



Araştırma Makalesi- Research Article

# Huntington Hastalığı ile İlişkili *ERN1* ve *TRAF2* Genlerindeki Yanlış Anlamalı SNP'lerin *In Silico* Değerlendirilmesi

## *In Silico* Evaluation of Missense SNPs in *ERN1* and *TRAF2* Genes Associated with Huntington's Disease

Nurbanu Tanrıverdi<sup>1</sup>, Ömer Faruk Karasakal<sup>2\*</sup>, Mesut Karahan<sup>3</sup>

Geliş / Received: 18/07/2023

Reviz / Revised: 19/10/2024

Kabul / Accepted: 07/11/2023

### ÖZ

Huntington hastalığı (HD), kromozomun 4. kolundaki HTT genindeki CAG trinükleotidlerinin tekrarı sonucu beyin nöronlarında ciddi dejenerasyona neden olan ve ölümlü sonuçlanabilecek bir hastalıktır. Bu çalışma, Huntington hastalığı ile ilişkili *ERN1* ve *TRAF2* genlerinin yanlış anlamalı SNP'lerinde potansiyel olarak zararlı etkileri olanların biyoinformatik yazılım araçları kullanılarak belirlenmesini ve bunların proteinlerin fonksiyonları ve stabilizasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini amaçlamıştır. Yanlış anlamalı SNP'lerin potansiyel olarak zararlı etkilerini tahmin etmek için SNAP2, SIFT, PolyPhen-2 (HumDiv ve HumVar), SNPs&GO, PhD-SNP, PANTHER ve Meta-SNP, protein stabilizasyonu için I-Mutant 2.0 ve MUPRO, üç boyutlu modelleme için Project HOPE, gen-gen etkileşimleri için GeneMANIA ve protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi için STRING yazılım araçları kullanıldı. Huntington hastalığı ile ilişkili *ERN1* ve *TRAF2* genleri için 7 farklı programda 8 yazılım aracı kullanılarak 7'si ve üzerinde ortak zararlı etkiye sahip olan varyantlar seçildi. Sonuç olarak hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen *ERN1* ve *TRAF2* genleri için toplam 4 varyant belirlendi. *ERN1* geni için rs138082110 (S224C), rs199512451 (G133R), rs370210153 (P623Q) varyantlarının, *TRAF2* geni için ise rs144405558 (C469R) varyantının olası zararlı etkiye sahip olabileceği çalışma sonucunda belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Huntington hastalığı ile ilgili yapılacak ileri araştırmalarda ve deneysel çalışmalarda fayda sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler-** Huntington Hastalığı, *ERN1*, *TRAF2*, Biyoinformatik Analiz

### ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a disease that results from the repetition of CAG trinucleotides in the HTT gene in the 4th arm of the chromosome, causing severe degeneration of brain neurons and may result in death. This study aimed to identify those with potentially harmful effects in the missense SNPs of *ERN1* and *TRAF2* genes associated with Huntington's disease, using bioinformatics software tools, and to evaluate their impact on the functions and stabilization of proteins. SNAP2, SIFT, PolyPhen-2 (HumDiv and HumVar), SNPs&GO, PhD-SNP, PANTHER

<sup>1</sup>İletişim: [tanriverdi.nurbanu@outlook.com](mailto:tanriverdi.nurbanu@outlook.com) (<https://orcid.org/0009-0000-7934-3476>)

Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Üsküdar Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

<sup>2\*</sup> Sorumlu Yazar İletişim: [omerfaruk.karasal@uskudar.edu.tr](mailto:omerfaruk.karasal@uskudar.edu.tr) (<https://orcid.org/0000-0001-7803-3249>)

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, Üsküdar Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İletişim: [mesut.karahan@uskudar.edu.tr](mailto:mesut.karahan@uskudar.edu.tr) (<https://orcid.org/0000-0002-8971-678X>)

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, Üsküdar Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

and Meta-SNP to predict potentially deleterious effects from missense SNPs, I-Mutant 2.0 and MUpro for protein stabilization, Project HOPE for three-dimensional modeling, GeneMANIA for gene-gene interactions and STRING software tools for determination of protein-protein interactions were used. For *ERN1* and *TRAF2* genes associated with Huntington's disease, variants with 7 or more common deleterious effects were selected using 8 software tools in 7 different programs. As a result, a total of 4 variants were identified for the *ERN1* and *TRAF2* genes, which were thought to be associated with the disease. As a result of the study, it was determined that the rs138082110 (S224C), rs199512451 (G133R), rs370210153 (P623Q) variants for the *ERN1* gene and the rs144405558 (C469R) variant for the *TRAF2* gene may have potentially harmful effects. The data obtained as a result of these studies will be beneficial in further research and experimental studies on Huntington's disease.

**Keywords-** Huntington's Disease, *ERN1*, *TRAF2*, Bioinformatics Analysis

## I. GİRİŞ

Huntington hastalığı (HD), nadir görülen bir hastalık olmakla birlikte, otozomal kalıtsal hastalık olup, istem dışı anormal hareketlere, bilişsel ve davranışsal bozukluklara neden olan ölümlü sonuçlanabilen nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [1,2]. Huntington hastalığının Asya ve Afrika popülasyonlarında görülme sıklığı düşük, Batı Avrupa popülasyonlarında ise görülme sıklığı yüksek olarak bildirilmiştir. Dünya genelinde ise insidansının 5-10 kişi/100.000 olduğu görülmektedir [3]. Huntington hastalığında her hastanın kendine özgü bulguları bulunmaktadır. Bazı ilaç ve tedavi yöntemleri görüldüğü dahi henüz net bir tedavi sürecinin olmadığı literatürde bildirilmiştir [4]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Endoplazmik retikulum stres faktörünün nörodejeneratif hastalık patolojisi arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir [5,6]. Endoplazmik retikulum stres faktörü nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde önemli etki göstermektedir [7]. Endoplazmik retikulum stresi sırasında ortaya çıkan yanlış katlanmış ya da katlanmamış olan proteinlerin birikmesi sonucunda katlanmamış protein tepkisinin (UPR) parçası olarak apoptozu indüklemektedir [8,9]. Aynı zamanda ER membranında bulunan *ERN1*, *PERK* ve *ATF6* katlanmamış protein (UPR) tepkisini aktive ederek apoptozu başlatmaktadır [10]. ER stres yollarından olan *ERN1* ve *TRAF2* genlerinin (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ER stres yollarının detaylı incelenmeleri sonucunda Mhht birikimlerinin otofaji akışının inhibisyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir [11]. ER stres faktörlerinden olan *ERN1* Huntington hastalığı patogenezi katılabilmektedir. ER stres faktörleri giderilemediğinde *ERN1* hücre ölümünü indükleyerek apoptozu başlatmaktadır [6]. Yüksek ER stresi altında kalan *ERN1* mRNA'nın işlevini bozarak antiapoptatik proteinlerde mRNA'ların parçalanması ile hücrelerin ölümüne neden olarak apoptoz meydana gelmektedir [12,13]. *ERN1* ve *TRAF2* kompleksi MAP/JNK yolunu aktive ederek otofajiyi başlatarak apoptozu desteklemektedir [14]. Ayrıca *ERN1* ve *TRAF2* kompleksleri apoptoz sinyal düzenleyicilerden olan kinaz1 (ASK1) ve JNK'ye ilave olarak NF-κB sinyalinin etkinleştirilmesine dahil olmaktadır [15,16]. *ERN1* ve *TRAF2* yollarının daha ileri boyutlarının incelenmesi sonucunda otofajik inhibisyona bağlı olarak hücrelerde ölümüne neden olduğu bulunmuştur [11]. Genetik hastalıklarda ve otonom sinir sistemi hastalıkları ile ilişkili olan genlerin kapsamlı araştırılmasında SNP analizlerinden faydalanılmaktadır [17]. Bu analizler ile birlikte hedef genlerin tespiti, elde edilen verilerin analizi açısından kolaylıklar sağlaması, hastalıklardaki anormal semptomların incelenmesi ve ilaç keşif çalışmalarının yapılmasına yardımcı olmayı hedeflemesinin yanı sıra maliyet açısından etkin bir avantajda sağlamaktadır [18]. Huntington Hastalığına neden olan CAG tekrarı ile oluşan mutant genlerin SNP çalışmaları ile susturulabileceği düşünülmektedir [19]. Tek nükleotit polimorfizm (SNP) çalışmaları kanser, diyabet, cilt hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çoklu gen hastalıklarının tanımlanmasında önemli yer sağlamaktadır [20].

SNP'ler bireylerdeki hastalıklara yatkınlık ve tedaviye yanıtlarındaki farklılıklarından dolayı klinik araştırmalar açısından önemli bir yere sahiptir [21]. DNA polimorfizm çeşitlerinde birincil polimorfizm olan ve DNA dizilimindeki değişikliklere neden olabileceği düşünülen polimorfizm olan Restriksiyon Parçaları Uzunluk Polimorfizm'leri (RFLP), daha sonra çok sayıda genetik hastalıkların haritalanmasında ve bu hastalıklardan sorumlu olan genleri izole eden Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar (VNTR) olan ikincil polimorfizmler keşfedilirken, üçüncül polimorfizm olarak bireyler arasında farklılık meydana getiren ve kimliklendirme yaptığı düşünülen mikrosatelit (Short Tandem Repeats-STR) ve takiben kopya sayısı çeşitliliği ile dördüncü polimorfizm olarak adlandırılan Tek Nükleotit Polimorfizmleri tanımlanmıştır [22,24]. SNP'ler DNA'da kodlanan ve kodlanmayan dizilerinde ya da genler arası bölgelerinde görülebilmektedir [24]. Kodlanma bölgesinde bulunan

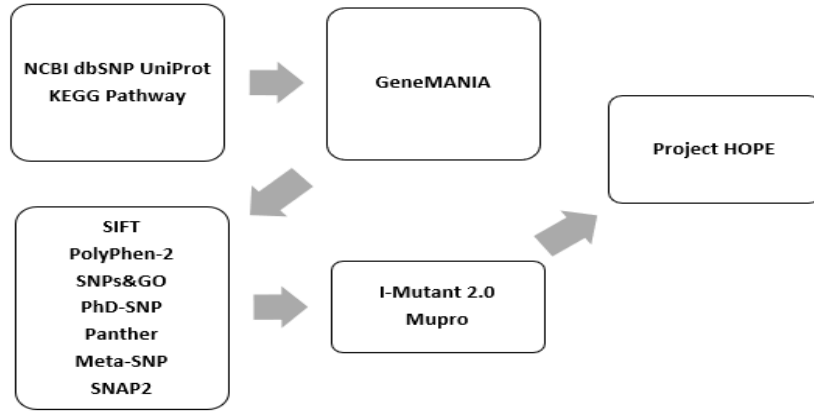
SNP'ler sinonim ve sinonim olmayan bölgeler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sinonim olan SNP'ler kendi içinde yanlış anlamlı ve anlamsız olmak üzere iki kategoride incelenmektedir. Anlamsız SNP'ler durdurma kodonlarında oluşan mutasyonlar sonucunda farklı fonksiyonel özelliğe sahip protein oluşumuna neden olmaktadır [25]. Yanlış anlamlı SNP'ler ise bir amino asidi kodlayan kodonun farklı bir amino asidi kodlaması sonucunda proteinleri işlevsiz hale getirerek hastalık oluşumuna neden olabilmektedir [26]. DNA dizisindeki farklılıklardan oluşan polimorfizmler hastalıklar ile ilişkilendirilebilmektedir [27]. Huntington hastalığına neden olan kalıtsal polimorfizmlerin araştırılması, Huntington hastalığı ile ilişkili genlerin belirlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır [28].

Bu çalışmada Huntington hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen *ERN1* ve *TRAF2* genlerindeki yanlış anlamlı SNP'lerin tespit edilerek farklı ve literatürde yaygın olarak tercih edilen biyoinformatik internet tabanlı yazılım araçlarını kullanarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Yapılan *in siliko* analizde 7 farklı programda 8 yazılım aracı kullanılarak 7'si ve üzerinde ortak zararlı etkiye sahip olan varyantlar belirlenerek olası zararlı etkiye sahip olduğu tahmin edilen SNP'lerin aynı zamanda proteinin işlevini, yapısını ve stabilizasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

## II. MATERYAL VE METOT

### A. Veri Eldesi ve İş Akışı

Huntington hastalığı ile ilişkili olan *ERN1* ve *TRAF2* genlerindeki yanlış anlamlı SNP'lerin *in siliko* analizlerini yapabilmek için kullanılan biyoinformatik yazılım araçları şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyoinformatik Akış Şeması

### B. Biyoinformatik Analizler

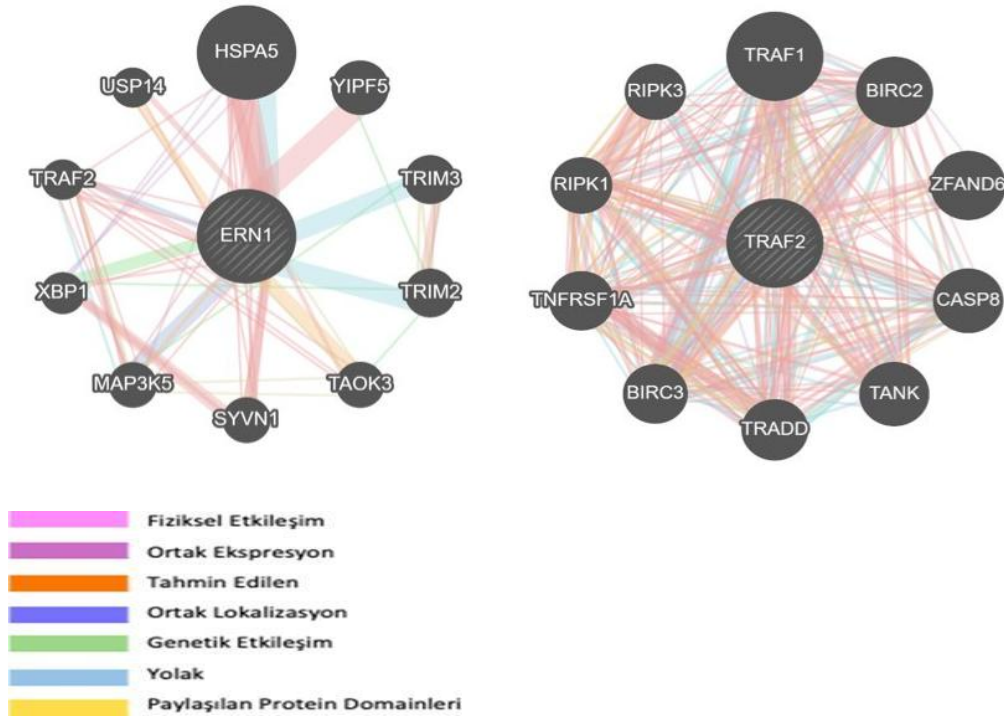
NCBI veri tabanından elde edilen bilgilere göre *ERN1* geni için toplam 33486 SNP sayısından 740 adet yanlış anlamlı SNP, *TRAF2* geni için ise 23398 SNP sayısından 434 adet yanlış anlamlı SNP tespit edilmiştir. Bu yanlış anlamlı SNP'lerde internet tabanlı kamuya açık yazılım araçları kullanılarak olası zararlı etkiye sahip olanlar tahmin edilmiştir. Yazılım araçlarından SIFT, bir proteindeki aminoasit ikamelerinin fenotipik olarak zararlı veya tolere edilebilir etkiye sahip olup olmayacağını tahmin etmektedir [29]. PolyPhen-2, proteinlerin aminoasit dizilerindeki değişimi, protein yapısını ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin etmektedir [30]. SNPs&GO, proteinin fonksiyonel verilerini kullanarak olası zararlı SNP'lerin tahmini için kullanılmaktadır [31]. PhD-SNP, insanlarda hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen zararlı SNP'leri tahmin etmektedir [32]. SNAP2, çeşitli sekansları ve varyant boyutlarını değerlendirerek varyantların fonksiyonel işlev ve etkilerini belirlemektir [33]. PANTHER, gen ve proteinlerin sınıflandırılması ve analizleri için tasarlanmış yazılım programıdır [34]. Meta-SNP protein varyasyonlarının hastalıkla ilişkili olup olmadığını ve polimorfizm olarak sınıflandırılıp sınıflandırılmayacağını belirlemede kullanılan yazılım aracıdır [35]. Proteinlerin stabilizasyonuna olan etkileri için MUpro ve I-Mutant 2.0 kullanılmıştır. I-Mutant 2.0, proteinlerin yapısında ya da protein dizilerinden tek bir alandaki varyasyon üzerindeki değişimi analiz etmek için kullanılan yazılım aracıdır. [36]. Mupro, tek bölgedeki aminoasit dizilişindeki varyasyonların protein stabilitesi ve katlanmaları üzerine etkisini tahmin etmede kullanılmaktadır [37]. Project HOPE, varyantların amino asit ikamesinin yapısal özellikleri birlikte boyut, yük ve hidrofobikliği açısından değerlendirme yapmasının yanı sıra protein yapılarının üç boyutlu (3B) modelleri ile ilgili rapor

vermektedir [38]. Gen-gen etkileşimleri için kullanılan GeneMANIA, en temel anlamda çok amaçlı fonksiyonel veri kanallarını kullanarak belirlenen genlerin diğer genlerle olan fonksiyonel ilişkisini bulmak için kullanılmaktadır [39]. Protein-Protein etkileşimlerinin belirlenmesi için kullanılan STRING yazılım aracı ile işlevsel protein-protein etkileşimlerini ve biyolojik süreçleri ile birlikte fiziksel etkileri değerlendirilmiştir [40].

### III. BULGULAR

#### A. ERN1 ve TRAF2 Gen-Gen Etkileşimleri

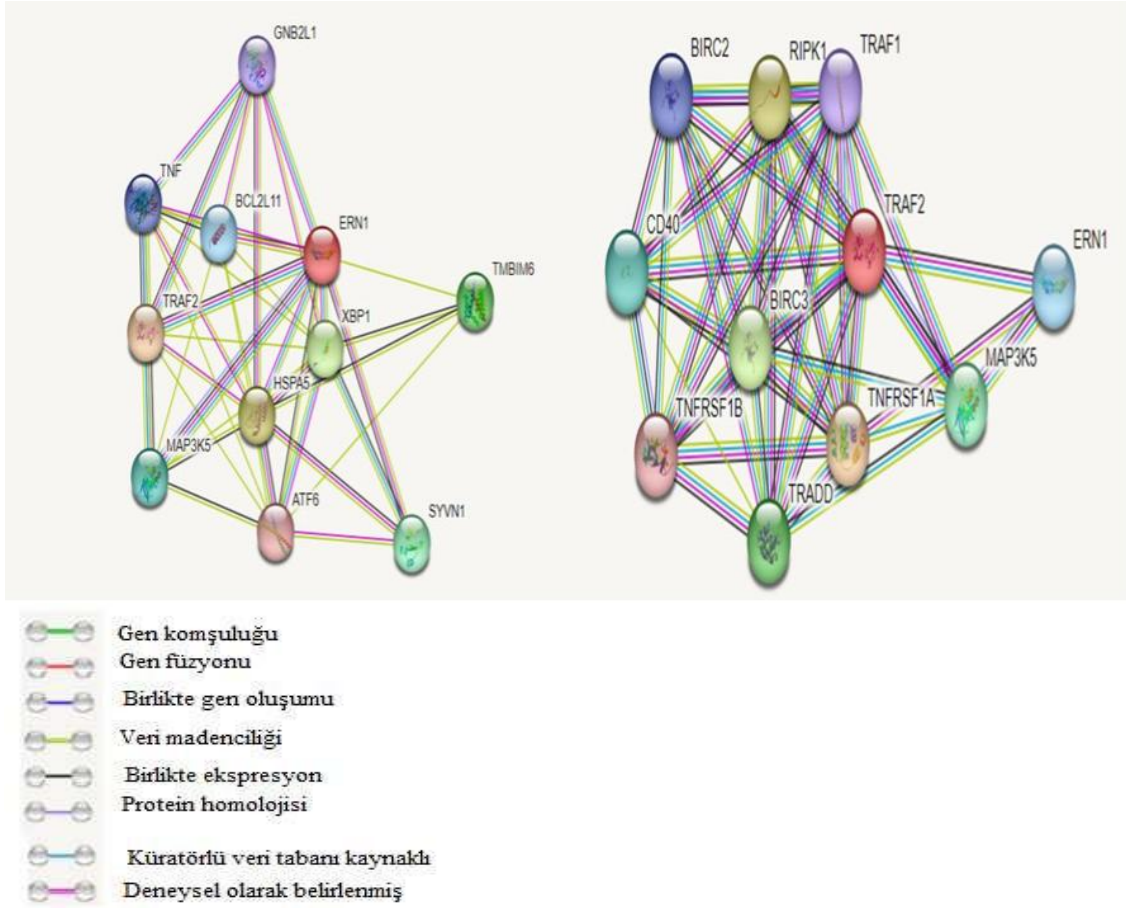
GeneMANIA Birden fazla genlerin birbiri ile etkileşimlerini tahmin etmede kullanılan yazılım aracıdır [41]. *ERN1* ve *TRAF2* genleri için GeneMANIA yazılım aracından elde edilen gen-gen etkileşimleri Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. *ERN1* ve *TRAF2* gen-gen etkileşimi

#### B. ERN1 ve TRAF2 Protein-Protein Etkileşimleri

Biyomoleküller ağlar arasında protein-protein etkileşimleri çok yönlülük ve özgüllüğün belirlenmesi ile birlikte hem fiziksel hem de fonksiyonel ilişkileri birleştirmeyi amaçlamıştır [42]. Protein- protein etkileşimleri hücrel biyolojik süreçleri önemli ölçüde etkilediğinden dolayı bu etkileşimlerin tanımlanması yaşam aktivitelerinin yapısına katkı sağlamaktadır [43]. *ERN1* ve *TRAF2* genleri için STRING yazılım aracından elde edilen protein-protein etkileşimleri Şekil 3’te gösterilmektedir.



Şekil 3. ERN1 ve TRAF2 protein-protein etkileşimi

ERN1 ve TRAF2 genlerinde yapılan *in silico* analizler sonucunda ERN1 geninde yer alan yanlış anlamlı SNP'lerden 3 varyantın, TRAF2 de ise 1 varyantın olası zararlı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. ERN1 ve TRAF2 genlerine ait yazılım araçlarından alınan bu bilgiler Tablo 1'de gösterilmektedir. ERN1 ve TRAF2 genlerinde tespit edilen varyantların I-Mutant 2.0 ve MUpro programlarının veri analizleri sonucunda tüm varyantların protein stabilizasyonuna olan etkisinin azalan olduğu tespit edilmiştir ve Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. ERN1 ve TRAF2 Genleri SNP analizleri yazılım araçlarındaki tahmin sonuçları





SNP NUMARASI	ERN1 GEN rs138082110	ERN1 GEN rs199512451	ERN1 GEN rs370210153	TRAF2 GEN rs144405558
Amino asit değişimi	(S224C)	(G133R)	(P623Q)	(C469R)
Snap2 Sonucu	Etkili	Etkili	Etkili	Etkili
SNAP2 Skoru	30	38	57	51
SNAP2 Doğrulama Oranı	%66	%91	%66	%85
SIFT Sonucu	Zararlı	Zararlı	Zararlı	Zararlı
SIFT Skoru	0.032	0.001	0.002	0
Polyphen2 (HumDiv) Sonucu	Muhtemelen Zararlı	Muhtemelen Zararlı	Muhtemelen Zararlı	Olası Zararlı
Polyphen2 (HumDiv) Skoru	0.990	1	0.998	0.999
Polyphen2 (HumVar) Sonucu	Muhtemelen Zararlı	Muhtemelen Zararlı	Muhtemelen Zararlı	Olası Zararlı
Polyphen2 (HumVar) Skoru	0.999	0.999	0.986	0.993
SNPs&GO Sonucu	-	-	-	Hastalık İlişkili

SNPs&GO Skoru	-	-	-	8
PhD-SNP	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili
RI	3	5	1	6
PANTHER	Olası Zararlı	Olası Zararlı	Olası Zararlı	Olası Zararlı
Pdel Skoru	0.85	0.89	0.85	0.85
Meta-SNP Sonucu	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili	Hastalık İlişkili
Meta SNP Skoru	0.651	0.747	0.568	0.824
I-Mutant 2.0 Tahmin sonucu	Azalan	Azalan	Azalan	Azalan
Güvenlik İndeksi Gİ	4	8	9	6
MUpro Analiz Sonucu	Azalan	Azalan	Azalan	Azalan
Serbest Enerji Değişim Değeri (DDG)	-13.752.949	-0.37544877	-92377539	-1,0368671

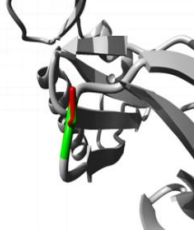
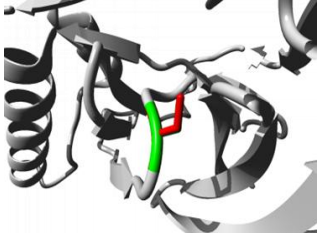
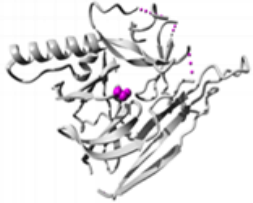
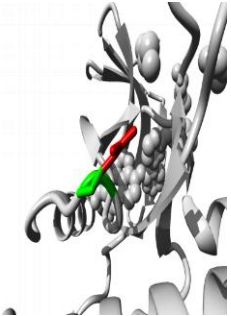
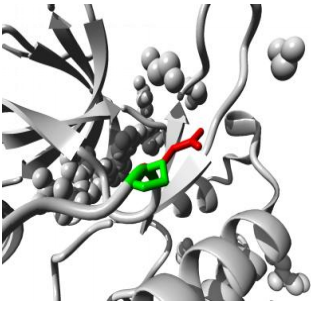
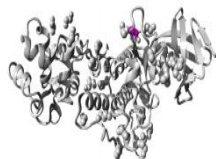
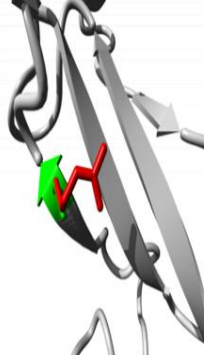
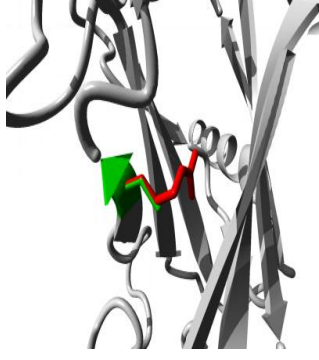

### C. Project HOPE Sonuçları

Project HOPE mutasyonların yapısal etkilerini analiz etmede kullanılan yazılım aracıdır [44]. *ERN1* ve *TRAF2* genlerine ait varyasyonlar Project HOPE sonuçları Tablo 2’de verilmiştir. Üç boyutlu modellemeleri ise Tablo 3’ te gösterilmiştir.

Tablo 2. *ERN1* ve *TRAF2* genine ait yabancı ve mutant tip aminoasitlerin Project Hope yazılım aracı sonuçları

SNP NUMARASI	AMİNO ASİT DEĞİŞİMİ	
<i>ERN1</i> rs138082110 S224C		S224C varyantında 224. pozisyonda Serin amino asidinin Sistein amino asidine değişimi
<i>ERN1</i> rs199512451 G133R		G133R varyantında 133. pozisyonda Glisin amino asidinin Arjinin amino asidine değişimi
<i>ERN1</i> rs370210153 P623Q		P623Q varyantında 623. pozisyonda Prolin amino asidinin Glutamin amino asidine değişimi
<i>TRAF2</i> rs144405558 C469R		C469R varyantında 469. pozisyonda Sistein amino asidinin Arjinin amino asidine değişimi

**Tablo 3.** *ERN1* ve *TRAF2* genine ait varyasyonların üç boyutlu gösterimi

SNP Numarası	Polimorfizm Bölgelerinin Yakından Görünümleri (Protein gri renkte gösterilmiş olup, yabani (yeşil) ve mutant (kırmızı) rezidüleri tablo içerisinde ilgili sütunda gösterilmiştir.)		Mutant Proteinin üç boyutlu görünümü
rs138082110 <i>ERN1</i> S224C			
rs370210153 <i>ERN1</i> P623Q			
rs144405558 <i>TRAF2</i> C469R			

SNP'lerin Project HOPE yazılım aracılığı ile belirlenen özellikleri ise Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** *ERN1* ve *TRAF2* Genleri İçin Yabani ve Mutant Varyantların Sonuçları

SNP NUMARASI	AMİNO ASİT DEĞİŞİMİ	YABANIL TİP ÖZELLİK			MUTANT TİP ÖZELLİK		
		BOYUT	YÜK	HİDROFOBİKLİK	BOYUT	YÜK	HİDROFOBİKLİK
<i>ERN1</i> rs138082110	S224C	-	-	>	-	-	<
<i>ERN1</i> rs199512451	G133R	<	Nötr	>	>	+Yük	<
<i>ERN1</i> rs370210153	P623Q	>	-	<	<	-	>

<b>TRAF2</b> <b>rs144405558</b>	C469R	<	Nötr	>	>	+Yük	<
------------------------------------	-------	---	------	---	---	------	---

#### IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada Huntington hastalığı ile ilişkili *ERN1* ve *TRAF2* genlerindeki yanlış anlamlı SNP'lerin *in silico* analizi verilerinde *ERN1* geni için NCBI dbSNP veri tabanında 740 adeti yanlış anlamlı SNP olmak üzere toplamda SNP sayısı 33486 olarak tespit edilmiştir. *ERN1* geninde yer alan yanlış anlamlı SNP'lerin *in silico* yazılım araçları ile değerlendirilmesi sonucunda kamuya açık internet tabanlı yazılım araçlarında ortak zararlı etkiye sahip olduğu tespit edilenleri rs138082110 (S224C), rs199512451(G133R) ve rs370210153 (P623Q)'dir. *TRAF2* için ise toplam SNP sayısı 23398, yanlış anlamlı SNP sayısı 434 olarak belirlenmiştir ve rs14440558 (C469R) referans numaralarına sahip SNP'nin olası zararlı etkiye sahip olduğu tahmin edilmiştir.

2021 yılında yapılan bir çalışmada, Huntington hastalığında patolojik protein HTT'yi hedeflemek için varsayılan proteinlerin agregasyonunu önlediği bilinen çeşitli etkin peptitleri karşılaştırılmalı olarak Swiss-model *in silico* yazılım aracı kullanarak analizleri gerçekleştirilmiş ve hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere yeni peptidler keşfetmişlerdir [45]. Aynı yılda yapılan başka bir çalışmada, nörodejeneratif hastalıklarda etkisi olan *GOT1* geni ve mutasyonlarını, PROVEAN, Mutation Assesor, PANTHER, PolyPhen-2, PMut, SNAP, PhD-SNP, SNPs&GO, I-Mutant *in silico* yazılım araçları kullanarak SNP analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonuçlarında L36R, W162C, L345P olmak üzere 4 mutasyonun *GOT1* geni üzerinde zararlı etkiye neden olduğunu bulmuşlardır [46]. 2019 yılında gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise, BDNF varyantlarının proteinler üzerindeki zararlı mutasyonların belirlenmesinde, PhD-SNP, P-Mut, PolyPhen-2, SIFT, SNAP, SNPs&GO, VarMod, NP Effect 4.0, mutasyonların işlevi ve kararlılığını üzerindeki etkilerini analiz etmek içinse I-Mutant 2.0 *in silico* yazılım aracını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda, BDNF'nin insanlarda en yaygın olan mutasyonu V66M'nin hastalıkla ilişkili olacağı sonucuna varmışlardır [47]. Yukarıda örneklendirilen bazı çalışmalarda görüldüğü üzere *in silico* araştırmaların polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanıldığı literatürde görülmektedir. Huntington hastalığı ile ilgili 2021 yılında yapılan deneysel bir çalışmada, araştırmacı *ERN1* ve Tip 2 Diyabet (T2D) ilişkisini incelemek amacıyla, *ERN1* geninin SNP'leri ile Tip 2 Diyabet riski arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Çalışmaya 1558 T2D hastası (586 erkek ve 972 kadın) ve 1611 (618 erkek ve 993 kadın) sağlıklı birey dahil etmiştir. *ERN1*'in düzenleyici bölgesinde yer alan rs196914 ve rs9911085 gibi iki yaygın SNP geni, MassArray Analyzer-4 sistemi ile genotiplenmiştir. rs196914-rs9911085 'nin aşırı kilolu ve obez deneklerde (yani BMI>25 kg/m<sup>2</sup>) T2D riski ile ilişkili olduğu sonucunu bulmuştur (p=0.004). [48]. 2020 yılında ABD'deki 7 tesiste, HD'li 202 denekten, CAG tekrarlarının sayısını ve boyutunu, SNP'lerin varlığını, heterozigotluğunu ve uzun okumalı dizileme ve fazlama kullanılarak mutant *HTT* aleli üzerinde SNP'lerin bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla merkezi olarak işlenen kan örnekleri sağlamışlardır. Çalışmaları sonucunda, SNP1 ve/veya SNP2'nin heterozigotluğu 146 (%72) kişide tanımlanmışlardır. Bu 2 polimorfizm, bireylerin %61'inde (%95 yüksek yoğunluk aralığı: %55, %67) yalnızca Mhtt aleli ile ilişkilendirildiğini tespit etmişlerdir [49]. 2013'te deneysel bir çalışmada ise, oksidatif strese verilen yanıtlarla ilişkilendirilen, *OGG1* ve *XPC* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) HD'nin başlangıç yaşı ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, HD'li 299 bireyde ve 582 kontrolde 9 SNP genotiplenmiştir. *OGG1* ve *XPC* haplotiplerinin HTT içindeki CAG tekrarlarının sayısından bağımsız olarak başlangıçta genç yaşla ilişkili olduğu bulmuşlardır. Ayrıca bu iki haploitten bir tanesinde, daha düşük bir 8-oxoG onarım aktivitesi ile ilişkili olan ve özellikle hücrel redoks durumuna duyarlı OGG1 -326Cys (rs1052133) aleli içerdiğini söylemektedirler. Çalışma sonucunda, oksidatif stresin HD başlangıcındaki yaşı belirlemedeki potansiyel rolü olduğunu vurgulamışlardır [50]. 2010 yılında, HD'li 91 İtalyan denekten kan DNA'sı üzerinde yapılan bir çalışmada, mutant Cys326 alel (Ser326Cys + Cys326Cys) taşıyıcılarının, genişlemiş HD alelinin (P = 0.049) artan sayıda CAG tekrarına sahip olma eğiliminde olduklarını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak HD'li bireyler ve sağlıklı deneklerden oluşan kontrol grupları arasında, *hOGG326* Ser200Cys aleli ve genotip frekanslarında fark bulunmadığı ve bu durum sonucunda HD deneklere tercihli alel iletimi olmadığını çalışmacılara düşündürmüştür [51].

*ERN1* geninde, G133R varyantında mutant tip rezidü, yabanıl tip rezidüden boyut olarak büyüktür. Bu boyut farklılığı nedeniyle mutant rezidünün proteinin çekirdeğine sığamayabileceği düşünülebilmektedir. P623Q varyantında ise, yabanıl tip rezidü mutant tipe göre boyut olarak büyüktür ve bu sebeple protein çekirdeğinde boş bir alan oluşumuna sebep olabileceği öne çıkmaktadır. *TRAF2* geninde ise C469R varyantında mutant tip rezidü yabanıl tipe göre büyüktür ve bu boyut farklılığı yapının bozulmasına neden olabilir. *ERN1* geninde S224C ve



G133R varyantlarında mutant tip rezidü, yabancı tip rezidüye göre daha az hidrofobiktir. Bu durum sonucunda etkileşim kayıpları meydana gelebilmektedir. *TRAF2* geninde hidrofobik etkileşimler değerlendirildiğinde ise C469R varyantında mutant tip rezidü, yabancı tip rezidüye göre daha az hidrofobiktir ve hidrofobiklik farklılığından dolayı proteinde etkileşim kayıplarının ortaya çıkabileceği düşünülebilir [38]. Hidrofobik etkiler, proteinlerin katlanmasında itici güç olsalar bile, elektrostatik etkileşimler proteinlerin katlanması, esneklik, stabilitesi ve fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır [52]. *ERN1* geni G133R varyantında elektriksel yük açısından yabancı rezidü nötr mutant rezidü ise pozitif olarak belirlenmiştir. Yük verilerinde aynı yüke sahip olan ligandlar birbirlerini itebilmektedir [38].

*ERN1* ve *TRAF2* genlerinde olası zararlı etkiye sahip olduğu tüm programlarca tespit edilen SNP'lerinin protein stabilizasyonları üzerine etkilerini araştırmak için I-Mutant 2.0 ve MUpro yazılım araçları kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda her iki programda da *ERN1* geninde rs138082110 (S224C), rs199512451(G133R), rs370210153 (P623Q) *TRAF2* geninde ise rs144405558 (C469R) SNP'lerinin protein stabilitesini azalttığı tespit edilmiştir.

## V. SONUÇLAR

Huntington hastalığı ile ilişkilendirilen *ERN1* ve *TRAF2* genleri için yüksek riskli olabileceği tahmin edilen toplamda 4 varyant saptanmıştır. Yanlış anlamalı SNP'lerin olası zararlı etkilerini tahmin etmek için SNAP2, SIFT, PolyPhen-2 (HumDiv ve HumVar), SNPs&GO, PhD-SNP, PANTHER ve Meta-SNP, protein stabilizasyonu için I-Mutant 2.0 ve MUpro, üç boyutlu modelleme için Project HOPE yazılım araçları kullanılmıştır. *ERN1* genine ait rs138082110 (S224C), rs199512451(G133R), rs370210153 (P623Q), *TRAF2* genine ait rs144405558 (C469R) polimorfizmlerinin zararlı olabileceği belirlenmiştir. Gen-gen etkileşimlerinin değerlendirilmesi için GeneMANIA yazılım aracı kullanılmış ve *ERN1* geni için maksimum etkileşimli ilk 5 gen *YIPF5*, *TRIM2*, *TRIM3*, *HSPA5* ve *TAOKK3* olarak tespit edilmiştir. *TRAF2* geni için ise *TANK*, *BIRC2*, *TRAF1*, *ZFAND6*, *CASP8* genleri yazılım aracı ile belirlenmiştir. Protein-protein etkileşimleri için kullanılan STRING yazılım aracılığı ile *ERN1* ve *TRAF2* genlerinin işlevsel protein-protein etkileşimlerini ve fiziksel etkileri araştırılmıştır. *ERN1* geni için *TRAF2*, *HSPA5*, *SYVN1*, *XBP1*, *TMBIM6*, *TRAF2* geni için ise *RIPK1*, *TNFRSF1A*, *MAP3K5*, *BIRC*, *TRADD* proteinleri tespit edilmiştir.

Huntington hastalığı ile yapılan bu çalışma sonucunda *ERN1* ve *TRAF2* genlerindeki yüksek riskli olabileceği tahmin edilen SNP'lerin, ileride gerçekleştirilecek farklı genotipleme araştırmalarında SNP seçimi konusunda destek sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada *in silico* olarak zararlı etkilerinin olabileceği tahmin edilen bu SNP'lerin *ERN1* ve *TRAF2* genleri ile yapılacak olan deneysel çalışmalarda tercih edilebileceği bildirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Pantiya, P., Thonusin, C., Chattapakorn, N., & Chattapakorn, S. C. (2020). Mitochondrial abnormalities in neurodegenerative models and possible interventions: Focus on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease. *Mitochondrion*, 55, 14-47.
- [2] Lemoine, L., Lunven, M., Fraisse, N., Youssov, K., Bapst, B., Morgado, G., ... & Bachoud-Lévi, A. C. (2023). The striatum in time production: The model of Huntington's disease in longitudinal study. *Neuropsychologia*, 179, 108459.
- [3] Schapira, A. H., Olanow, C., Greenamyre, J., & Bevard, E. (2014). Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *The Lancet*, 545-555.
- [4] Dong, X., & Cong, S. (2021). MicroRNAs in Huntington's disease: Diagnostic biomarkers or therapeutic agents *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 705348.
- [5] Kim, S., Kim, D. K., Jeong, S., & Lee, J. (2022). The common cellular events in the neurodegenerative diseases and the associated role of endoplasmic reticulum stress. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5894.
- [6] Chen, L., Bi, M., Zhang, Z., Du, X., Chen, X., Jiao, Q., & Jiang, H. (2022). The functions of IRE1 $\alpha$  in neurodegenerative diseases: beyond ER stress. *Ageing Research Reviews*, 101774.
- [7] da Silva, D. C., Valentão, P., Andrade, P. B., & Pereira, D. M. (2020). Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer and neurodegenerative disorders: Tools and strategies to understand its complexity. *Pharmacological Research*, 155, 104702.
- [8] Krammes, L., Hart, M., Rheinheimer, S., Diener, C., Menegatti, J., Grässer, F., ... & Meese, E. (2020). Induction of the Endoplasmic-reticulum-stress response: MicroRNA-34a targeting of the IRE1 $\alpha$ -branch.

- Cells*, 9(6), 1442.
- [9] Wu, H., Ng, B. S., & Thibault, G. (2014). Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Bioscience reports*, 34(4), e00118.
- [10] Shi, M., Chai, Y., Zhang, J., & Chen, X. (2022). Endoplasmic reticulum stress-associated neuronal death and innate immune response in neurological diseases. *Frontiers in immunology*, 12, 794580.
- [11] Maity, S., Komal, P., Kumar, V., Saxena, A., Tungekar, A., & Chandrasekar, V. (2022). Impact of ER stress and ER-mitochondrial crosstalk in Huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 780.
- [12] Ajoolabady, A., Lindholm, D., Ren, J. & Pratico, D. (2022). Alzheimer hastalığında ER stresi ve UPR: Mekanizmalar, patogenez, tedaviler. *Hücre ölümü ve hastalığı*, 13 (8), 706.
- [13] Spencer, B. G., & Finnie, J. W. (2020). The role of endoplasmic reticulum stress in cell survival and death. *Journal of Comparative Pathology*, 181, 86-91.
- [14] Esmaceli, Y., Yarjanli, Z., Pakniya, F., Bidram, E., Łos, M. J., Eshraghi, M., ... & Zarrabi, A. (2022). Targeting autophagy, oxidative str
- [15] Asveda, T., Priti, T., & Ravanan, P. (2023). Exploring microglia and their phenomenal concatenation of stress responses in neurodegenerative disorders. *Life Sciences*, 121920.
- [16] Wang, C., Chang, Y., Zhu, J., Ma, R., & Li, G. (2022). Dual role of IRE1 $\alpha$ -XBP1 signaling in neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, and ER stress for neurodegenerative disease treatment. *Journal of Controlled Release*, 345, 147-175.
- [17] Yazar, E. Z. (2021). Psikopatolojilerde gen-çevre etkileşimi: Stresle ilgili genetik ve epigenetik süreçler. *Klinik Psikoloji Dergisi*, 5(3), 275-288.
- [18] Ekşi, M. (2019). *SNP Mikroarray Yöntemi ile Kalıtsal Metabolik Hastalıklardan Sorumlu Genlerin Tanımlanması*. Yıldırım Beyazıt Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 24,24s, Ankara.
- [19] Shin, J. W., Hong, E. P., Park, S. S., Choi, D. E., Zeng, S., Chen, R. Z., & Lee, J. M. (2022). PAM-altering SNP-based allele-specific CRISPR-Cas9 therapeutic strategies for Huntington's disease. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 26, 547-561.
- [20] Sattari, A., Nicknafs, F. ve Noroozi, R. (2020). Uzun kodlamayan RNA'lardaki tek nükleotid polimorfizmlerinin insan hastalıklarına duyarlılıktaki rolü. *Ekolojik Genetik ve Genomik*, 17, 100071.
- [21] Özlem, G. Ö. K., Aslan, A., & Erman, O. (2017). İnsan ENCODE, HapMap ve 1000 Genom Projeler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 33(2), 35-42.
- [22] Tavacı, İ., Bülbül, Ö., Filoğlu, G., & Altunçul, H. (2020). X Kromozomunda Bulunan 15 SNP Lokusunun Türkiye Popülasyonundaki Polimorfizmi. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine & Forensic Sciences*, 17(3).
- [23] Şenışık, M., Bülbül, Ö., & Filoğlu, G. (2023). Adli DNA Fenotipleme: Erkek Tipi Kellik: Geleneksel Derleme. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine & Forensic Sciences*, 20(1).
- [24] Kaman, T., Karasakal, Ö. F., Oktay, E. Ö., Ulucan, K., & Konuk, M. (2019). In silico approach to the analysis of SNPs in the human APAF1 gene. *Turkish Journal of Biology*, 43(6), 371-381.
- [25] Robert, F., & Pelletier, J. (2018). Exploring the impact of single-nucleotide polymorphisms on translation. *Frontiers in genetics*, 9, 507.
- [26] Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms. In (Ed.), Genetic Diversity and Disease Susceptibility. IntechOpen.
- [27] Fareed, M. M., Ullah, S., Aziz, S., Johnsen, T. A., & Shityakov, S. (2022). In-silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human  $\beta$ -defensin type 1 gene reveals their impact on protein-ligand binding sites. *Computational Biology and Chemistry*, 98, 107669.
- [28] Fidanoğlu, P. (2013). *Genom Ebadındaki Türk Popülasyonu Tnp Verilerinin Veri Tabanının Hazırlanması ve Sonuçların Hapmap Işığında Değerlendirilmesi*. Ankara Üniversitesi. Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Doktora Tezi, 7s, Ankara
- [29] Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research*, 11(5), 863-874.
- [30] Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics*, 76(1), 7-20.
- [31] Capriotti, E., & Altman, R. B. (2011). Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC bioinformatics*, 12(4), 1-11.
- [32] Capriotti, E., Calabrese, R., & Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*, 22(22), 2729-2734.
- [33] Hecht, M., Bromberg, Y., & Rost, B. (2015). Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC genomics*, 16(8), 1-12.
- [34] Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P., & Mi, H. (2022). PANTHER:

- Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, 31(1), 8-22.
- [35] Capriotti, E., Altman, R. B., & Bromberg, Y. (2013). Collective judgment predicts disease-associated single nucleotide variants. *BMC genomics*, 14, 1-9.
- [36] Bava, K. A., Gromiha, M. M., Uedaira, H., Kitajima, K., & Sarai, A. (2004). ProTherm, version 4.0: thermodynamic database for proteins and mutants. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_1), D120-D121.
- [37] Cheng, J., Randall, A., & Baldi, P. (2006). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 62(4), 1125-1132.
- [38] 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(1), 1-10.
- [39] Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., ... & Morris, Q. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research*, 38(suppl\_2), W214-W220.
- [40] Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., ... & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638-D646.
- [41] Mustafa, M. I., Murshed, N. S., Abdelmoneim, A. H., & Makhawi, A. M. (2020). In silico analysis of the functional and structural consequences of SNPs in human ARX gene associated with EIEE1. *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 100447
- [42] Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., ... & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research*, 49(D1), D605-D612.
- [43] Kermani, A. G., Kamandi, A., & Moeini, A. (2022). Integrating graph structure information and node attributes to predict protein-protein interactions. *Journal of Computational Science*, 64, 101837.
- [44] Yang, Z., Liu, M., Wang, B., & Wang, B. (2021). Classification of protein domains based on their three-dimensional shapes (CPD3DS). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(3), 224-230.
- [45] Kohli, H., Kumar, P., & Ambasta, R. K. (2021). In silico designing of putative peptides for targeting pathological protein Htt in Huntington's disease. *Heliyon*, 7(2).
- [46] Saxena, S., Murthy, T. K., Chandramohan, V., Yadav, A. K., & Singh, T. R. (2021). Structural and functional analysis of disease-associated mutations in GOT1 gene: An in silico study. *Computers in Biology and Medicine*, 136, 104695. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104695>
- [47] De Oliveira, C. C. S., Pereira, G. R. C., De Alcantara, J. Y. S., Antunes, D., Caffarena, E. R., & De Mesquita, J. F. (2019). In silico analysis of the V66M variant of human BDNF in psychiatric disorders: An approach to precision medicine. *Plos one*, 14(4), e0215508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215508>
- [48] Yu, K. E. (2022). Genetic Variation of Ern1 and Susceptibility To Type 2 Diabetes. *Научные результаты биомедицинских исследований*, 8(3), 268-277
- [49] Claassen, D. O., Corey-Bloom, J., Dorsey, E. R., Edmondson, M., Kostyk, S. K., LeDoux, M. S., ... & Panzara, M. A. (2020). Genotyping single nucleotide polymorphisms for allele-selective therapy in Huntington disease. *Neurology Genetics*, 6(3).
- [50] Berger, F., Vaslin, L., Belin, L., Asselain, B., Forlani, S., Humbert, S., ... & Hall, J. (2013). The impact of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in OGG1 and XPC on the age at onset of Huntington disease. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(2), 115-119.
- [51] Coppède, F., Migheli, F., Ceravolo, R., Bregant, E., Rocchi, A., Petrozzi, L., ... & Migliore, L. (2010). The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and Huntington's disease. *Toxicology*, 278(2), 199-203.
- [52] Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBioChem*, 3(7), 604-617. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703))