0.16, P = 0.02)”, MutPred-2 skoru 0.843 olan Y328C varyantında “C326'da katalitik bölge kazanımı (olasılık = 0.28, P = 2.3e-03), C326'da disülfid bağı kazanımı (olasılık = 0.20, P = 0.02)”, MutPred-2 skoru 0.894 olan C387S varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.40, P = 7.7e-03), çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.35, P = 1.4e-03), C387'de disülfid bağı kaybı (olasılık = 0.10, P = 0.05), C387'de katalitik bölge kazanımı (olasılık = 0.28, P = 0.05) tespit edilmiştir. Straightjacket bölgesinde yer alan

ve MutPred-2 skoru 0.670 olan R50C varyantında “düzensiz ara yüzeyde değişiklik (olasılık = 0.21, P = 0.03)”, bir diğer Straightjacket bölgesinde yer alan MutPred-2 skoru 0.834 olan I49S varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.45, P = 4.1e-03)” tespit edilmiştir.

4.8. I-TASSER ANALIZI

En patojenik 11 nsSNP'nin 3B yapıları, yüksek kaliteli yapısal modelleme özelliğinden faydalanmak maksadıyla I-TASSER programı kullanılarak patojenik varyantların 3B yapıları yeniden oluşturulmuştur. I-TASSER analizi, TGFβ1 proteininin WT ve her bir mutant dizisi ayrı ayrı sunularak analizi gerçekleştirilmiştir. I-TASSER, her nsSNP varyant için –5 ile 2 arasında değişen C-skorlarına sahip beş farklı yapısal model üretmiştir. C-skorunun yüksek olması demek, oluşturulan yapısal modelin güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Her nsSNP varyant için en yüksek C-skoruna sahip varyant L260P (-0.31) seçilmiştir. Ayrıca, R50C (-0.27), Y328C (-0.26), C387S (-0.25), H312Y (-0.23), M382T (-0.20), P363R (-0.19), C387G (-0.19), L298P (-0.18), V339D (-0.17), I49S (-0.06) varyantları da sırasıyla yüksek kaliteli yapılar olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: I-TASSER analiz bulguları

	C-skor	RMSD	TM skor
TGFβ1_WT	-0.39	7.6±4.3	0.66±0.13
V339D	-0.17	7.4±4.2	0.69±0.12
P363R	-0.19	7.2±4.2	0.69±0.12
M382T	-0.20	7.2±4.2	0.69±0.12
C387G	-0.19	7.2±4.2	0.69±0.12
H312Y	-0.23	7.3±4.2	0.68±0.12
L298P	-0.18	7.2±4.2	0.69±0.12
L260P	-0.31	7.4±4.3	0.67±0.13
Y328C	-0.26	7.3±4.2	0.68±0.12
R50C	-0.27	7.4±4.2	0.68±0.12
I49S	-0.06	6.9±4.1	0.71±0.12
C387S	-0.25	7.3±4.2	0.68±0.12

5. TARTIŞMA

5.1. TARTIŞMA

Genetik polimorfizm, popülasyonda %1'den daha fazla oranda görülen varvasyonlardır. Bir gen üzerindeki kodlama bölgelerinde tek bir tane nükleotidin yer değiştirmesiyle bile protein yapı ve işlevinde değişiklik gerçekleşebilmektedir. Genetik polimorfizmler radyasyon gibi dış etkenlerden kaynaklı ya da kendiliğinden gerçekleşebilmektedirler. Her ne tür etkenden olursa olsun her türlü genetik polimorfizm önem taşımaktadır; çünkü hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilir ve hasta bireylerin kullandıkları ilaçlara verdiği tepkilerin farklılıklarını açıklamaya yardımcı olabilir (Gummadi ve Guddati, 2021). Tek nükleotid polimorfizm (SNP), bir nükleotidin diğer üç tür nükleotidden birine dönüşmesi olup genetik polimorfizmler arasında en sık rastlanan türü olduğu bilinmektedir (Shastri, 2009; Dabhi ve Mistry, 2014; Petrosino ve ark., 2021). Tek nükleotid polimorfizmler arasında ise en sık hastalık etkeni olarak görülen non-sinonim tek nükleotid varyantlar (nsSNP), proteinin genotipinde ve/veya fenotipinde değişim yaratarak birçok hastalıklara (kanser, akut lenfoblastik lösemi, tip II diyabet vb.) sebebiyet verebilmektedir (Hassan ve ark., 2019; Petrosino ve ark., 2021). Yapılan birçok çalışmaya göre, HER2 proteinin 655. kodonundaki valin amino asidinin izolösin amino asidine dönüşümü (Ile655Val, GTC > ATC; refSNP numarası, rs1136201) bir nsSNP olarak meme kanserinde bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (Dahabreh ve Murray, 2011). Yine aynı şekilde BRCA1 ve BRCA2 genlerinde de çok sayıda missense varyantlar tespit edilmiştir (Hart ve ark., 2019). BRCA1 genindeki 185delAG, 5382InsC, BRCA2 genindeki 6174delT, RAD51D genindeki c.556C>T, p.Arg186* missense mutasyonlar yapılan çalışmalar sonucunda meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Schayek ve ark., 2018). Yapılan farklı çalışma sonucunda 869C/T missense polimorfizmi radyasyon pnömonisi (RP) duyarlılığı, akciğer kanseri, romatoid artrit ile ilişkilendirilmiştir (Park ve ark., 2006; Wang ve ark., 2015; Liu ve ark., 2020). Polimorfizm incelemesi dışında yine bakıldığında TGF- β sinyalizasyonunun fazla aktivitesi birçok farklı dokuda fibrozise yol açabilmektedir. Örneğin; akciğer dokusunda idiopatik pulmoner fibrozis ve kistik fibrozis hastalıklarında TGF β 1 geninin akciğer dokusundaki alveoler epitel hücrelerinde EMT'yi tetikleyerek fibroblast aktivasyonunu yükseltir. Yine benzer şekilde, böbrek dokusunda glomerülonefrit, diyabetik nefropati ve kronik red gibi hastalıklarda artan TGF β 1 gen ekspresyonu, ECM bileşenlerinin oluşmasını ve

fibrozisi desteklemektedir. Karaciğer dokusunda yine TGF β 1 geni, hepatosit apoptozu ve merkezi sinir sisteminde bulunan yıldız hücrelerinin (astrosit) aktivasyonu yoluyla fibrojeneze sebebiyet verir. Yapılan çalışmalara ve literatür bilgilerine bakıldığında kronik yara iyileşmesi, inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıklarında da olmak üzere farklı hastalık türlerinde TGF β 1 geninin aktivitesi ve polimorfizmlerinin önemi oldukça fazladır. Bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, TGF β 1 geninin üzerindeki zararlı/tehlikeli olan non-sinonim tek nükleotid polimorfizmleri (nsSNP) in siliko araçlarla çıkarılıp yapısal ve fonksiyonel analizlerini hesaplamalı yaklaşımlar ile gerçekleştirilerek protein yapısı, fonksiyonu ve hastalık ilişkisi bağlamında çalışılması amaçlanmıştır.

Dönüştürücü Büyüme Faktörü 1 (TGF β 1) geni, TGF beta süper ailesinin bir üyesi olup proliferasyon, apoptoz, farklılaşma gibi birçok biyolojik rolde görev almaktadır (Kim ve ark., 2018; Vitiello ve ark., 2021; Chen ve ark., 2024). TGF beta gen ailesinde TGF β 1 geni en fazla çalışılan formu ve neredeyse tüm insan dokusu hücrelerinde eksprese edilmektedir (Vitiello ve ark., 2021). Literatürde incelendiğinde TGF β 1 geninin nsSNP verilerinin yapısal ve fonksiyonel analizlerine hesaplamalı yaklaşımlarla herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında, ilk kez TGF β 1 geninin nsSNP verilerinin biyoinformatik açıdan hesaplamalı analizleri gerçekleştirilmiştir.

5.2. ÇALIŞMANIN SINIRLILIĞI

İn siliko araçlarda patojenite sınıflandırılmasında kullanılan eşik değerlerin manuel olarak belirlenmesi, bu çalışmanın bazı sınırlamalarını da beraberinde getirmektedir. Manuel olarak belirlenen eşik değerler, araştırmacıların öznel seçimlerine bağlı olabilir ve bu nedenden durum, yanlış pozitif (tehlikeli olmayan varyantların patojenik olarak belirlenmesi) veya yanlış negatif (tehlikeli varyantların gözden kaçırılması) gibi sonuçlara neden olabilir. Bu çalışmada, manuel olarak belirlenen eşik değerler seçilen 11 varyantı da patojenik olarak sınıflandırmış olsa da, herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmaması durumunda, sonuçların tekrar çalışılmasını ve diğer çalışmalarla olan uyumluluğunu sınırlayabilir.

5.3. SONUÇ

TGF β 1 geninin ClinVar veritabanından alınan 170 nsSNP varyantı in siliko araçlarla çalışması yapılmış ve biyoinformatik açısından analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 170 nsSNP varyantının listesi EK-3’de verilmiştir. İlk olarak; SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, Fathmm-xf, SNP&GO in siliko araçlarında patojenite tahmin skorları belirlenmiştir. SIFT ve PROVEAN in siliko analiz sonuçları EK-4’te verilmiştir. PolyPhen-2 in siliko analiz sonuçları

EK-5’te verilmiştir. Fathmm-xf in siliko analiz sonuçları EK-6’da verilmiştir. SNP&GO in siliko analiz sonuçları EK-7’de verilmiştir. Her bir in siliko aracında Tablo 2.3’te belirtildiği üzere varsayılan eşik değerlerinin üzerinde bir eşik değer baz alınarak en yüksek patojenite skorlarına sahip olan 11 varyant (V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S) belirlenmiştir. Bu belirlenen varyantlar AlphaMissence veritabanında da kontrol edilmiştir. Belirlenen varyantlar Tablo 5.1’de belirtildiği üzere AlphaMissence veritabanında patojenite durumları doğrulanmıştır.

Tablo 5.1: AlphaMissence veritabanının varyantlar üzerindeki patojenite tahmini

Varyant	Tahmin Skoru	Sonuç
V339D	0.997	Likely Pathogenic
P363R	0.942	Likely Pathogenic
M382T	0.998	Likely Pathogenic
C387G	0.995	Likely Pathogenic
H312Y	0.728	Likely Pathogenic
L298P	0.999	Likely Pathogenic
L260P	0.991	Likely Pathogenic
Y328C	0.988	Likely Pathogenic
R50C	0.987	Likely Pathogenic
I49S	0.999	Likely Pathogenic
C387S	1.000	Likely Pathogenic

TGFβ1 geninde in siliko analizlerle seçilen 11 patojenik varyant, Tablo 2.3’te belirtilmiş olan eşik değerler baz alınarak in silico araçlarla yapılan çalışmalar neticesinde seçilmiştir. Bu baz alınan eşik değerler, manuel olarak belirlenerek herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmadan seçilmişlerdir. Fakat, in silico araçların varsayılan eşik değerlerinin üstünde değerler alınarak varyantlar patojenik olarak değerlendirilmiştir. ACMG-AMP kılavuzunun yayınına göre, PP3 kriteri in silico araçlarla yapılan analizler, patojenite kanıtı olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada, TGF β 1 geninin in siliko analizler ile seçilen 11 patojenik varyantın (V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S) evrimsel korunmuşluk skorlarını incelemek için, ConSurf analizi kullanılmıştır. ConSurf sunucusu, proteindeki rezidülerin evrimsel olarak korunmuşluğunu incelemek için uygun araçtır. Bu ConSurf analizi, seçilen 11 patojenik varyantın TGF β 1 genindeki amino asit konumlarının biyolojik açıdan önemini ortaya çıkarmıştır. Tablo 4.2'deki ConSurf analiz sonuçlara göre, bu patojenik varyantların bulunmuş olduğu rezidüler yüksek korunmuşluk skorlarına (7, 8 ve 9) sahip olmakla beraber, TGF β 1 geninin işlevsel ve yapısal anlamda oldukça önemli bölgelerinde yer aldığı anlaşılmaktadır. Bu analizdeki bulgular, patojenik varyantların TGF β 1 geninin korunmuş bölgelerinde yer alması ve oldukça yüksek skorlara sahip olmasından dolayı biyolojik fonksiyonlarını değiştirebileceğini ve potansiyel patojenik etkilere neden olabileceğini düşündürmektedir.

ConSurf analiz bulgularına göre, V339D, Y328C ve L260P patojenik varyantları sırasıyla 8 ve 7 evrimsel korunmuşluk skorlarına sahip olmakla beraber gömülü rezidü olarak konumlanmaları, TGF β 1 geninin nükleusunda konumlanmıştır. Bu patojenik varyantların belirtilen yüksek korunmuşluk skorları, söz konusu pozisyonlarının evrimsel açıdan oldukça önemli olduğunu ve TGF β 1 geninin yapısal olarak bütünlüğünde kritik bir görev üstlendiğini göstermektedir. Protein nükleusundaki rezidüler, genellikle proteinin katlanma stabilitesi ve hidrofobik çekirdek oluşumu için önemlidir. Bu nedenden dolayı, V339D, Y328C ve L260P patojenik varyantlarının genin nükleusunda yer alması, TGF β 1 geninin yapısal durumunda farklılıklara neden olarak işlevsel bozulmalara sebebiyet vereceğini düşündürmektedir.

Geriye kalan patojenik varyantlar ise (P363R, H312Y, R50C, M382T, C387G, L298P, I49S, C387S), ConSurf analizi sonucunda en yüksek korunmuşluk skoruna (9) sahip olarak sınıflandırılmıştır ve protein yüzeyinde (P363R, H312Y, R50C) veya proteinde gömülü (M382T, C387G, L298P, I49S, C387S) lokalizasyonda yer alan rezidüler olarak ayrılmıştır. Evrimsel korunmuşluk skorunda 9, P363R, H312Y, R50C, M382T, C387G, L298P, I49S, C387S varyantlarının evrimsel olarak son derece önemli olduğunu ve TGF β 1 geninin biyolojik işlevi açısından vazgeçilmez olduğu anlaşılmaktadır. TGF β 1 geninin yüzeyinde konumlanan varyantlar (P363R, H312Y, R50C), genel olarak TGF β 1 proteininin diğer biyomoleküllerle (örneğin, reseptörler veya ligandlar) ilişkilerinden sorumludur. Bu P363R, H312Y, R50C varyantların ayrıca yüksek korunmuş konumlarda bulunması, TGF β 1 geninin sinyal iletiminde veya protein-protein etkileşimlerinde bozulmalara neden olabileceğini düşündürmektedir.

Örnek olarak, bu tür kritik konumda yer alan varyantlar, TGF β 1 geninin reseptör bağlanma afinitesini veya dimerizasyon gibi biyolojik kapasitesinde değişim yaratabilir, bu da patojenik olarak etki yaratarak kanser sürecinde veya birçok hastalık bağlamında rol alabilir.

TGF β 1 geninin gömülü konumunda yer alan varyantlar (M382T, C387G, L298P, I49S, C387S), gömülü yapıli olmalarından dolayı proteinin nukleusunda bulunduklarından TGF β 1 geninin yapısal stabilitesi için direkt etkiye sahip olabilir. Bu varyantların (M382T, C387G, L298P, I49S, C387S) pozisyonlarının evrimsel korunmuşluk skorunun 9 ile yüksek korunmuşluk göstermesi durumu, bu rezidülerin TGF β 1 geninin protein katlanma ve yapısal bütünlüğü açısından yine aynı şekilde diğer varyantlarda olduğu gibi oldukça önem arz etmektedir. Bu patojenik varyantların, protein nukleusunda sterik engellemeler yaratacağı veya hidrofobik olarak etkileşimlerde bozulmalara neden olarak TGF β 1 geninin işlevsel etkinliğini olumsuz yönde etkileyebileceği tahmin edilmektedir. Özellikle bakıldığında, C387G ve C387S gibi aynı pozisyonda (C387) bulunan patojenik varyantların yüksek evrimsel korunmuşluk skoru, bu C387 pozisyonunun TGF β 1 geninin yapısal ve işlevsel bütünlüğü açısından oldukça kritiktir.

ConSurf analizinin sonuçları genel olarak, bu 11 patojenik varyantın (V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S) TGF β 1 geninin evrimsel olarak korunmuş lokalizasyonlarında bulunduğunu ve bu nedenden ötürü patojenik etkilerinin TGF β 1 geninin işlevsel/fonksiyonel veya yapısal özelliklerindeki farklılıkla ilişkili olabileceği anlaşılmaktadır. Yüksek evrimsel korunmuşluk skorları (7, 8, 9), bu 11 patojenik varyantın TGF β 1 geninin sinyal iletimi, hücre proliferasyonu veya immün düzenleme gibi önemli biyolojik işlevlerinde roller oynayan pozisyonlarda bulunduğunu düşündürmekte olup bu varyantların patojenik etkilerindeki sonuçlar, özellikle TGF β 1 geninin birçok hastalıklardaki rolü kapsamında incelendiğinde (tümör oluşumu, inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıkları, kronik yara iyileşmesi vs.) klinik olarak önem taşıyabilir.

ERIS analiziyle, seçilen 11 varyantın TGF β 1 geninin stabilitesinde etkisini incelemek amaçlı yapılmıştır. ERIS sunucusunun omurga yapısı ve ön gevşetme seçenekleri esas alınarak stabilite çalışması yapılmıştır. Böylelikle daha güvenilir sonuçların çıkması sağlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, yüksek derece TGF β 1 geninin stabiliteyi etkileyen varyantları C387G (>10), C387S (>10), I49S (>10) varyantlarıdır. Orta derecede stabilite kaybı olan varyantlar ise sırasıyla V339D (7.28), L260P (6.60), L298P (2.83), R50C (2.48) ve M382T (2.51) olduğu görülmektedir (Tablo 4.3). Stabiliteyi arttıran ya da hafif etkisi olan varyantlar ise

incelendiğinde, H312Y (-6.07) varyantı, protein stabilitesini artırabilecek potansiyele sahip olduğu görülmüştür. P363R (-0.03) ve Y328C (-0.08) patojenik varyantları protein stabilitesi üzerinde az bir etki göstermektedir (Tablo 4.3). Bu değerlerin analizi Tablo 2.5'te verilen eşik değerlere göre belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, C387G, C387S ve I49S varyantlarının stabilite üzerinde yüksek derecede destabilize edici etkisi olduğu belirlenmiştir ($\Delta\Delta G > 10$). Birçok patojenik varyantta, destabiliteye yol açan mutasyonlar fonksiyon kaybına sebebiyet verebilirken; stabilitedeki daha düşük düzeydeki farklılıklar, protein yapısında bağlanma afinitesinde değişikliklere neden olabilmektedir (Petrascio ve ark., 2021). Bu varyantların, TGF β 1 proteininin üç boyutlu yapısında önemli konformasyonel değişikliklere yol açabileceği ve dolayısıyla protein fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. Özellikle, bu varyantların yüksek $\Delta\Delta G$ değerleri, proteinin katlanma enerjisinde ciddi bir kayıba işaret etmekte olup, bu durum TGF β 1 sinyal yolunda fonksiyonel bozukluklara neden olabilir. Bu varyantların patojenik potansiyelleri, literatürde verilen benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, özellikle sitokin sinyalizasyonunda kritik roller oynayan TGF β 1 geninin mutasyonlarının hastalıklarla ilişkilendirilebileceği düşüncesini desteklemektedir. Orta derecede stabilite kaybına neden olan varyantlar arasında V339D ($\Delta\Delta G = 7.28$), L260P ($\Delta\Delta G = 6.60$), L298P ($\Delta\Delta G = 2.83$), R50C ($\Delta\Delta G = 2.48$) ve M382T ($\Delta\Delta G = 2.51$) bulunmaktadır. Bu patojenik varyantların protein stabilitesi üzerindeki etkileri, daha az olsa da; TGF β 1 proteininin işlevsel etkilerini kısmen değiştirebileceği öngörülmektedir. Özellikle, C387G, C387S ve I49S varyantlarının yanı sıra L260P ve V339D varyantlarının nispeten yüksek $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) değerleri, bu varyantların proteinin konformasyonel değişiminde önemli farklılıklara neden olabileceğini göstermektedir. Buna karşın, H312Y varyantının ($\Delta\Delta G = -6.07$) protein stabilitesini artırıcı bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Negatif $\Delta\Delta G$ değeri, ERIS sunucusunun eşik değerine göre bakıldığında bu varyantın TGF β 1 proteininin katlanma enerjisini arttırıcı yönde etki yaratarak daha stabil bir yapıya dönüşeceğini göstermektedir. Bu durum, H312Y varyantının TGF β 1 işlevi üzerinde düzenleyici bir görev alacağını düşündürmektedir. Ancak, bu varyantın diğer proteinlerle nasıl bir etkileşim içinde olduğu deneysel çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir. P363R ($\Delta\Delta G = -0.03$) ve Y328C ($\Delta\Delta G = -0.08$) varyantlarının ise protein stabilitesi üzerinde 0 sonucuna yakın olmalarından dolayı az bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu P363R, Y328C varyantlarının düşük $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) değerleri, TGF β 1 proteininin yapısal ve işlevsel özelliklerinde bariz bir farklılıklara neden olmadığı göstermektedir.

HOPE analizinde, TGF β 1 proteinindeki 11 patojenik varyantın biyokimyasal olarak farklılıklarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Yapılan analiz, varyantların boyutlarında, akımlarında ve hidrofobiklik gibi biyokimyasal durumlarında oluşan değişikliklerini tespit ederek, bu değişikliklerin TGF β 1 proteininin kimyasal yapısında ve işlevsel etkinliği üzerindeki durumu anlamak için fayda sağlamıştır. HOPE analiz sonuçları EK-8 kısmında verilmiştir. HOPE analiz sonuçlarına göre, V339D, P363R, M382T, C387G, Y328C ve R50C varyantlarının WT proteinine göre boyut olarak daha küçük olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Bu boyut değişimi, proteinin üç boyutlu kimyasal yapısında sterik tıkanmalara neden olabilir ve TGF β 1 proteinin katlanma durumunu veya diğer moleküllerle olan biyolojik etkileşimlerini değiştirebilir. Aynı zamanda, M382T, C387G, Y328C varyantların TGF β 1 proteininin olgun kısmında sinyal iletiminde veya protein-protein etkileşimlerinin sağlandığı kısımda yer almaları boyutsal küçülme nedeniyle bozulmalara sebebiyet vereceği öngörülmektedir. Bu varyantların patojenik durumlarının, özellikle TGF β 1 geninin hücre proliferasyonu gibi kanserde önemli süreçlerdeki rolünü bozacağı düşünülmektedir. H312Y varyantının mutant formda daha büyük bir boyuta ulaştığı tespit edilmiştir. Bu boyut artışı sonucunda, proteinin konformasyonel durumunda farklılıklara yol açarak yine aynı şekilde ve sterik etkilerdeki değişiklik sebebiyle TGF β 1 proteininin diğer proteinlerle olan bağlanma bölgelerinde değişiklik yaratabilir. Ayrıca, ERIS analizinde de H312Y varyantının stabilize yönündeki etkisi ($\Delta\Delta G = -6.07$), protein stabilitesi üzerinde artış gerçekleştireceği ve TGF β 1 geninin işlevsel durumunu destekleyebileceği yönünde düşünülebilir. Elektrik yükü yani akımı açısından sonuçlar incelendiğinde, V339D patojenik varyantının nötr durumdan negatif yüke, P363R patojenik varyantının ise nötr durumdan pozitif yüke geçiş yaptığı tespit edilmiştir. Bu tür yük değişimi durumlarında, ilgili proteinin elektrostatik etkileşim durumlarında ve iyonik bağ oluşumu süreçlerinde önemli olabilecek farklılıklara neden olabilir. Mesela, V339D patojenik varyantının negatif yük kazanım durumu, proteinin diğer biyomoleküllerle olabilecek elektrostatik etkileşim ilişkisini arttırabilecek duruma gelebilir veya tam tersi bozabilir. Böylece, TGF β 1 geninin reseptör bağlanma afinitesini veya sinyal yolağındaki iletimini değiştirerek kanser sürecinde yer alabilir. Aynı şekilde, P363R patojenik varyantındaki pozitif yüke geçiş durumu, TGF β 1 proteininin iyonik bağ ilişkilerinde değişim yaratarak işlevsel sonuçlara neden olabilir. Bu tür değişiklik durumlarının, TGF β 1 geninin hücre içi sinyalizasyon görevi üzerinde patojenik sayılabilecek etkilere neden olabileceği düşünülmektedir. Hidrofobiklik açısından analiz sonuçları incelendiğinde, V339D, P363R, M382T ve C387G patojenik varyantlarında gözlemlenen hidrofobiklik durumundaki azalma, H312Y ve Y328C

patojenik varyantlarında hidrofobiklik durumlarında artış görülmüştür. Hidrofobiklikteki bu tür değişiklikler, TGFβ1 proteinin hidrofobik çekirdekindeki stabilite durumu veya yüzeydeki etkileşimlerini değiştirebilir. Mesela, V339D ve C387G gibi patojenik varyantlardaki hidrofobik durumlarındaki azalma, TGFβ1 proteinin katlanma stabilitesinde eksi durumlar yaratabilir ve bu durumda ERIS analizinde tespit edilen C387G ($\Delta\Delta G > 10$) gibi yüksek destabilize edici etki gösteren varyantlarla da uyumlu sonuç göstermektedir. Diğer yandan, H312Y patojenik varyantındaki hidrofobiklik durumundaki artış, TGFβ1 proteinin stabilize yönündeki durumunu artı yönde etkileyebilir ve bu H312Y varyantının TGFβ1 geninin konformasyonel bütünlüğünü güçlendirebileceği düşüncesini güçlendirir. Bir diğer varyant olan, Y328C patojenik varyantındaki hidrofobiklik durumundaki artış ise, az bir stabilite etki ($\Delta\Delta G = -0.08$) göstererek, TGFβ1 proteinin yüzeysel etkileşimler kısımlarında lokal bazlı farklılıklara neden olabilir.

MutPred-2 analizinde, hastalık fenotipi üzerindeki etkileri öngörmek ve TGFβ1 geninin nsSNP'leri ile oluşan amino asit değişimlerinin neden olduğu moleküler mekanizmaları belirlemek amaçlı çalışma yapılmıştır. Bu analiz değerlendirmesi yapılırken, I-TASSER'a gönderilen her sorgu dizisi, her biri kendi C-skora sahip beş olası yapısal model üretmektedir. Bu C-skoru, ne kadar yüksekse yapısal modelin güvenilirliğini o derece artmaktadır. En yüksek C-skorlarına sahip yapıları seçildi. Bu seçilime göre TGFβ1_WT (-0.39) göre en yüksek C-skoru L260P varyantı (-0.31) ve moleküler mekanizmasında “stabilitede değişiklik (olasılık = 0.30, P-değeri = 5.5e-03)” değişikliği tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Diğer MutPred2 skoru olan ve olgun TGFβ1 bölgesinde yer alan L298P varyantı da zincir kaybı (olasılık = 0.27, P = 0.02) ve C293'te disülfid bağı kazanımı (olasılık = 0.19, P = 0.02) göstermiştir. Olgun TGFβ1 bölgesinde yer alan diğer varyantlar sırasıyla MutPred-2 skoru 0.846 olan V339D moleküler mekanizmada “helix kazanımı (olasılık = 0.29, P = 0.02), zincir kaybı (olasılık = 0.28, P = 0.01), Y336'da sülfatlanma kazancı (olasılık = 0.04, P = 0.01)”, MutPred-2 skoru 0.880 olan P363R varyantında “P-363'te ADP-ribozilasyonunun kazancı (olasılık = 0.021, P = 0.03)”, MutPred-2 skoru 0.918 olan M382T varyantında “çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.32, P = 4.9e-03)”, MutPred-2 skoru 0.915 olan C387G varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.35, P = 0.02), çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.32, P = 4.3e-03), MutPred-2 skoru 0.868 olan H312Y varyantında “çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.33, P = 4.3e-03), W308'te allosterik bölge kazancı (olasılık = 0.26, P = 0.01), Y317'de katalitik bölge kaybı (olasılık = 0.16, P = 0.02)”, MutPred-2 skoru 0.843 olan Y328C varyantında “C326'da katalitik bölge kazanımı (olasılık = 0.28, P = 2.3e-03), C326'da disülfid bağı kazanımı (olasılık = 0.20,

P = 0.02)”, MutPred-2 skoru 0.894 olan C387S varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.40, P = 7.7e-03), çözücüyle temas kazancı (olasılık = 0.35, P = 1.4e-03), C387’de disülfid bağı kaybı (olasılık = 0.10, P = 0.05), C387’de katalitik bölge kazanımı (olasılık = 0.28, P = 0.05) tespit edilmiştir. Straightjacket bölgesinde yer alan ve MutPred-2 skoru 0.670 olan R50C varyantında “düzensiz ara yüzeyde değişiklik (olasılık = 0.21, P = 0.03)”, bir diğer Straightjacket bölgesinde yer alan MutPred-2 skoru 0.834 olan I49S varyantında “yapısal düzensizlik kazancı (olasılık = 0.45, P = 4.1e-03)” tespit edilmiştir. Sonuç olarak, MutPred2 analizi, 11 patojenik varyantın hepsinin TGFβ1 geni üzerinde yapısal veya işlevsel özelliklerini etkileyebileceğini göstermektedir.

Bu I-TASSER analizi çalışmasında, TGFβ1 genindeki 11 patojenik varyantın (V339D, P363R, C387G, H312Y, L298P, R50C, M382T, L260P, Y328C, I49S, C387S) WT proteini esas alınarak üç boyutlu (3B) yapısal değişikliklerindeki durumlar değerlendirilmiştir (Tablo 4.5). I-TASSER analizi, protein yapılarının 3B modellenmesi ve patojenik varyantların yapısal etkilerindeki değişimleri tahmin etmek için kullanılan bir in silico araçtır. I-TASSER analizinde ölçüt olarak C-skoru oldukça önemlidir; çünkü oluşturulan 3B yapısal modellerin doğruluğunu ölçmede kanıt sunar. Yüksek bir C-skora sahip yapı modeli, o modelin doğruluk seviyesini vermektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen analiz sonuçları, 11 patojenik varyantların TGFβ1 geninin yapısal durumunda farklı derecelerde farklılıklara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Analiz sonuçlarına göre, L260P patojenik varyantı en yüksek C-skora (-0.31) sahip olduğu tespit edilerek oluşturulan bu 3B yapısal modelin en yüksek doğruluğa sahip olduğu anlaşılmıştır. Bunu sırasıyla takip eden patojenik varyantlar R50C (-0.27), Y328C (-0.26), C387S (-0.25), H312Y (-0.23), M382T (-0.20), P363R (-0.19), C387G (-0.19), L298P (-0.18), V339D (-0.17) ve I49S (-0.06) olmuştur. Tüm bu patojenik varyantlar için elde edilen C-skorumları sonuçlarının negatif değerlerde olması, I-TASSER aracının skorlama algoritmasında kaynaklı beklenen bir olaydır; fakat, bu analiz değerlerin yüksek sonuçlarda olması, oluşturulan yapısal modellerin genel olarak doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle L260P, R50C, Y328C ve C387S patojenik varyantlarının yüksek olan C-skorumları, bu varyantların 3B yapı modellerinin güvenilir bir şekilde yapısal modellendiğini ve TGFβ1 genindeki yapısal olarak gerçekleşen farklılıkların güvenilir bir şekilde analiz edilebileceğini ortaya koymaktadır. I-TASSER analizindeki varyantların neden olduğu TGFβ1 proteininin 3B yapısında farklılıklar, proteinin işlevsel etkilerini değiştirebileceğini düşündürmektedir. Mesela, L260P patojenik varyantının yüksek çıkan C-skoru, bu patojenik varyantın TGFβ1 proteinin katlanma veya konformasyonel etkilerinde önemli farklılıklara neden olabileceğini

düşündürmektedir. Önceki analiz olan ERIS analizi ile uyumlu olarak, L260P patojenik varyantının orta derecede görülen destabilize edici etkisi ($\Delta\Delta G = 6.60$) olduğu tespit edilmişti. Bu durum, L260P varyantının TGF β 1 protein stabilitesini azaltma yaratarak yapısal olarak bütünlüğü değiştirebileceğini ve bundan ötürü TGF β 1 geninin sinyal iletim mekanizmasını değiştireceği anlaşılmaktadır. Aynı şekilde, ERIS analizinde çıkan C387G ve C387S gibi yüksek olarak değerlendirilen destabilize edici etkilere sahip varyantlar ($\Delta\Delta G > 10$) için I-TASSER analiz sonuçları, bu C387G ve C387S varyantlarının TGF β 1 proteinin 3B yapısal etkisinde önemli konformasyonel farklılık yaratarak kanser ve diğer bağlantılı hastalık sürecinde rol alabileceğini desteklemektedir. Yapılan HOPE analiziyle ilişkili olarak, V339D, P363R, M382T ve C387G patojenik varyantlarının boyutlarındaki ve hidrofobiklik durumlarındaki azalma ve elektrik yükü (akımlarında) farklılık olabileceği tespit edilmişti. I-TASSER analiz sonuçları, bu V339D, P363R, M382T ve C387G varyantların 3B yapısal modelleme değişikliklerini daha kapsamlı bir şekilde ortaya çıkararak, biyokimyasal olarak gerçekleşen değişikliklerin TGF β 1 proteinin katlanma kısımlarında veya yüzey kısımlarındaki moleküllerle olan etkileşim alanlarında nasıl bir sonuca neden olabileceğini göstermektedir. Örnek olarak, V339D patojenik varyantının nötr durumdan negatif yük durumuna geçişi ve hidrofobiklik etkisindeki azalması, I-TASSER tarafından oluşturulan modellerinde TGF β 1 proteinin yüzeydeki özelliklerinde elektrostatik yönden farklılıklara neden olabilir, bu durum neticesinde TGF β 1, ilgili reseptörlerine (TGF β R1, TGF β R2) bağlanma veya dimerizasyon gibi aşamaları değiştirebilir. H312Y patojenik varyantı, daha önceki ERIS ve HOPE analizlerde olan stabilize edici etkisi ($\Delta\Delta G = -6.07$) ve hidrofobiklik durumundaki artışı tespit edilmişti. I-TASSER analizinde H312 varyantının C-skoru (-0.23), bu varyantın oluşturulan 3B yapısal modelinin güvenilir olabileceğini ve TGF β 1 proteinin 3B yapısında stabilize edici yönde farklılıklara sebebiyet vereceğini düşündürmektedir. Bu H312Y varyantın mutant formda daha büyük bir boyuta gelmesi, TGF β 1 proteinin konformasyonel durumunda artı yönde bir düzenlemeye neden olabilir ve TGF β 1 geninin işlevsel olarak etkisini artırabilir. I49S patojenik varyantının ise I-TASSER sonuçlarında en düşük C-skoruna (-0.06) sahip olması, bu patojenik varyantın yapısal modellemesinde daha düşük bir doğruluk olduğunu belirtmektedir. Aynı zamanda, ERIS analizinde yapılan sonuca göre I49S varyantının yüksek destabilize edici etkisi ($\Delta\Delta G > 10$) olduğu tespit edilmişti. Bu durum neticesinde, I49S patojenik varyantının TGF β 1 protein yapısında önemli olabilecek değişikliklere neden olabileceğini düşündürmektedir.

5.4. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, TGF β 1 genine ait biyoinformatik nsSNP verileri esas alınarak önemli sonuçlar elde edilmiş olsa da, bu sonuçların kesinliğinin ve güvenilirliğinin artırılması için TGF β 1 geninin fonksiyonunun in vitro yöntemlerle (hücre kültürü, gen ekspresyon çalışmaları, rekombinant plazma yöntemleri vs.) daha ayrıntılı olarak laboratuvar ortamında incelenmesi gerekmektedir.

Ayrıca, in siliko araçların manuel olarak eşik değeri belirlenip analizler gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışması, eşik değerlerin TGF β 1 genine özgü biyolojik özellikleri dikkate alarak kalibre edilmesini sağlamaktadır. Örneğin bir optimizasyon çalışması olarak Alıcı İşletim Karakteristiği Eğrisi (*ing.* Receiver Operating Characteristic, ROC) analizi veya daha yenilikçi makine öğrenimi tabanlı yöntemler çalışılarak eşik değerlerin hassasiyeti ve özgüllüğü açısından daha güvenilir sonuçlar çıkartılabilir. Bu tür optimizasyon çalışmaları, yanlış patojenite sınıflandırmasını azaltarak klinik kısımda karar alma durumlarında daha net sonuçlar verilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, Chapter 7, Unit7.20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Amendola, L. M., Jarvik, G. P., Leo, M. C., McLaughlin, H. M., Akkari, Y., Amaral, M. D., ... Rehm, H. L. (2016). Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *The American Journal of Human Genetics*, 98(6), 1067–1076. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.024>
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
- Capriotti, E., Calabrese, R., Fariselli, P., Martelli, P., Altman, R. B., & Casadio, R. (2013). WS-SNPs&GO: A web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics*, 14(Suppl 3), S6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S3-S6>
- Chaudhary, R., Singh, B., Kumar, M., Gakhar, S. K., Saini, A. K., Parmar, V. S., & Chhillar, A. K. (2015). Role of single nucleotide polymorphisms in pharmacogenomics and their association with human diseases. *Drug Metabolism Reviews*, 47(3), 281–290. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1047027>
- Chen, Z., Ding, C., Chen, J., Zheng, S., & Li, Q. (2024). Pan-cancer analysis revealing the multidimensional expression and prognostic and immunologic roles of TGFB1 in cancer. *The Journal of International Medical Research*, 52(1), 3000605231221361. <https://doi.org/10.1177/03000605231221361>
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(16), 2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Chorley, B. N., Wang, X., Campbell, M. R., Pittman, G. S., Nouredine, M. A., & Bell, D. A. (2008). Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory

genomic regions: Current and developing technologies. *Mutation Research*, 659(1-2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.001>

Chung, J. Y.-F., Chan, M. K.-K., Li, J. S.-F., Chan, A. S.-W., Tang, P. C.-T., Leung, K.-T., ... Tang, P. M.-K. (2021). TGF- β Signaling: From Tissue Fibrosis to Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7575. <https://doi.org/10.3390/ijms22147575>

Dabhi, B., & Mistry, K. N. (2014). In silico analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in human TNF- α gene. *Meta Gene*, 2, 586–595. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.07.005>

Dahabreh, I. J., & Murray, S. (2011). Lack of replication for the association between HER2 I655V polymorphism and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, 35(6), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.01.007>

Dakal, T. C., Kala, D., Dhiman, G., Yadav, V., Krokhotin, A., & Dokholyan, N. V. (2017). Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in IL8 gene. *Scientific Reports*, 7(1), 6525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06575-4>

Deng, Z., Fan, T., Xiao, C. *et al.* TGF- β signaling in health, disease and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 9, 61 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>

Ensembl. (2025). Ensembl genome browser. EMBL-EBI. <https://www.ensembl.org/> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2025)

European Bioinformatics Institute. (2025). AlphaFold Protein Structure Database. <https://alphafold.ebi.ac.uk/> (Erişim tarihi: 18.03.2025)

Giorgi, F. M., Ceraolo, C., & Mercatelli, D. (2022). The R Language: An Engine for Bioinformatics and Data Science. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(5), 648. <https://doi.org/10.3390/life12050648>

Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., & Ben-Tal, N. (2003). ConSurf: Identification of Functional Regions in Proteins by Surface-Mapping of Phylogenetic Information. *Bioinformatics*, 19(1), 163–164. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.1.163>

Granevitze, Z., David, L., Twito, T., Weigend, S., Feldman, M., & Hillel, J. (2014). Phylogenetic resolution power of microsatellites and various single-nucleotide polymorphism

- types assessed in 10 divergent chicken populations. *Animal Genetics*, 45(1), 87–95. <https://doi.org/10.1111/age.12088>
- Gummadi, A. C., & Guddati, A. K. (2021). Genetic Polymorphisms in Pharmaceuticals and Chemotherapy. *World Journal of Oncology*, 12(5), 149–154. <https://doi.org/10.14740/wjon1405>
- Hart, S. N., Hoskin, T., Shimelis, H., Moore, R. M., Feng, B., Thomas, A., ... Couch, F. J. (2019). Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genetics in Medicine*, 21(1), 71–80. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0018-4>
- Hassan, M. S., Shaalan, A. A., Dessouky, M. I., Abdelnaiem, A. E., & ElHefnawi, M. (2019). A review study: Computational techniques for expecting the impact of non-synonymous single nucleotide variants in human diseases. *Gene*, 680, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.028>
- Iannuzzi, M. C., Maliarik, M., & Rybicki, B. (2002). Genetic polymorphisms in lung disease: Bandwagon or breakthrough? *Respiratory Research*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/rr164>
- Iglesias, M. S., & Grzelczak, M. (2020). Using gold nanoparticles to detect single-nucleotide polymorphisms: Toward liquid biopsy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 263–284. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.20>
- Kim, K. K., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2018). TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), a022293. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022293>
- Khushalani, J. S., Qin, J., Ekwueme, D. U., & White, A. (2019). Awareness of breast cancer risk related to a positive family history and alcohol consumption among women aged 15-44 years in United States. *Preventive Medicine Reports*, 17, 101029. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2019.101029>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., & Maglott, D. R. (2014). ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D980–D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1113>

- Liu, J., Chen, Q., Alkam, E., Zheng, X., Li, Y., Wang, L., & Fang, J. (2020). Association between gene polymorphisms of TGF- β and Smad3 and susceptibility to arthritis: a meta-analysis. *Expert review of clinical immunology*, 16(9), 943–954. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1816826>
- Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Advances in Clinical Chemistry*, 80, 45–72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>
- Mathur, S., & Sutton, J. (2017). Personalized medicine could transform healthcare (Review). *Biomedical Reports*, 7, 3-5. <https://doi.org/10.3892/br.2017.922>
- Mayer, S., Rüdiger, S., Ang, H. C., Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Correlation of Levels of Folded Recombinant p53 in Escherichia coli with Thermodynamic Stability in Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 372(1), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.044>
- National Cancer Institute. (2025). The Cancer Genome Atlas Program. <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> (Erişim tarihi: 18 Mayıs 2025)
- National Center for Biotechnology Information. (2024). ClinVar: Clinical variants database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (Erişim tarihi: 18.09.2024)
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Research*, 11(5), 863–874. <https://doi.org/10.1101/gr.176601>
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3812–3814. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>
- Niroula, A., & Vihinen, M. (2016). Variation Interpretation Predictors: Principles, Types, Performance, and Choice. *Human Mutation*, 37(6), 579–597. <https://doi.org/10.1002/humu.22987>
- Pal, M., Das, D. & Pandey, M. Understanding genetic variations associated with familial breast cancer. *World J Surg Onc* 22, 271 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12957-024-03553-9>
- Park, K. H., Lo Han, S. G., Whang, Y. M., Lee, H. J., Yoo, Y. D., Lee, J. W., Shin, S. W., & Kim, Y. H. (2006). Single nucleotide polymorphisms of the TGFB1 gene and lung cancer risk in a Korean population. *Cancer genetics and cytogenetics*, 169(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2006.03.012>

Pejaver, V., Urresti, J., Lugo-Martinez, J., Pagel, K. A., Lin, G. N., Nam, H. J., ... Radivojac, P. (2020). Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nature Communications*, 11(1), 5918.

Peleg Hasson, S., Menes, T., & Sonnenblick, A. (2020). Comparison of Patient Susceptibility Genes Across Breast Cancer: Implications for Prognosis and Therapeutic Outcomes. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 13, 227–238. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S233485>

Perou, C. M., Jeffrey, S. S., van de Rijn, M., Rees, C. A., Eisen, M. B., Ross, D. T., ... Botstein, D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9212–9217. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9212>

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Petrosino, M., Novak, L., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Turina, P., Capriotti, E., & Consalvi, V. (2021). Analysis and Interpretation of the Impact of Missense Variants in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5416. <https://doi.org/10.3390/ijms22115416>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Rogers, M. F., Shihab, H. A., Mort, M., Cooper, D. N., Gaunt, T. R., & Campbell, C. (2018). FATHMM-XF: Accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(3), 511–513. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx536>

Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651–672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>

Roy, D., Cai, Q., Felty, Q., & Narayan, S. (2007). Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *Journal of*

- Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 10(4), 235–257. <https://doi.org/10.1080/15287390600974924>
- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., ... Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D23–D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- Schayek, H., Korach, H., Laitman, Y., Bernstein-Molho, R., & Friedman, E. (2018). Mutational analysis of candidate genes in Israeli male breast cancer cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(2), 399–404. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4765-3>
- Sepulveda, J. L. (2020). Using R and Bioconductor in Clinical Genomics and Transcriptomics. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 22(1), 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.08.006>
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., et al. (2011). Latent TGF- β structure and activation. *Nature*, 474, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature10152>
- Singh, S. M., Kongari, N., Cabello-Villegas, J., & Mallela, K. M. G. (2010). Missense mutations in dystrophin that trigger muscular dystrophy decrease protein stability and lead to cross- β aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15069–15074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008818107>
- Sim, N.-L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W452–W457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Stel, V. S., Dekker, F. W., Tripepi, G., Zoccali, C., & Jager, K. J. (2011). Survival analysis I: The Kaplan-Meier method. *Nephron Clinical Practice*, 119(1), c83–c88.
- Sukumar, S., Krishnan, A., & Banerjee, S. (2021). An Overview of Bioinformatics Resources for SNP Analysis. In: Singh, V., Kumar, A. (eds) *Advances in Bioinformatics*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6191-1_7
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

The Human Protein Atlas. TGFβ1 protein expression - Subcellular localization. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105329-TGFβ1/subcellular> (Erişim Tarihi: 24.04.2025)

The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

Tokuriki, N., & Tawfik, D. S. (2009). Stability effects of mutations and protein evolvability. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.08.003>

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>

Tsuchida, J., Rothman, J., McDonald, K. A., Nagahashi, M., Takabe, K., & Wakai, T. (2019). Clinical target sequencing for precision medicine of breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 24(2), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s10147-018-1373-5>

UniProt Consortium. (2008). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D190–D195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm895>

UniProt. TGF-β1 (Entry: P01137). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P01137> (Erişim Tarihi: 26.04.2025)

Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., & Ng, P. C. (2016). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>

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. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-548>

Vitiello, G. A. F., Amarante, M. K., Crespigio, J., et al. (2021). TGFβ1 pathway components in breast cancer tissue from aggressive subtypes correlate with better prognostic parameters in ER-positive and p53-negative cancers. *Surgical and Experimental Pathology*, 4, 14. <https://doi.org/10.1186/s42047-021-00097-0>

Walton, K. L., Makanji, Y., Chen, J., Wilce, M. C., Chan, K. L., Robertson, D. M., & Harrison, C. A. (2010). Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the

- latent transforming growth factor-beta1 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 17029–17037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110288>
- Wang, L. L., Li, Y., & Zhou, S. F. (2009). A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(5), 977–991. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.026047>
- Wang, Y., Wang, X., Wang, X., Zhang, D., & Jiang, S. (2015). Effect of transforming growth factor- β 1 869C/T polymorphism and radiation pneumonitis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(3), 2835–2839.
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, 95(1130), 20211033. <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>
- Xie, F., Ling, L., van Dam, H., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 121–132.
- Xiao, H., Wang, K., Li, D., Wang, K., & Yu, M. (2021). Evaluation of FGFR1 as a diagnostic biomarker for ovarian cancer using TCGA and GEO datasets. *PeerJ*, 9, e10817. <https://doi.org/10.7717/peerj.10817>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 52, 5.8.1–5.8.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yates, C. M., & Sternberg, M. J. (2013a). The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology*, 425(21), 3949–3963. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.012>
- Yates, C. M., & Sternberg, M. J. (2013b). Proteins and domains vary in their tolerance of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs). *Journal of Molecular Biology*, 425(8), 1274–1286. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.026>
- Yin, S., Ding, F., & Dokholyan, N. V. (2007a). Eris: An automated estimator of protein stability. *Nature Methods*, 4(6), 466–467. <https://doi.org/10.1038/nmeth0607-466>

Yin, S., Ding, F., & Dokholyan, N. V. (2007b). Modeling backbone flexibility improves protein stability estimation. *Structure (London, England : 1993)*, 15(12), 1567–1576. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.024>

Zenebe, B., Nigussie, H., Belay, G., & Seboka, N. (2023). In silico analysis of non-synonymous coding single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human BRCA2 gene. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 16(1), 641. <https://doi.org/10.35248/0974-276X.23.16.641>



EKLER

EK-1 İNTİHAL RAPORU

Berna Türkmen-
Sinonim Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Sanal Fonksiyonel
Profili

TGFβ1 Geninin Non-

ORJİNALLİK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**2**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**0**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

2

Kaya, Niyazi. "Yeni Nesil Dizileme Yontemi Ile Brca1 ve Brca2 Genlerinde Tespit Edilmis Varyantların Biyoinformatik Yontemlerle Analizleri: Retrospektif Calisma", Bursa Uludag University

Yayın

<%**1**

3

Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

ri.ujat.mx

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

tr1.eu-care.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Erturk, Elif. "Kanser Kok hucre Sinyal Iletim yOlaklarında Gorev Alan Mikrorna'ların Meme Tumorlerinde Biyobelirtec Olarak Degerlendirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021

Yayın

<%**1**

7

acikerisim.atlas.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.frontiersin.org

İnternet Kaynağı

EK-2 FASTA DİZİSİ

```
>sp|P01137|TGFB1_HUMAN Transforming growth factor beta-1 proprotein  
MPPSGRLRLPLLLPLLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKRLA  
SPPSQGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEI  
YDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWR  
YLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFT  
TGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYI  
DFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQA  
LEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
```



EK-3 nsSNP ANALİZ VERİLERİ

Gen	Protein Değişimi	GRCh37 Kromozom	GRCh37 Lokasyon	GRCh38 Kromozom	GRCh38 Lokasyon	Varasyon ID	Allel ID	dbSNP ID
TGFB1	T34M	19	41838046	19	41332141	1911603	1973116	
TGFB1	Q335R	19	41838043	19	41332138	1383129	1509725	rs2123080065
TGFB1	K338T	19	41838034	19	41332129	1382525	1434954	rs2037939146
TGFB1	V339D	19	41837114	19	41331209	2113033	2164321	
TGFB1	A341T	19	41837109	19	41331204	2977263	3141088	
TGFB1	A341S	19	41837109	19	41331204	3176638	3342838	
TGFB1	N344T	19	41837099	19	41331194	1306494	1296437	rs2123077879
TGFB1	P354S	19	41837070	19	41331165	1717451	1774076	
TGFB1	A360V	19	41837051	19	41331146	2706767	2870340	
TGFB1	P363R	19	41837042	19	41331137	1916238	1977748	
TGFB1	I366V	19	41837034	19	41331129	1716002	1771299	
TGFB1	V367M	19	41837031	19	41331126	2839223	2996494	
TGFB1	V367L	19	41837031	19	41331126	1908628	1958930	
TGFB1	V370L	19	41837022	19	41331117	2799574	2959398	
TGFB1	E377K	19	41837001	19	41331096	2748256	2918510	
LOC130064510 TGFB1	M38T	19	41858837	19	41352932	3019047	3175411	
TGFB1	N381H	19	41836989	19	41331084	1359501	1370681	rs2123077496
TGFB1	N381S	19	41836988	19	41331083	2850312	3015920	
TGFB1	M382T	19	41836985	19	41331080	1908752	1959054	
TGFB1	I383F	19	41836983	19	41331078	1382552	1513026	rs2123077460
TGFB1	R385G	19	41836977	19	41331072	1475445	1400476	rs981119783
TGFB1	R385H	19	41836976	19	41331071	2166952	1895794	
TGFB1	C387G	19	41836971	19	41331066	2073996	2120644	
TGFB1	C387S	19	41836970	19	41331065	2696192	2861047	
LOC130064510 TGFB1	E39A	19	41858834	19	41352929	2108531	2159945	
TGFB1	S4F	19	41858939	19	41353034	1898806	1953443	
LOC130064510 TGFB1	V41G	19	41858828	19	41352923	3011318	3180704	
TGFB1	G5R	19	41858937	19	41353032	1920364	1975392	
LOC130064510 TGFB1	I49S	19	41858804	19	41352899	1956397	2015243	
LOC130064510 TGFB1	R50C	19	41858802	19	41352897	2983733	3153093	
LOC130064510 TGFB1	G51R	19	41858799	19	41352894	2753889	2916359	
LOC130064510 TGFB1	I53T	19	41858792	19	41352887	2768144	2929312	
LOC130064510 TGFB1	L57M	19	41858781	19	41352876	1415059	1474671	rs1203938760
LOC130064510 TGFB1	A60G	19	41858771	19	41352866	1996313	2053388	
LOC130064510 TGFB1	S61R	19	41858767	19	41352862	1363078	1396398	rs2123118360
LOC130064510 TGFB1	P62T	19	41858766	19	41352861	2981955	3152610	
LOC130064510 TGFB1	S64T	19	41858759	19	41352854	1977671	2024031	
LOC130064510 TGFB1	P69L	19	41858744	19	41352839	1511180	1377995	rs745931726

TGFB1	R7L	19	41858930	19	41353025	2189128	1911471	
LOC130064510 TGFB1	G71D	19	41858738	19	41352833	2079049	2131816	
LOC130064510 TGFB1	P72L	19	41858735	19	41352830	1364850	1409331	rs774505337
LOC130064510 TGFB1	V81C	19	41858708	19	41352803	2825006	2986091	
LOC130064510 TGFB1	S83T	19	41858702	19	41352797	2404786	2390889	
LOC130064510 TGFB1	R85C	19	41858697	19	41352792	2891454	3055264	
LOC130064510 TGFB1	D86H	19	41858694	19	41352789	1977896	2044869	
LOC130064510 TGFB1	D86Y	19	41858694	19	41352789	1013166	1001121	rs201155269
LOC130064510 TGFB1	D86E	19	41858692	19	41352787	2820802	2978047	
LOC130064510 TGFB1	E91K	19	41858679	19	41352774	1897309	1962737	
LOC130064510 TGFB1	E91G	19	41858678	19	41352773	2135032	2190440	
LOC130064510 TGFB1	P95Q	19	41858666	19	41352761	1921762	1979377	
LOC130064510 TGFB1	E98K	19	41858658	19	41352753	2969295	3131837	
LOC130064510 TGFB1	E98Q	19	41858658	19	41352753	3020729	3175788	
LOC130064510 TGFB1	P99T	19	41858655	19	41352750	2877505	3041714	
LOC130064510 TGFB1	P99S	19	41858655	19	41352750	2077523	2131581	
TGFB1	P10R	19	41858921	19	41353016	1473460	1391340	rs1800470
LOC130064510 TGFB1	E100D	19	41858650	19	41352745	3019448	3171956	
LOC130064510 TGFB1	A101V	19	41858648	19	41352743	2860476	3025404	
LOC130064510 TGFB1	D102Y	19	41858646	19	41352741	1720441	1776623	
TGFB1	L11Q	19	41858918	19	41353013	1417381	1377748	rs867906741
LOC130064510 TGFB1	M113T	19	41858612	19	41352707	1981032	2035102	
LOC130064510 TGFB1	E115K	19	41858607	19	41352702	1990387	2048234	
TGFB1 LOC130064510	T116A	19	41858604	19	41352699	1997527	2060609	
TGFB1	I120M	19	41854356	19	41348451	1691632	1684111	rs1018687476
TGFB1	D122N	19	41854352	19	41348447	2118022	2179790	
TGFB1	K123E	19	41854349	19	41348444	3006669	3165618	
TGFB1	F124V	19	41854346	19	41348441	2122661	2184421	
TGFB1	K125R	19	41854342	19	41348437	2985240	3153304	
TGFB1	S127T	19	41854336	19	41348431	1895796	1952593	
TGFB1	H129R	19	41854330	19	41348425	1438953	1448677	rs2123108844
TGFB1	S130G	19	41854328	19	41348423	1721404	1772738	
TGFB1	L13P	19	41858912	19	41353007	1994131	2059793	
TGFB1	I131T	19	41854324	19	41348419	2804599	2970827	
TGFB1	V132H	19	41854322	19	41348417	2130000	2189277	
TGFB1	V132C	19	41854321	19	41348416	1021413	1013750	rs200481365
TGFB1	M133I	19	41854317	19	41348412	1325512	1315768	rs201567874
TGFB1	N136Y	19	41854310	19	41348405	2744153	2903630	

TGFB1	N136S	19	41854309	19	41348404	2118916	2172925	
TGFB1	T137K	19	41854306	19	41348401	2706096	2877421	
TGFB1	P14Q	19	41858909	19	41353004	1957797	2019222	
TGFB1	R141Q	19	41854294	19	41348389	2189097	1911440	
TGFB1	A143V	19	41854288	19	41348383	2832621	2991165	
TGFB1	P145S	19	41854283	19	41348378	1942676	2001537	
TGFB1	V148M	19	41854274	19	41348369	1348432	1459662	rs142642007
TGFB1	S151F	19	41854264	19	41348359	2180006	1912592	
TGFB1	R152W	19	41854262	19	41348357	1908270	1962454	
TGFB1	R156H	19	41854249	19	41348344	2802576	2963261	
TGFB1	K161R	19	41854234	19	41348329	1491287	1508522	rs1433256361
TGFB1	K161N	19	41854233	19	41348328	2008150	2069962	
TGFB1	L162S	19	41854231	19	41348326	2840780	2996768	
TGFB1	H167D	19	41854217	19	41348312	2851791	3006468	
TGFB1	V168M	19	41854214	19	41348309	1346195	1378484	rs1301240679
TGFB1	E169Q	19	41854211	19	41348306	1920186	1975214	
TGFB1	K173E	19	41850769	19	41344864	1383354	1509950	rs2123103625
TGFB1	N177D	19	41850757	19	41344852	1421136	1399863	rs202057576
TGFB1	W179R	19	41850751	19	41344846	634551	622462	rs1568478752
TGFB1	N184K	19	41850734	19	41344829	1483405	1380524	rs2123103533
TGFB1	R185W	19	41850733	19	41344828	1003441	998620	rs201055697
TGFB1	R185Q	19	41850732	19	41344827	1915305	1974228	
TGFB1	L19P	19	41858894	19	41352989	2877583	3041792	
TGFB1	L19R	19	41858894	19	41352989	3325685	3478705	
TGFB1	S190R	19	41850716	19	41344811	2972614	3136394	
TGFB1	D191N	19	41850715	19	41344810	2987647	3150492	
TGFB1	S192L	19	41850711	19	41344806	2861399	3018875	
TGFB1	G202R	19	41850682	19	41344777	1347627	1466057	rs151105395
TGFB1	V204G	19	41850675	19	41344770	2986565	3143057	
TGFB1	R205G	19	41850673	19	41344768	2698632	2854923	
TGFB1	R205W	19	41850673	19	41344768	1049659	1038722	rs199882566
TGFB1	S209R	19	41850661	19	41344756	1439642	1346170	rs746228911
TGFB1	R210C	19	41850658	19	41344753	1379026	1408215	rs779534698
TGFB1	R210H	19	41850657	19	41344752	1510529	1465206	rs201430293
TGFB1	S220N	19	41848128	19	41342223	2771957	2927943	
TGFB1	S220R	19	41848127	19	41342222	2841425	2993578	
TGFB1	A221T	19	41848126	19	41342221	2767837	2932449	
TGFB1	H222R	19	41848122	19	41342217	2093372	2156453	
TGFB1	H222L	19	41848122	19	41342217	1352253	1482789	rs2123098956

TGFB1	D226N	19	41848111	19	41342206	2963600	3117466	
TGFB1	S227N	19	41848107	19	41342202	2415689	1940796	
TGFB1	R228K	19	41848104	19	41342199	2996320	3163028	
TGFB1	R228S	19	41848103	19	41342198	1380392	1421214	rs771288773
TGFB1	D229G	19	41848101	19	41342196	2884647	3053658	
TGFB1	G238R	19	41848075	19	41342170	803560	791931	rs1454205854
TGFB1	F239I	19	41847933	19	41342028	1029928	1018582	rs569594975
TGFB1	T240P	19	41847930	19	41342025	1389042	1476622	rs148552731
TGFB1	T240A	19	41847930	19	41342025	1422888	1412781	rs148552731
TGFB1	T241A	19	41847927	19	41342022	1972775	2033203	
TGFB1	T241I	19	41847926	19	41342021	1431578	1490875	rs72480424
TGFB1	G242S	19	41847924	19	41342019	2072152	2120092	
TGFB1	R25G	19	41858877	19	41352972	2112648	2167930	
TGFB1	I250S	19	41847899	19	41341994	2048181	2107367	
TGFB1	R25Q	19	41858876	19	41352971	2800888	2962868	
TGFB1	H251R	19	41847896	19	41341991	2898901	3060536	
TGFB1	G252S	19	41847894	19	41341989	2876363	3035633	
TGFB1	R255W	19	41847885	19	41341980	3007487	3158784	
TGFB1	R255Q	19	41847884	19	41341979	1907528	1955673	
TGFB1	R255L	19	41847884	19	41341979	2788190	2939398	
TGFB1	L259I	19	41847873	19	41341968	2750314	2919272	
TGFB1	L260P	19	41847869	19	41341964	1490438	1433507	rs2123098293
TGFB1	M261L	19	41847867	19	41341962	1930104	1991576	
TGFB1	M261T	19	41847866	19	41341961	963045	950803	rs2038060686
TGFB1	M261I	19	41847865	19	41341960	2964956	3117523	
TGFB1	P264L	19	41847857	19	41341952	1467482	1356989	rs146182311
TGFB1	A268V	19	41847845	19	41341940	2812615	2975847	
TGFB1	H270Y	19	41847840	19	41341935	2632666	2797106	
TGFB1	R275Q	19	41847824	19	41341919	2099663	2147221	
TGFB1	R277C	19	41847819	19	41341914	2114206	2172100	
TGFB1	R277H	19	41847818	19	41341913	2102313	2165358	
TGFB1	R278G	19	41847816	19	41341911	1416735	1487475	rs1599888650
TGFB1	D281N	19	41847807	19	41341902	1478546	1429782	rs1348401868
TGFB1	S287C	19	41847789	19	41341884	2110344	2160464	
TGFB1	G29R	19	41858865	19	41352960	2414800	1947303	
TGFB1	G29R	19	41858865	19	41352960	1358332	1460631	rs200868154
TGFB1	S288F	19	41838184	19	41332279	2013824	2067907	
TGFB1	T289A	19	41838182	19	41332277	2069765	2129854	
TGFB1	T289M	19	41838181	19	41332276	1932954	1985372	

TGFB1	G29A	19	41858864	19	41352959	1461638	1494581	rs199758510
TGFB1	V295M	19	41838164	19	41332259	2769957	2929826	
TGFB1	R296G	19	41838161	19	41332256	2745238	2907298	
TGFB1	L298P	19	41838154	19	41332249	1506364	1430289	rs2123080497
TGFB1	I300T	19	41838148	19	41332243	1972017	2029446	
TGFB1	D301H	19	41838146	19	41332241	1365198	1502242	rs2037941311
TGFB1	R303H	19	41838139	19	41332234	1990873	2044812	
TGFB1	S31A	19	41858859	19	41352954	1356981	1348412	rs61761349
TGFB1	K309R	19	41838121	19	41332216	2015218	2068016	
TGFB1	I311V	19	41838116	19	41332211	2745656	2903849	
TGFB1	H312Y	19	41838113	19	41332208	1061718	1051331	rs2123080343
TGFB1	E313K	19	41838110	19	41332205	2606638	2769069	
TGFB1	E313D	19	41838108	19	41332203	2148803	1881130	
TGFB1	K315R	19	41838103	19	41332198	1383975	1447571	rs199516461
TGFB1	P325A	19	41838074	19	41332169	1917611	1967895	
TGFB1	Y328C	19	41838064	19	41332159	2760940	2918234	

EK-4

SIFT ve PROVEAN ANALİZ VERİLERİ

PROTEİN ID	PROTEİN KODU	KONUMU	VE	DEĞİŞİMİ	PROVEAN	TAHMİN SKORU	#SEQ	#CLUSTER	SIFT SKOR	TAHMİNİ	MEDYAN_INFO	#SEQ
ENSP00000221930	334	T	M		-3.18	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	137
ENSP00000221930	335	Q	R		-1.09	Neutral	220	30	0.072	Tolerated	2.87	136
ENSP00000221930	338	K	T		-1.95	Neutral	220	30	0.314	Tolerated	2.87	136
ENSP00000221930	339	V	D		-5.18	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	136
ENSP00000221930	341	A	T		-1.81	Neutral	220	30	0.039	Damaging	2.87	136
ENSP00000221930	341	A	S		-0.54	Neutral	220	30	0.879	Tolerated	2.87	136
ENSP00000221930	344	N	T		-3.41	Deleterious	220	30	0.002	Damaging	2.87	136
ENSP00000221930	354	P	S		-6.33	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	134
ENSP00000221930	360	A	V		0.04	Neutral	220	30	0.396	Tolerated	2.88	134
ENSP00000221930	363	P	R		-7.00	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.87	135
ENSP00000221930	366	I	V		-0.77	Neutral	220	30	0.000	Damaging	2.87	134
ENSP00000221930	367	V	M		-0.33	Neutral	220	30	0.095	Tolerated	2.87	134
ENSP00000221930	367	V	L		0.46	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.87	134
ENSP00000221930	370	V	L		-1.53	Neutral	220	30	0.073	Tolerated	2.87	134
ENSP00000221930	377	E	K		-3.00	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	134
ENSP00000221930	38	M	T		-2.89	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	381	N	H		-3.75	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	134
ENSP00000221930	381	N	S		-3.75	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	134
ENSP00000221930	382	M	T		-4.50	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	134
ENSP00000221930	383	I	F		-2.79	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	132
ENSP00000221930	385	R	G		-3.37	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	131
ENSP00000221930	385	R	H		-2.43	Neutral	220	30	0.001	Damaging	2.88	131
ENSP00000221930	387	C	G		-8.48	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.86	129
ENSP00000221930	387	C	S		-7.12	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.86	129
ENSP00000221930	39	E	A		-3.36	Deleterious	220	30	0.016	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	4	S	F		-0.56	Neutral	220	30	0.000	Damaging	4.32	10
ENSP00000221930	41	V	G		-3.50	Deleterious	220	30	0.016	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	5	G	R		-0.45	Neutral	220	30	0.000	Damaging	4.32	10
ENSP00000221930	49	I	S		-4.24	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	50	R	C		-5.66	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	51	G	R		-5.39	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.86	124
ENSP00000221930	53	I	T		-3.84	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.86	126
ENSP00000221930	57	L	M		-1.49	Neutral	220	30	0.000	Damaging	2.86	126
ENSP00000221930	60	A	G		-1.12	Neutral	220	30	0.081	Tolerated	2.87	126
ENSP00000221930	61	S	R		-0.97	Neutral	220	30	0.053	Tolerated	2.86	127
ENSP00000221930	62	P	T		-3.45	Deleterious	220	30	0.068	Tolerated	2.86	127
ENSP00000221930	64	S	T		-0.80	Neutral	220	30	0.051	Tolerated	2.89	108
ENSP00000221930	69	P	L		-2.30	Neutral	220	30	0.009	Damaging	2.90	124
ENSP00000221930	7	R	L		-0.67	Neutral	220	30	0.000	Damaging	4.32	10
ENSP00000221930	71	G	D		0.42	Neutral	220	30	0.556	Tolerated	2.87	107
ENSP00000221930	72	P	L		-1.14	Neutral	220	30	0.179	Tolerated	2.87	106
ENSP00000221930	81	Y	C		-6.92	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	130
ENSP00000221930	83	S	T		-2.24	Neutral	220	30	0.003	Damaging	2.87	130
ENSP00000221930	85	R	C		-3.14	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.87	130
ENSP00000221930	86	D	H		-2.58	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.87	130
ENSP00000221930	86	D	Y		-3.81	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.87	130
ENSP00000221930	86	D	E		1.11	Neutral	220	30	0.923	Tolerated	2.87	130
ENSP00000221930	91	E	K		-0.22	Neutral	220	30	0.275	Tolerated	2.90	129
ENSP00000221930	91	E	G		-2.46	Neutral	220	30	0.029	Damaging	2.90	129
ENSP00000221930	95	P	Q		-0.77	Neutral	220	30	0.576	Tolerated	2.85	129
ENSP00000221930	98	E	K		-0.94	Neutral	220	30	0.099	Tolerated	2.87	130
ENSP00000221930	98	E	Q		-0.31	Neutral	220	30	0.136	Tolerated	2.87	130
ENSP00000221930	99	P	T		0.36	Neutral	220	30	0.727	Tolerated	2.87	130
ENSP00000221930	99	P	S		0.62	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.87	130
ENSP00000221930	10	P	R		0.11	Neutral	220	30	0.109	Tolerated	4.32	10
ENSP00000221930	100	E	D		-1.11	Neutral	220	30	0.381	Tolerated	2.87	132
ENSP00000221930	101	A	V		-0.79	Neutral	220	30	0.041	Damaging	2.87	132
ENSP00000221930	102	D	Y		-3.91	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.87	132
ENSP00000221930	11	L	Q		-1.54	Neutral	220	30	0.059	Tolerated	3.47	13
ENSP00000221930	113	M	T		-2.68	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	3.04	132

ENSP00000221930	115	E	K	-0.51	Neutral	220	30	0.346	Tolerated	2.87	134
ENSP00000221930	116	T	A	-0.57	Neutral	220	30	0.329	Tolerated	2.88	133
ENSP00000221930	120	I	M	-0.53	Neutral	220	30	0.030	Damaging	2.88	130
ENSP00000221930	122	D	N	0.09	Neutral	220	30	0.497	Tolerated	2.89	133
ENSP00000221930	123	K	E	-0.48	Neutral	220	30	0.986	Tolerated	3.05	131
ENSP00000221930	124	F	V	0.29	Neutral	220	30	0.498	Tolerated	3.11	129
ENSP00000221930	125	K	R	-0.91	Neutral	220	30	0.268	Tolerated	3.10	130
ENSP00000221930	127	S	T	0.06	Neutral	220	30	0.666	Tolerated	3.04	129
ENSP00000221930	129	H	R	-1.40	Neutral	220	30	0.116	Tolerated	2.89	132
ENSP00000221930	130	S	G	-1.03	Neutral	220	30	0.180	Tolerated	2.89	132
ENSP00000221930	13	L	P	-2.11	Neutral	220	30	0.002	Damaging	3.09	30
ENSP00000221930	131	I	T	-0.54	Neutral	220	30	0.110	Tolerated	2.89	132
ENSP00000221930	132	Y	H	-1.24	Neutral	220	30	0.155	Tolerated	2.88	107
ENSP00000221930	132	Y	C	-1.13	Neutral	220	30	0.081	Tolerated	2.88	107
ENSP00000221930	133	M	I	-0.56	Neutral	220	30	0.457	Tolerated	2.87	134
ENSP00000221930	136	N	Y	-3.97	Deleterious	220	30	0.016	Damaging	2.88	136
ENSP00000221930	136	N	S	-2.64	Deleterious	220	30	0.081	Tolerated	2.88	136
ENSP00000221930	137	T	K	-1.49	Neutral	220	30	0.120	Tolerated	2.88	136
ENSP00000221930	14	P	Q	-0.10	Neutral	220	30	0.584	Tolerated	3.09	30
ENSP00000221930	141	R	Q	-0.79	Neutral	220	30	0.074	Tolerated	2.88	136
ENSP00000221930	143	A	V	-1.04	Neutral	220	30	0.244	Tolerated	2.88	134
ENSP00000221930	145	P	S	0.65	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.92	130
ENSP00000221930	148	V	M	0.21	Neutral	220	30	0.269	Tolerated	2.91	53
ENSP00000221930	151	S	F	-0.42	Neutral	220	30	0.919	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	152	R	W	-4.33	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	156	R	H	-3.88	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	161	K	R	-1.14	Neutral	220	30	0.059	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	161	K	N	-0.91	Neutral	220	30	0.084	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	162	L	S	1.60	Neutral	220	30	0.744	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	167	H	D	-2.17	Neutral	220	30	0.001	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	168	V	M	-1.02	Neutral	220	30	0.101	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	169	E	Q	-2.42	Neutral	220	30	0.000	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	173	K	E	0.19	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	177	N	D	0.62	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	179	W	R	-1.12	Neutral	220	30	0.098	Tolerated	2.89	136
ENSP00000221930	184	N	K	-1.45	Neutral	220	30	0.027	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	185	R	W	-5.31	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	185	R	Q	-2.12	Neutral	220	30	0.057	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	19	L	P	-2.67	Deleterious	220	30	0.006	Damaging	3.06	75
ENSP00000221930	19	L	R	-2.31	Neutral	220	30	0.004	Damaging	3.06	75
ENSP00000221930	190	S	R	0.63	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	191	D	N	-0.27	Neutral	220	30	0.499	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	192	S	L	-2.74	Deleterious	220	30	0.094	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	202	G	R	-0.08	Neutral	220	30	0.124	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	204	V	G	-5.47	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	205	R	G	-3.67	Deleterious	220	30	0.009	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	205	R	W	-4.54	Deleterious	220	30	0.002	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	209	S	R	-0.75	Neutral	220	30	0.575	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	210	R	C	-2.54	Deleterious	220	30	0.063	Tolerated	2.89	136
ENSP00000221930	210	R	H	1.48	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.89	136
ENSP00000221930	220	S	N	-1.47	Neutral	220	30	0.007	Damaging	2.89	137

ENSP00000221930	220	S	N	-1.47	Neutral	220	30	0.007	Damaging	2.89	137
ENSP00000221930	220	S	R	-1.58	Neutral	220	30	0.091	Tolerated	2.89	137
ENSP00000221930	221	A	T	-0.82	Neutral	220	30	0.185	Tolerated	2.89	137
ENSP00000221930	222	H	R	-4.71	Deleterious	220	30	0.004	Damaging	2.89	137
ENSP00000221930	222	H	L	-6.10	Deleterious	220	30	0.006	Damaging	2.89	137
ENSP00000221930	226	D	N	-0.90	Neutral	220	30	0.610	Tolerated	2.89	137
ENSP00000221930	227	S	N	0.90	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	228	R	K	0.99	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.90	137
ENSP00000221930	228	R	S	0.16	Neutral	220	30	0.394	Tolerated	2.90	137
ENSP00000221930	229	D	G	-1.58	Neutral	220	30	0.251	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	238	G	R	-5.46	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	239	F	I	0.31	Neutral	220	30	0.896	Tolerated	2.90	138
ENSP00000221930	240	T	P	-0.76	Neutral	220	30	0.209	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	240	T	A	-0.41	Neutral	220	30	0.363	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	241	T	A	-0.48	Neutral	220	30	0.555	Tolerated	2.91	137
ENSP00000221930	241	T	I	-1.50	Neutral	220	30	0.179	Tolerated	2.91	137
ENSP00000221930	242	G	S	0.26	Neutral	220	30	0.685	Tolerated	2.93	133
ENSP00000221930	25	R	G	0.32	Neutral	220	30	0.528	Tolerated	3.02	78
ENSP00000221930	250	I	S	-2.32	Neutral	220	30	0.021	Damaging	2.92	136
ENSP00000221930	25	R	Q	-0.10	Neutral	220	30	0.078	Tolerated	3.02	78
ENSP00000221930	251	H	R	0.09	Neutral	220	30	0.174	Tolerated	2.92	135
ENSP00000221930	252	G	S	0.64	Neutral	220	30	1.000	Tolerated	2.92	135
ENSP00000221930	255	R	W	-3.63	Deleterious	220	30	0.003	Damaging	2.88	137
ENSP00000221930	255	R	Q	-0.66	Neutral	220	30	0.244	Tolerated	2.88	137
ENSP00000221930	255	R	L	-2.04	Neutral	220	30	0.239	Tolerated	2.88	137
ENSP00000221930	259	L	I	-0.93	Neutral	220	30	0.414	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	260	L	P	-4.34	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	261	M	L	-2.22	Neutral	220	30	0.004	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	261	M	T	-4.04	Deleterious	220	30	0.148	Tolerated	2.88	139
ENSP00000221930	261	M	I	-3.06	Deleterious	220	30	0.002	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	264	P	L	-8.50	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	139
ENSP00000221930	268	A	V	-0.64	Neutral	220	30	0.426	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	270	H	Y	-2.52	Deleterious	220	30	0.041	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	275	R	Q	-3.33	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	277	R	C	-5.31	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	277	R	H	-3.27	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	278	R	G	-5.38	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	281	D	N	-3.14	Deleterious	220	30	0.007	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	287	S	C	-2.41	Neutral	220	30	0.020	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	29	G	R	-2.03	Neutral	220	30	0.025	Damaging	2.88	114
ENSP00000221930	29	G	R	-2.03	Neutral	220	30	0.025	Damaging	2.88	114
ENSP00000221930	288	S	F	-3.48	Deleterious	220	30	0.002	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	289	T	A	-1.07	Neutral	220	30	0.687	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	289	T	M	-1.00	Neutral	220	30	0.098	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	29	G	A	-0.28	Neutral	220	30	0.660	Tolerated	2.88	114
ENSP00000221930	295	V	M	-1.44	Neutral	220	30	0.004	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	296	R	G	-5.90	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	298	L	P	-6.10	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	300	I	T	-4.31	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	301	D	H	-5.38	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	303	R	H	-4.13	Deleterious	220	30	0.001	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	31	S	A	-2.05	Neutral	220	30	0.006	Damaging	2.87	120
ENSP00000221930	309	K	R	-2.04	Neutral.	220	30	0.090	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	311	I	V	-0.72	Neutral	220	30	0.175	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	312	H	Y	-5.07	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	313	E	K	-2.18	Neutral	220	30	0.058	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	313	E	D	-2.35	Neutral	220	30	0.004	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	315	K	R	-1.86	Neutral	220	30	0.005	Damaging	2.88	138
ENSP00000221930	325	P	A	-1.72	Neutral	220	30	0.515	Tolerated	2.88	138
ENSP00000221930	328	Y	C	-7.25	Deleterious	220	30	0.000	Damaging	2.88	138

EK-5 POLYPHEN-2 ANALİZ VERİLERİ

Varyant	HumDiv Skor	Sonuç	Hassaslık	Duyarlılık
T334M	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
Q335R	0.738	Possibly Damaging	0.85	0.92
K338T	0.866	Possibly Damaging	0.83	0.93
V339D	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
A341T	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
A341S	0.886	Possibly Damaging	0.82	0.94
N344T	0.996	Probably Damaging	0.55	0.98
P354S	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
A360V	0.019	Benign	0.95	0.80
P363R	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
I366V	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
V367M	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
V367L	0.012	Benign	0.96	0.78
V370L	0.219	Benign	0.91	0.88
E377K	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
M38T	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
N381H	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
N381S	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00

M382T	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
I383F	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
R385G	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
C387G	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
C387S	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
E39A	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
S4F	0.981	Probably Damaging	0.75	0.96
V41G	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
G5R	0.006	Benign	0.97	0.75
I49S	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R50C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
G51R	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
I53T	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
L57M	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
A60G	0.036	Benign	0.94	0.82
S61R	0.109	Benign	0.93	0.86
P62T	0.053	Benign	0.94	0.84
S64T	0.002	Benign	0.99	0.30
P69L	0.872	Possibly Damaging	0.83	0.93
R7L	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99

G71D	0.036	Benign	0.94	0.82
P72L	0.991	Probably Damaging	0.71	0.97
Y81C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
S83T	0.174	Benign	0.92	0.87
R85C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
D86H	0.932	Possibly Damaging	0.80	0.94
D86Y	0.973	Probably Damaging	0.77	0.96
D86E	0.000	Benign	1.00	0.00
E91K	0.001	Benign	0.99	0.15
E91G	0.449	Benign	0.89	0.90
P95Q	0.087	Benign	0.93	0.85
E98K	0.057	Benign	0.94	0.84
E98Q	0.011	Benign	0.96	0.78
P99T	0.018	Benign	0.95	0.80
P99S	0.745	Possibly Damaging	0.85	0.92
P10R	0.001	Benign	0.99	0.15
E100D	0.049	Benign	0.94	0.83
A101V	0.256	Benign	0.91	0.88
D102Y	0.997	Probably Damaging	0.41	0.98
L11Q	0.343	Benign	0.90	0.89
M113T	0.309	Benign	0.90	0.89

E115K	0.001	Benign	0.99	0.15
T116A	0.001	Benign	0.99	0.15
I120M	0.996	Probably Damaging	0.55	0.98
D122N	0.000	Benign	1.00	0.00
K123E	0.011	Benign	0.96	0.78
F124V	0.000	Benign	1.00	0.00
K125R	0.000	Benign	1.00	0.00
S127T	0.000	Benign	1.00	0.00
H129R	0.434	Benign	0.89	0.90
S130G	0.178	Benign	0.92	0.87
L13P	0.000	Benign	1.00	0.00
I131T	0.271	Benign	0.91	0.88
Y132H	0.004	Benign	0.97	0.59
Y132C	0.905	Possibly Damaging	0.82	0.94
M133I	0.004	Benign	0.97	0.59
N136Y	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
N136S	0.996	Probably Damaging	0.55	0.98
T137K	0.957	Probably Damaging	0.78	0.95
P14Q	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99
R141Q	0.944	Possibly Damaging	0.80	0.95
A143V	0.901	Possibly Damaging	0.82	0.94
P145S	0.758	Possibly Damaging	0.85	0.92

V148M	0.002	Benign	0.99	0.30
S151F	0.096	Benign	0.93	0.85
R152W	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R156H	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
K161R	0.001	Benign	0.99	0.15
L162S	0.022	Benign	0.95	0.80
H167D	0.977	Probably Damaging	0.79	0.96
V168M	0.992	Probably Damaging	0.70	0.97
E169Q	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
K173E	0.094	Benign	0.93	0.85
N177D	0.000	Benign	1.00	0.00
W179R	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
N184K	0.631	Possibly Damaging	0.87	0.91
R185W	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
L19P	0.950	Possibly Damaging	0.79	0.95
L19R	0.950	Possibly Damaging	0.79	0.95
S190R	0.276	Benign	0.91	0.88
D191N	0.001	Benign	0.99	0.15
S192L	0.135	Benign	0.92	0.86
G202R	0.805	Possibly Damaging	0.84	0.93
V204G	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00

R205G	0.997	Probably Damaging	0.41	0.98
R205W	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
S209R	0.001	Benign	0.99	0.15
R210C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R210H	0.001	Benign	0.99	0.15
S220N	0.206	Benign	0.92	0.88
S220R	0.106	Benign	0.92	0.86
A221T	0.003	Benign	0.98	0.44
H222R	0.689	Possibly Damaging	0.86	0.92
H222L	0.314	Benign	0.90	0.89
D226N	0.000	Benign	1.00	0.00
S227N	0.000	Benign	1.00	0.00
R228K	0.000	Benign	1.00	0.00
R228S	0.007	Benign	0.96	0.75
D229G	0.015	Benign	0.96	0.79
G238R	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
F239I	0.001	Benign	0.99	0.19
T240P	0.000	Benign	1.00	0.00
T240A	0.000	Benign	1.00	0.00
T241A	0.000	Benign	1.00	0.00
T241I	0.000	Benign	1.00	0.00
G242S	0.000	Benign	1.00	0.00

R25G	0.041	Benign	1.00	0.00
I250S	0.983	Probably Damaging	0.74	0.96
R25Q	0.980	Probably Damaging	0.75	0.96
H251R	0.008	Benign	0.96	0.76
G252S	0.000	Benign	1.00	0.00
R255W	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R255Q	0.650	Probably Damaging	0.87	0.91
R255L	0.570	Probably Damaging	0.81	0.91
R259I	0.990	Probably Damaging	0.72	0.97
L260P	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
M261L	0.030	Benign	0.95	0.82
M261T	0.917	Possibly Damaging	0.81	0.94
M261I	0.537	Possibly Damaging	0.88	0.90
P264L	0.969	Probably Damaging	0.77	0.95
A268V	0.241	Benign	0.91	0.88
H270Y	0.279	Benign	0.91	0.88
R275Q	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R277C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R277H	0.995	Probably Damaging	0.68	0.97
R278G	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99

D281N	0.617	Possibly Damaging	0.87	0.91
S287C	0.974	Probably Damaging	0.76	0.96
G29R	0.043	Benign	0.94	0.83
S288F	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99
T289A	0.429	Benign	0.89	0.90
T289M	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99
G29A	0.004	Benign	0.97	0.59
V295M	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99
R296G	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
L298P	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
I300T	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
D301H	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
R303H	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
S31A	0.992	Probably Damaging	0.70	0.97
K309R	0.999	Probably Damaging	0.14	0.99
I311V	0.998	Probably Damaging	0.27	0.99
H312Y	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
E313K	0.946	Possibly Damaging	0.80	0.95
E313D	0.994	Probably Damaging	0.69	0.97
K315R	0.974	Probably Damaging	0.76	0.96
P325A	0.836	Possibly Damaging	0.84	0.93

Y328C	1.000	Probably Damaging	0.00	1.00
K161N	0.320	Benign	0.90	0.89



EK-6 FATHMM-XF ANALİZ VERİLERİ

#	Chromosome	Position	Ref. Base	Mutant Base	Coding Score
19	41331065	C	G	0.819538	pathogenic
19	41331066	A	C	0.938865	pathogenic
19	41331071	C	T	0.104110	benign
19	41331072	G	C	0.704962	pathogenic
19	41331078	T	A	0.250888	benign
19	41331080	A	G	0.884979	pathogenic
19	41331083	T	C	0.730149	pathogenic
19	41331084	T	G	0.747140	pathogenic
19	41331096	C	T	0.872206	pathogenic
19	41331117	C	G	0.368124	benign
19	41331126	C	T	0.065129	benign
19	41331126	C	G	0.105462	benign
19	41331129	T	C	0.914114	pathogenic
19	41331137	G	C	0.921755	pathogenic
19	41331146	G	A	0.057816	benign
19	41331165	G	A	0.918082	pathogenic
19	41331194	T	G	0.792553	pathogenic
19	41331204	C	T	0.245350	benign
19	41331204	C	A	0.271134	benign
19	41331209	A	T	0.961201	pathogenic
19	41332129	T	G	0.252781	benign
19	41332138	T	C	0.388865	benign
19	41332141	G	A	0.275608	benign
19	41332159	T	C	0.823398	pathogenic
19	41332169	G	C	0.199563	benign
19	41332198	T	C	0.212930	benign
19	41332203	C	A	0.373573	benign
19	41332205	C	T	0.629095	pathogenic
19	41332208	G	A	0.923021	pathogenic
19	41332211	T	C	0.707816	pathogenic
19	41332216	T	C	0.524072	pathogenic
19	41332234	C	T	0.816100	pathogenic
19	41332241	C	G	0.808064	pathogenic
19	41332243	A	G	0.939597	pathogenic
19	41332249	A	G	0.901227	pathogenic
19	41332256	G	C	0.668196	pathogenic
19	41332259	C	T	0.156148	benign
19	41332276	G	A	0.088226	benign
19	41332277	T	C	0.056827	benign
19	41332279	G	A	0.451318	benign
19	41341884	T	A	0.205872	benign
19	41341902	C	T	0.755386	pathogenic
19	41341911	G	C	0.388966	benign
19	41341913	C	T	0.445570	benign
19	41341914	G	A	0.753270	pathogenic
19	41341919	C	T	0.492346	benign
19	41341935	G	A	0.520979	pathogenic
19	41341940	G	A	0.843263	pathogenic
19	41341952	G	A	0.703341	pathogenic
19	41341960	C	G	0.698735	pathogenic

19	41341961	A	G	0.656828	--	pathogenic
19	41341962	T	A	0.589010	--	pathogenic
19	41341964	A	G	0.852914	--	pathogenic
19	41341968	G	T	0.313126	--	benign
19	41341979	C	T	0.204428	--	benign
19	41341979	C	A	0.158560	--	benign
19	41341980	G	A	0.646121	--	pathogenic
19	41341989	C	T	0.130304	--	benign
19	41341991	T	C	0.100338	--	benign
19	41341994	A	C	0.492477	--	benign
19	41342019	C	T	0.060709	--	benign
19	41342021	G	A	0.149822	--	benign
19	41342022	T	C	0.128529	--	benign
19	41342025	T	G	0.261347	--	benign
19	41342025	T	C	0.096727	--	benign
19	41342028	A	T	0.053864	--	benign
19	41342170	C	T	0.671960	--	pathogenic
19	41342196	T	C	0.146397	--	benign
19	41342198	C	A	0.199524	--	benign
19	41342199	C	T	0.048101	--	benign
19	41342202	C	T	0.055865	--	benign
19	41342206	C	T	0.619890	--	pathogenic
19	41342217	T	C	0.654256	--	pathogenic
19	41342217	T	A	0.679747	--	pathogenic
19	41342221	C	T	0.180721	--	benign
19	41342222	G	T	0.224695	--	benign
19	41342223	C	T	0.612719	--	pathogenic
19	41344752	C	T	0.054401	--	benign
19	41344753	G	A	0.259022	--	benign
19	41344756	T	G	0.443789	--	benign
19	41344768	G	C	0.286012	--	benign
19	41344768	G	A	0.462630	--	benign
19	41344770	A	C	0.789756	--	pathogenic
19	41344777	C	T	0.096869	--	benign
19	41344806	G	A	0.164338	--	benign
19	41344810	C	T	0.132735	--	benign
19	41344811	G	C	0.138757	--	benign
19	41344827	C	T	0.107161	--	benign
19	41344828	G	A	0.572019	--	pathogenic
19	41344829	G	T	0.421798	--	benign
19	41344846	A	G	0.376832	--	benign
19	41344852	T	C	0.054008	--	benign
19	41344864	T	C	0.143562	--	benign
19	41348306	C	G	0.784959	--	pathogenic
19	41348309	C	T	0.762374	--	pathogenic
19	41348312	G	C	0.579300	--	pathogenic
19	41348326	A	G	0.076550	--	benign
19	41348328	C	A	0.130001	--	benign
19	41348329	T	C	0.137193	--	benign
19	41348344	C	T	0.318432	--	benign

19	41348357	G	A	0.503162	--	pathogenic
19	41348359	G	A	0.207042	--	benign
19	41348369	C	T	0.127538	--	benign
19	41348378	G	A	0.125302	--	benign
19	41348383	G	A	0.259278	--	benign
19	41348389	C	T	0.351742	--	benign
19	41348401	G	T	0.317694	--	benign
19	41348404	T	C	0.671594	--	pathogenic
19	41348405	T	A	0.546006	--	pathogenic
19	41348412	C	T	0.194940	--	benign
19	41348416	T	C	0.179344	--	benign
19	41348417	A	G	0.101905	--	benign
19	41348419	A	G	0.109858	--	benign
19	41348423	T	C	0.486997	--	benign
19	41348425	T	C	0.448655	--	benign
19	41348431	C	G	0.090144	--	benign
19	41348437	T	C	0.087640	--	benign
19	41348441	A	C	0.083762	--	benign
19	41348444	T	C	0.102462	--	benign
19	41348447	C	T	0.050644	--	benign
19	41348451	G	C	0.232680	--	benign
19	41352699	T	C	0.142165	--	benign
19	41352702	C	T	0.304825	--	benign
19	41352707	A	G	0.163450	--	benign
19	41352741	C	A	0.952997	--	pathogenic
19	41352743	G	A	0.265361	--	benign
19	41352745	C	A	0.487965	--	benign
19	41352750	G	T	0.219483	--	benign
19	41352750	G	A	0.235548	--	benign
19	41352753	C	T	0.334322	--	benign
19	41352753	C	G	0.461027	--	benign
19	41352761	G	T	0.308346	--	benign
19	41352773	T	C	0.757229	--	pathogenic
19	41352774	C	T	0.463740	--	benign
19	41352787	G	T	0.565236	--	pathogenic
19	41352789	C	G	0.790470	--	pathogenic
19	41352789	C	A	0.829640	--	pathogenic
19	41352792	G	A	0.581626	--	pathogenic
19	41352797	C	G	0.942608	--	pathogenic
19	41352803	T	C	0.762037	--	pathogenic
19	41352830	G	A	0.313637	--	benign
19	41352833	C	T	0.200739	--	benign
19	41352839	G	A	0.277641	--	benign
19	41352854	C	G	0.139668	--	benign
19	41352861	G	T	0.510104	--	pathogenic
19	41352862	G	T	0.428254	--	benign
19	41352866	G	C	0.138194	--	benign
19	41352876	G	T	0.637009	--	pathogenic
19	41352887	A	G	0.946359	--	pathogenic
19	41352894	C	G	0.936474	--	pathogenic
19	41352897	G	A	0.850794	--	pathogenic
19	41352899	A	C	0.948578	--	pathogenic

EK-7 SNP&GO ANALİZ VERİLERİ

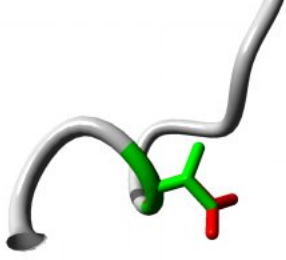
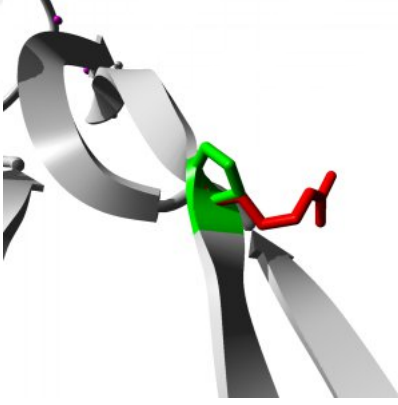
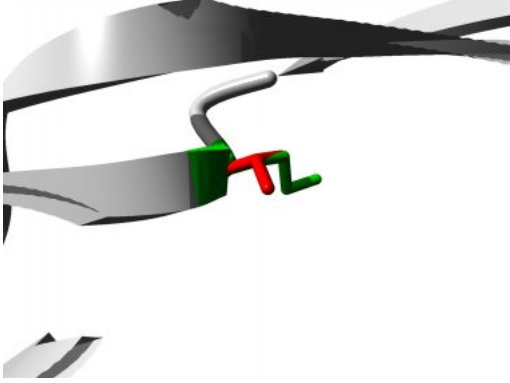
Protein Varyant	Patojenite	Tahmin Skoru	Tahminin güvenilirlik seviyesi (RI)
P01137 K309R	Pathogenic	0.7084826762246117	4
P01137 R85C	Pathogenic	0.9325077399380804	9
P01137 H167D	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137 K161N	Pathogenic	0.5404411764705884	1
P01137 H129R	Benign	0.32827324478178366	3
P01137 K125R	Benign	0.2648648648648648	5
P01137 H312Y	Pathogenic	0.9304662379421221	9
P01137 E39A	Benign	0.2656250000000000	5
P01137 L298P	Pathogenic	0.9814814814814815	10
P01137 T137K	Benign	0.4113636363636364	2
P01137 F124V	Benign	0.22937625754527163	5
P01137 P325A	Pathogenic	0.7084826762246117	4
P01137 R185W	Pathogenic	0.9301310043668122	9
P01137 D229G	Pathogenic	0.7191151919866443	4
P01137 D191N	Benign	0.14873603762492651	7
P01137 N177D	Benign	0.16747337850919652	7
P01137 N381H	Pathogenic	0.7405857740585774	5
P01137 S220R	Pathogenic	0.6153846153846154	2
P01137 G5R	Benign	0.05997638724911451	9
P01137 R228S	Pathogenic	0.4838709677419355	0
P01137 S287C	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137 D86H	Benign	0.34234234234234234	3
P01137 R255Q	Pathogenic	0.5404411764705884	1
P01137 S151F	Pathogenic	0.5404411764705884	1
P01137 G29A	Benign	0.4113636363636364	2
P01137 S190R	Benign	0.23890967397113844	5
P01137 E313K	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137 I366V	Pathogenic	0.6239130434782607	2
P01137 A360V	Benign	0.2566445182724252	5
P01137 R156H	Pathogenic	0.7191151919866443	4
P01137 H222R	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137 S31A	Benign	0.3610955841252096	3
P01137 E115K	Pathogenic	0.7191151919866443	4
P01137 S4F	Benign	0.05997638724911451	9
P01137 H251R	Benign	0.2857142857142857	4
P01137 T289A	Benign	0.2892561983471074	4
P01137 S130G	Benign	0.32827324478178366	3
P01137 R255L	Pathogenic	0.8375478927203065	7
P01137 E98K	Benign	0.23890967397113844	5
P01137 Y328C	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137 C387G	Pathogenic	0.9304662379421221	9
P01137 V367L	Benign	0.4501347708894879	1
P01137 R255W	Pathogenic	0.8597038191738113	7
P01137 M261I	Benign	0.4630321135175504	1
P01137 V204G	Pathogenic	0.5844504021447721	2
P01137 F239I	Benign	0.4630321135175504	1
P01137 T240P	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137 R25G	Benign	0.1111111111111111	8
P01137 A60G	Benign	0.34234234234234234	3
P01137 R25Q	Benign	0.0886899918633035	8
P01137 A143V	Benign	0.1111111111111111	8
P01137 N184K	Pathogenic	0.6153846153846154	2
P01137 L162S	Benign	0.3760092272202999	2
P01137 M38T	Benign	0.3423913043478261	3
P01137 M113T	Pathogenic	0.5145228215767634	0
P01137 V168M	Benign	0.3760092272202999	2
P01137 R275Q	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137 L57M	Pathogenic	0.8197358197358198	6
P01137 D102Y	Benign	0.2892561983471074	4
P01137 R7L	Benign	0.132412672623883	7
P01137 M382T	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137 R141Q	Benign	0.0967741935483871	8
P01137 G238R	Pathogenic	0.9301310043668122	9
P01137 S288F	Pathogenic	0.8197358197358198	6
P01137 K123E	Benign	0.3472222222222222	3
P01137 I53T	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137 N381S	Pathogenic	0.7191151919866443	4

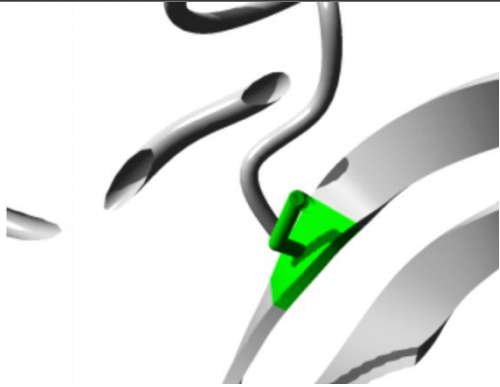
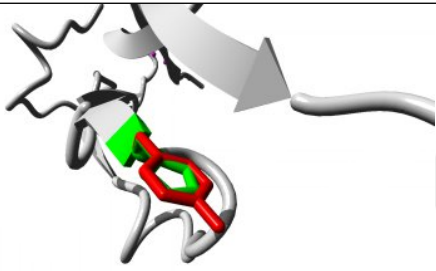
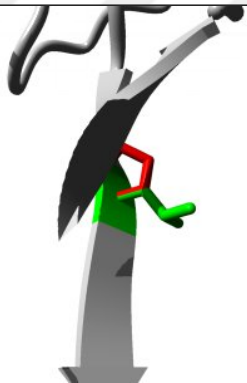
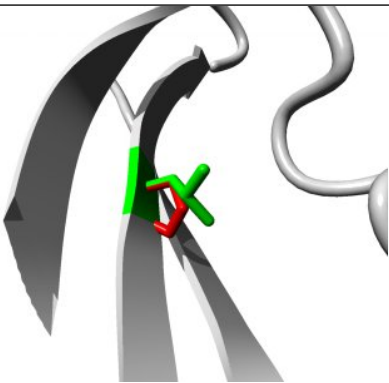
P01137	V339D	Pathogenic	0.9534497090606816	9
P01137	E98Q	Benign	0.1674733785091965	7
P01137	V295M	Pathogenic	0.8465011286681715	7
P01137	S227N	Benign	0.3610955841252096	3
P01137	T289M	Benign	0.2566445182724252	5
P01137	G29R	Pathogenic	0.5145228215767634	0
P01137	G51R	Benign	0.3610955841252096	3
P01137	Y132C	Pathogenic	0.8375478927203065	7
P01137	D122N	Benign	0.132412672623883	7
P01137	P62T	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137	V41G	Pathogenic	0.8597038191738113	7
P01137	A341S	Benign	0.2566445182724252	5
P01137	L13P	Benign	0.4630321135175504	1
P01137	R277C	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137	I383F	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137	P69L	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	V370L	Benign	0.4222222222222222	2
P01137	K338T	Pathogenic	0.6239130434782607	2
P01137	I49S	Pathogenic	0.9534497090606816	9
P01137	R296G	Pathogenic	0.9550881182490051	9
P01137	E313D	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137	R228K	Pathogenic	0.5145228215767634	0
P01137	P145S	Benign	0.08120950323974083	8
P01137	D281N	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137	R385G	Pathogenic	0.5404411764705884	1
P01137	E377K	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137	G202R	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	K315R	Pathogenic	0.607661822985469	2
P01137	C387S	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137	P99S	Benign	0.08120950323974083	8
P01137	S83T	Benign	0.4630321135175504	1
P01137	P264L	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137	T334M	Pathogenic	0.9301310043668122	9
P01137	I131T	Benign	0.4107142857142857	2
P01137	S64T	Benign	0.1111111111111111	8
P01137	A221T	Benign	0.26562500000000006	5
P01137	D86E	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	R50C	Pathogenic	0.9301310043668122	9
P01137	E91K	Benign	0.2566445182724252	5
P01137	E91G	Benign	0.21336032388663967	6
P01137	P95Q	Benign	0.11337030191004313	8
P01137	G252S	Benign	0.2648648648648648	5
P01137	I311V	Pathogenic	0.8375478927203065	7
P01137	M133I	Pathogenic	0.5145228215767634	0
P01137	I120M	Benign	0.132412672623883	7
P01137	R210H	Benign	0.21336032388663967	6
P01137	L260P	Pathogenic	0.9550881182490051	9
P01137	R210C	Pathogenic	0.5404411764705884	1
P01137	P363R	Pathogenic	0.8652815013404825	7
P01137	D226N	Pathogenic	0.7191151919866443	4
P01137	L19R	Pathogenic	0.7084826762246117	4
P01137	R385H	Benign	0.4501347708894879	1
P01137	N136Y	Pathogenic	0.7611940298507462	5
P01137	I300T	Pathogenic	0.9550881182490051	9
P01137	H222L	Pathogenic	0.9164179104477612	8
P01137	S209R	Benign	0.21336032388663967	6
P01137	T240A	Benign	0.3423913043478261	3
P01137	P14Q	Benign	0.3472222222222222	3
P01137	N344T	Benign	0.4113636363636364	2
P01137	L11Q	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	G242S	Benign	0.21336032388663967	6
P01137	R185Q	Pathogenic	0.7191151919866443	4
P01137	P10R	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	T116A	Benign	0.26562500000000006	5
P01137	V148M	Benign	0.05997638724911451	9
P01137	R152W	Pathogenic	0.6153846153846154	2
P01137	S220N	Pathogenic	0.7084826762246117	4

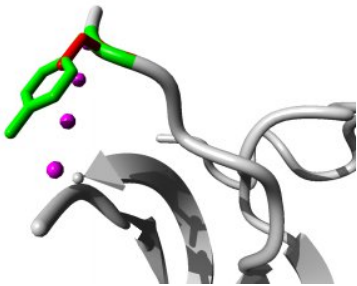
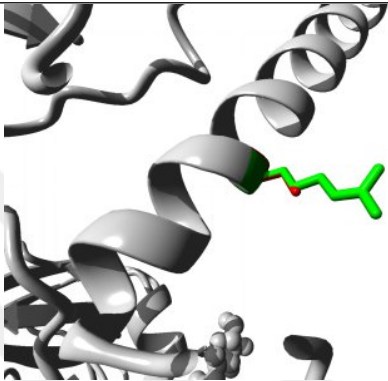
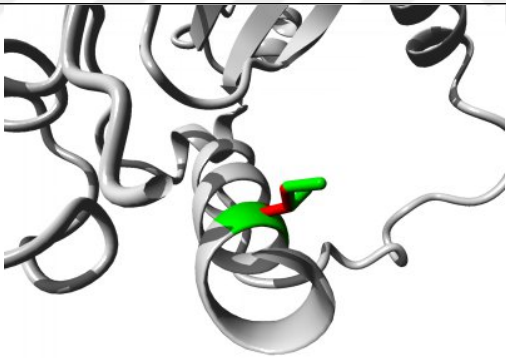
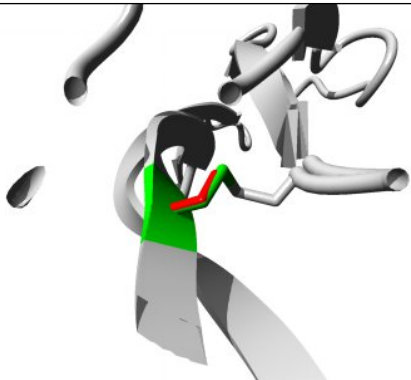
P01137	S127T	Benign	0.16747337850919652	7
P01137	T241A	Benign	0.14873603762492651	7
P01137	H270Y	Benign	0.3472222222222222	3
P01137	P72L	Benign	0.16747337850919652	7
P01137	W179R	Pathogenic	0.7767145135566188	6
P01137	P354S	Pathogenic	0.6239130434782607	2
P01137	Y81C	Pathogenic	0.9550881182490051	9
P01137	A268V	Benign	0.23890967397113844	5
P01137	G71D	Benign	0.3760092272202999	2
P01137	L19P	Pathogenic	0.47395171537484115	1
P01137	V367M	Pathogenic	0.5581395348837208	1
P01137	R205G	Benign	0.4630321135175504	1
P01137	Q335R	Pathogenic	0.9304662379421221	9
P01137	R205W	Pathogenic	0.6543778801843316	3
P01137	A341T	Benign	0.3508771929824561	3
P01137	K161R	Benign	0.4630321135175504	1
P01137	I250S	Benign	0.3610955841252096	3
P01137	E169Q	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137	R278G	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137	A101V	Benign	0.08120950323974083	8
P01137	Y132H	Benign	0.34234234234234234	3
P01137	S192L	Benign	0.26562500000000006	5
P01137	T241I	Benign	0.132412672623883	7
P01137	R277H	Pathogenic	0.8375478927203065	7
P01137	D301H	Pathogenic	0.9529945120496301	9
P01137	M261T	Pathogenic	0.7084826762246117	4
P01137	S61R	Benign	0.14873603762492651	7
P01137	N136S	Benign	0.3760092272202999	2
P01137	L259I	Benign	0.22937625754527163	5
P01137	M261L	Pathogenic	0.6153846153846154	2
P01137	R303H	Pathogenic	0.8909646739130435	8
P01137	D86Y	Benign	0.2857142857142857	4
P01137	P99T	Benign	0.0967741935483871	8
P01137	E100D	Benign	0.08811104405552203	8
P01137	K173E	Pathogenic	0.7084826762246117	4

EK -8 HOPE ANALİZ VERİLERİ

Kırmızı yapı: mutant
sonrası değişen kısım
Yeşil yapı: mutant
öncesi kendi yapısı

Varyant	Kimyasal Yapısındaki Değişim
V339D	
P363R	
M382T	

C387G	
H312Y	
L298P	
L260P	

Y328C	
R50C	
I49S	
C387S	

EK-9 MUTPRED-2 ANALİZ VERİLERİ

Varyant	P-değeri ≤ 0.05 olan moleküler mekanizmalar	p-değeri	Olasılık (g-değeri)	MutPred-2 skoru
V339D	Helix kazanımı	0.02	0.29	0.846
	Zincir kaybı	0.01	0.28	
	Y336'da sülfatlanma kazancı	0.04	0.01	
P363R	P-363'te ADP-ribozilasyonun kazancı	0.03	0.21	0.880
M382T	Çözünübilirlik kazancı	4.9 e-03	0.32	0.918
C387G	Yapısal düzensizlik kazancı	0.02	0.35	0.915
	Çözünübilirlik kazancı	4.3 e-03	0.32	
H312Y	Çözünübilirlik kazancı	4.3 e-03	0.33	0.868
	W382'de allosterik bölge kazancı	0.01	0.26	
	Y317'de katalitik bölge kaybı	0.02	0.16	
L298P	Zincir kaybı	0.02	0.27	0.934
	C293'te disülfid bağı kazanımı	0.02	0.19	
L260P	Stabilitede değişiklik	5.5 e-03	0.30	0.943
Y328C	C326'da katalitik bölge kazanımı	2.3 e-03	0.28	0.843
	C326'da disülfid bağı kazanımı	0.02	0.20	

R50C	Düzensiz ara yüzeyde değişiklik	0.03	0.21	0.670
I49S	Yapısal düzensizlik kazancı	4.1 e-03	0.45	0.834
C387S	Yapısal düzensizlik kazancı	7.7 e-03	0.40	0.894
	Çözünürlük kazancı	1.4 e-03	0.35	
	C387’de disülfid bağı kaybı	0.05	0.10	
	C387’de katalitik bölge kazanımı	0.05	0.08	

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: BERNA TÜRKMEN

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	Haliç Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik	2022
Önlisans	Acıbadem Üniversitesi – Patoloji Laboratuvar Teknikleri	2018

Staj Deneyimi:

Unvan	Görev Yeri	Yıl
Moleküler Biyolog	Avicenna Ataşehir Hastanesi	2021
Patoloji Lab. Teknikeri	Acıbadem Maslak Hastanesi	2017

Uluslararası Kongre Yayınları

1. Pathogenicity Prediction of CHEK1 and CHEK2 Genes Using Artificial Intelligence-supported in Silico: The Third International Conference on Applied Mathematics in Engineering 2024 (185).
2. Serotonin ve Melatonin Uygulanmış Meme Kanseri Hücrelerinde MT-1 ve MT-2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi: 6. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı 2023 (205).

Projeler

1. TÜBİTAK 2209-A: Serotonin ve Melatonin Uygulanmış Meme Kanseri Hücrelerinde ER α Gen Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi