

TIBBİ BİYOLOJİ ALANINDA AKADEMİK TARTIŞMALAR

Editör: Doç.Dr.Aykut ZEREK

yaz
yayınları

Tıbbi Biyoloji Alanında Akademik Tartışmalar

Editör

Doç.Dr. Aykut ZEREK

yaz
yayınları

2026

Tıbbi Biyoloji Alanında Akademik Tartışmalar

Editör: Doç.Dr. Aykut ZEREK

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-8926-00-2

Haziran 2026 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

İÇİNDEKİLER

Kistik Fibroziste TGFB1 Polimorfizmleri: Hastalık Şiddeti, Modifiye Edici Etkiler 1 Polimorfizmleri Güncel Yaklaşımlar.....1	
<i>Sonay TEMURHAN, Filiz AYDIN</i>	
Temozolomid ve Palomid 529 Kombinasyonun Glioblastoma Hücrelerindeki Antikanser Etkinliğinin İncelenmesi 20	
<i>Çığır BIRAY AVCI, Sıla ÖZKAL, Elham SHAHRIYARI, Asghar KHALILNEZHAD, İrem YILDIRIM</i>	
Transcriptional Modulation of the Wnt/β-catenin Signaling Pathway by Origanum onites L. Essential Oil: A Link to Epigenetic Regulation in Gastric Cancer.....38	
<i>Çığır BIRAY AVCI, Mert PEKERBAŞ, Fatma SÖĞÜTLÜ, Emine BAYRAM, Muhsin Özgür ÇOĞULU</i>	
Tıbbi Biyolojide Doğal Bileşiklerin Rolü ve İlaç Gelişimine Katkıları 56	
<i>Muazzez DERYA ANDEDEN</i>	
Otizm Spektrum Bozukluğunun Genetik Etiyolojisi.....74	
<i>Tuba KÖSE</i>	
Genetik Varyasyonların Fonksiyonel Sonuçları ve Fenotipik Yansımaları 105	
<i>Merve Dolunay UYANIK, Gönül Zişan ÖNCEL</i>	

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

KİSTİK FİBROZİSTE TGFB1 POLİMORFİZMLERİ: HASTALIK ŞİDDETİ, MODİFİYE EDİCİ ETKİLER VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR¹

Sonay TEMURHAN²

Filiz AYDIN³

1. GİRİŞ

Kistik fibrozis (KF), tek bir gen olan CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genindeki patojenik varyantlar sonucu ortaya çıkan monogenik bir hastalık olmasına rağmen, aynı CFTR genotipine sahip bireylerde dahi klinik seyir ve özellikle akciğer hastalığının başlangıç yaşı, progresyon hızı ve komplikasyon spektrumu açısından belirgin heterojenlik gösterebilmektedir (Weiler & Drumm, 2013). Bu klinik değişkenlik, hastalık fenotipinin yalnızca primer genetik defekt ile açıklanamayacağını ve fenotipin şekillenmesinde ek genetik ve çevresel faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Kistik fibroziste gözlenen bu fenotipik çeşitliliğin açıklanmasında “modifiye edici genler” kavramı giderek daha

¹ Bu kitap bölümü, Sonay Temurhan tarafından İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Filiz Aydın danışmanlığında 2014 yılında tamamlanan “Türk Popülasyonundaki Kistik Fibrozis Hastalarında TGFB1 ve CD14 Gen Polimorfizmleri ile Hastalık Prognosu Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı doktora tezinden üretilmiştir. (İÜ BAP Proje No: 9523).

² Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, ORCID: 0000-0001-9889-9330.

³ Prof. Dr., Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, ORCID: 0000-0001-5984-7538.

fazla önem kazanmıştır. Tütün dumanı maruziyeti gibi çevresel etkenlerle birlikte değerlendirildiğinde, özellikle inflamasyon, fibrozis ve doku onarım süreçlerinde merkezi rol oynayan TGF- β 1, kistik fibrozis akciğer hastalığının şiddetini etkileyebilecek önemli modifiye edici genlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Çok sayıda aday-gen çalışması ve aile tabanlı analizlerde TGFB1'in tekrarlayan biçimde akciğer fenotipi ile ilişkilendirilmiş olması, bu genin hastalık şiddetinin belirlenmesindeki potansiyel rolünü desteklemektedir (Kramer & Clancy, 2018).

2. KİSTİK FİBROZİSTE FENOTİP HETEROJENLİĞİ

Kistik fibrozis, otozomal resesif kalıtılan ve CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) genindeki patojenik varyantların CFTR protein fonksiyonunda kayba yol açması sonucu gelişen multisistemik bir hastalıktır (Garg & Oermann, 2025). CFTR proteini, başta solunum yolu epiteli olmak üzere pankreas, hepatobiliyer sistem, gastrointestinal sistem ve ter bezleri gibi epitelyal dokularda iyon ve su taşınımının düzenlenmesinde temel rol oynar. Bu fizyolojik dengenin bozulması, hava yolu yüzey sıvısının azalmasına, mukus viskozitesinin artmasına ve bunun sonucunda özellikle akciğerde kronik enfeksiyon, nötrofilik inflamasyon ve ilerleyici hava yolu hasarı ile karakterize patolojik bir döngünün gelişmesine neden olur (Garg & Oermann, 2025; Yıldız ve ark., 2025).

Kistik fibroziste genotip-fenotip ilişkisi bazı organ tutulumlarında, özellikle ekzokrin pankreas yetmezliği gibi klinik tablolarda daha öngörülebilir özellik göstermektedir. Buna karşın, akciğer hastalığının şiddeti ve progresyonu açısından aynı CFTR varyant sınıfına ya da benzer genotiplere sahip bireylerde bile belirgin klinik farklılıklar gözlenmektedir. Bu durum, akciğer

fenotipinin yalnızca CFTR genotipi ile açıklanamayacağını ve hastalık şiddetinin şekillenmesinde modifiye edici genler ile çevresel faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir (Butnariu ve ark., 2021).

CFTR modülatör tedavilerinin geliştirilmesi, kistik fibrozis tedavisinde önemli bir dönüm noktası oluşturmuş olmakla birlikte, bu tedavilerin yalnızca belirli CFTR varyantlarına etkili olması genetik heterojenliğin klinik önemini daha görünür hale getirmiştir. Hastaların yaklaşık yarısının mevcut modülatör tedavilere uygun olduğu bildirilmekte; genetik çeşitlilik, moleküler tanı eksiklikleri ve tedaviye erişim sorunları bu tedavilerden yararlanma oranlarını sınırlandıran başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Türkiye’de kistik fibrozis hasta kayıtlarına dayanan veriler de CFTR varyant spektrumunun belirgin heterojenite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalarda, en sık görülen varyant olan F508del’in toplumdaki sıklığının Batı popülasyonlarına kıyasla daha düşük olduğu ve geniş varyant çeşitliliğinin tedavi planlamasında önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (Akgül Erdal ve ark., 2025).

3. MODİFİYE EDİCİ GEN KAVRAMI

Modifiye edici genler, hastalığın primer nedenini oluşturmamakla birlikte, organ tutulumunun şiddeti, hastalığın progresyon hızı, komplikasyon gelişimi ve tedavi yanıtı gibi klinik fenotiplerin değişkenliğini etkileyebilen genetik faktörler olarak tanımlanmaktadır. Kistik fibroziste, aynı CFTR genotipine sahip bireylerde bile özellikle akciğer hastalığının klinik seyrinde belirgin farklılıklar gözlenmesi, modifiye edici gen hipotezinin temel dayanaklarından birini oluşturmaktadır. Bu kavram, başlangıçta aday gen çalışmaları ile araştırılmış; daha sonra genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ile desteklenerek kistik

fibrozis fenotipik çeşitliliğinin anlaşılmasında önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Butnariu ve ark., 2021).

Kistik fibrozis akciğer hastalığında modifiye edici gen araştırmaları, başlangıçta inflamasyon, konak savunması ve fibrozisle ilişkili biyolojik yollara odaklanan aday gen çalışmaları üzerinden şekillenmiş; teknolojik gelişmelerle birlikte genom çapında analizlerle daha geniş kapsamlı değerlendirmelere ulaşmıştır. Bu çalışmalar, hastalık şiddetini etkileyebilecek çok sayıda genetik belirleyiciyi ortaya koymuş olmakla birlikte, klinik sonlanım ölçütlerindeki heterojenlik, popülasyonlar arası farklılıklar ve genetik etkilerin çoğunlukla sınırlı büyüklükte olması nedeniyle bulguların klinik pratiğe doğrudan yansması halen kısıtlıdır (Shanthikumar, Neeland, Saffery, & Ranganathan, 2019).

Bu genler arasında TGFB1, inflamasyonun düzenlenmesi, doku onarımı ve fibrotik yeniden yapılanma süreçlerindeki merkezi biyolojik rolü nedeniyle kistik fibrozis akciğer hastalığının şiddetini etkileyebilecek en güçlü modifiye edici gen adaylarından biri olarak öne çıkmaktadır. Farklı popülasyonlarda yürütülen çok sayıda çalışma, TGFB1 varyantlarının akciğer fonksiyon kaybı, enfeksiyon dinamikleri ve hastalık progresyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Kramer & Clancy, 2018).

Modifiye edici gen etkileri çoğu zaman tek başına ortaya çıkmamakta; gen-gen ve gen-çevre etkileşimleri üzerinden fenotipik sonuçları şekillendirmektedir. Kistik fibroziste bunun dikkat çekici örneklerinden biri, pasif sigara dumanı maruziyetinin akciğer fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkisinin hem CFTR genotipi hem de TGFB1 varyantları ile etkileşim içinde daha belirgin hale gelebilmesidir. Bu durum, hastalık fenotipinin oluşumunda genetik ve çevresel faktörlerin birlikte değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır (Collaco ve ark., 2008).

4. TGF- β 1'İN BİYOLOJİK ROLÜ

TGF- β (*transforming growth factor- β*) ailesi, embriyonik gelişim, doku homeostazı, yara iyileşmesi ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi birçok temel biyolojik süreçte merkezi rol oynayan pleiotropik bir sitokin ailesidir. TGF- β sinyal iletimi temel olarak ligandların hücre yüzeyindeki reseptör komplekslerine (T β RII/T β RI) bağlanması ile başlar ve başlıca SMAD aracılı kanonik yol üzerinden hücrel transkripsiyon programlarının yeniden düzenlenmesi ile sonuçlanır. Bunun yanında PI3K/AKT gibi SMAD-dışı sinyal yolları aracılığıyla da hücrel yanıtların şekillenmesine katkıda bulunabilir. Bu çok yönlü sinyal ağı, TGF- β 'nın hücrel ve doku düzeyindeki etkilerinin biyolojik bağlama göre farklılaşabilmesini sağlamaktadır (Deng ve ark., 2024).

Kistik fibrozis açısından TGF- β 1'in önemi, kronik enfeksiyon ve persistan inflamasyon ortamında hava yolu yeniden yapılanması, doku hasarı onarımı ve fibrotik yanıtın düzenlenmesindeki belirleyici rolünden kaynaklanmaktadır. Kronik inflamasyonun sürdüğü kistik fibrozis akciğerinde TGF- β sinyal aktivitesinin artması, ekstraselüler matriks birikimi, skar oluşumu ve ilerleyici fibrotik değişiklikler ile ilişkilendirilmektedir. Bu süreçler, hava yolu yapısal bütünlüğünün bozulmasına ve akciğer fonksiyonlarında kalıcı kayba katkıda bulunmaktadır (Kramer & Clancy, 2018). İnsan kistik fibrozis akciğer dokusunda yapılan morfometrik analizlerde, pSMAD2 aracılı TGF- β sinyal aktivasyonunun artmış fibrozis ve miyofibroblast farklılaşması ile ilişkili bulunması, bu pro-fibrotik yolların hastalık patogenezinde aktif rol oynadığını göstermektedir (Harris ve ark., 2013).

TGF- β 1'in kistik fibrozis patofizyolojisindeki önemi yalnızca inflamasyon ve fibrozis ile sınırlı değildir; aynı zamanda CFTR biyolojisi ile doğrudan etkileşim göstermesi nedeniyle

hastalık fenotipinin şekillenmesinde daha geniş bir biyolojik etki alanına sahiptir. Deneysel çalışmalar, TGF- β 1 sinyal aktivasyonunun CFTR ve diğer klor kanallarının ekspresyonunu ve fonksiyonunu baskılayabildiğini göstermiştir. Ayrıca, *in vitro* modellerde F508del-CFTR için geliştirilen düzeltici ajanlardan VX-809 (lumacaftor) etkinliğinin TGF- β 1 varlığında belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2014). Bu bulgular, TGF- β 1'in yalnızca inflamasyon ve fibrozis süreçlerini yönlendiren bir düzenleyici değil, aynı zamanda CFTR hedefli tedavilere verilen biyolojik yanıtı etkileyebilecek önemli bir modifiye edici faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu yönüyle TGF- β 1 aktivitesi, kistik fibroziste hastalık şiddetinin ve tedavi yanıtının bireysel farklılıklarını açıklamada dikkate değer bir biyolojik belirleyici olarak değerlendirilmektedir (Trugilo ve ark., 2022).

5. TGFB1 POLİMORFİZMLERİ

TGFB1 geni, insan genomunda 19q13.2 bölgesinde yer alan ve yedi ekzondan oluşan bir gendir (Trugilo ve ark., 2022). Bu gen üzerinde yürütülen polimorfizm çalışmaları, ağırlıklı olarak promotör ve diğer regülatuar bölgelerdeki varyantlar ile sinyal peptidi ve kodlayıcı bölgelerde aminoasit değişimine yol açabilen fonksiyonel varyantlar üzerine odaklanmıştır. Bu yaklaşım, TGF- β 1 ekspresyon düzeyi, protein üretimi ve biyolojik aktivite üzerinde doğrudan etkili olabilecek genetik değişikliklerin belirlenmesini amaçlamaktadır (Sepahzad, Morris-Rosendahl, & Davies, 2021). Özellikle transkripsiyonel aktiviteyi etkileyebilen promotör varyantları ile protein yapısını veya sekresyonunu değiştirebilen kodlayıcı bölge varyantları, kistik fibrozis gibi inflamasyon ve fibrozis temelli hastalıklarda klinik fenotipin şekillenmesinde potansiyel modifiye edici faktörler olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda, kistik fibrozis

fenotipi ile ilişkisi en sık araştırılan TGFB1 varyantları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Kistik Fibrozis Fenotipi ile İlişkisi En Sık Araştırılan TGFB1 Varyantları

Varyant Türü	Nükleotid Değişimi	rs Kimliği	Yaygın Adlandırma	Fonksiyonel / Klinik Önemi
Promotör varyantı	c.-509C>T	rs1800469	-509 C>T	Transkripsiyon faktörü bağlanması, transkripsiyonel aktivite ve dolaşımdaki TGF- β 1 düzeyleri ile ilişkili olabilir (Zheng ve ark., 2013).
Sinyal peptidi varyantı	c.29C>T	rs1800470	Kodon 10 (Pro10Leu / Leu10Pro)	Sinyal peptidinde aminoasit değişimine yol açar; serum TGF- β 1 düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir (Taubenschuß ve ark., 2013).
Kodlayıcı bölge varyantı	c.74G>C	rs1800471	Kodon 25 (Arg25Pro)	Aminoasit değişimi oluşturan fonksiyonel varyantlardan biridir (Stoll ve ark., 2004).
İntron / 3’ bölge varyantı	—	rs8179181	İntron 5 / 3’ SNP	Haplotip analizlerinde yer alır; kistik fibrozis akciğer fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (Bremer ve ark., 2008).

Not. TGFB1 varyantları, promotör, kodlayıcı ve intronik bölgelerde yer alabilir ve gen ekspresyonu, protein sekresyonu veya biyolojik aktivite üzerinde farklı düzeylerde etkili olabilir.

TGFB1 varyantlarının fenotip üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde, tekil polimorfizmlerin yanı sıra bu varyantların birlikte kalıtım paternleri de önem taşımaktadır. Bağlantı dengesizliği (*linkage disequilibrium*, LD) nedeniyle bazı varyantların belirli popülasyonlarda birlikte taşınma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Özellikle rs1800469’un T aleli ile rs1800470 kodon 10 varyantlarının birçok popülasyonda sıklıkla birlikte kalıtıldığı ve bu nedenle tekil SNP analizlerinin bazen haplotip düzeyindeki fonksiyonel etkileri yansıtabildiği bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2013).

Kistik fibroziste TGFB1 ile ilişkili çalışmalarda bildirilen sonuçlar arasındaki farklılıkların bir kısmının, popülasyonlar arasındaki LD yapılarındaki değişkenlik, haplotip çeşitliliği ve CFTR genotip dağılımındaki farklılıklarla ilişkili olabileceği

düşünülmektedir. Bu durum, TGFB1 polimorfizmlerinin klinik etkilerinin değerlendirilmesinde popülasyona özgü genetik yapının dikkate alınmasının önemini göstermektedir (Bremer ve ark., 2008).

6. TÜRK POPÜLASYONUNDA ELDE EDİLEN VERİLER

Türkiye’de kistik fibroziste CFTR varyant spektrumunun belirgin genetik heterojenite göstermesi, hem CFTR hedefli tedavilere uygunluk oranlarının değerlendirilmesi hem de modifiye edici gen analizlerinin CFTR genotipine göre tabakalanarak yorumlanması açısından önemli bir metodolojik gereklilik ortaya koymaktadır. Türkiye kistik fibrozis kayıt verilerine dayanan analizlerde, en sık görülen varyant olan F508del’in tüm aleller içindeki oranının yaklaşık %22 düzeyinde olduğu ve bu varyantın hasta popülasyonunun yalnızca sınırlı bir bölümünü temsil ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, kayıtlı hastaların yaklaşık yarısının mevcut CFTR hedefli tedavilere uygun olduğu gösterilmiş; bu durum, geniş varyant çeşitliliğinin tedaviye erişim ve tedavi uygunluğu açısından önemli bir belirleyici olduğunu ortaya koymuştur (Akgül Erdal ve ark., 2025). Bu genetik çeşitlilik, özellikle CFTR modülatör tedavilerinin yaygın kullanım döneminde, modifiye edici gen etkilerinin klinik fenotip üzerindeki katkısının daha belirgin şekilde ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

Türk popülasyonunda gerçekleştirilen ve 65 kistik fibrozis hastası ile 85 sağlıklı kontrolü kapsayan bir çalışmada, TGFB1 geninin rs1800469, rs1800470 ve rs8179181 polimorfizmleri DNA dizi analizi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışma bulguları, TGFB1 varyantlarının yalnızca hastalık yatkınlığı ile değil, aynı zamanda bronşiektazi gelişimi, enfeksiyon dinamikleri ve büyüme parametreleri gibi klinik alt fenotiplerle

de ilişkili olabileceğini göstermiştir (Tablo 2) (Temurhan ve ark., 2016). Özellikle rs1800469 varyantının enfeksiyon dinamikleri ile, rs8179181 varyantının ise büyüme parametreleri ile ilişkili bulunması, TGFB1'in kistik fibrozis fenotipinin farklı klinik bileşenlerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Tablo 2. Türk popülasyonunda TGFB1 polimorfizmlerinin klinik fenotiple ilişkisi

Polimorfizm	Gen bölgesi	Fonksiyonel bölge	Klinik ilişki
rs1800469	Promotör	C-509T	TT genotipi kontrol grubunda anlamlı düzeyde daha sık saptanmış ve koruyucu etki olasılığı göstermiştir. CT genotipi, daha erken <i>Pseudomonas aeruginosa</i> enfeksiyonu kazanımı ile ilişkili bulunmuştur.
rs1800470	Ekzon 1	Kodon 10	Klinik fenotiplerle ilişkisi değerlendirilmiş, ancak anlamlı ilişki saptanmamıştır.
rs8179181	İntron 5	İntronik varyant	CC genotipi daha iyi büyüme parametreleri ile ilişkili bulunmuş; CT genotipi ve T aleli daha düşük büyüme persentilleri ile ilişkilendirilmiştir.

Not. Bulgular, Türk kistik fibrozis kohortunda TGFB1 varyantlarının enfeksiyon dinamikleri ve büyüme parametreleri gibi klinik alt fenotipler üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Temurhan ve ark., 2016).

7. TGFB1 VE KİSTİK FİBROZİSTE HASTALIK ŞİDDETİ: GÜNCEL KLİNİK PERSPEKTİF

Kistik fibroziste TGFB1 polimorfizmlerinin hastalık şiddeti üzerindeki etkileri; başlıca akciğer fonksiyon kaybı (özellikle FEV1 düzeylerinde azalma), kronik *Pseudomonas aeruginosa* kolonizasyonu, bronşiektazi gelişimi ve inflamatuvar biyobelirteçlerdeki değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. Erken dönem aday-gen araştırmalarından aile temelli analizlere ve daha güncel kohort çalışmalarına uzanan literatür, TGFB1'in kistik fibrozis akciğer fenotipinin şekillenmesinde önemli bir modifiye edici rol oynayabileceğini desteklemektedir (Collaco ve ark., 2008; Trojan ve ark., 2022).

Bu alandaki ilk güçlü bulgular, TGFB1 yüksek üretici genotiplerinin daha hızlı akciğer fonksiyon kaybı ile ilişkili olabileceğini gösteren erken dönem çalışmalarla ortaya konmuştur (Arkwright ve ark., 2000). Bunu izleyen çalışmalar, özellikle promotör bölge ve kodon 10 varyantlarının hastalık şiddeti ile ilişkili olabileceğini göstermiş; bazı haplotiplerin ise CFTR genotipine bağlı olarak daha iyi akciğer fonksiyonları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Drumm ve ark., 2005; Bremer ve ark., 2008). Ayrıca pasif sigara dumanı gibi çevresel maruziyetlerin TGFB1 varyantları ile etkileşime girerek akciğer fonksiyon kaybını artırabilmesi, modifiye edici etkinin yalnızca genetik değil, gen-çevre etkileşimleri üzerinden şekillendiğini göstermektedir (Bremer ve ark., 2008; Collaco ve ark., 2008).

Daha yakın dönem veriler, TGFB1 etkisinin yalnızca genotip düzeyinde değil, biyolojik aktivite düzeyinde de klinik sonuçlarla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Özellikle plazma ve hava yolu örneklerinde yüksek TGF- β 1 düzeylerinin daha hızlı akciğer fonksiyon kaybı ve inflamatuvar aktivite ile ilişkili bulunması, TGFB1'in biyobelirteç potansiyelini güçlendirmektedir (Trojan ve ark., 2022). Deneysel çalışmalar da bu klinik gözlemleri desteklemekte; TGF- β sinyal aktivasyonunun CFTR ekspresyonunu ve fonksiyonunu baskılayabildiği ve modülatör tedavilerin hücresel etkinliğini azaltabildiği gösterilmektedir (Sun ve ark., 2014; Sepahzad ve ark., 2021).

CFTR modülatör tedavilerinin klinik pratiği dönüştürdüğü son yıllarda, TGFB1 ekseninin tedavi yanıt heterojenliğinde de rol oynayabileceği gösterilmiştir. Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) tedavisi alan hastalarda yüksek TGF- β 1 aktivitesinin daha sınırlı akciğer fonksiyon iyileşmesi ve daha yüksek ter klorür düzeyleri ile ilişkili olması, bu eksenin modülatör yanıtını etkileyebileceğini düşündürmektedir (Kim ve ark., 2022). Benzer şekilde

nesolicaftor ve losartan ile yapılan deneysel çalışmalar, TGF- β aracılı baskının farmakolojik olarak geri çevrilebileceğini ve CFTR fonksiyonunun yeniden artırılabilirliğini göstermiştir (Kim ve ark., 2022; Bengtson ve ark., 2022).

Bununla birlikte, mevcut veriler TGFB1'in klinik etkisinin tek başına belirleyici olmadığını, diğer genetik ve çevresel etkenlerle birlikte şekillendiğini göstermektedir. Geniş genomik analizlerde TGFB1'in başlıca modifiye edici lokuslar arasında ön plana çıkmaması ve modülatör tedavi yanıtı ile TGFB1 genotipi arasındaki doğrudan ilişkinin halen sınırlı sayıda çalışmada değerlendirilmiş olması, bu alanın halen gelişmekte olduğunu göstermektedir (Shanthikumar ve ark., 2019; Middleton ve ark., 2019). Buna karşın, mevcut kanıtlar TGFB1'in kistik fibroziste hem hastalık şiddetinin hem de modülatör tedavi yanıt heterojenliğinin biyolojik açıklamalarından biri olabileceğini desteklemektedir.

8. KLİNİK YANSIMALAR

TGFB1 polimorfizmlerinin klinik pratiğe doğrudan yansımaları, mevcut kanıtlar ışığında henüz rutin genotipleme veya bireysel prognoz öngörüsünde kullanılabilecek düzeye ulaşmış değildir. Bunun başlıca nedenleri arasında çalışmalar arasındaki sonuç farklılıkları, klinik sonlanım ölçütlerindeki heterojenlik, CFTR modülatör tedavilerinin yaygınlaşmasıyla hastalık seyrinin değişen dinamikleri ve popülasyonlar arası genetik farklılıkların bulguların tekrarlanabilirliğini sınırlaması yer almaktadır (Shanthikumar, Neeland, Saffery, & Ranganathan, 2019). Bununla birlikte, mevcut veriler TGFB1 polimorfizmlerinin klinik öneminin risk tabakalama, tedavi yanıtının öngörülmesi ve terapötik hedef potansiyeli olmak üzere üç temel düzlemde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Risk tabakalama açısından, TGFB1 gibi modifiye edici genlerin etkisi tek başına değerlendirildiğinde sınırlı kalabilmektedir. Ancak CFTR genotipi, çevresel maruziyetler, kronik enfeksiyon durumu ve inflamatuvar biyobelirteçlerle birlikte ele alındığında klinik anlamlılığı daha belirgin hale gelmektedir. Bu çok boyutlu yaklaşım, hastalık progresyonu açısından yüksek risk taşıyan hasta alt gruplarının daha erken tanımlanmasına katkı sağlayabilir ve özellikle önlenabilir çevresel risk faktörlerinin kontrolüne yönelik hedeflenmiş koruyucu stratejilerin geliştirilmesini destekleyebilir (Collaco ve ark., 2008).

Tedavi yanıtı açısından değerlendirildiğinde, TGF- β sinyal aktivasyonunun CFTR ekspresyonunu ve fonksiyonunu baskılayabilmesi ve CFTR düzeltici tedavilerin hücresel etkinliğini azaltabilmesi, TGFB1/TGF- β ekseninin modülatör tedavilere verilen bireysel yanıt farklılıklarında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle yüksek TGF- β aktivitesi veya belirli TGFB1 haplotiplerine sahip bireylerde tedavi etkinliğinin farklılaşabileceği öne sürülmektedir. Bu yaklaşım henüz klinik uygulama düzeyine ulaşmamış olmakla birlikte, modülatör tedavilere kısmi veya yetersiz yanıt veren hastaların biyolojik olarak sınıflandırılmasında ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır (Sun ve ark., 2014; Sepahzad, Morris-Rosendahl, & Davies, 2021).

Terapötik hedef potansiyeli açısından TGF- β 1, fibrozis, hava yolu yeniden yapılanması ve kronik inflamasyon süreçlerindeki merkezi rolü nedeniyle dikkat çekmektedir. TGF- β hedefli tedavi stratejilerinin kistik fibroziste ilerleyici akciğer hasarını yavaşlatabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, TGF- β sinyal yolunun doku homeostazı, immün düzenleme ve yara iyileşmesindeki temel fizyolojik işlevleri göz önüne alındığında, sistemik inhibisyonun önemli güvenlik sorunlarına

yol açabileceği açıktır. Bu nedenle gelecekte geliştirilecek tedavi yaklaşımlarında hedef dokuya özgü uygulama stratejileri, uygun doz optimizasyonu ve aşağı akım sinyal yollarının daha seçici biçimde hedeflenmesi translasyonel açıdan kritik önem taşımaktadır (Kramer & Clancy, 2018; Deng ve ark., 2024).

Türkiye perspektifinden değerlendirildiğinde, CFTR varyant spektrumundaki yüksek genetik heterojenlik ve mevcut CFTR hedefli tedavilere uygunluk oranlarının görece sınırlı olması, modifiye edici genlerin klinik fenotip üzerindeki etkilerinin daha görünür hale gelmesine neden olabilir. Özellikle modülatör tedaviye uygun olmayan veya sınırlı yanıt veren hasta alt gruplarında TGFB1 gibi modifiye edici genlerin katkısı daha belirgin olabilir. Bununla birlikte, bu genetik çeşitlilik TGFB1'in klinik etkilerini güvenilir biçimde değerlendirebilmek için CFTR genotipine göre tabakalanmış, çok merkezli ve daha geniş örneklem büyüklüğüne sahip çalışmalara olan gereksinimi artırmaktadır (Akgül Erdal ve ark., 2025).

9. SONUÇ

TGFB1, kistik fibroziste hastalık şiddeti, akciğer fenotipi ve tedavi yanıt heterojenliğini etkileyebilecek önemli bir modifiye edici eksen olarak öne çıkmaktadır. Özellikle inflamasyon, fibrozis ve doku yeniden yapılanması üzerindeki merkezi biyolojik rolü, TGFB1'i hem hastalık progresyonunun anlaşılmasında hem de potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesinde dikkat çekici bir moleküler aday haline getirmektedir. Klinik ve deneysel çalışmalar, TGFB1 varyantları ile akciğer fonksiyon kaybı, enfeksiyon dinamikleri ve CFTR modülatör tedavilere verilen yanıt arasında anlamlı ilişkiler olabileceğini göstermektedir (Kim ve ark., 2022).

Bununla birlikte, mevcut literatür bazı temel sınırlılıklar içermektedir. Geniş genomik analizlerde TGFB1'in başlıca

genetik belirleyiciler arasında ön plana çıkmaması, bu genin etkisinin doğrudan nedensel olmaktan çok biyolojik aktivite düzeyi üzerinden klinik fenotipi etkileyen bir modifiye edici eksen olabileceğini düşündürmektedir (Zhou ve ark., 2023). Ayrıca, çalışma tasarımlarındaki metodolojik heterojenlik, fenotip tanımlarındaki farklılıklar ve biyobelirteç ölçümlerindeki standardizasyon eksiklikleri, bulguların karşılaştırılabilirliğini ve genellenebilirliğini sınırlamaktadır (Ward ve ark., 2024).

CFTR modülatör tedavilerinin klinik pratiği dönüştürdüğü günümüzde, TGFB1'in özellikle modülatör tedavilere kısmi veya yetersiz yanıt veren hasta alt gruplarında daha belirgin klinik önem taşıyabileceği düşünülmektedir. Ancak mevcut veriler, TGFB1 genotiplemesinin rutin klinik kullanımını destekleyecek düzeye ulaşmış değildir. Bu nedenle gelecekte, CFTR genotipine göre iyi tabakalanmış, prospektif, çok merkezli ve biyobelirteç temelli kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır. Özellikle aktif/toplam TGF- β 1 oranı ve ilişkili sitokin ağlarının değerlendirilmesi, TGFB1 ekseninin prognostik ve terapötik değerinin daha net ortaya konmasına katkı sağlayabilir. Bu yaklaşım, kistik fibroziste kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde ve modülatör tedaviye dirençli hasta alt gruplarının tanımlanmasında önemli katkılar sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Akgül Erdal, M., Nayır Büyükşahin, H., Şen, V., Kılınç, A. A., Çokuğraş, H., Doğan, G., ... Doğru, D. (2025). Eligibility of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulator therapies: Cohort of cystic fibrosis registry of Türkiye. *Turkish Journal of Pediatrics*, 67, 22–30. doi:10.24953/turkjpediatr.2025.4680
- Arkwright, P. D., Laurie, S., Super, M., Pravica, V., Schwarz, M. J., Webb, A. K., & Hutchinson, I. V. (2000). TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 55(6), 459–462. doi:10.1136/thorax.55.6.459
- Bengtson, C., Silswal, N., Baumlin, N., Yoshida, M., Dennis, J., Yerrathota, S., & Salathe, M. (2022). The CFTR amplifier nesolicaftor rescues TGF-β1 inhibition of modulator-corrected F508del CFTR function. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10956. doi:10.3390/ijms231810956
- Bremer, L. A., Blackman, S. M., Vanscoy, L. L., McDougal, K. E., Bowers, A., Naughton, K. M., ... Cutting, G. R. (2008). Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Human Molecular Genetics*, 17(14), 2228–2237. doi:10.1093/hmg/ddn123
- Butnariu, L. I., Țarcă, E., Cojocaru, E., Rusu, C., Moisă, Ș. M., Leon Constantin, M.-M., ... Trandafir, L. M. (2021). Genetic modifying factors of cystic fibrosis phenotype: A challenge for modern medicine. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5821. doi:10.3390/jcm10245821
- Collaco, J. M., Vanscoy, L., Bremer, L., McDougal, K., Blackman, S. M., Bowers, A., ... Cutting, G. R. (2008).

- Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA*, 299(4), 417–424. doi:10.1001/jama.299.4.417
- Deng, Z., Fan, T., Xiao, C., Tian, H., Zheng, Y., Li, C., & He, J. (2024). TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 61. doi:10.1038/s41392-024-01764-w
- Dorfman, R., Sandford, A., Taylor, C., Huang, B., Frangolias, D., Wang, Y., ... Zielenski, J. (2008). Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 118(3), 1040–1049. doi:10.1172/JCI33754
- Drumm, M. L., Konstan, M. W., Schluchter, M. D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., ... Knowles, M. R. (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1443–1453. doi:10.1056/NEJMoa051469
- Garg, U., & Oermann, C. M. (2025). Cystic fibrosis: A brief review of pathogenesis, clinical features, diagnosis and therapies. *International Journal of Clinical and Translational Medicine*, 1(4), 4. doi:10.53941/ijctm.2025.1000025
- Gentzsch, M., Cholon, D. M., Quinney, N. L., Martino, M. E. B., Minges, J. T., Boyles, S. E., ... Ribeiro, C. M. P. (2021). Airway epithelial inflammation *in vitro* augments the rescue of mutant CFTR by current CFTR modulator therapies. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 628722. doi:10.3389/fphar.2021.628722
- Harris, W. T., Kelly, D. R., Zhou, Y., Wang, D., MacEwen, M., Hagood, J. S., ... Sorscher, E. J. (2013). Myofibroblast differentiation and enhanced TGF- β signaling in cystic

- fibrosis lung disease. *PLoS One*, 8(8), e70196.
doi:10.1371/journal.pone.0070196
- Kim, M. D., Bengtson, C. D., Yoshida, M., Niloy, A. J., Dennis, J. S., Baumlin, N., & Salathe, M. (2022). Losartan ameliorates TGF- β 1-induced CFTR dysfunction and improves correction by cystic fibrosis modulator therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 132(11), e155241. doi:10.1172/JCI155241
- Kramer, E. L., & Clancy, J. P. (2018). TGF β as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(2), 177–189.
doi:10.1080/14728222.2018.1406922
- Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., ... Jain, R. (2019). Elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *New England Journal of Medicine*, 381(19), 1809–1819.
doi:10.1056/NEJMoa1908639
- Sepahzad, A., Morris-Rosendahl, D. J., & Davies, J. C. (2021). Cystic fibrosis lung disease modifiers and their relevance in the new era of precision medicine. *Genes*, 12(4), 562.
doi:10.3390/genes12040562
- Shanthikumar, S., Neeland, M. N., Saffery, R., & Ranganathan, S. (2019). Gene modifiers of cystic fibrosis lung disease: A systematic review. *Pediatric Pulmonology*, 54(9), 1356–1366. doi:10.1002/ppul.24366
- Stoll, C., Mengsteab, S., Stoll, D., Riediger, D., Gressner, A. M., & Weiskirchen, R. (2004). Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate

- compared with healthy adults. *BMC Medical Genetics*, 5, 15. doi:10.1186/1471-2350-5-15
- Sun, H., Harris, W. T., Kortyka, S., Kotha, K., Ostmann, A. J., Rezayat, A., ... Clancy, J. P. (2014). TGF-beta downregulation of distinct chloride channels in cystic fibrosis-affected epithelia. *PLoS One*, 9(9), e106842. doi:10.1371/journal.pone.0106842
- Taubenschuß, E., Marton, E., Mogg, M., Frech, B., Ehart, L., Muin, D., & Schreiber, M. (2013). The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor β 1 in human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15376–15385. doi:10.3390/ijms140815376
- Temurhan, S., Tamay, Z., Gürkan, H., Akgül, S., Özçeker, D., Kekik, Ç., ... Güler, N. (2016). The effect of TGFB1 and CD14 gene polymorphisms on the clinical findings of cystic fibrosis in Turkish patients. *International Journal of Human Genetics*, 16(1–2), 40–47. doi:10.1080/09723757.2016.11886276
- Trojan, T., Alejandro Alcazar, M. A., Fink, G., Thomassen, J. C., Maessenhausen, M. V., Rietschel, E., ... van Koningsbruggen-Rietschel, S. (2022). The effect of TGF- β 1 polymorphisms on pulmonary disease progression in patients with cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 22(1), 183. doi:10.1186/s12890-022-01977-1
- Trugilo, K. P., Cebinelli, G. C. M., Pereira, É. R., Okuyama, N. C. M., Cezar-Dos-Santos, F., Castilha, E. P., ... de Oliveira, K. B. (2022). Haplotype structures and protein levels of TGFB1 in HPV infection and cervical lesion: A case-control study. *Cells*, 12(1), 84. doi:10.3390/cells12010084

- Ward, A., Mauleon, R., Ooi, C. Y., & Rosic, N. (2024). Impact of gene modifiers on cystic fibrosis phenotypic profiles: A systematic review. *Human Mutation*, 45, 6165547. doi:10.1155/2024/6165547
- Weiler, C. A., & Drumm, M. L. (2013). Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 40. doi:10.3389/fphar.2013.00040
- Yıldız, C. A., Gökdemir, Y., Eralp, E. E., Ergenekon, P., Karakoç, F., & Karadağ, B. (2025). Cystic fibrosis treatment landscape: Progress, challenges, and future directions. *Turkish Archives of Pediatrics*, 60(2), 117–125. doi:10.5152/TurkArchPediatri.2025.24257
- Zheng, W., Yan, C., Wang, X., Luo, Z., Chen, F., Yang, Y., ... Huang, M. (2013). The TGFB1 functional polymorphism rs1800469 and susceptibility to atrial fibrillation in two Chinese Han populations. *PLoS One*, 8(12), e83033. doi:10.1371/journal.pone.0083033
- Zhou, Y.-H., Gallins, P. J., Pace, R. G., Dang, H., Aksit, M. A., Blue, E. E., ... Knowles, M. R. (2023). Genetic modifiers of cystic fibrosis lung disease severity: Whole-genome analysis of 7,840 patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 207(10), 1324–1333. doi:10.1164/rccm.202209-1653O
- Zhu, M.-L., Wang, M. Y., Shi, T.-Y., Li, Q.-X., Xi, P., Xia, K.-Q., ... Wei, Q.-Y. (2013). No association between TGFB1 polymorphisms and late radiotherapy toxicity: A meta-analysis. *PLoS One*, 8(10), e76964. doi:10.1371/journal.pone.0076964

TEMOZOLOMİD VE PALOMİD 529 KOMBİNASYONUN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Çığır BİRAY AVCI¹

Sıla ÖZKAL²

Elham SHAHRİYARİ³

Asghar KHALİLNEZHAD⁴

İrem YILDIRIM⁵

1. GİRİŞ

Glioblastoma, merkezi sinir sisteminin en agresif primer malign tümörlerindendir. Nöro-onkoloji alanında tedaviye en dirençli tablolardan birini oluşturan glioblastoma, güncel çalışmalara göre en sık karşılaşılan primer malign santral sinir sistemi tümörüdür. 2025 yılı CBTRUS raporu verilerine göre bu patoloji, tüm primer beyin ve santral sinir sistemi lezyonlarının %13,7'sini oluştururken sadece malign karakterli tümörler hesaba katıldığında bu oran yarıyı aşarak %52,2'ye ulaşmaktadır (Price et al., 2025). Mevcut istatistikler, glioblastomanın sadece

¹ Prof. Dr, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, ORCID: 0000-0001-8251-4520.

² Dr., Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, ORCID: 0009-0006-8535-8731.

³ Doktora Öğrencisi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, ORCID: 0000-0002-7861-6767.

⁴ Doktora Öğrencisi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, ORCID: 0000-0001-8142-7222.

⁵ Doktora Öğrencisi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, ORCID: 0009-0007-5967-9125.

sergilediği agresif biyolojik davranışla değil, aynı zamanda malign santral sinir sistemi neoplazileri arasındaki yüksek insidansıyla da halk sağlığı ve bilimsel araştırmalar açısından nedenli kritik bir odak noktası olduğunu kanıtlamaktadır. Hastalığın klinik yönetimini zorlaştıran başlıca faktörler; tümörün yüksek proliferasyon hızı, çevre dokulara diffüz yayılımı, ileri düzeydeki moleküler heterojenitesi, standart tedavilere gösterdiği direnç ve nükse olan güçlü eğilimidir. Kapsamlı cerrahi rezeksiyona eklenen adjuvan kemoradyoterapiye rağmen lokalize veya multifokal nükslerin önlenememesi, sağkalım verilerinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Geniş çaplı popülasyon taramaları, malign santral sinir sistemi tümörlerinin genelinde beş yıllık sağkalımın sınırlı olduğunu ve glioblastomanın bu grup içerisinde en zayıf prognostik gidişata sahip olduğunu teyit etmektedir (Price et al., 2025). Tüm bu bulgular, glioblastoma yönetiminde sadece tümör hücrelerini öldürmeye odaklanan değil, hücresel direnç yollarını da eş zamanlı olarak bloke edebilen yenilikçi kombinasyon tedavilerine duyulan acil ihtiyacı gözler önüne sermektedir.

Gliomablastoma tedavisinin standart bileşenlerinden biri olan Temozolomid, kan-beyin bariyerini yüksek oranda geçebilen oral bir alkilleyici kemoterapötiktir. EANO rehberlerine göre, santral sinir sistemi neoplazilerine doğrudan ulaşabilme özelliği, bu ajanı gliomalar için en sık uygulanan sistemik tedavi haline getirmiştir (Weller et al., 2021). Ancak ilacın klinik kullanımı büyük ölçüde mielosupresyon (özellikle trombositopeni) gibi dozu sınırlandıran toksisitelerle kısıtlanmakta olup, tedavi sürecinde karaciğer fonksiyonlarının da yakından takip edilmesi zorunludur (Weller et al., 2021). Moleküler etki mekanizması incelendiğinde Temozolomid'in, fizyolojik koşullarda reaktif ara ürünlere dönüşerek DNA'nın N7-guanin, N3-adenin ve O6-guanin bölgelerini metillediği görülmektedir. N7 ve N3 pozisyonlarındaki hasarların miktarı daha fazla olmasına rağmen,

hücre ölümünü tetikleyen asıl sitotoksik lezyon O6-metilguanindir (Ito et al., 2013). DNA replikasyonu aşamasında O6-metilguanin, timin bazı ile hatalı bir eşleşme yapmakta ve bu anomali, hücrenin DNA yanlış eşleşme onarımı mekanizmasını tetiklemektedir. O6-metilguanin hasarının çözilememesi durumunda başlayan sonuçsuz "faydasız tamir" döngüleri; hücreyi strese sokmakta, sarmalda tek ve çift zincir kırıklarına neden olmakta, Chk1/Chk2 yolağını aktive ederek bölünmeyi durdurmakta ve en nihayetinde apoptozu başlatmaktadır (Ito et al., 2013).

Glioblastoma klinik yönetiminde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri Temozolomid direncidir. Mevcut literatür, bu ajanla tedavi edilen hastaların büyük kısmında optimal yanıtın elde edilemediğine ve bu durumun temelinde MGMT kaynaklı DNA onarım aktivitesi ile buna eşlik eden çeşitli moleküler kaçış mekanizmalarının yattığına işaret etmektedir (Lee, 2016; Yi et al., 2019). Bu noktada, tümör direncini besleyen en temel moleküler mekanizmalardan biri PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağıdır. Bu yolak, reseptörlerden gelen büyüme sinyallerini alarak hücre proliferasyonu, sağkalım, anjiyogenez, invazyon, otofaji ve metabolik yeniden programlama gibi kanser hücrelerinin temel yaşamsal faaliyetlerini koordine etmektedir (Abe et al., 2020). Glioblastoma vakalarının büyük bir çoğunluğunda reseptör tirozin kinaz/Ras/PI3K kaskadını etkileyen genetik anomaliler mevcut olup, dikkate değer bir hasta popülasyonunda PTEN delesyonu veya mutasyonları gözlenmektedir (Abe et al., 2020). PTEN fonksiyonunun yitilmesi veya PI3K/Akt'nin aşırı aktivasyonu, mTOR iletimini şiddetlendirerek hücre proliferasyonunu, anabolik süreçleri ve apoptozdan kaçışı tetiklemektedir. Dolayısıyla, PI3K/Akt/mTOR yolağı, yalnızca tümörögenезin ve progresyonun durdurulması bağlamında değil, aynı zamanda tedavi direncinin kırılması noktasında da önemli bir terapötik hedef konumundadır (Abe et al., 2020).

RES-529 veya P529 isimleriyle de bilinen Palomid 529, PI3K/Akt/mTOR sinyal kaskadında spesifik olarak mTORC1 ve mTORC2 komplekslerini eş zamanlı bloke eden küçük molekül yapılı bir inhibitördür (National Cancer Institute [NCI], n.d.; Pearson & Regad, 2017). Palomid 529'un ilgili kompleksleri barındıran tümörlerde proliferasyonu baskılayıp programlı hücre ölümünü uyardığı bilinmektedir (Pearson & Regad, 2017). Ayrıca Xue ve arkadaşlarının çalışmaları, ilacın TORC1 ve TORC2 blokajı sayesinde tümöral anjiyogenezi, damar geçirgenliğini ve kitlesel büyümeyi yavaşlattığını ortaya koymuştur (Xue et al., 2008). Bu özellikleri, Palomid 529'un Temozolomid direncine katkıda bulunan sağkalım sinyalleri ile DNA hasar yanıtlarını kırmada stratejik bir kombinasyon partneri olabileceğine işaret etmektedir. Glioblastoma spesifik tedavilerde karşılaşılan en büyük engel, in vitro etkinliği yüksek ajanların ABCB1 (P-glikoprotein) ve ABCG2 (BCRP) effluks taşıyıcılarına takılarak kan-beyin bariyerini geçememesidir. Ancak Palomid 529 için yapılan farmakokinetik değerlendirmeler, molekülün bu dışa atım pompalarından etkilenmeksizin intrakraniyal alana nüfuz edebildiğini ve U87 modellerinde tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (Weinberg et al., 2016).

Preklinik çalışmalarda, dual mTORC1/mTORC2 inhibitörü olan Palomid 529'un glioblastoma hücre yollarını hedefleyerek tümöral gelişimi durdurduğu ve umut verici bir profil sergilediği bildirilmektedir. Temozolomid ve Palomid 529'un kombine edilmesinin altındaki temel bilimsel gerekçe, bu iki ajanın hücre içinde farklı ancak birbirini tamamlayıcı biyolojik süreçleri bloke etmesidir. Temozolomid doğrudan DNA alkilasyonu ile genotoksik bir yük yaratırken Palomid 529, hücrenin sağkalım, çoğalma, protein anabolizması, anjiyogenezi, otofaji ve DNA hasarına toleransından sorumlu olan mTORC1/mTORC2 sinyallerini bloke etmektedir (Ito et al., 2013; Pearson & Regad, 2017; Xue et al., 2008). Bu sayede

Palomid 529, hücrenin Temozolomid'e karşı geliştireceği adaptif kurtarma yanıtlarını zayıflatabilme potansiyeli taşımaktadır. Özellikle Temozolomid direnci gösteren MGMT pozitif T98G hücrelerinde bu kombinasyonun, daha düşük ilaç dozlarında bile yüksek antitümöral etkinlik ve artmış sitotoksosite sağlaması beklenmektedir (Hegi et al., 2005). Hücrenin Temozolomid hasarına vereceği yanıt tek tip değildir. Hasar boyutuna ve tamir kapasitesine göre hücre döngüsü duraklaması, apoptoz, senesens veya mitotik katastrof görülebilmektedir (Ito et al., 2013; Lee, 2016). O6-metilguanin lezyonlarının yanlış eşleşme onarımı mekanizması tarafından işlenmesi sürecinde DNA'da tek ve çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Bu reaksiyon dizisi Chk1/Chk2 kinazlarının uyarılmasına, Cdc25C'nin baskılanmasına ve hücre döngüsünün G2/M evresinde bloke edilmesine yol açmaktadır (Ito et al., 2013). Bu nedenle kombinasyon terapilerinde sitotoksosite verilerinin hücre döngüsü profilleriyle desteklenmesi gerekmektedir. Hücrelerin G0/G1, S veya G2/M fazlarındaki birikimi, DNA hasar kontrol noktalarının nasıl çalıştığını göstermektedir. Özellikle G2/M duraklaması, hücrenin ölümcül hasarı mitozdan önce onarma çabasını veya onarılamaz düzeyde bir hasar yükünü yansıtmaktadır. Temozolomid ilk anda DNA çift zincir kırığı yaratmasa da replikasyon ve yanlış eşleşme onarımı aktiviteleri neticesinde bu ölümcül kırıklar sonradan gelişmektedir (Ito et al., 2013). ATM/ATR aracılı sinyal ağını uyaran bu çift zincir kırıkları onarılamadığında, hücre apoptoza, mitotik katastrofa veya hücrenel yaşlanmaya sürüklenmektedir (Ito et al., 2013; Lee, 2016).

T98G hücre hattı, sahip olduğu MGMT pozitif profili ve Temozolomid'e karşı gösterdiği direnç nedeniyle, klinikte sıkça karşılaşılan tedavi yanıtsızlığını modellemek ve kombinasyon stratejilerini test etmek için ideal bir zemin sunmaktadır. Palomid 529'un mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri üzerindeki ikili

inhibisyonu, Temozolomid'in indüklediği DNA hasarı ile entegre edildiğinde; hücrenin hayatta kalma sinyallerinin baskılanması, hücre döngüsü kontrol noktalarının bozulması ve DNA çift sarmal kırıklarının artışı gibi çoklu mekanizmalar aracılığıyla antitümöral etkinin belirgin şekilde güçlenmesi öngörülmektedir (Ito et al., 2013; Pearson & Regad, 2017; Weinberg et al., 2016; Xue et al., 2008).

Sonuç olarak yüksek ölüm oranları, agresif invazyon kapasitesi, kompleks moleküler yapısı ve terapötik direnci göz önüne alındığında, glioblastoma günümüzde acil çözüm bekleyen kritik bir medikal zorluk olmaya devam etmektedir (Price et al., 2025; Weller et al., 2021). Her ne kadar Temozolomid mevcut standart tedavi protokolünün belkemiğini oluştursa da hasta popülasyonunun kayda değer bir kısmında ortaya çıkan primer ya da sonradan kazanılmış hücresel direnç, sağlanan klinik faydayı büyük ölçüde kısıtlamaktadır (Lee, 2016; Stupp, Mason, et al., 2005; Stupp, Hegi, et al., 2009; Yi et al., 2019). Bu noktada PI3K/Akt/mTOR kaskadının tümör biyolojisindeki kilit fonksiyonu ve Palomid 529'un her iki mTOR kompleksini (mTORC1/mTORC2) eş zamanlı inhibe etme yeteneği büyük önem taşımaktadır. Zira bu özellikler, Palomid 529'u Temozolomid'e karşı hücre duyarlılığını yeniden tesis edebilecek ve tedavi başarısını artırabilecek son derece güçlü bir kombinasyon adayı olarak konumlandırmaktadır (Abe et al., 2020; Pearson & Regad, 2017; Xue et al., 2008).

Tüm bu veriler ışığında araştırmamızın temel hedefleri dört aşamada kurgulanmıştır. Öncelikle her iki ajanın T98G hücrelerindeki tekil sitotoksitelerinin ölçülmesi, ardından kombinasyon tedavisinin additif mi yoksa sinerjistik mi olduğunun saptanması, üçüncü adımda hücre döngüsü profillerindeki evresel değişimlerin incelenmesi ve son olarak tedaviye bağlı DNA çift zincir kırığı oluşum düzeylerinin analiz edilmesidir.

2. YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

T98G glioblastoma hücreleri, T-75 flasklarda %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ortamında kültüre edilmiştir. Flasklardaki hücre kültürü ortamları, haftada 2–3 kez yenilenmiştir. Hücreler, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki inkübe edilmiştir. Pasajlama adımlarında Tripsin-EDTA kullanılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi ve hücre sayımının yapılması için Tripan Blue kullanılmıştır.

2.2. Hücre Proliferasyon Deneyi

Sitotoksosite analizlerine geçilmeden önce, T98G hücreleri için mililitre başına düşen en ideal ekim konsantrasyonunu belirlemek amacıyla bir proliferasyon optimizasyon testi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hücreler, 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 100 µl hacim olacak şekilde ve azalan seri dilüsyonlarla (kuyucuk başına 1×10^5 ile 1.562,5 hücre aralığında) ekilmiştir. Plakalar 96 saatlik inkübasyon sürecine bırakılmış, ardından her bir kuyucuğa 10 µl WST-8 ilave edilmiştir. Reaktif eklendikten sonra 37°C sıcaklıkta 30 dakika daha inkübe edilen plakaların 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri bir mikropalak okuyucu yardımıyla ölçülmüştür. Elde edilen OD verileri, CalcuSyn yazılımına aktarılarak hücre proliferasyon hızları hesaplanmış ve optimal ekim yoğunluğu saptanmıştır.

2.3. Sitotoksosite Testi

Deneylerde kullanılmak üzere 10 mg Palomid 529, 2,46 ml DMSO içerisinde çözündürülerek 10 mM'lık ana stok solüsyon elde edilmiş ve -80°C'de saklanmıştır. Temozolomid ise 1 ml DMSO ile 50 mM stok konsantrasyonuna getirilerek aynı koşullarda saklanmıştır. Tripan Blue yöntemiyle canlılık ve hücre

sayımı yapıldıktan sonra hücreler, daha önceki proliferasyon testinde belirlenen optimum yoğunlukta 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için geçen 24 saatlik inkübasyonun ardından eski kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Tedavi aşamasında Palomid 529 için 100 μ M, Temozolomid için ise 1000 μ M başlangıç dozlarından yola çıkılarak sırasıyla 5 nM–100 μ M ve 1,95 μ M–1000 μ M aralıklarında doz serileri uygulanmıştır. Tüm ilaç uygulamaları üç bağımsız tekrar içerecek şekilde 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar halinde gerçekleştirilmiştir. İlgili inkübasyon süreleri tamamlandığında her kuyucuğa 10 μ l WST-8 reaktifi ilave edilmiş, plakalar 37°C’de 30 dakika bekletildikten sonra mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, ilaç verilmeyen kontrol grubuna oranlanarak ajanların IC₅₀ değerleri CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.4. İzobologram Analizi

İki etken maddenin birbirleriyle olan etkileşimlerini kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla izobologram analizinden faydalanılmıştır. Etkileşim türünün belirlenmesinde kullanılan kombinasyon indeksi (CI) hesaplamalarında değerin 1’den küçük olması sinerjistik, 1’e eşit olması additif ve 1’den büyük olması ise antagonistik etki şeklinde yorumlanmıştır. Hücrelerin kuyucuklara optimum sayılarda ekilmesinin ardından, daha önce saptanan IC₅₀ dozları referans alınarak kombinasyon setleri kurulmuştur. Bu aşamada Temozolomid konsantrasyon oranı sabit tutulmuş, üzerine Palomid 529 eklenerek hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Hiçbir ilaç muamelesi görmeyen hücreler kontrol grubu olarak belirlenmiştir. İnkübasyon bitiminde her bir kuyucuğa 10 μ l WST-8 reaktifi ilave edilmiştir. Absorbans okumaları mikropalak spektrofotometresinde 450 nm dalga boyunda 30 dakikalık periyotlarla gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın matematiksel modellemesi olan kombinasyon indeksi (CI), doz azaltım indeksi (DRI), regresyon değeri (r) ve doz-yanıt

eğrisi eğim (m) parametreleri CalcuSyn V2.0 yazılımı aracılığıyla hesaplanmıştır.

2.5. Hücre Döngüsü Analizi

Uygun yoğunluktaki hücreler 6 kuyucuklu plakalara üç tekrarlı olacak biçimde ekilmiş ve 24 saat süresince standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından, daha önce hesaplanan IC₅₀ ve ED dozları referans alınarak etken madde muameleleri yapılmıştır. Planlanan inkübasyon süreleri tamamlandığında, spesifik hücre döngüsü analiz kitinin prosedürü izlenerek sırasıyla A, B ve C solüsyonları kuyucuklara ilave edilmiş ve uygun inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Analizler, her deney grubu için 2×10^5 hücre okutularak değerlendirmeler yapılmıştır.

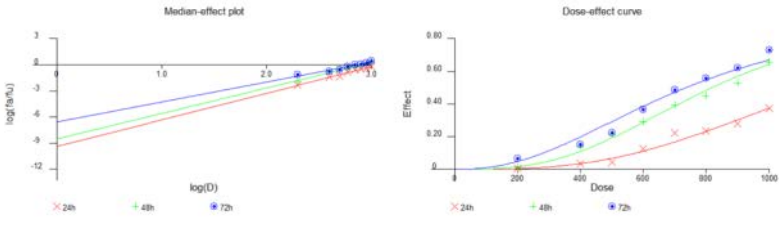
2.6. Çift Zincir Kırık Analizi

Temozolomid, Palomid 529 ve bu iki ajanın kombinasyonunun T98G kanser hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı ve malign progresyonu durdurma potansiyeli, anti-H2AX (pS139) antikoru kullanılarak ölçülmüştür. Öncelikle hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılıp $1 \times$ PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Fiksasyon işlemi için PBS içinde hazırlanan %3,7 oranındaki formaldehit solüsyonu kullanılarak örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve ardından santrifüj edilmiştir. Permeabilizasyon amacıyla %90 metanol ilave edilip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Metanolün uzaklaştırılmasını takiben $1 \times$ PBS ile yıkama yapılmış ve bloklama için %3'lük FBS kullanılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Sonrasında 1:10 oranında seyreltilmiş primer antikorlar örneklerle eklenerek oda sıcaklığında 60 dakika reaksiyona bırakılmıştır. Antikor fazlası uzaklaştırılıp PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve akım sitometri

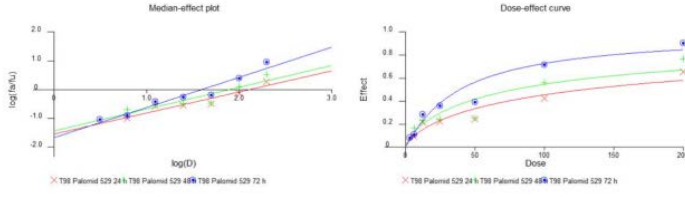
cihazında 482/35 nm ile 536/40 nm bandpass emisyon filtreleri ayarlanarak analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

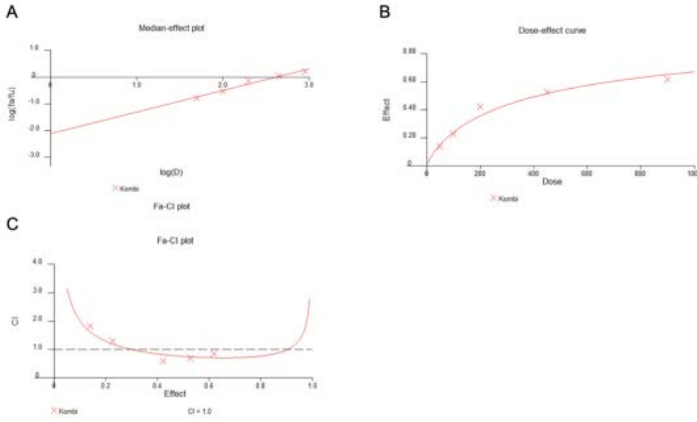
T98G hücre hattında yürütülen tekil sitotoksikite testleri sonucunda, Temozolomid'in 24, 48 ve 72. saatlerdeki inhibitör dozları sırasıyla 1182,69 μM (m: $3,05 \pm 0,18$, r: 0,99), 817,63 μM (m: $2,92 \pm 0,13$, r: 0,99) ve 735,23 μM (m: $2,28 \pm 0,20$, r: 0,97) olarak belirlenmiştir. Palomid 529'un 24, 48 ve 72. saatlerindeki inhibitör dozları ise sırasıyla 127,93 μM (m: $0,73 \pm 0,12$, r: 0,95), 77,95 μM (m: $0,76 \pm 0,17$, r: 0,91) ve 39,10 μM (m: $1,04 \pm 0,12$, r: 0,97) şeklinde hesaplanmıştır. Elde edilen bu veriler ışığında, ajanlar 10:1 TMZ:Pal sabit oranında kombine edilmiştir. İkili uygulamanın sonucunda ED50 değerleri Temozolomid için 412,60 μM 'ye, Palomid 529 için ise 41,26 μM 'ye gerilemiştir. Temozolomid'e ait doz azaltma indeksi (DRI) 1,98 olarak kaydedilmiştir. Fa50 seviyesinde hesaplanan kombinasyon indeksi (CI) değeri 0,76 olup, bu durum iki ajanın 'ılımlı sinerjistik' bir etkileşim sergilediğini kanıtlamaktadır (Şekil 1-3).



Şekil 1. Temozolomid ile 24, 48 ve 72 saat boyunca tedavi edilen T98G hücrelerinde medyan-etki ve doz-etki grafikleri



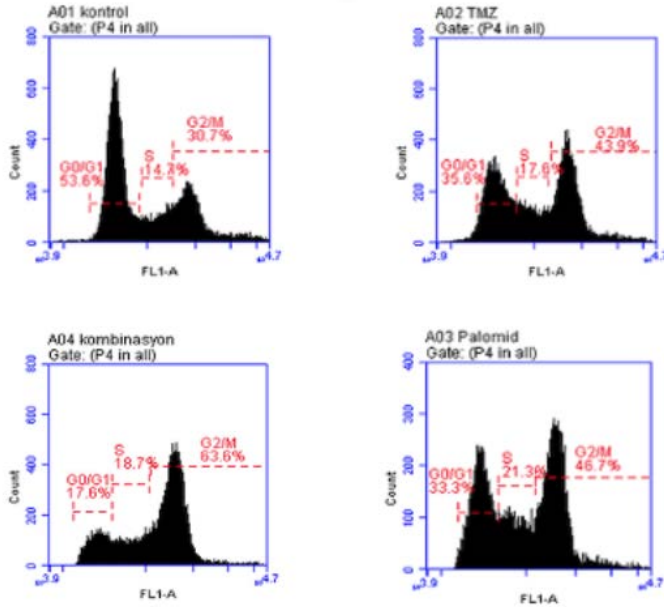
Şekil 2. Palomid 529 ile 24, 48 ve 72 saat boyunca tedavi edilen T98G hücrelerinde medyan-etki ve doz-etki grafikleri



Şekil 3. Temozolomid ve Palomid 529'un kombinasyonu ile tedavi edilen T98G hücrelerinde medyan-etki (A), doz-etki (B) ve Fa-CI (C) grafikleri

Hücre döngüsü analizi verileri incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinin ağırlıklı olarak G0/G1 evresinde (%53,6) toplandığı, S evresi (%14,4) ve G2/M evresindeki (%30,7) hücre oranlarının ise daha düşük seviyelerde kaldığı saptanmıştır. Yalnızca Temozolomid uygulanan grupta G0/G1 fazındaki hücre popülasyonu %35,6'ya gerilerken, G2/M fazında %43,9'luk dikkati çeken bir artış kaydedilmiştir. Bu bulgu, ajanın hücre döngüsünü G2/M kontrol noktasında sekteye uğrattığına işaret etmektedir. Palomid 529 tedavisinde ise G0/G1 fazında kontrol grubuna nazaran daha dramatik bir düşüş (%33,3) izlenmiş ve hücrelerin %46,7 oranında G2/M evresinde biriktiği tespit

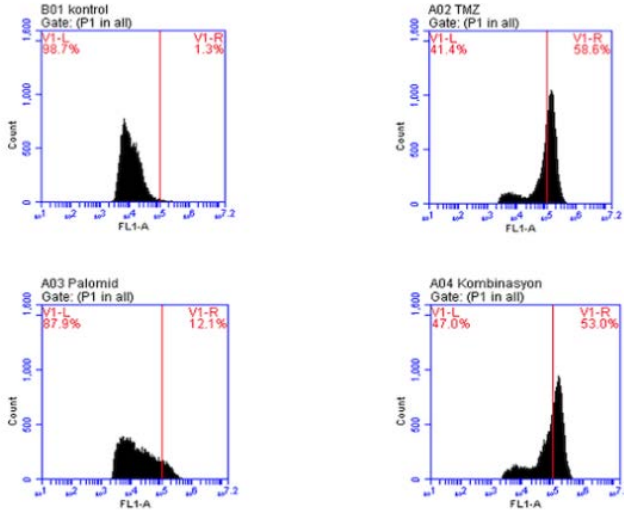
edilmiştir. Ayrıca bu grupta S fazında (%21,3) hafif bir yükseliş gözlenmesi, ilacın döngüsel progresyonu baskılayarak mitotik fazda duraklamaya neden olduğunu doğrulamaktadır. Tedavi modaliteleri arasında en dikkat çekici hücresel yanıt kombinasyon grubunda ortaya çıkmıştır. Bu grupta G0/G1 evresindeki hücre oranı %17,6'ya kadar düşerken, popülasyonun büyük bir kısmının (%63,6) G2/M fazında biriktiği görülmüştür. Elde edilen bu tablo, Temozolomid ve Palomid 529'un eş zamanlı kullanımının sinerjistik bir biçimde şiddetli bir G2/M arresti indüklediğini ve hücre proliferasyonunu tekil uygulamalara kıyasla çok daha başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak, her iki etken madde de hücre döngüsü akışını bozmakla birlikte, kombinasyon tedavisi ile mitotik blokaj ve antiproliferatif etki artırılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Hücre döngüsü analizleri grafikleri

Akım sitometri cihazıyla H2AX ekspresyonu ölçülerek DNA çift zincir kırıklarının incelendiği analizlerde, FL1-A sinyalindeki artış DNA hasarının derecesini, V1-R bölgesi ise

H2AX-pozitif hücre popülasyonunu göstermektedir (Şekil 5). Analiz sonucunda, kontrol grubunda (A01) H2AX-pozitif hücre oranı %1,3 olarak ölçülerek bazal DNA hasarının düşük seviyede olduğu saptanmıştır. Temozolomid (A02) maruziyeti sonrasında saptanan sağa kayma ve %58,6'lık H2AX-pozitif hücre oranı, ajanın DNA çift zincir kırıklarını belirgin bir biçimde uyardığını doğrulamıştır. Buna karşın, Palomid 529 (A03) uygulamasında ilgili oran %12,1'de kalarak, bu molekülün DNA hasarı indüklemeye yeteneğinin Temozolomid'e kıyasla daha zayıf olduğunu göstermiştir. Kombinasyon grubunda (A04) ise H2AX-pozitif hücre yüzdesi %53,0 olarak belirlenmiştir. Bu oranın Temozolomid'in tekil etkisine yakın (hatta kısmen altında) olması, ikili kullanımın DNA hasarı bağlamında beklenen additif veya sinerjistik artışı sağlamadığını ortaya koymaktadır. Özetle, Temozolomid bu hücre modelinde belirgin bir çift zincir kırığı profili çizerken, Palomid 529'un etkisi sınırlı kalmıştır. Bu bulgular aynı zamanda, ATM/ATR aracılı H2AX fosforilasyonunun DNA hasar değerlendirilmesinde güvenilir bir moleküler belirteç olduğunu teyit etmektedir.



Şekil 5. Çift zincir kırık analizi sonuçları

4. TARTIŞMA

T98G hücre hattında yürütülen bu çalışma, Temozolomid ve Palomid 529 kombinasyonunun antiproliferatif, hücre döngüsü ve DNA hasar modülasyonu üzerindeki etkilerini aydınlatmayı hedeflemiştir. Sonuçlar, ilaçların tekli veya birlikte uygulandığında farklı biyolojik yollara etki ettiğini ve anlamlı farmakodinamik etkileşimler doğurduğunu göstermektedir. İnkübasyon süresi uzadıkça (24, 48, 72 saat) Temozolomid'e ait IC_{50} değerlerinin 1182,69 μM 'den 735,23 μM 'ye inmesi, hücrelerin zamanla ilaca daha duyarlı hale geldiğini göstermektedir. Palomid 529 ise 127,93 μM ile 39,10 μM bandında seyreden çok düşük IC_{50} profiliyle, Temozolomid'den daha güçlü bir hücre çoğalması önleyici etkiye sahiptir. Bu durum ilacın PI3K/AKT/mTOR yolağını durdurarak hızlı bir sitostatik yanıt oluşturmaya bağlanabilir. Temozolomid ve Palomid 529'un 10:1 oranında verildiği kombinasyonda, Temozolomid'in ED_{50} değerinin 412,60 μM 'ye düşmesi ve doz azaltma indeksinin (DRI) 1,98 hesaplanması, etkinliğin iki katına çıkarıldığını doğrulamaktadır. Kombinasyon indeksinin ($CI=0,76$) 1'in altında hesaplanması, Temozolomid'in DNA hasar kapasitesi ile Palomid 529'un sinyal blokajı arasında ılımlı sinerjistik bir uyum olduğunu göstermektedir.

Bu sinerji hücre döngüsü profillerine de yansımıştır. Kontrol hücreleri yoğunlukla G0/G1'de bulunurken, Temozolomid ve Palomid 529 tedavileri, hücreleri G2/M'de durdurmuştur. Temozolomid kaynaklı %43,9'luk G2/M arresti, DNA hasarı sonrası G2 kontrol noktasının çalıştığını gösterirken Palomid 529 grubundaki %46,7'lik G2/M arresti, mTOR baskılanmasına bağlı mitotik duraklamayı temsil etmektedir. Kombinasyonda G2/M oranının %63,6'ya fırlaması ve G0/G1 evresinin %17,6'ya inmesi, her iki ilacın hücre döngüsü üzerinde sinerjik bir bariyer kurduğunu, hücrelerin proliferasyonunu bloke ettiğini göstermektedir.

Genotoksik etkiyi gösteren H2AX (pS139) değerlendirmesi, Temozolomid'in güçlü DNA parçalayıcı özelliğini (%58,6 pozitiflik) doğrulamış ve ATM/ATR yolağının aktifleştiğini göstermiştir. Palomid 529'un tek başına sadece %12,1 H2AX pozitifliği üretmesi, ilacın DNA lezyonlarından ziyade yolak inhibisyonu üzerinden çalıştığını teyit etmektedir. Kombinasyon uygulamasında ise H2AX oranının %53,0 olarak ölçülmesi (Temozolomid'in monoterapi değerinin hafifçe altında), ikili kullanımın ekstra bir DNA çift zincir kırığına yol açmadığını belirtmektedir. Ancak buna rağmen kombinasyon grubunda izlenen anlamlı hücre döngüsü arresti, ikili tedavinin asıl öldürücü gücünün DNA hasarını artırmasından değil, hücre döngüsü kontrol noktalarını eş zamanlı olarak çökertmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ

Çalışmanın genel sonuçları, Temozolomid ve Palomid 529 moleküllerinin glioblastoma tedavisinde farklı ancak birbirini tamamlayan yollarla hücresel yanıtlar oluşturduğu görülmektedir. Temozolomid, DNA'yı alkileyip çift sarmal kırıkları oluşturarak genotoksik stres üzerinden etki gösterirken; Palomid 529, PI3K/AKT/mTOR yolaklarını inhibe etmek suretiyle hücresel çoğalmayı durdurmaktadır. Söz konusu iki moleküler etkinin bir araya gelmesi, özellikle hücre döngüsünün G2/M geçişinde derin bir blokaj yaratarak hücre büyümesini anlamlı düzeyde engellemektedir. Buna karşın, DNA hasarı parametrelerinde sinerjistik bir tırmanışın kaydedilmemesi, ikili kombinasyonun öldürücü etkisinin genotoksisiteden çok proliferatif sinyallerin kesilmesinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Temozolomid ve Palomid 529'un birlikte kullanımı, T98G glioblastoma hücrelerinde ılımlı sinerjistik bir hücre çoğalmasını önleyici etki sağlamakta ve hücre döngüsü kontrol

mekanizmaları üzerinden umut verici bir antikanser aktivite ortaya koymaktadır. Mevcut veriler ışığında, Temozolomid bazlı kemoterapi rejimlerine mTOR inhibitörlerinin dahil edilmesi, glioblastoma yönetiminde potansiyel bir klinik avantaj sağlama kapasitesine sahiptir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 32879 numaralı proje kodu ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- Abe, H., Natsumeda, M., Kanemaru, Y., Watanabe, J., Tsukamoto, Y., Okada, M., et al. (2020). MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma cell lines. *Frontiers in Oncology*, 9, 1568.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003.
- Ito, M., Ohba, S., Gaensler, K., Ronen, S. M., Mukherjee, J., & Pieper, R. O. (2013). Early Chk1 phosphorylation is driven by temozolomide-induced, DNA double strand break- and mismatch repair-independent DNA damage. *PLOS ONE*, 8(5), e62351.
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210.
- National Cancer Institute. (n.d.). mTORC1/mTORC2 inhibitor Palomid 529. *NCI Drug Dictionary*.
- Pearson, J. R. D., & Regad, T. (2017). Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17040.
- Price, M., et al. (2025). CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2018–2022. *Neuro-Oncology*.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncology*, 10(5), 459-466.

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996.
- Weinberg, M. A., et al. (2016). RES-529: A PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitor that dissociates the mTORC1 and mTORC2 complexes. *Anti-Cancer Drugs*, 27(6), 475-487.
- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., et al. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18, 170-186.
- Xue, Q., Hopkins, B., Perruzzi, C., Udayakumar, D., Sherris, D., & Benjamin, L. E. (2008). Palomid 529, a novel small-molecule drug, is a TORC1/TORC2 inhibitor that reduces tumor growth, tumor angiogenesis, and vascular permeability. *Cancer Research*, 68(22), 9551-9557.
- Yi, G. Z., Huang, G., Guo, M., Zhang, X., Wang, H., Deng, S., et al. (2019). Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain*, 142(8), 2352-2371.

TRANSCRIPTIONAL MODULATION OF THE WNT/ β -CATENIN SIGNALING PATHWAY BY ORIGANUM ONITES L. ESSENTIAL OIL: A LINK TO EPIGENETIC REGULATION IN GASTRIC CANCER

Çığır BİRAY AVCI¹

Mert PEKERBAŞ²

Fatma SÖĞÜTLÜ³

Emine BAYRAM⁴

Muhsin Özgür ÇOĞULU⁵

1. INTRODUCTION

1.1. Origanum Onites L. and Cancer

Gastric cancer (GC) ranks fourth in cancer-related deaths worldwide according to GLOBOCAN 2020 data, and it is thought to be responsible for 800,000 deaths per year (Ilic & Ilic, 2022). With a better understanding of the molecular foundations of GC, research into agents targeting these molecular mechanisms has greatly advanced in recent years. In these studies, alongside synthetic molecules targeting key molecules or pathways in the

¹ Prof. Dr., Department of Medical Biology, Ege University, ORCID: 0000-0001-8251-4520.

² Dr., Izmir Biomedicine and Genome Center, ORCID: 0000-0003-0515-2858.

³ Dr., Department of Medical Biology, Ege University, ORCID: 0000-0002-1210-7660.

⁴ Prof. Dr., Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ege University, ORCID: 0000-0001-5856-2637.

⁵ Prof. Dr., Department of Pediatric Genetics, Ege University, ORCID: 0000-0002-9037-5599.

molecular mechanisms of GC, naturally occurring plant-based molecules are also a subject of research. Regarding these plant-based molecules, essential oils of species of *Origanum*, commonly known as oregano, are often highlighted in literature for their multiple biological effects and are seen as having considerable potential.

Origanum onites L., also known as “Turkish Oregano”, is a species of oregano part of the Lamiaceae family, which also includes *Origanum syriacum* L., *Origanum majorana* L., and *Origanum vulgare* L. It grows almost exclusively in the Mediterranean basin, primarily in Turkey, and extending to regions including Greece and Sicily (Vokou, Kokkini, & BessiÈRe, 1988). The essential oil extracted from the desiccated foliage of this species, commonly referred to as *Origanum onites* essential oil (OOEO), is frequently used for medicinal purposes, including for gastric complaints in traditional practices. This essential oil, containing volatile phytochemicals and characterized by a bitter taste, is commonly used by local people by adding a few drops to 200-300 ml of water. Carvacrol is the most concentrated volatile oil in its composition, and to date, a wide range of biological effects of OOEO and carvacrol, including antimicrobial (Sakkas & Papadopoulou, 2017), antiviral (Orhan et al., 2012), antioxidant (Kubiliene et al., 2023), neuroprotective (Aykac et al., 2022), and anti-hyperlipidemic (Özdemir et al., 2008) properties, have been demonstrated. However, studies on the anticancer effects of OOEO are limited in number.

In the first study demonstrating the anticancer property of OOEO, it was revealed that carvacrol, isolated from OOEO, inhibited DNA synthesis in mouse myoblast cells transformed by the human N-RAS oncogene (Zeytinoglu et al., 2003). In another study, it was shown that OOEO induces apoptosis in 5RP7 (c-H-ras transformed rat embryonic fibroblasts) cells, exhibiting an

anti-tumoral effect, and blocks tube formation in rat adipose tissue endothelial cells (RATECs) in vitro, indicating its anti-angiogenic properties (Bostancioğlu et al., 2012). Baranauskaite et al. reported that OOEO reduces cell survival in triple-negative breast cancer (MDA-MB231) cells, demonstrating its anticancer effect (Baranauskaite et al., 2017). The most comprehensive study demonstrating the anticancer properties of OOEO was published in 2019 by Spyridopoulou et al. This research evidenced the antiproliferative effects of OOEO on various cancer cells, including A375 (melanoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), HT-29 (colon cancer), and MCF7 (breast cancer), with the most significant effects observed in colon cancer cells (HT-29) (Spyridopoulou et al., 2019). In this study, apart from its antiproliferative effects, it has been revealed that OOEO attenuates cell migration in the colon cancer cell line (HT-29) and induces morphological changes associated with apoptosis. Moreover, oral administration of OOEO has inhibited the development of colon cancer in mice, and this experiment is the sole study demonstrating the in vivo anticancer effect of OOEO through oral administration.

In terms of GC, there is no study in the literature investigating the anticancer effects on OOEO on GC. In our previous research, we demonstrated that OOEO exhibits selective cytotoxic activity against gastric adenocarcinoma (AGS) cells, whereas the calculated IC₅₀ for baseline normal gastric epithelial (GES-1) cells were approximately 2.3 times higher (Sogutlu et al., 2025). OOEO treatment was found to induce apoptosis and cause DNA double-strand breaks, specifically increasing γ -H2AX phosphorylation 7.72-fold in cancer cells while sparing healthy cells. At the molecular level, OOEO treatment significantly reduced the promoter methylation of several tumor suppressor genes, including *LOX*, *TIMP3*, *CDH1*, and *RARB*. Additionally, the essential oil reorganized H3K9ac and

H3K27me3 modifications at gene promoters, which led to the activation of the *CDKN1A* tumor suppressor and the inhibition of the *MYC* oncogene. These findings suggest that OOEO can act as an anti-cancer agent by restoring the epigenetic balance in gastric cancer. This study is pointing out that OOEO may have anticancer effects in intestinal-type GC, which shares similar initiating molecular pathways with intestinal-type colon cancer such as Wnt/ β -catenin signaling pathway.

1.2 Wnt/ β -catenin and Gastric Cancer

The evolutionary conserved Wnt signaling pathway plays a critical role in regulating embryonic development as well as in maintaining the homeostasis of adult tissues. This pathway is essential for key cellular functions like cell proliferation, differentiation, migration, and the maintenance of stem cell characteristics. Due to its significant role in managing the balance and rejuvenation of the epithelial cells in the gastrointestinal system, alterations in this pathway's activation, which can be either hypo- or hyperactivation, can serve as an initiating incident in numerous solid tumors such as colorectal cancer, gastric cancer, breast and prostate cancer (Koushyar et al., 2020). Specifically, in 46% of GC, dysregulations related to the Wnt/ β -catenin pathway are observed. These findings suggest that aberrations within the Wnt/ β -catenin signaling cascade drive the molecular pathogenesis of GC, reflecting the well-established oncogenic mechanisms seen in colorectal malignancies.

The canonical Wnt/ β -catenin axis contains numerous regulatory proteins and promotes the subsequent nuclear localization of β -catenin, through various cascades. This, in turn, leads to the activation of target genes via T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (*TCF/LEF*) transcription factors (Liu et al., 2022). The deactivation of this pathway occurs through a destruction complex composed of AXIN, adenomatous polyposis

coli (APC), glycogen synthase 3 (GSK3 α/β), and casein kinase 1 α (CK1 α), which specifically targets β -catenin. The transcriptional dysregulation of various molecules in this pathway has been observed in GC and is being investigated as potential treatment targets (Koushyar et al., 2020). In our study, we investigated whether OOEO induces alterations in the transcriptional levels of molecules located in the Wnt/ β -catenin axis and downstream of this pathway in both GC cells (AGS) and healthy gastric epithelial cells (GES-1).

2. MATERIAL & METHODS

In this study, we utilized the IC₅₀ values obtained from our previous research (Sogutlu et al., 2025) to test whether OOEO altered the expression of genes involved in the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer cells and healthy gastric epithelial cells (23.5 μ g/ml for the gastric adenocarcinoma cell line (AGS) and 41.3 μ g/ml for the healthy gastric epithelial cell line (GES-1). 48 hours after applying these doses to the cells, we performed total RNA isolation (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany). Then, we converted the isolated RNAs into cDNA using reverse transcriptase enzyme (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™). We designed primer pairs for 84 different genes located in the Wnt/ β -catenin signaling pathway and used G6PD for housekeeping gene. We performed RT-PCR analysis using SYBR green and analyzed the results using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

3. RESULTS

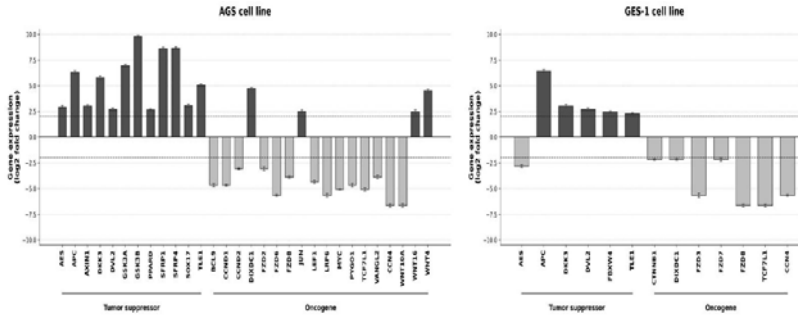


Fig. 1. Differential expression of Wnt/β-catenin pathway genes in AGS and GES-1 cells treated with OOEO.

In the 84 different genes within the Wnt/β-catenin pathway, we identified significant expression changes in 25 genes in the AGS cell line and 12 genes in the GES-1 cell line ($P < 0.05$) (Figure 1). Gene expression levels were determined by RT-PCR 48 hours after treatment with OOEO at IC_{50} doses (23.5 $\mu\text{g/ml}$ for AGS and 41.3 $\mu\text{g/ml}$ for GES-1). Results are expressed as log2 fold changes relative to untreated control groups. The red dashed lines represent the threshold for significant upregulation (+2) or downregulation (-2), corresponding to a 4-fold change. In the AGS gastric cancer cell line (left), OOEO induced a clear shift toward tumor suppression by upregulating inhibitory components (e.g., *APC*, *GSK3B*, *SRP1*) and downregulating key oncogenic effectors (e.g., *MYC*, *CCND1*, *LRP6*). In the healthy GES-1 cell line (right), the transcriptional response was more limited, with significant changes primarily observed in the downregulation of specific oncogenes. All experimental data are expressed as the mean values accompanied by their respective standard deviations ($\pm$ SD), derived from a minimum of three separate and independent replications, where a p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

We observed that the significant fold changes caused by OOEO were much more dramatic in gastric cancer cells (AGS).

Among the 13 genes with increased expression in AGS cells, 10 were tumor suppressor genes (*AES*, *APC*, *AXIN1*, *DKK3*, *GSK3A*, *GSK3B*, *SFRP1*, *SFRP4*, *SOX17* and *TLE1*) while 3 (*PPARD*, *DIXDC1* and *JUN*) were oncogenes. The 12 genes with decreased expression (*BCL9*, *CCND1*, *CCND2*, *FZD2*, *FZD6*, *FZD8*, *LEF1*, *LRP6*, *MYC*, *PYGO1*, *TCF7L1* and *VANGL2*) were identified as oncogenes, all being activators and effectors in the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

In the GES-1 cell line, representing healthy gastric epithelium, we observed that the effect of OOEO on the genes expression we examined was more limited. While the expression of 4 tumor suppressor genes (*APC*, *DKK3*, *FBXW4* and *TLE1*) involved in the inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway increased, only the expression of the *AES* gene decreased. Similar to the AGS cell line, all genes with decreased expression in GES-1 cells (*CTNNB1*, *DIXDC1*, *FZD3*, *FZD7*, *FZD8*, *TCF7L1* and *CCN4*) were identified as oncogenes within the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Interestingly, OOEO increased the expression of *AES* (*TLE5*), a gene from the Tle family that regulates the repression of WNT target genes (Brantjes et al., 2001), in AGS cells while decreasing it in GES-1 cells. Similarly, OOEO increased the expression of the *DIXDC1* oncogene, a positive cytoplasmic transducer in the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Martin et al., 2018), in AGS cells while decreasing it in GES-1 cells. Expression of tumor suppressor genes *APC*, *DKK3* and *TLE1* increased upon OOEO treatment in both cell lines. Additionally, expression levels of oncogenes *FZD8* and *TCF7L1* decreased in both cell lines.

4. DISCUSSION

The Wnt/ β -catenin cascade fundamentally regulates diverse cellular mechanisms, particularly driving tumor cell proliferation in cancer, primarily through its target genes. It is also activated or inhibited by effector genes of other pathways. In summary, the binding of Wnt protein to the Frizzled/LRP5-6 receptor can be described as the canonical pathway, which involves the cytoplasmic β -catenin protein complex transporting to the nucleus, binding to TCF/LEF transcription factors, and increasing the target genes expression such as cyclin D1 (*CCND1*), c-Myc (*MYC*), c-Jun (*JUN*), and PPAR δ (*PPARD*). Key tumor suppressor genes like APC and GSK3 α/β are responsible for the continuous degradation of the β -catenin protein complex in the cytosol, and the loss of function or expression of these genes is commonly observed in various cancers, including GC. Our study examined the expression of 84 genes that play roles as positive/negative modifiers or target genes in the Wnt/ β -catenin pathway, observing significant findings in both AGS and GES-1 cell lines.

4.1. OOEO Inhibits the Expressions of Oncogenes

The Frizzled gene family codes for transmembrane proteins that initiate the Wnt/ β -catenin signaling pathway, with 10 different members in humans (Ueno et al., 2013). FZD8 is a member of this transmembrane protein complex and, like other FZD proteins, its upregulation in cancer has been previously demonstrated, and it is transcriptionally repressed by wild-type p53 (Li et al., 2017a). Additionally, FZD8's association with poor prognosis in gastric cancer (GC) and its role in triggering invasion have been reported (Li et al., 2017b). In our study, *FZD8* expression was downregulated in both cell lines, and considering FZD8's central role in the Wnt signaling pathway, the potential

anticancer effect of OOEO in GC might be enhanced by its suppression of FZD8.

TCF/LEF enables the activation of target genes after the β -catenin protein complex enters the nucleus, with TCF7L1 being a member of this family. The β -catenin-TCF7L1 complex in the nucleus upregulates the transcription of many cancer-related genes (Yuan et al., 2019). More importantly, TCF7L1 has been reported to inhibit the Keap1 molecule, enhance NRF2 expression, and contribute to uncontrolled proliferation and poor prognosis in gastric cancer (GC) (Zhang et al., 2019). Therefore, the suppression of TCF7L1 by OOEO in both cell lines seems to be a significant anticancer effect of OOEO in GC.

One of the intriguing findings of our study is the change in *DIXDC1* expression. *DIXDC1* (Dishevelled-Axin domain containing 1) acts as an upstream stimulator of Wnt signaling, exerting its effect by binding to Dishevelled Segment Polarity Protein 2 (DVL2). This polymerization also stabilizes VEGFR2 protein, contributing to cancer angiogenesis (Kim et al., 2022). Furthermore, Wang et al. have indicated that upregulated *DIXDC1* is associated with advanced lymph node metastasis, TNM stages, and poor prognosis in GC, and have mentioned the involvement of E-cadherin in this process (Wang et al., 2015). In our study, OOEO application downregulated the *DIXDC1* gene in healthy gastric epithelium (GES-1) while upregulating it in AGS cells. This disparity suggests that it may be due to the disrupted balance of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer cells.

Our study has revealed controversial results in the *JUN* and *PPARD* genes following OOEO application. While the expression of these two oncogenes increased in AGS cells, there was no significant change in GES-1 cells. These genes are target transcription factors activated by the Wnt/ β -catenin signaling

pathway in the nucleus, encoding c-Jun and PPAR δ proteins. However, despite being a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, active JNK1, which codes for c-Jun-N-terminal kinase (JNK) 1 protein, increases glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) activity, suppressing β -catenin expression and reducing β -catenin-mediated transcriptional activity (Hu et al., 2008). Therefore, it's unclear whether the increase in expression mediated by OOEO has a carcinogenic or anticancer effect via JUN. Correspondingly to the literature, an increase in GSK3 β expression level has also been observed in the AGS cell line in our study. On the other hand, PPAR δ is known to interact with the Hippo Coactivator YAP1, enhancing SOX9 expression and contributing to GC progression (Song et al., 2020). Thus, the stimulatory effect of OOEO on PPAR δ expression in cancer cells has been considered a potential carcinogenic effect caused by OOEO.

One of the most significant findings of our study was observed in c-Myc, a key transcription factor in cell proliferation and a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Following OOEO application, a significant decrease in the expression level of *MYC*, one of the most critical oncogenes, was observed in cancer cells, while this change was not noted in healthy gastric epithelial cells. Considering the central role of c-Myc in the pathogenesis of GC, as in many other cancers, the suppression induced by OOEO in the cancer cells' aberrant Wnt/ β -catenin signaling pathway on this key target gene is considered one of the most important potential anticancer effects identified in this study.

We also observed a decrease in the expression of oncogenes *BCL9*, *CCND1*, *CCND2*, *FZD2*, *FZD6*, *FZD8*, *LEF1*, *LRP6*, *PYGO1*, and *VANGL2* in the AGS cell line, while a decrease in the expression of oncogenes *CTNNB1*, *FZD3*, *FZD7*, and *CCN4* was seen only in the GES-1 cell line. Considering all

the data together, the fact that most of the changes in the oncogenes we examined were in favor of downregulation supports the potential anticancer property of OOEO in GC.

4.2. OOEO Activates the Tumor Suppressor Genes

APC protein, one of the most important regulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, plays a role as a scaffold in the destruction complex that degrades cytoplasmic β -catenin (Parker & Neufeld, 2020). In our study, we found that the expression of the APC gene increased in both AGS and GES-1 cell lines following OOEO application. This increase suggests that OOEO might have an anticancer potential through its effects on both the Wnt signaling pathway and the non-canonical effects of APC. Considering the key role of APC in various types of cancer, particularly colorectal cancer, one of the most significant findings of our study is the effect of OOEO on APC gene expression.

DKK3, a member of the human Dickkopf family, is a secreted glycoprotein and, despite contradictory studies, is considered an inhibitor of the Wnt signaling pathway. Although it does not bind to LRP6 or Kremen-2 co-receptors on the cell membrane like other DKK proteins, it is known to inhibit the Wnt signaling pathway by preventing the translocation of cytoplasmic β -catenin to the nucleus, thus exhibiting tumor suppressor effects (Mourtada et al., 2024). In our study, an increase in *DKK3* gene expression was observed in both AGS and GES-1 cell lines following OOEO application. Considering the controversial and ambiguous nature of DKK3's effect on the Wnt signaling pathway, further functional studies are needed to clarify whether OOEO's effect on DKK3 has anticancer properties.

Following the application of OOEO, *TLE1* was the third gene observed to have increased expression in both cell lines. In the Wnt signaling pathway, once the β -catenin complex enters the nucleus, it binds to TCF/LEF transcription factors and enhances

the transcription of target genes. TLE1 is among the transducing-like enhancers of split (TLE) proteins that degrade these transcription factors in the absence of a Wnt signal (Ramakrishnan et al., 2018). In the presence of Wnt, it is ubiquitinated and deactivated by UBR5, a HECT E3 Ubiquitin Ligase (Flack et al., 2017). Consequently, although its effect is only in the absence of Wnt, TLE1 can be considered a tumor suppressor gene as it continuously inhibits the TCF/LEF complex that enhances the transcription of target genes in the nucleus of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. OOEO has increased the expression of this gene in both cell lines, suggesting its anticancer potential both through the Wnt signaling pathway and via the Wnt independent general inhibition of TCF/LEF.

The application of OOEO in AGS cells also increased the gene expressions of important inhibitors of the Wnt/ β -catenin cascade, such as AES/TLE1, Axin1, GSK3 α , GSK3 β , sFRP1, sFRP2, and Sox17. However, these effects were not observed in the GES-1 cell line. This observation suggests that the molecular-level impact of OOEO on the expression of these genes may be dependent on other changes occurring in cancer cells, while still indicating OOEO's potential as an anticancer agent.

5. CONCLUSION

This study demonstrates that *Origanum onites* L. essential oil (OOEO) effectively suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer cells. The treatment led to a significant increase in the expression of tumor suppressors that promote β -catenin degradation, such as *APC* and *GSK3B*. At the same time, it decreased the expression of critical oncogenic target genes like *MYC* and *CCND1*, which are essential for cancer cell proliferation. The fact that these inhibitory effects were more extensive and dramatic in AGS cancer cells compared to normal

GES-1 cells suggests that OOEO may offer a selective therapeutic advantage. These findings, combined with our previous data on epigenetic restoration, provide a possible explanation of how OOEO causes its anticancer effects. Future in vivo studies are necessary to confirm these molecular changes in a clinical context and to evaluate OOEO as a preventive agent for gastric cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Ege University Office of Scientific Research Projects with project number 23451.

REFERENCES

- Aykac, A., Teralı, K., Özbeyli, D., Ede, S., Albayrak, Ö., Başer, K. H. C., & Şener, G. (2022). A multi-parameter evaluation of the neuroprotective and cognitive-enhancing effects of *Origanum onites* L. (Turkish oregano) essential oil on scopolamine-induced amnestic rats. *Metabolic Brain Disease*, 37(4), 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/S11011-022-00933-6>
- Baranauskaite, J., Kubiliene, A., Marksa, M., Petrikaite, V., Vitkevičius, K., Baranauskas, A., & Bernatoniene, J. (2017). The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1681392>
- Bostancıoğlu, R. B., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C., & Koparal, A. T. (2012). Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2002–2008. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.03.074>
- Brantjes, H., Roose, J., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Research*, 29(7), 1410–1419. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.7.1410>
- Flack, J. E., Mieszczanek, J., Novcic, N., & Bienz, M. (2017). Wnt-dependent inactivation of the Groucho/TLE co-repressor by the HECT E3 ubiquitin ligase Hyd/UBR5. *Molecular Cell*, 67(2), 181. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.06.009>

- Hu, D., Fang, W., Han, A., Gallagher, L., Davis, R. J., Xiong, B., & Yang, W. (2008). c-Jun N-terminal kinase 1 interacts with and negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling through GSK3 β pathway. *Carcinogenesis*, 29(12), 2317–2324. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGN239>
- Ilic, M., & Ilic, I. (2022). Epidemiology of stomach cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 28(12), 1187–1203. <https://doi.org/10.3748/WJG.V28.I12.1187>
- Kim, Y., Kim, D. Y., Zhang, H., Bae, C. R., Seong, D., Kim, Y., ... Kwon, Y. G. (2022). DIX domain containing 1 (DIXDC1) modulates VEGFR2 level in vasculatures to regulate embryonic and postnatal retina angiogenesis. *BMC Biology*, 20(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12915-022-01240-3/FIGURES/7>
- Koushyar, S., Powell, A. G., Vincan, E., & Phesse, T. J. (2020). Targeting Wnt signaling for the treatment of gastric cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS21113927>
- Kubiliene, A., Munius, E., Songailaite, G., Kokyte, I., Baranauskaite, J., Liekis, A., & Sadauskiene, I. (2023). A comparative evaluation of antioxidant activity of extract and essential oil of *Origanum onites* L. in vivo. *Molecules*, 28(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28145302>
- Li, Q., Ye, L., Xin, Z., Wang, M., Lin, C., Huang, S., ... Peng, X. (2017a). FZD8, a target of p53, promotes bone metastasis in prostate cancer by activating canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Letters*, 402, 166–176. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.05.029>
- Li, Q., Ye, L., Xin, Z., Wang, M., Lin, C., Huang, S., ... Peng, X. (2017b). FZD8, a target of p53, promotes bone metastasis

- in prostate cancer by activating canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Letters*, 402, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.029>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., ... Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00762-6>
- Martin, P. M., Stanley, R. E., Ross, A. P., Freitas, A. E., Moyer, C. E., Brumback, A. C., ... Cheyette, B. N. R. (2018). DIXDC1 contributes to psychiatric susceptibility by regulating dendritic spine and glutamatergic synapse density via GSK3 and Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 467–475. <https://doi.org/10.1038/MP.2016.184>
- Mourtada, J., Thibaudeau, C., Wasylyk, B., & Jung, A. C. (2024). The multifaceted role of human Dickkopf-3 (DKK-3) in development, immune modulation and cancer. *Cells*, 13(1), 75. <https://doi.org/10.3390/CELLS13010075>
- Orhan, I. E., Özçelik, B., Kartal, M., & Kan, Y. (2012). Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology*, 36(2), 239–246. <https://doi.org/10.3906/biy-0912-30>
- Özdemir, B., Ekbul, A., Topal, N. B., Sarandöl, E., Sağ, S., Başer, K. H. C., ... Aydınlar, A. (2008). Effects of Origanum onites on endothelial function and serum biochemical markers in hyperlipidaemic patients. *Journal of International Medical Research*, 36(6), 1326–1334. <https://doi.org/10.1177/147323000803600621>

- Parker, T. W., & Neufeld, K. L. (2020). APC controls Wnt-induced β -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59899-z>
- Ramakrishnan, A. B., Sinha, A., Fan, V. B., & Cadigan, K. M. (2018). The Wnt transcriptional switch: TLE removal or inactivation? *BioEssays*, 40(1). <https://doi.org/10.1002/BIES.201700162>
- Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/JMB.1608.08024>
- Sogutlu, F., Pekerbas, M., Boztas, G., Bayram, E., Pariltay, E., Cogulu, O., & Biray Avci, C. (2025). The anticancer potential of *Origanum onites* L. in gastric cancer through epigenetic alterations. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25. <https://doi.org/10.1186/S12906-025-04942-7>
- Song, S., Wang, Z., Li, Y., Ma, L., Jin, J., Scott, A. W., ... Ajani, J. A. (n.d.). PPAR δ interacts with the Hippo coactivator YAP1 to promote SOX9 expression and gastric cancer progression. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0895>
- Spyridopoulou, K., Fitsiou, E., Bouloukosta, E., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Oreopoulou, A., ... Chlichlia, K. (2019). Extraction, chemical composition, and anticancer potential of *Origanum onites* L. essential oil. *Molecules*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24142612>
- Ueno, K., Hirata, H., Hinoda, Y., & Dahiya, R. (2013). Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt signaling in

- cancer. *International Journal of Cancer*, 132(8), 1731–1740. <https://doi.org/10.1002/IJC.27746>
- Vokou, D., Kokkini, S., & BessiÈRe, J. M. (1988). *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economic Botany*, 42(3), 407–412. <https://doi.org/10.1007/BF02860163/METRICS>
- Wang, L., Tan, C., Qiao, F., Wang, W., Jiang, X., Lian, P., ... Sheng, W. (2015). Upregulated expression of DIXDC1 in intestinal-type gastric carcinoma: Co-localization with β -catenin and correlation with poor prognosis. *Cancer Cell International*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12935-015-0273-2/FIGURES/4>
- Yuan, Y. H., Zhou, J., Zhang, Y., Xu, M. D., Wu, J., Li, W., ... Li, D. M. (2019). Identification of key genes and pathways downstream of the β -catenin-TCF7L1 complex in pancreatic cancer cells using bioinformatics analysis. *Oncology Letters*, 18(2), 1117–1132. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10444/HTML>
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., & Baser, K. H. C. (2003). Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10(4), 292–299. <https://doi.org/10.1078/094471103322004785>
- Zhang, B., Wu, J., Cai, Y., Luo, M., Wang, B., & Gu, Y. (2019). TCF7L1 indicates prognosis and promotes proliferation through activation of Keap1/NRF2 in gastric cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51(4), 375. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMZ015>

TIBBİ BİYOLOJİDE DOĞAL BİLEŞİKLERİN ROLÜ VE İLAÇ GELİŞİMİNE KATKILARI

Muazzez DERYA-ANDEDEN¹

1. GİRİŞ

Antik uygarlıkların bitkilerin, minerallerin ve hayvansal kaynaklı maddelerin tedavi edici özelliklerini keşfetmesinden bu yana doğal ürünler insan tıbbının temel kaynaklarından biri olmuştur. Günümüzde sentetik kimya ve rasyonel ilaç tasarımıındaki gelişmelere rağmen doğal ürünler, klinik olarak kullanılan ilaçların önemli bir bölümüne katkı sağlamaya ve yeni sentetik analoglar için ilham kaynağı olmaya devam etmektedir (Skalicka-Woźniak, 2021).

Doğal bileşiklerin değeri, yalnızca doğrudan terapötik kullanımlarından değil, aynı zamanda evrimsel süreçte şekillenmiş özgün kimyasal yapılarından ve biyolojik aktivitelerinden kaynaklanır. Bu moleküller; enzimler, reseptörler, mikrobiyal hedefler ve hücrel sinyal yolları üzerinde güçlü ve seçici etkiler gösterebilir (Rodrigues vd., 2016; Koehn vd., 2005).

İlaç dirençli patojenlerin artışı, kanser, diyabet ve kronik inflamatuvar hastalıkların yaygınlaşması, daha etkili ve hedefli tedavilere duyulan ihtiyacı artırmıştır. Antibiyotiklerden antikanser ajanlara kadar birçok doğal ürün, bu klinik gereksinimlere yanıt verebilme kapasitesini göstermiştir (Moloney, 2016). Bu bölümde doğal bileşiklerin tarihsel gelişimi, kaynaklarına göre sınıflandırılması, temel etki mekanizmaları,

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0003-4390-5769.

ilaç geliştirme sürecindeki rolleri, başarılı örnekleri ve gelecekteki yönelimleri özetlenmektedir.

2. TARİHSEL ARKA PLAN

2.1. Çağlar Boyu Bitki Türevli İlaçlar

Bitkisel kaynaklı ilaçların kullanımı insanlık tarihinin en eski sağlık uygulamalarından biridir. Eski uygarlıklar, farklı coğrafyalarda çok sayıda bitki türünün ağrı, ateş, enfeksiyon ve inflamasyon gibi durumlarda kullanılabileceğini gözlemlemiştir. Geleneksel bitkisel ilaçlardan modern farmasötiklere geçiş ise 19. yüzyılda aktif bileşiklerin izole edilmesiyle başlamış ve tedavi edici etkinin belirli moleküllerle ilişkilendirilmesini sağlamıştır.

20. yüzyılda sistematik tarama programları, bitki kaynaklı birçok klinik açıdan önemli bileşiğin tanımlanmasına yol açmıştır. Bitki kökenli doğal ürünler ve analogları, günümüzde kullanılan ilaçların önemli bir bölümünü oluşturmakta; bu durum bitki ikincil metabolitlerinin kimyasal çeşitliliğini ve biyolojik aktivite açısından evrimsel olarak optimize edilmiş yapılarını yansıtmaktadır (Atanasov vd., 2015).

2.2. Geleneksel Tıp Sistemleri

Geleneksel tıp sistemleri, doğal ürünlerin terapötik özelliklerine ilişkin uzun süreli gözlem ve deneyim birikimini temsil eder. Geleneksel Çin Tıbbı, Ayurveda ve benzeri sistemler, modern ilaç keşfi için değerli ipuçları sağlamış; farklı bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı maddelerin kullanımını sistematik bir bilgi alanı haline getirmiştir.

Geleneksel Çin Tıbbı'ndan türetilen en bilinen örneklerden biri, *Artemisia annua*'dan elde edilen artemisininidir. Benzer şekilde Ayurveda da çok bileşenli bitkisel formülasyonları ve sinerjik tedavi yaklaşımlarıyla modern farmakolojiye katkı sağlamıştır (Shu, 1998; Patwardhan, 2007).

2.3. Etnofarmakolojinin Yükselişi

Etnofarmakoloji, geleneksel tıp bilgisini modern ilaç keşfine dönüştürmek için antropoloji, botanik, kimya, farmakoloji ve tıbbi bir araya getiren disiplinlerarası bir alandır. Bu yaklaşım, özellikle araştırılacak türlerin ve kullanılacak bitki kısımlarının seçilmesinde rastgele taramaya göre daha verimli bir yol sunar (Patwardhan, 2007).

Geleneksel kullanım; biyolojik aktivite, güvenilirlik ve uygun hazırlama biçimleri hakkında ön bilgi sağlayabilir. Ancak geleneksel bilginin etik kullanımı, fayda paylaşımı ve yerel toplulukların katkısının tanınması önemlidir. Bu nedenle çağdaş etnofarmakolojik araştırmalar, bilimsel doğrulama ile etik iş birliğini birlikte ele almalıdır (Atanasov vd., 2015; Nasim vd., 2022; Chaachouay ve Zidane, 2024).

3. DOĞAL BİLEŞİKLERİN SINIFLANDIRILMASI

3.1. Bitki Bazlı Doğal Ürünler

Bitkiler, alkaloidler, terpenoidler, fenolik bileşikler ve glikozitler gibi çok çeşitli ikincil metabolitler üretir. Bu bileşikler bitkilerde savunma, çevresel streslere uyum ve ekolojik etkileşimlerde rol oynarken, insan tıbbında güçlü biyolojik etkileri nedeniyle ilaç geliştirme açısından önemli kaynaklar oluşturur (Chaachouay ve Zidane, 2024).

Alkaloidler genellikle azot içeren ve reseptörler ya da enzimlerle etkileşerek güçlü farmakolojik etkiler oluşturan bileşiklerdir. Morfin, kodein, vinkristin, vinblastin ve kinin bu gruba örnek verilebilir. Terpenoidler ise paklitaksel, artemisinin ve forskolin gibi antikanser, antimikrobiyal veya antiinflamatuvar etkili molekülleri içerir (Atanasov vd., 2015; Shu, 1998).

Fenolik bileşikler; flavonoidler, tanenler, lignanlar ve stilbenoidleri kapsar. Salisilik asit, resveratrol, kurkumin ve yeşil çay kateşinleri gibi örnekler antioksidan, antiinflamatuvar ve potansiyel antikanser etkileriyle dikkat çekmektedir. Bu çeşitlilik, bitki kaynaklı bileşiklerin ilaç keşfindeki sürekliliğini açıklamaktadır (Nasim vd., 2022).

3.2. Deniz Kaynaklı Bileşikler

Deniz ortamları; süngerler, mercanlar, yumuşakçalar, tulumlular, algler ve deniz mikroorganizmaları aracılığıyla özgün kimyasal yapılar sahip doğal ürünler sunar. Yüksek tuzluluk, basınç değişimleri ve sınırlı ışık gibi koşullar, karasal organizmalardan farklı savunma ve sinyal moleküllerinin evrimleşmesine katkıda bulunmuştur (Santos vd., 2020).

Deniz kaynaklı bileşiklerde halojenli yapılar, alışılmadık amino asitler ve karmaşık polieter iskeletleri sıklıkla görülür. Squalamine gibi bileşikler antimikrobiyal ve anti-anjiyojenik özellikler göstererek kanser ve enfeksiyon hastalıkları için potansiyel adaylar sunmaktadır. Bu nedenle denizel biyoçeşitlilik, ilaç geliştirme açısından hâlen büyük ölçüde keşfedilmemiş bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (Cragg vd., 2002).

3.3. Mikrobiyal Türetilmiş Doğal Ürünler

Mikroorganizmalar, özellikle bakteriler ve mantarlar, antibiyotikler, immünosupresanlar ve metabolik düzenleyiciler açısından en üretken doğal ürün kaynakları arasındadır. Fleming'in *Penicillium notatum*'dan penisilini keşfi, mikrobiyal doğal ürünlerin modern tıptaki önemini ortaya koymuş ve antibiyotik çağını başlatmıştır (Demain, 2014).

Aktinomisetler, özellikle *Streptomyces* türleri, streptomisin, tetrasiklinler, eritromisin ve çok sayıda başka antibiyotik dahil olmak üzere çok geniş bir biyoaktif bileşik

repertuarı üretmiştir. Mantarlardan elde edilen penisilinler, sefalosporinler, statinler ve siklosporin gibi örnekler de mikrobiyal kaynakların klinik etkisini göstermektedir (Almeida vd., 2025; Shu, 1998).

3.4. Hayvan Kaynaklı Bileşikler

Hayvan kaynaklı doğal ürünler, bitki ve mikrobiyal kaynaklara göre daha sınırlı incelenmiş olsa da zehirler, toksinler, peptitler ve hormonlar yoluyla ilaç geliştirme için önemli öncüler sağlamaktadır. Bu bileşikler çoğu zaman belirli reseptörler, iyon kanalları veya enzimler üzerinde yüksek özgüllük gösterir (Cragg vd., 2002).

Yılan, örümcek, akrep ve koni salyangozu zehirleri biyoaktif peptitler açısından zengindir. Kaptoprilin Bothrops jararaca zehirinden esinlenerek geliştirilmesi ve ziconotide'in Conus magus zehirinden türetilmesi, hayvan kaynaklı bileşiklerin terapötik potansiyelini göstermektedir. Deniz hayvanlarından elde edilen squalamine ve psödopterosin gibi bileşikler de antimikrobiyal, anti-anjiyojenik, antiinflamatuvar ve analjezik etkiler açısından dikkat çekmektedir (Shu, 1998; Ahmad vd., 2025).

4. TIBBİ BİYOLOJİDE ETKİ MEKANİZMALARI

4.1. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu, doğal bileşiklerin terapötik etkilerini gösterdiği başlıca mekanizmalardan biridir. Doğal ürünler, rakip organizmalardaki metabolik süreçleri baskılamak üzere evrimleşmiş olabilir ve bu özgüllük insan hastalıklarında da terapötik avantaja dönüştürülebilir (Rodrigues vd., 2016).

Statinler, HMG-CoA redüktazı inhibe ederek kolesterol biyosentezini azaltır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde büyük klinik başarı sağlamıştır. Akarboz ise

bağırsak α -glukozidaz enzimlerini inhibe ederek karbonhidrat emilimini yavaşlatır ve tip 2 diyabet yönetiminde kullanılır (Shu, 1998).

4.2. Reseptör Modülasyonu

Doğal bileşikler, reseptörleri aktive eden agonistler veya onları bloke eden antagonistler olarak hücresel sinyal yollarını düzenleyebilir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı birçok molekülün endojen sinyal bileşiklerini taklit etmesi, bu reseptör modüle edici etkilerin temelini oluşturur (Koehn vd., 2005).

Morfin ve ilişkili opioid alkaloidler, merkezi sinir sistemindeki opioid reseptörlerine bağlanarak endojen opioid peptitlerini taklit eder ve güçlü analjezik etki oluşturur. Morfinin etki mekanizmasının aydınlatılması, endojen opioid sisteminin anlaşılmasına ve yeni analjeziklerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Atanasov vd., 2015).

4.3. Antimikrobiyal Aktivite

Doğal ürünlerin antimikrobiyal etkileri; hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, protein sentezinin baskılanması, membran bütünlüğünün bozulması ve nükleik asit metabolizmasının hedeflenmesi gibi farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilir. Bu çeşitlilik, doğal ürünleri özellikle dirençli patojenlerle mücadelede değerli kılmaktadır (Moloney, 2016).

β -laktam antibiyotikler, penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak bakteriyel peptidoglikan çapraz bağlanmasını engeller. Memeli hücrelerinde hücre duvarı bulunmaması, bu bileşiklere seçici toksisite kazandırır. Direnç sorununa rağmen β -laktamlar klinikte en yaygın kullanılan antimikrobiyal ajanlar arasında yer almayı sürdürmektedir (Demain, 2009).

4.4. Kanser Önleyici Mekanizmalar

Doğal ürünler, kanser hücrelerinde mitoz, DNA bütünlüğü, hücre döngüsü ve apoptoz gibi temel süreçleri

hedefleyerek antikanser etki gösterebilir. 1960'tan bu yana onaylanan birçok antikanser ilacın doğal ürünlerden türetilmiş veya onlardan esinlenmiş olması, bu kaynakların onkolojideki önemini ortaya koymaktadır (Cragg vd., 2002).

Paklitaksel mikrotübülleri stabilize ederek, vinkristin ise mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek mitotik süreci bozar. Doksorubisin ve daunorubisin gibi antrasiklinler ise DNA ile etkileşerek topoizomera II aktivitesini etkiler. Bu örnekler, doğal ürünlerin kanser tedavisinde farklı moleküler hedefler üzerinden etkili olabildiğini göstermektedir (Atanasov vd., 2015).

4.5. Anti-İnflamatuvar Yollar

Doğal ürünler, inflamasyonla ilişkili enzimleri, transkripsiyon faktörlerini ve sitokin yollarını modüle ederek antiinflamatuvar etki gösterebilir. Aspirin, salisilik asitten esinlenen klasik bir örnek olup siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek prostaglandin ve tromboksan sentezini azaltır.

Kurkumin NF- κ B başta olmak üzere birçok inflamatuvar sinyal yolunu etkilerken, resveratrol NF- κ B inhibisyonu, sitokin modülasyonu ve sirtuin aktivasyonu yoluyla çok yönlü etki gösterebilir. Bu bileşikler, doğal ürünlerin tek bir hedef yerine birden fazla biyolojik yolu birlikte düzenleyebileceğini göstermektedir (Chaachouay vd., 2024).

5. DOĞAL ÜRÜNLER İÇİN İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİ

5.1. Etnofarmakolojiden İlaç Keşfine Geçiş

Doğal ürünlerde ilaç geliştirme süreci, çoğu zaman etnofarmakolojik bilgi veya sistematik tarama programlarıyla başlar. Geleneksel kullanım, biyolojik aktivite ve güvenlik açısından ön ipuçları sağladığından, klinik olarak yararlı bileşiklerin keşfedilme olasılığını artırabilir (Patwardhan, 2007).

Biyoanaliz kılavuzluğunda fraksiyonlama, ham ekstraktların biyolojik aktiviteye göre ayrıştırılması ve aktif bileşiklerin izole edilmesi esasına dayanır. Yüksek verimli tarama ise çok sayıda doğal ürün örneğinin farklı biyolojik hedeflere karşı hızlı test edilmesini sağlar; ancak ham ekstraktların karmaşıklığı ve müdahale eden bileşikler dikkatli analiz gerektirir (Nasim vd., 2022; Shu, 1998).

5.2. İzolasyon ve Yapısal Aydınlatma

Biyoaktif bir özüt belirlendikten sonra aktif bileşiklerin saflaştırılması ve yapısal olarak tanımlanması gerekir. Kolon kromatografisi, HPLC ve preparatif ince tabaka kromatografisi gibi yöntemler, doğal ürün izolasyonunun temelini oluşturur. Biyoaktivite rehberliğinde fraksiyonlama, aktif bileşiklerin saflaştırma boyunca izlenmesini sağlar (Nasim vd., 2022; Rodrigues vd., 2016).

Yapısal aydınlatmada NMR spektroskopisi ve kütle spektrometrisi başlıca yöntemlerdir. NMR moleküler bağlantı ve stereokimya hakkında bilgi verirken, MS moleküler ağırlık ve parçalanma örüntülerini belirler. Gerekli durumlarda X-ışını kristalografisi kesin yapısal doğrulama sağlayabilir (Gullo vd., 2006).

5.3. Yapı-Aktivite İlişkisi Çalışmaları

Yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları, doğal ürün yapısındaki değişikliklerin biyolojik aktivite, seçicilik ve farmakokinetik özellikleri nasıl etkilediğini ortaya koyar. Bu çalışmalar, aktivite için gerekli yapısal bölgeleri ve modifiye edilebilir alanları belirleyerek daha etkili ve güvenli analogların geliştirilmesine rehberlik eder (Rodrigues vd., 2016).

5.4. Yarı Sentez ve Optimizasyon

Yarı sentez, doğal ürünlerin yapısal karmaşıklığını korurken farmakolojik özelliklerini iyileştirmek için kimyasal

modifikasyon yapılmasına dayanır. Bu yaklaşım, antibiyotikler, antikanser ajanlar ve diğer birçok terapötik bileşiğin geliştirilmesinde kritik rol oynamıştır (Koehn vd., 2005).

Yarı sentetik penisilinlerin geliştirilmesi bu stratejinin klasik örneğidir. Penisilin G'nin asit kararsızlığı ve dar spektrumu, kimyasal modifikasyonlarla geliştirilen yeni penisilin türevleriyle aşılmıştır. Günümüzde geç aşama fonksiyonelleştirme, stereoselektif reaksiyonlar ve biyokataliz gibi yöntemler doğal ürün optimizasyonunun olanaklarını genişletmektedir (Demain, 2009; Gullo vd., 2006).

5.5. Klinik Çalışmalar ve Düzenleyici Onay

Doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar, sentetik ilaçlar gibi Faz I, II ve III klinik çalışmalarından geçerek güvenlik, doz, etkinlik ve karşılaştırmalı klinik fayda açısından değerlendirilir. Ancak doğal ürünlerde tutarlı tedarik, üretim partileri arası uyumluluk, karmaşık karışımlar ve fikri mülkiyet gibi ek zorluklar bulunur (Wu vd., 2020).

Faz I çalışmaları güvenlik ve farmakokinetiği, Faz II çalışmaları daha geniş hasta gruplarında etkinliği, Faz III çalışmaları ise büyük çok merkezli tasarımlarla kesin güvenlik ve etkililiği değerlendirir. Onay sonrası Faz IV çalışmalar nadir yan etkilerin, uzun dönem güvenliğin ve yeni endikasyonların izlenmesini sağlar (Cragg vd., 2001; Skalicka-Woźniak, 2021).

6. BAŞARILI DOĞAL BİLEŞİK İLAÇLARA İLİŞKİN ÖRNEKLER

6.1. Penisilin

Penisilin, Alexander Fleming'in 1928'de *Penicillium notatum*'un bakteriyel büyümeyi inhibe ettiğini gözlemlemesiyle keşfedilmiş ve antibiyotik çağını başlatmıştır. Daha sonra Florey, Chain ve çalışma arkadaşlarının üretim ve saflaştırma çabalarıyla

klirik kullanıma taşınmıştır (Demain, 2009). Penisilin, penisilin bağlayıcı proteinleri hedefleyerek bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe eder; bu seçici toksisite enfeksiyon tedavisinde büyük başarı sağlamış ve yarı sentetik antibiyotiklerin geliştirilmesine öncülük etmiştir (Pelaez, 2006).

6.2. Aspirin

Aspirin, söğüt kabuğu ve salisilat içeren bitkilerin geleneksel kullanımından modern farmakolojiye uzanan klasik bir doğal ürün örneğidir. Salisilik asidin mide tahrişi gibi sınırlamalarını azaltmak amacıyla asetilsalisilik asit geliştirilmiştir (Cragg vd., 2001). Aspirin, siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek prostaglandin ve tromboksan sentezini azaltır; böylece analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar ve antitrombosit etkiler gösterir. Bu mekanizmanın aydınlatılması, NSAID alanının gelişimine de katkı sağlamıştır (Cragg vd., 2001).

6.3. Morfin

Morfin, Papaver somniferum'dan elde edilen başlıca alkaloid olup bitkisel ilaçlardan saf aktif bileşik izolasyonunun erken ve etkili örneklerinden biridir. Friedrich Sertürner'in morfini izole etmesi, farmakolojide saf doğal bileşik döneminin başlangıcı olarak kabul edilir (Cragg vd., 2001). Morfin, opioid reseptörlerine bağlanarak güçlü analjezik etki oluşturur; endojen opioid sisteminin tanımlanmasına ve sentetik opioidlerin geliştirilmesine rehberlik etmiştir. Günümüzde özellikle şiddetli ağrı ve palyatif bakımda önemini korumaktadır (Atanasov vd., 2015; Cragg vd., 2002).

6.4. Paklitaksel (Taxol)

Paklitaksel, Taxus brevifolia kabuğundan izole edilmiş ve doğal ürün ilaç geliştirmede hem başarıyı hem de tedarik zorluklarını göstermiştir. Düşük verim ve çevresel kaygılar, yarı

sentez ve alternatif üretim stratejilerinin önemini artırmıştır (Atanasov vd., 2015). Paklitaksel, β -tübüline bağlanarak mikrotübülleri stabilize eder ve mitoz için gerekli dinamik kararsızlığı bozar; bu mekanizma meme, yumurtalık, akciğer ve diğer kanserlerin tedavisinde yaygın kullanımını sağlamıştır (Cragg vd., 2002).

6.5. Artemisinin

Artemisinin, *Artemisia annua*'dan elde edilen ve sıtma tedavisinde büyük klinik öneme sahip bir bileşiktir. Tu Youyou ve ekibinin geleneksel Çin tıbbı kayıtlarından yola çıkarak bu bileşiği tanımlaması, etnofarmakolojinin modern ilaç keşfindeki değerini göstermiştir (Shu, 1998). Artemisinin, parazitte demir aracılı aktivasyonla serbest radikal oluşumuna yol açar ve hızlı antiparaziter etki gösterir. Sentetik biyolojiyle artemisinik asit üreten maya suşlarının geliştirilmesi, sürdürülebilir tedarik için önemli bir örnektir (Skalicka-Woźniak, 2021).

6.6. Vinkristin

Vinkristin, *Catharanthus roseus* bitkisinden izole edilmiş ve özellikle lösemi ile lenfomalarda etkili bir antikanser ajan olarak geliştirilmiştir. Başlangıçta bitkinin diyabetle ilişkili geleneksel kullanımının incelenmesi sırasında keşfedilmesi, etnofarmakolojik çalışmaların beklenmedik klinik uygulamalara yol açabileceğini göstermektedir (Shu, 1998). Vinkristin tübüline bağlanarak mikrotübül polimerizasyonunu inhibe eder, mitotik iğ oluşumunu bozar ve apoptoza neden olur; çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinde önemli klinik başarı sağlamıştır (Atanasov vd., 2015).

6.7. Metformin

Metformin, *Galega officinalis*'in kan şekeri düşürücü geleneksel kullanımından esinlenen biguanid yaklaşımının modern sonucudur. Guanidin türevlerinin toksisitesi nedeniyle

daha güvenli bir analog olarak metformin geliştirilmiştir (Cragg vd., 2001). Temel etkileri arasında AMPK aktivasyonu, hepatik glukoz üretiminin azalması, insülin duyarlılığının artması ve glukoz alımının iyileşmesi yer alır. Hipoglisemi riskinin düşük olması, güvenlik profili ve düşük maliyeti nedeniyle tip 2 diyabet tedavisinde birinci basamak ilaçlardan biridir (Skalicka-Woźniak, 2021).

6.8. Statinler

Statinler, mantar metabolitlerinden türetilmiş ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde büyük etki yaratmış ilaçlardır. Mevastatin *Penicillium citrinum*'dan, lovastatin ise *Aspergillus terreus*'tan izole edilmiştir (Shu, 1998). HMG-CoA redüktazı inhibe ederek kolesterol biyosentezini azaltır, LDL kolesterol düzeylerini düşürür ve kardiyovasküler olay riskini azaltır. Yarı sentetik ve sentetik statinlerin geliştirilmesi, doğal ürünlerden elde edilen öncülerin nasıl geniş bir ilaç sınıfına dönüşebileceğini göstermektedir (Demain, 2009).

6.9. Siklosporin

Siklosporin, *Tolypocladium inflatum* mantarından izole edilmiş ve organ naklinde immünosupresyonu dönüştürmüştür. Antimikrobiyal tarama sırasında keşfedilmesine rağmen güçlü immünosupresif etkilerinin fark edilmesi, geniş tarama yaklaşımlarının değerini göstermektedir (Demain, 2009). Siklosporin, siklofiline bağlanarak kalsineürin inhibisyonu oluşturur ve T hücresi aktivasyonu için gerekli sitokin transkripsiyonunu baskılar. Bu seçici etki, organ nakli başarı oranlarını artırmış ve bazı otoimmün hastalıklarda da kullanım alanı sağlamıştır (Shu, 1998).

7. ZORLUKLAR VE GELECEK YÖNELİMLER

7.1. Arz ve Sürdürülebilirlik Sorunları

Arz ve sürdürülebilirlik, özellikle nadir, yavaş büyüyen veya çevresel açıdan hassas organizmalardan elde edilen doğal ürünler için temel zorluklardandır. Paklitaksel örneğinde görüldüğü gibi, sınırlı doğal kaynaklar hem üretimi hem de ekosistemleri zorlayabilir. Bu nedenle tarımsal yetiştirme, bitki hücre kültürü, mikrobiyal fermantasyon, metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji alternatif üretim yolları olarak önem kazanmıştır (Chaachouay ve Zidane., 2024; Skalicka-Woźniak, 2021).

7.2. Biyoyararlanım ve Farmakokinetik Zorluklar

Birçok doğal ürün güçlü in vitro aktivite göstermesine rağmen düşük suda çözünürlük, zayıf membran geçirgenliği, ilk geçiş metabolizması veya hızlı eliminasyon nedeniyle klinik olarak sınırlı kalabilir. Bu sorunları aşmak için ön ilaç tasarımı, metabolik olarak stabil analoglar, alternatif uygulama yolları ve gelişmiş formülasyon stratejileri kullanılmaktadır (Chaachouay ve Zidane, 2024; Nasim ve ark., 2022). Paklitaksel ve kurkumin gibi lipofilik bileşiklerde nanopartikül, lipozom veya albumin bağlı sistemler biyoyararlanımı artırmak için önemli yaklaşımlardır (Li vd., 2022).

7.3. Yapısal Karmaşıklık

Doğal ürünlerin çoklu kiral merkezler, karmaşık halka sistemleri ve özgün fonksiyonel gruplar içeren yapıları biyolojik aktivite açısından avantaj sağlarken sentez, optimizasyon ve ölçeklenebilir üretim açısından zorluk yaratır (Rodrigues vd., 2016). Toplam sentez çoğu zaman düşük verimli ve maliyetlidir; bu nedenle yarı sentez ve biyosentetik mühendislik daha pratik stratejiler sunar. Dosetakselin 10-deasetilbaccatin III'ten

geliştirilmesi, bu yaklaşımın başarılı örneklerinden biridir (Koehn vd., 2005; Gullo vd., 2006).

7.4. Sentetik Biyoloji Yaklaşımları

Sentetik biyoloji, doğal ürünlerin sürdürülebilir üretimi ve yeni analogların keşfi açısından dönüştürücü bir yaklaşımdır. Genom madenciliği, sessiz biyosentetik gen kümelerinin belirlenmesine ve heterolog konaklarda ifade edilmesine olanak tanır (Gullo vd., 2006; Demain, 2014). *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Streptomyces* gibi konakların kullanılması üretim verimini artırabilir. Artemisinik asidin mühendislik ürünü mayada üretilmesi, bu yaklaşımın ölçeklenebilirliğini göstermektedir (Skalicka-Woźniak, 2021).

7.5. Yapay Zekâ Destekli Keşif

Yapay zekâ ve makine öğrenimi, doğal ürün ilaç keşfinde aktivite tahmini, hedef belirleme, yapı optimizasyonu ve genom madenciliği için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Büyük veri setlerinden örüntü çıkarabilen bu yöntemler, deneysel çalışmaları daha umut vadeden adaylara yönlendirerek keşif sürecini hızlandırabilir (Rodrigues vd., 2016). Ayrıca biyosentetik gen kümelerinin tanımlanması, ürün yapılarının öngörülmesi ve deneysel önceliklendirme için de önemli potansiyel taşımaktadır (Demain, 2014).

7.6. Nanoteknoloji Uygulamaları

Nanoteknoloji, doğal ürünlerde özellikle çözünürlük, biyoyararlanım, hedefli dağıtım ve kontrollü salınım sorunlarına çözüm sunar. Lipozomlar, polimerik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller ve nanoemülsiyonlar doğal ürünlerin korunmasını, hedef dokulara taşınmasını ve terapötik etkinliğin artırılmasını sağlayabilir (Li vd., 2022). Pasif hedefleme, aktif ligand bazlı hedefleme ve uyarıcıya duyarlı sistemler özellikle antikanser doğal ürünlerin sistemik toksisitesini azaltma

açısından önemlidir. Nanoteknoloji ayrıca kombinasyon tedavileri ve teranostik yaklaşımlar için de yeni olanaklar sunmaktadır (Li vd., 2022).

8. SONUÇ

Doğal bileşikler, geleneksel tıptan modern ilaç geliştirmeye uzanan süreçte tıbbi biyolojinin en önemli kaynaklarından biri olmayı sürdürmektedir. Bitkisel, denizel, mikrobiyal ve hayvansal kökenli doğal ürünler; enzim inhibisyonu, reseptör modülasyonu, antimikrobiyal, antikanser ve antiinflamatuvar etkiler gibi farklı mekanizmalarla terapötik potansiyel sunmaktadır (Skalicka-Woźniak, 2021; Chaachouay ve Zidane, 2024).

Penisilin, aspirin, morfin, paklitaksel, artemisinin, vinkristin, metformin, statinler ve siklosporin gibi örnekler, doğal ürünlerin enfeksiyon hastalıkları, ağrı, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve organ nakli gibi alanlarda modern tıbbi nasıl şekillendirdiğini göstermektedir (Atanasov vd., 2015). Buna karşın arz, sürdürülebilirlik, biyoyararlanım ve yapısal karmaşıklık gibi sorunlar doğal ürün ilaç geliştirmede önemini korumaktadır.

Gelecekte sentetik biyoloji, yapay zekâ ve nanoteknoloji gibi yaklaşımların doğal ürün araştırmalarıyla bütünleşmesi hem yeni bileşiklerin keşfini hem de mevcut doğal ürünlerin klinik uygulanabilirliğini artıracaktır. Antimikrobiyal direnç, kronik hastalıklar ve kişiselleştirilmiş tedavi gereksinimleri karşısında doğal ürünler, 21. yüzyılda da ilaç geliştirme süreçlerinin merkezinde yer almaya devam edecektir (Rodrigues vd., 2016; Moloney, 2016; Skalicka-Woźniak, 2021).

KAYNAKÇA

- Ahmad, M., Tahir, M. N., Hong, Z., Zia, M. A., Rafeeq, H., Ahmed, S., ... Kumar, S. (2025). Plant and marine-derived natural products: Sustainable pathways for future drug discovery and therapeutic development. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1497668. doi:10.3389/fphar.2024.1497668
- Almeida, E. L., Rincón, A. F. C., Jackson, S. A., & Dobson, A. D. W. (2025). Harnessing Actinobacteria secondary metabolites for tuberculosis drug discovery: Historical trends, current status and future outlooks. *Natural Products and Bioprospecting*, 15(1), 1–25. doi:10.1007/s13659-025-00533-8
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.001
- Chaachouay, N., & Zidane, L. (2024). Plant-derived natural products: A source for drug discovery and development. *Drugs and Drug Candidates*, 3(1), 184–207. doi:10.3390/ddc3010011
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2002). Drugs from nature: Past achievements, future prospects. In M. M. Iwu & J. C. Wootton (Eds.), *Advances in phytomedicine: Ethnomedicine and drug discovery* (Vol. 1, pp. 23–37). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. doi:10.1016/S1572-557X(02)80010-1
- Cragg, G. M., Newman, D. J., & Snader, K. M. (2001). Natural product drug discovery in the next

- millennium. *Pharmaceutical Biology*, 39(Suppl. 1), 8–17. doi:10.1076/phbi.39.s1.8.0009
- Demain, A. L. (2009). Antibiotics: Natural products essential to human health. *Medicinal Research Reviews*, 29(6), 821–842. doi:10.1002/med.20154
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(2), 185–201. doi:10.1007/s10295-013-1325-z
- Gullo, V. P., McAlpine, J., Lam, K. S., Baker, D., & Petersen, F. (2006). Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(7), 523–531. doi:10.1007/s10295-006-0107-2
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), 206–220. doi:10.1038/nrd1657
- Li, Z., Zhao, T., Li, J., Yu, Q., Feng, Y., Xie, Y., & Sun, P. (2022). Nanomedicine based on natural products: Improving clinical application potential. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 3066613. doi:10.1155/2022/3066613
- Moloney, M. G. (2016). Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), 689–701. doi:10.1016/j.tips.2016.05.001
- Nasim, N., Sandeep, I. S., Mohanty, S., & Nayak, S. (2022). Plant-derived natural products for drug discovery: Current approaches and prospects. *The Nucleus*, 65(3), 399–411. doi:10.1007/s13237-022-00405-3
- Patwardhan, B. (2007). *Drug discovery & development: Traditional medicine and ethnopharmacology*. New Delhi, India: New India Publishing Agency. doi:10.59317/9789389992076

- Pelaez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 981–990. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.010
- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., & Schneider, G. (2016). Counting on natural products for drug design. *Nature Chemistry*, 8(6), 531–541. doi:10.1038/nchem.2479
- Santos, J. D., Vitorino, I., Reyes, F., Vicente, F., & Lage, O. M. (2020). From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*, 9(8), 455. doi:10.3390/antibiotics9080455
- Shu, Y. Z. (1998). Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61(8), 1053–1071. doi:10.1021/np9800102
- Skalicka-Woźniak, K. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3). doi:10.1038/s41573-020-00114-z
- Wu, C., Lee, S. L., Taylor, C., Li, J., Chan, Y. M., Agarwal, R., ... Khan, I. (2020). Scientific and regulatory approach to botanical drug development: A U.S. FDA perspective. *Journal of Natural Products*, 83(2), 552–562. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00949

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNUN GENETİK ETİYOLOJİSİ¹

Tuba KÖSE²

1. GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), erken çocukluk döneminde ortaya çıkan, sosyal iletişim ve etkileşimde kalıcı yetersizlikler ile sınırlı/tekrarlayan davranış paternleriyle karakterize, heterojen bir nörogelişimsel bozukluktur (Genovese ve Butler, 2023). En güncel izleme verilerine göre, 2022 yılında ABD'de 8 yaşındaki çocuklarda OSB prevalansı 31 çocukta 1 (%3,2) olarak bildirilmiş; bu oran 2020 yılındaki 36'da 1 değerine göre artış göstermiştir (Shaw ve ark., 2025). Erkek çocuklarda OSB, kız çocuklarına kıyasla yaklaşık 3-4 kat daha sık görülmektedir (Shaw ve ark., 2025).

OSB kavramının kökleri, Amerikalı çocuk psikiyatristi Leo Kanner'ın 1943 yılında 11 çocuğun davranışlarını betimlediği klasik makalesine dayanmaktadır (Kanner, 1943). Günümüzde OSB, Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel Kılavuzu'nun beşinci baskısına (DSM-V) göre, sosyal iletişim/etkileşim alanındaki yetersizlikler ve sınırlı/tekrarlayan davranış örüntüleri temelinde tanılanmaktadır (Volkmar ve Reichow, 2013).

¹ Bu bölüm, yazarın 2019 yılında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladığı "Otizm Spektrum Bozukluğu Olan İkizlerde Kopya Sayısı Değişikliklerinin Vitamin D Reseptörü ile İlişkinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezinden üretilmiş olup, güncel literatür taraması ile genişletilerek yeniden düzenlenmiştir.

² Arş. Gör., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ORCID: 0000-0002-2372-9190.

OSB'nin en çarpıcı özelliklerinden biri, son yirmi yılda gerçekleştirilen genetik araştırmaların hastalığın etiyolojisine getirdiği derinlemesine açıklamalardır. Aile ve ikiz çalışmaları, OSB'nin kalıtım oranının %70-90 aralığında olduğunu göstermektedir (Genovese ve Butler, 2023). Buna karşın, hastalığın genetik mimarisi son derece karmaşıktır: yaygın poligenik varyasyonlar, nadir kalıtsal varyantlar ve de novo mutasyonlar bir araya gelerek OSB riskini şekillendirmektedir (Havdahl ve diğerleri, 2021).

Bu bölümde, OSB'nin genetik etiyolojisi; (1) ikiz ve aile çalışmalarından elde edilen kalıtım kanıtları, (2) sendromik ve non-sendromik (idiyopatik) otizm ayrımı, (3) kopya sayısı değişiklikleri (CNV) ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) bulguları ekseninde ele alınacaktır. Ayrıca, D vitamini reseptör (VDR) geni polimorfizmleri örneği üzerinden, OSB'ye genetik yaklaşımın güncel bir uygulama alanı tanıtılacaktır.

2. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU: TANIM VE TARİHÇE

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), yaşamın erken dönemlerinde kendini gösteren, sosyal iletişim ve etkileşimde kalıcı yetersizlikler ile sınırlı ve tekrarlayan davranış örüntüleriyle karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur (Mintz, 2017).

Hastalık tüm etnik, ırksal ve sosyoekonomik gruplarda görülebilmekte; ömür boyu sürmekte; ancak erken tanı ve müdahale ile semptom şiddetinde ve işlevsellikte önemli iyileşmeler sağlanabilmektedir (Mintz, 2017).

OSB'nin tanımlanmasında tarihsel açıdan iki temel figür öne çıkmaktadır. İlk olarak Amerikalı çocuk psikiyatristi Leo Kanner, 1943 yılında 11 çocuğun davranışlarını betimlediği

makalesinde "otistik" kavramını ilk kez kullanmış; bu çocuklarda bebeklik döneminden itibaren diğer bireylerle iletişim kurmada aşırı yetersizlik, dil gelişiminde gecikme, duyu hassasiyet ve tekrarlayan davranışlar gözlemlenmiştir (Kanner, 1943). Kanner'ın ardından Avusturyalı hekim Hans Asperger, aynı dönemde iletişimde güçlük yaşayan, empati kuramayan ancak normal ya da üstün zekaya sahip çocukları tanımlamış ve bu tablo daha sonra Asperger sendromu olarak adlandırılmıştır (Mintz, 2017).

1940'lı yıllarda psikiyatri çevrelerinde otistik belirtiler çocukluk şizofrenisiyle ilişkilendirilmişse de nöropatolojik ve nöroradyolojik çalışmalar, otizmin başlı başına bir nörobiyolojik bozukluk olduğunu ortaya koymuştur (Mintz, 2017). Sınıflandırma açısından ilk resmi tanıma, 1980 yılında DSM-III'te "Yaygın Gelişimsel Bozukluklar" başlığı altında gerçekleşmiş; 1994'te yayınlanan DSM-IV ve metin revizyonu olan DSM-IV-TR'de ise otistik bozukluk, Asperger bozukluğu, Rett sendromu ve başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk gibi alt kategorileri kapsayan bir "şemsiye" yaklaşım benimsenmiştir (Volkmar ve Reichow, 2013). En son olarak 2013 yılında yayınlanan DSM-V, bu alt kategorileri birleştirerek tek bir "otizm spektrum bozukluğu" tanısı altında toplamış; tanı kriterlerini sosyal iletişim/etkileşim yetersizlikleri ve sınırlı/tekrarlayan davranış örüntüleri olarak iki temel eksen üzerinde yeniden düzenlemiştir (Volkmar ve Reichow, 2013).

3. TANI KRİTERLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLER

OSB tanısı, günümüzde uygun bir biyobelirteç bulunamaması nedeniyle davranışa dayalı olarak konulmaktadır. Tanı için yaygın biçimde Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından yayımlanan Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın beşinci baskısı (DSM-5) kriterleri kullanılmaktadır

(American Psychiatric Association [APA], 2013). DSM-5'in 2013'teki yayımlanmasının ardından geçen on yıllık deneyim, bu kriterlerin OSB'nin tanınmasında önemli bir ilerleme sağladığını, ancak bazı güçlüklerin de devam ettiğini ortaya koymaktadır (Posar ve Visconti, 2023).

DSM-5'e göre OSB tanısı için iki temel ölçüt zorunludur (APA, 2013):

A. Sosyal iletişim ve etkileşimde kalıcı yetersizlikler: Bu alan; sosyal-duygusal karşılıklılıktaki eksiklikler, sözel olmayan iletişim davranışlarındaki yetersizlikler ve ilişkileri geliştirme, sürdürme ve anlamlandırmadaki güçlükler olmak üzere üç alt boyuttan oluşmakta olup her üç boyutta da yetersizliğin varlığı gerekmektedir.

B. Sınırlı, tekrarlayan davranış, ilgi veya etkinlikler: Basmakalıp/tekrarlayan motor hareketler, rutinlere sıkı bağlılık, konu ya da yoğunluk açısından anormal olan sabitlenmiş ilgiler ve duysal uyaranlara karşı aşırı ya da az duyarlılık olmak üzere dört özellikten en az ikisinin bulunması gerekmektedir.

Bunların yanı sıra belirtilerin gelişimin erken evrelerinde mevcut olması, sosyal ve mesleki alanlarda klinik düzeyde bozukluğa yol açması ve zihinsel yetersizlik ya da genel gelişimsel gerilikle daha iyi açıklanamaması da tanı kriterleri arasında yer almaktadır (APA, 2013).

DSM-5, OSB'den etkilenme düzeyini üç ayrı ciddiyet düzeyinde tanımlamaktadır. Düzey 1 ("destek gerektiren"), günlük sosyal etkileşimlerde gözlemlenebilir güçlükleri kapsar. Düzey 2 ("önemli düzeyde destek gerektiren"), sözel ve sözel olmayan iletişimde belirgin yetersizliklerle karakterizedir. Düzey 3 ("çok yüksek düzeyde destek gerektiren") ise sözel ve sözel olmayan iletişimdeki ağır yetersizlikler ile işlevselliği tüm alanlarda olumsuz etkileyen esnek olmayan davranış örüntülerini kapsamaktadır (APA, 2013).

4. EPİDEMİYOLOJİ

OSB, dünya genelinde görülme sıklığı giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Global Hastalık Yüklü Çalışması 2021 verilerine göre, 2021 yılı itibarıyla dünya genelinde her 127 kişiden birinin otizm spektrumunda yer aldığı tahmin edilmekte; bu rakam, OSB'yi 20 yaş altı bireylerde ölüme yol açmayan hastalık yükü sıralamasında ilk on arasına taşımaktadır (Global Burden of Disease Study 2021 Autism Spectrum Collaborators, 2025). ABD'de 2022 yılına ait izleme verilerine göre 8 yaşındaki çocuklarda OSB prevalansı 31 çocukta 1'e (%3,2) yükselmiş olup bu oran son on yılda sürekli bir artış eğilimi sergilemiştir (Shaw ve diğerleri, 2025).

OSB tüm ırk, etnik köken ve sosyoekonomik gruplarda görülmekle birlikte, cinsiyetler arasında belirgin bir dağılım eşitsizliği dikkat çekmektedir. Kız çocuklarına kıyasla erkek çocuklarda hastalık 3-4 kat daha sık gözlemlenmektedir (Shaw ve diğerleri, 2025). Bu farklılığın altında yatan biyolojik ve genetik mekanizmalar, "aşırı erkek beyni" ve "kadın koruyucu model" gibi hipotezler çerçevesinde tartışılmaya devam etmektedir (Genovese ve Butler, 2023).

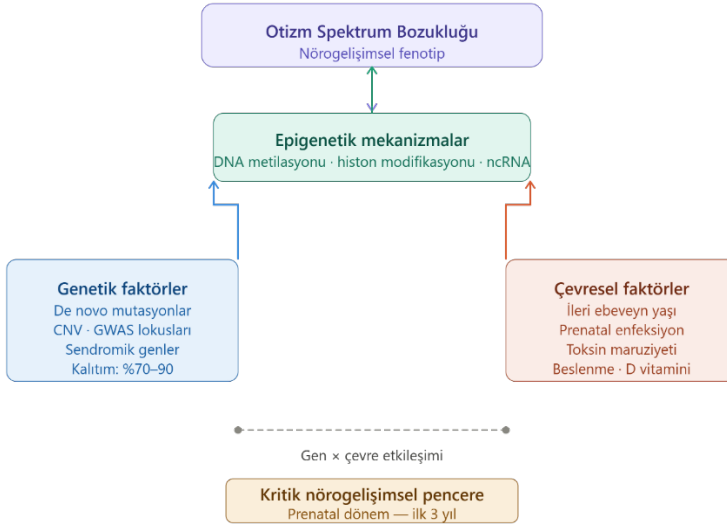
Türkiye'de OSB'nin yaygınlığına ilişkin kapsamlı ulusal veriler henüz sınırlı olmakla birlikte, İstanbul'da 16-36 aylık 6.712 çocuğu kapsayan bir tarama çalışmasında OSB görülme sıklığının 117 çocukta 1 (%0,85) olduğu saptanmıştır (Oner ve Munir, 2020). Bu bulgu, Türkiye'deki OSB prevalansının küresel ortalamalarla uyumlu olduğuna işaret etmekte; erken tarama ve tanının önemi bir kez daha vurgulanmaktadır.

Prevalanstaki artışın tamamının gerçek bir yükseliş mi yoksa iyileşmiş tanı uygulamalarının ve toplumsal farkındalığın bir yansıması mı olduğu tartışma konusudur. Bununla birlikte, OSB'nin bireyler, aileler ve sağlık sistemleri üzerindeki yükünün

her geçen yıl arttığı açıktır (Global Burden of Disease Study 2021 Autism Spectrum Collaborators, 2025).

5. ETİYOLOJİ

OSB'nin etiolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamış olup, hastalığın karmaşık bir multifaktöriyel yapıya sahip olduğu yaygın biçimde kabul görmektedir. Güncel kanıtlar, OSB'nin genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığına işaret etmektedir (Yoon, Choi, Lee ve Do, 2020). Bu faktörlerin nörotransmitter dengesizliği, işlevsiz nöronal yollar, anormal sinaptogenez ve anormal nöronal bağlantıya yol açtığı öne sürülmektedir (Genovese ve Butler, 2023). Genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin OSB gelişimine olan katkısı ve bu faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. OSB etiolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi.

OSB, Mendeliyen kalıtım paterni göstermemektedir; bunun yerine, çok sayıda yaygın ve nadir genetik varyantın birikimli etkisi söz konusudur. Hastalığın kalıtım oranının %70-90 arasında olduğu tahmin edilmekte; ancak bu yüksek kalıtım oranı, OSB'nin "saf genetik" bir hastalık olduğu anlamına gelmemektedir (Havdahl ve diğerleri, 2021). Aksine, epigenetik mekanizmalar — başta DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA'lar — genetik yatkınlığı çevresel faktörlerle birleştiren kritik bir köprü işlevi görmektedir (Yoon ve diğerleri, 2020).

Çevresel risk faktörleri arasında ileri ebeveyn yaşı, prenatal dönemde enfeksiyon ya da toksin maruziyeti, prematürite ve perinatal komplikasyonlar yer almaktadır. Bununla birlikte bu faktörlerin her biri tek başına görece küçük bir risk artışına yol açmakta; asıl önem taşıyan husus, bu faktörlerin genetik yatkınlıkla nasıl etkileşime girdiğidir (Havdahl ve diğerleri, 2021). OSB'li bireylerin yalnızca %20'sinde tanımlanabilir genetik bir anormallik saptanabilmekte, kalan vakaların büyük çoğunluğu hâlâ idiyopatik olarak değerlendirilmektedir (Genovese ve Butler, 2023).

Tablo 1 OSB'nin etiyoloji kategorilerini, tahmini sıklıklarını ve örnek genetik/epigenetik bulgularını özetlemektedir. Tabloda görüldüğü üzere, OSB'nin büyük çoğunluğunda birden fazla etiyolojik mekanizmanın bir arada rol oynadığı ve pek çok vakada kesin bir nedenin saptanamadığı dikkat çekmektedir.

Tablo 1. OSB Etiyoloji Kategorileri

Kategori	Sıklık	Örnek bulgular
Kromozom anomalileri Karyotip analizi ile saptanan	~%5	Trizomi 21, cinsiyet kr. anomalileri
Kopya sayısı değişiklikleri (CNV) Mikroarray ile saptanan de novo/kalıtsal	%10–20	16p11.2, 15q11-q13, 22q11.2 delesyon/duplikasyonları
Sendromik tek gen mutasyonları Bilinen genetik sendromlar	~%5–10	Frajl X, Rett, Tuberoz Skleroz, Angelman sendromu
De novo nokta mutasyonları Tüm egzom/genom dizileme	<%20	CHD8, SHANK3, SYNGAP1, ADNP, SCN2A genleri
Yaygın poligenik varyantlar (GWAS) Toplumsal sıklıkta SNP'ler	Kalıtım varyansının ~%40–60'ı	5p14.1 (CDH9/CDH10), şizofreni ile paylaşılan lokuslar
Epigenetik değişiklikler Gen ifadesini etkileyen mekanizmalar	Belirsiz	DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, MECP2 promoter metilasyonu
Çevresel risk faktörleri Gen × çevre etkileşimi	Kalıtım varyansının ~%40–50'si	İleri ebeveyn yaşı, prenatal enfeksiyon, toksin maruziyeti

Kaynak: Abedini ve diğerleri (2024); Genovese ve Butler (2023); Fernandez ve Scherer (2017); Modabbernia ve diğerleri (2017)

6. OSB'YE GENETİK YAKLAŞIM

6.1. İkiz ve Aile Çalışmaları: Kalıtım Kanıtları

OSB'nin güçlü bir genetik bileşene sahip olduğuna dair en temel kanıtlar ikiz ve aile çalışmalarından elde edilmektedir. Monozigot (MZ, tek yumurta) ikizler genomik materyallerinin tamamını paylaşıırken, dizigot (DZ, çift yumurta) ikizler kardeşler

gibi yaklaşık %50'sini paylaşmaktadır; bu fark, kalıtım oranının hesaplanmasında temel araç olarak kullanılmaktadır. İkiz çalışmalarının sistematik bir meta-analizinde MZ ikizler için OSB konkordansı yaklaşık %98, DZ ikizler için ise prevalansa bağlı olarak %53–67 olarak hesaplanmış; OSB için kalıtım oranı %64–91 aralığında tahmin edilmiştir (Tick, Bolton, Happé, Rutter ve Rijdsdijk, 2016). Bu bulgular, OSB'nin kalıtsal bileşeninin son derece güçlü olduğunu ortaya koymakla birlikte, paylaşılmış çevresel etkenlerin de hastalık riskine katkı sağladığını göstermektedir.

Aile çalışmaları da genetik yatkınlığı destekleyen önemli veriler sunmaktadır. OSB'li bir çocuğun kardeşlerinde hastalığın görülme riski, genel toplum riskiyle kıyaslandığında belirgin biçimde yüksektir. Büyük ölçekli popülasyon tabanlı çalışmalar, kardeşlerde yinelenme riskinin yaklaşık %10 olduğunu bildirmektedir; bu oran, OSB için kuvvetli bir ailesel birikim örüntüsüne işaret etmektedir (Havdahl ve diğerleri, 2021).

6.2. Sendromik ve Non-sendromik (İdiyopatik) Otizm Ayrımı

OSB'nin genetik etiyolojisini anlamlandırmada öncelikli adım, sendromik ve non-sendromik (idiyopatik) otizm ayrımının yapılmasıdır. Sendromik otizm, iyi tanımlanmış ve bilinen genetik bir nedene bağlı olarak ortaya çıkan, klinik olarak tanımlanmış somatik anormallikler ve nörodavranışsal bulgular ile karakterize bir tablodur (Fernandez ve Scherer, 2017). Bu gruba örnek olarak Frajil X sendromu, Tuberoz Skleroz, Rett sendromu ve Angelman sendromu sayılabilir. Frajil X sendromu, FMR1 genindeki CGG tekrar genişlemesine bağlı olarak gelişen ve en sık görülen monojenik sendromik OSB nedeni olma özelliğini korumaktadır; etkilenen erkeklerin yaklaşık %60'ı OSB tanı kriterlerini karşılamaktadır (Fernandez ve Scherer, 2017).

PTEN gen mutasyonları ise aşırı makrosefali ile ilişkili OSB vakalarında önemli bir tanısal hedef olarak öne çıkmaktadır.

Non-sendromik (idiyopatik) otizm ise otizmin birincil tanısı olduğu ve altta yatan genetik nedenin bilinmediği vakaları tanımlamaktadır. Bu grupta oligojenik, poligenik ve multifaktöriyel mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmekte; hastalığın belirgin bir Mendeliyen kalıtım paterni göstermemesi, genetik mimarinin son derece karmaşık olduğuna işaret etmektedir (Genovese ve Butler, 2023). Kapsamlı genetik analiz yaklaşımları kullanıldığında, OSB'li vakaların yaklaşık %40'ında tanımlanabilir bir genetik etiyoloji saptanabilmektedir (Fernandez ve Scherer, 2017).

6.3. Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV) ve OSB

Kopya sayısı değişiklikleri (copy number variations, CNV), genomda görece büyük DNA segmentlerinin kazanım ya da kayıplarını ifade etmekte ve OSB'nin genetik etiyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. OSB'li bireylerin %10–20'sinde nadir CNV'ler saptanmakta; bunların %3–7'si sitogenetik yöntemlerle, geri kalanı ise yüksek çözünürlüklü array teknolojileriyle tespit edilebilmektedir (Abedini ve diğerleri, 2024). De novo CNV'ler — yani ebeveynlerden kalıtılmayan, yeni oluşan genomik değişiklikler — özellikle simpleks ailelerde (yalnızca bir etkilenen çocuk bulunan aileler) vakaların %7–10'unda, multipleks ailelerde ise %2–3'ünde gözlemlenmektedir (Havdahl ve diğerleri, 2021).

OSB ile ilişkilendirilen başlıca CNV bölgeleri arasında 16p11.2, 15q11-q13, 22q11.2, 7q11.23 ve 1q21.1 yer almaktadır. Bu bölgelerdeki duplikasyon ve delesyonların OSB riskini artırdığı gösterilmiş olmakla birlikte, bu CNV'lerin çoğu tam penetranslı değildir ve değişken bir klinik tabloya yol açabilmektedir (Abedini ve diğerleri, 2024). Ayrıca söz konusu varyasyonların önemli bir kısmı, sinaptik işlev ve nöronal

bağlantıyı düzenleyen gen bölgelerinde yoğunlaşmaktadır; bu durum OSB'nin nörobiyo-lojik temellerine ilişkin önemli ipuçları sunmaktadır (Fernandez ve Scherer, 2017).

6.4. Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS)

Nadir varyantların yanı sıra, yaygın tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) de OSB riskine katkıda bulunmaktadır. Birden fazla GWAS çalışmasından elde edilen veriler, nadir varyantlar tarafından açıklanamayan kalıtım oranının önemli bir bölümünün yaygın varyantlardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Bu alanda gerçekleştirilen en kapsamlı GWAS meta-analizinde, 18.381 OSB tanılı birey ve 27.969 kontrolün dahil edildiği çalışmada beş ayrı genomik lokus genome boyu anlamlılık düzeyinde OSB ile ilişkilendirilmiş; şizofreni, majör depresyon ve eğitim düzeyi ile genetik mimariyi paylaşan yedi ek lokus daha tanımlanmıştır (Grove ve diğerleri, 2019). Bu bulgular, OSB'nin diğer nörogelişimsel ve nöropsikiyatrik bozukluklarla ortak poligenik bir zemin paylaştığına işaret etmekte, hastalığın genetik mimarisinin son derece heterojen olduğunu doğrulamaktadır.

Bununla birlikte, GWAS çalışmalarının OSB etiyolojisini açıklamadaki katkısı hâlâ sınırlı kalmaktadır. Tek bir yaygın varyantın etkisi son derece küçük olduğundan, bu varyantların birikmeli etkisini değerlendiren poligenik risk skorları OSB araştırmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Havdahl ve diğerleri, 2021).

6.5. Aday Genler ve Nörobiyolojik Yolaklar

Günümüze kadar yürütülen kapsamlı genetik çalışmalar, yüzlerce OSB aday geninin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu genler fonksiyonel açıdan değerlendirildiğinde iki temel yolda yoğunlaştıkları görülmektedir: (1) sinaps oluşumu ve işlevi ile ilgili genler — nöroligin (NLGN), nöreksin (NRXN), SHANK ve SYNGAP gen aileleri bu gruba örnek gösterilebilir; (2)

transkripsiyon düzenlemesi ve kromatin yeniden yapılanması ile ilgili genler — CHD8, ADNP ve ARID1B bu grupta yer almaktadır (Genovese ve Butler, 2023). Özellikle sinaptik genlerdeki mutasyonlar, OSB'de nöronal bağlantı ve sosyal beyin devre oluşumunun bozulmasının temel mekanizması olarak öne çıkmaktadır.

Çeşitli aday genlerin birden fazla nöropsikiyatrik bozuklukla ortaklaşa ilişkilendirilmesi, OSB'nin diğer nörogelişimsel durumlarla biyolojik olarak iç içe geçtiğini göstermektedir. Örneğin 16p11.2 delesyonu OSB ile şizofreni ve entelektüel yetersizlikle de ilişkilendirilmiş; bu durum genetik özgülük sorusunu gündeme taşımıştır (Abedini ve diğerleri, 2024). Majör tek bir nedensel genin tespit edilememesi, OSB'nin multifaktöriyel bir genetik hastalık olduğunu ve önemli bir fenotipik heterojenite sergilediğini yansıtmaktadır (Fernandez ve Scherer, 2017).

7. OSB'DE EPİGENETİK MEKANİZMALAR

7.1. Epigenetiğe Genel Bakış

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesini düzenleyen ve kalıtılabilen mekanizmaları kapsamaktadır. Bu mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olmak üzere üç temel katmanda incelenmektedir. OSB'nin kalıtım oranının yüksekliğine karşın büyük çoğunlukta kesin bir genetik nedenin saptanamaması, epigenetik faktörlerin hastalığın etiolojisindeki rolüne işaret etmektedir. Günümüzde epigenetik değişikliklerin hem genetik yatkınlık hem de çevresel maruziyetlerle etkileşime girerek OSB patogenezi şekillendirdiği kabul görmektedir (Herrera, Paraíso-Luna, Bustos-Martínez ve Barco, 2024).

7.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, sitozin kalıntılarının 5-metilsitozine (5mC) dönüştürülmesini kapsayan ve gen transkripsiyonunu baskılayan en iyi karakterize edilmiş epigenetik mekanizmadır. OSB'li bireylerin beyin dokularında gerçekleştirilen epigenomik çalışmalar, sinaptik ve nörogelişimsel genleri düzenleyen bölgelerde anlamlı DNA metilasyon farklılıklarının varlığını ortaya koymuştur (LaSalle, 2023). Özellikle MECP2, UBE3A ve OXTR gibi genlerin promoter bölgelerindeki anormal metilasyon örüntülerinin OSB fenotipine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (LaSalle, 2023). Epigenomik imzaların plasenta ve kordon kanı gibi periferel dokulardan da saptanabilmesi, bu belirteçlerin erken tanı aracı olarak kullanılma potansiyelini gündeme taşımaktadır (LaSalle, 2023).

7.3. Histon Modifikasyonları

Histonlar, DNA'nın sarıldığı protein yapılarıdır ve bu proteinlerin kuyruklarında gerçekleşen kimyasal modifikasyonlar — asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon — kromatin yapısını ve gen ifadesini doğrudan düzenlemektedir. OSB ile ilişkilendirilen histon modifikasyonları arasında histon asetilasyonu en kapsamlı biçimde çalışılmış olandır. CHD8 ve ADNP gibi OSB risk genlerinin kodladığı proteinlerin kromatin yeniden düzenlenmesinde görev alması, histon modifikasyonlarının hastalıkla olan ilişkisini somutlaştırmaktadır (Herrera ve diğerleri, 2024). Ayrıca valproik asit gibi histon deasetilaz inhibitörlerinin prenatal maruziyetinin OSB benzeri davranışsal fenotiplere yol açtığı hayvan modellerinde gösterilmiş olması, histon asetilasyonunun nörogelişimsel süreçteki kritik rolünü vurgulamaktadır (Herrera ve diğerleri, 2024).

7.4. Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) — başta mikro RNA'lar (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) — gen ifadesinin translasyon sonrası düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. OSB'li bireylerde çeşitli miRNA'ların (örneğin miR-21, miR-146a) ve lncRNA'ların ifade düzeylerinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır; bu değişikliklerin sinaptik protein sentezini ve nöronal olgunlaşmayı bozduğu öne sürülmektedir (Yoon ve diğerleri, 2020). Kodlamayan RNA biyogenezinin bozulması, OSB ile ilişkilendirilen nörogelişimsel yolakları olumsuz etkileyebilmekte ve heterojen klinik tablonun ortaya çıkmasına zemin hazırlayabilmektedir (LaSalle, 2023).

7.5. Epigenetik Mekanizmaların Gen-Çevre Etkileşimindeki Rolü

Epigenetik mekanizmaların en kritik işlevi, genetik yatkınlığı çevresel tetikleyicilerle buluşturan dinamik bir köprü oluşturmalarıdır. Prenatal dönemde toksinlere, enfeksiyonlara ya da beslenme yetersizliklerine maruz kalma, epigenomu kritik nörogelişimsel pencereler sırasında kalıcı biçimde değiştirebilmektedir (Herrera ve diğerleri, 2024). Bu bakış açısıyla OSB, genetik zemin üzerine epigenetik değişimlerin biriktiği çok katmanlı bir bozukluk olarak değerlendirilebilir; yüksek kalıtım oranı ile çevresel risk faktörlerine olan duyarlılığın bir arada bulunması da bu modeli desteklemektedir (LaSalle, 2023).

8. ÇEVRESEL RİSK FAKTÖRLERİ

8.1. Çevresel Faktörlerin OSB Etiyolojisindeki Yeri

OSB etiyolojisinin güçlü bir genetik bileşene sahip olduğu bilinmekle birlikte, ikiz çalışmalarından elde edilen veriler MZ ikizlerde tam bir konkordansın bulunmamasından hareketle

çevresel faktörlerin de hastalık riskine anlamlı katkı sağladığını göstermektedir. OSB riskindeki varyansın %40–50'sine kadar olan bölümünün çevresel etkenler tarafından açıklanabileceği tahmin edilmektedir (Modabbernia, Velthorst ve Reichenberg, 2017). Çevresel risk faktörlerinin büyük çoğunluğu prenatal döneme, yani beyin gelişiminin kritik pencerelerine özgü olmakla birlikte, perinatal ve erken postnatal dönemdeki maruziyetler de OSB riskini şekillendirebilmektedir (Love, Sominsky, O'Hely, Berk, Vuillermin ve Dawson, 2024). OSB ile ilişkilendirilen başlıca çevresel risk faktörleri, maruziyet dönemleri ve kanıt düzeyleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. OSB ile İlişkilendirilen Çevresel Risk Faktörleri ve Kanıt Düzeyleri

Risk faktörü	Maruziyet dönemi	Kanıt düzeyi	Olası mekanizma
İleri ebeveyn yaşı	Konsepsiyon öncesi	Güçlü	De novo mutasyon birikimi, epigenetik değişimler
Prenatal viral enfeksiyon (kızamıkçık, CMV)	Prenatal (1-2. trimester)	Güçlü	Maternal immün aktivasyon, nöronal göç bozukluğu
Valproik asit (antiepileptik) maruziyeti	Prenatal	Güçlü	Histon deasetilaz inhibisyonu, nöral tüp gelişim bozukluğu
Preterm doğum / düşük doğum ağırlığı	Perinatal	Güçlü	Nöronal hipoksi, beyin gelişim bozukluğu
Doğum komplikasyonları (hipoksi/iskemi)	Perinatal	Güçlü	Nöronal hasar, oksidatif stres
Ağır metal maruziyeti (kurşun, cıva)	Prenatal / Postnatal	Orta	Nörotoksisite, oksidatif stres, epigenetik değişimler
Pestisit maruziyeti	Prenatal	Orta	Nörogelişimsel toksisite, immün disregülasyon
Maternal obezite ve diyabet	Prenatal	Orta	İnflamasyon, insülin direnci, mikrobiyom değişiklikleri

Risk faktörü	Maruziyet dönemi	Kanıt düzeyi	Olası mekanizma
Endokrin bozucular (BPA, ftalatlar)	Prenatal	Orta	Hormonal bozukluk, epigenetik modifikasyon
Hava kirliliği (PM2.5, NO2)	Prenatal / Erken postnatal	Orta	Nöroinflamasyon, oksidatif stres
D vitamini eksikliği	Prenatal / Erken çocukluk	Orta	VDR aracılı nörogelişim bozukluğu, immün disregülasyon
SSRI (antidepresan) kullanımı	Prenatal	Zayıf	Serotonin sisteminin gelişimsel bozulması
Aşılar (MMR, tiomersal)	Postnatal	İlişkisiz	Bilimsel kanıt yok; nedensellik reddedilmiştir

Kanıt düzeyi açıklamaları:

Güçlü: Çoklu meta-analiz ve sistematik derlemelerle desteklenen tutarlı bulgular

Orta: Anlamlı ilişki mevcut ancak mekanizma tam aydınlatılamamış veya çalışmalar arası heterojenlik yüksek

Zayıf: Sınırlı kanıt; karıştırıcı faktörler dışlanamıyor

İlişkisiz: Nedensellik bilimsel verilerle reddedilmiştir

Kaynak: Modabbernia ve diğerleri (2017); Love ve diğerleri (2024); Zhang ve diğerleri (2023)

8.2. İleri Ebeveyn Yaşı

Çevresel risk faktörleri arasında en tutarlı biçimde desteklenen bulgu, ileri ebeveyn yaşının OSB riskini artırmasıdır. Sistematik derlemeler ve meta-analizlerin gözden geçirildiği kapsamlı bir çalışmada, anne yaşındaki her 10 yıllık artışın OSB riskini %18, baba yaşındaki her 10 yıllık artışın ise %21 oranında yükselttiği bildirilmiştir (Modabbernia ve diğerleri, 2017). Özellikle ileri baba yaşının etkisi, yaşla birlikte biriken de novo mutasyonlarla ilişkilendirilmekte; bu durum çevresel ve genetik risk faktörlerinin iç içe geçtiğini bir kez daha ortaya koymaktadır (Havdahl ve diğerleri, 2021).

8.3. Prenatal Enfeksiyonlar ve İmmün Aktivasyon

Gebelik döneminde yaşanan enfeksiyonlar ve buna eşlik eden maternal immün aktivasyon, OSB için önemli bir çevresel risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Viral enfeksiyonların (özellikle kızamıkçık, sitomegalovirüs) yanı sıra bakteriyel enfeksiyonlara bağlı ateşin de OSB riskini artırabileceği epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmektedir (Love ve diğerleri, 2024). Prenatal immün aktivasyonun nörogelişimi, özellikle nöral göç, sinaptogenez ve korteks organizasyonunu bozabileceği hayvan modellerinde gösterilmiştir (Modabbernia ve diğerleri, 2017).

8.4. Prenatal İlaç ve Toksin Maruziyeti

Prenatal dönemde bazı ilaç ve toksik maddelere maruziyetin OSB riskini artırabileceğine dair güçlü kanıtlar birikmiştir. Antiepileptik bir ilaç olan valproik asidin gebelikte kullanımı, OSB riskini önemli ölçüde artıran çevresel etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir; bu ilişki hem epidemiyolojik veriler hem de hayvan modelleri tarafından desteklenmektedir (Modabbernia ve diğerleri, 2017). Bunun yanı sıra ağır metaller (kurşun, cıva), pestisitler, endokrin bozucular (özellikle bifenil A ve ftalatlar) ve hava kirliliğine prenatal dönemde maruziyetin nöronal gelişimi olumsuz etkileyerek OSB riskini artırabileceği bildirilmektedir (Love ve diğerleri, 2024).

8.5. Perinatal Komplikasyonlar ve Maternal Sağlık

Doğum komplikasyonları, özellikle hipoksi ve iskemi ile ilişkili olanlar, OSB için anlamlı bir risk faktörü oluşturmaktadır. Preterm doğum, düşük doğum ağırlığı ve neonatal hipoksi gibi perinatal olayların OSB ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Modabbernia ve diğerleri, 2017). Maternal obezite ve diyabet de OSB riskinde artış ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte bu ilişkinin mekanizması — inflamasyon, insülin direnci ve

mikrobiyom değişikliklerini kapsayacak biçimde — tam olarak aydınlatılamamıştır (Love ve diğerleri, 2024).

8.6. Aşılar ve OSB: Kanıta Dayalı Bir Değerlendirme

Toplumsal kaygı konusu olan aşı-OSB ilişkisi, bilimsel veriler ışığında kesin biçimde reddedilmiştir. Kapsamlı meta-analizler, MMR aşısı, tiomersal ve diğer aşı bileşenlerinin OSB riski üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını ortaya koymaktadır (Modabbernia ve diğerleri, 2017). Bu konudaki yanlış bilgilendirmenin kaynağı olan 1998 tarihli Wakefield çalışması, ciddi metodolojik kusurlar ve etik ihlaller nedeniyle geri çekilmiş olup bilimsel geçerliliği bulunmamaktadır.

9. OSB'DE CİNSİYET FARKLILIKLARI

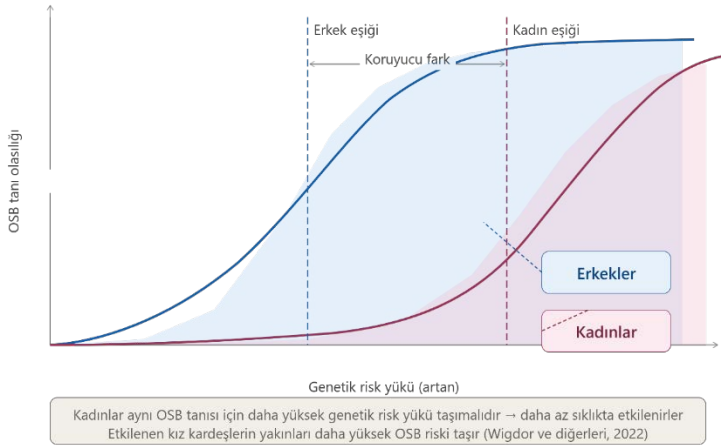
9.1. Erkek Yatkınlığı ve Prevalans Farklılıkları

OSB'nin en belirgin epidemiyolojik özelliklerinden biri, cinsiyetler arasındaki derin prevalans eşitsizliğidir. Hastalık, kız çocuklarına kıyasla erkek çocuklarda yaklaşık 3–4 kat daha sık görülmektedir; bu oran toplum tabanlı çalışmalarda 3:1 ile 4:1 arasında değişmektedir (Napolitano, Schiavi, La Rosa ve diğerleri, 2022). Ancak bu oranın tüm OSB şiddet düzeylerinde sabit olmadığı dikkat çekicidir; eşlik eden entelektüel yetersizlik varlığında erkek/kız oranının 2:1'e gerildiği bildirilmekte, bu durum ağır tablolarda cinsiyetin koruyucu etkisinin görece azaldığına işaret etmektedir (Napolitano ve diğerleri, 2022).

9.2. Kadın Koruyucu Etki Modeli

Erkeklerdeki yüksek OSB prevalansını açıklamaya yönelik en güçlü çerçeve, "kadın koruyucu etki" (female protective effect, FPE) modelidir. Bu modele göre OSB riski nicel bir dağılım göstermekte, kız çocukları aynı semptom şiddetine ya da aynı genetik yük düzeyine ulaşmak için erkeklerden daha fazla risk birikimine ihtiyaç duymaktadır. Büyük ölçekli bir genetik

çalışmada, kız çocuklarında nadiren görülen yüksek penetranslı de novo mutasyonların oranının erkeklerinkinden anlamlı biçimde yüksek olduğu gösterilmiş; bu bulgu FPE modelini destekleyen önemli bir kanıt olarak değerlendirilmiştir (Wigdor ve diğerleri, 2022). Söz konusu model, aynı zamanda kız kardeşleri OSB tanılı kız çocuklarının erkek kardeşleri OSB tanılı erkek çocuklarının kardeşlerine kıyasla daha yüksek OSB riskine sahip olduğunu öngörmekte olup bu öngörü aile çalışmalarıyla tutarlılık göstermektedir (Wigdor ve diğerleri, 2022). Erkek ve kadınlarda OSB gelişimi için gerekli genetik risk yükü eşliğinin farklılığı, kadın koruyucu etki modeli çerçevesinde Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Kadın koruyucu etki modeli — OSB'de yük eşliği diyagramı.

9.3. Aşırı Erkek Beyni Teorisi

Simon Baron-Cohen tarafından önerilen "aşırı erkek beyni" (extreme male brain) teorisi, otizmin insan bilişsel farklılıklarının erkek ucunda yer alan aşırı bir profili temsil ettiğini öne sürmektedir. Bu teoriye göre insan bilişi "sistematize etme" ve "empati kurma" olarak iki temel eksenle tanımlanabilir;

erkek beyni sistematize etmeye, kadın beyni ise empati kurmaya yönelik daha güçlü bir eğilim sergilemektedir. Otizm ise bu çerçevede sistematize etmenin aşırı biçimde ön plana çıktığı, empatinin ise geri planda kaldığı bir profil olarak konumlandırılmaktadır (Napolitano ve diğerleri, 2022). Ancak bu teorinin her kültürel bağlamda geçerliliği ve aşırı basitleştirme içerip içermediği tartışma konusu olmaya devam etmektedir.

7.5. Kız Çocuklarında Tanısal Güçlükler: Kamufraj ve Maskeleme

OSB'deki cinsiyet farklılıkları yalnızca gerçek biyolojik prevalans farkından kaynaklanmıyor olabilir; tanısal önyargı ve cinsiyet beklentileri de bu eşitsizliğe katkıda bulunabilmektedir. Kız çocuklarının ve kadınların OSB semptomlarını sosyal beklentilere uyum sağlamak amacıyla bilinçli ya da bilinçdışı olarak gizleme stratejisi kullandıkları bilinmektedir — bu süreç literatürde "kamufraj" (camouflage) ya da "maskeleme" (masking) olarak tanımlanmaktadır (Milner, Colvert, Hull ve diğerleri, 2024). Otistik kız çocukları ve kadınlar, göz temasını taklit etme, sosyal senaryoları öğrenme ve davranışlarını nörotipik normlara uyarlama gibi stratejiler geliştirerek semptomlarını örtdebilmektedir. Bu durum tanı gecikmeleri ile doğrudan ilişkili bulunmuş; yüksek düzeyde kamufraj sergileyen kız çocuklarının erkek yaşlılarına kıyasla anlamlı ölçüde daha geç tanı aldığı gösterilmiştir (Milner ve diğerleri, 2024).

Mevcut tanı araçlarının büyük çoğunluğunun erkek örneklemeler üzerinde geliştirilmiş ve doğrulanmış olması, kız çocukları ve kadınlarda tanısal duyarlılığı azaltmaktadır. Otistik kız çocuklarının sınırlı ve tekrarlayan ilgi alanları ile sosyal güçlükleri, toplumsal cinsiyet normlarıyla daha iyi örtüşen biçimlerde tezahür edebilmektedir; bu durum semptomların klinisyenler tarafından gözden kaçırılmasına zemin hazırlamaktadır (Napolitano ve diğerleri, 2022).

9.5. Hormonal ve Genetik Mekanizmalar

Cinsiyet farklılıklarının altında yatan biyolojik mekanizmalar henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Prenatal testosteron maruziyetinin sosyal beyin gelişimini etkileyebileceği ve erkeklerde OSB yatkınlığını artırabileceği öne sürülmüştür; bununla birlikte bu hipotezi destekleyen kanıtlar hâlâ tartışmalıdır (Napolitano ve diğerleri, 2022). X kromozomuna bağlı genetik mekanizmaların da cinsiyete özgü riski açıklayabileceği düşünülmekte, X-bağılantılı genler üzerindeki varyasyonların erkeklerde daha doğrudan fenotipik etkilere yol açabileceği ileri sürülmektedir (Wigdor ve diğerleri, 2022).

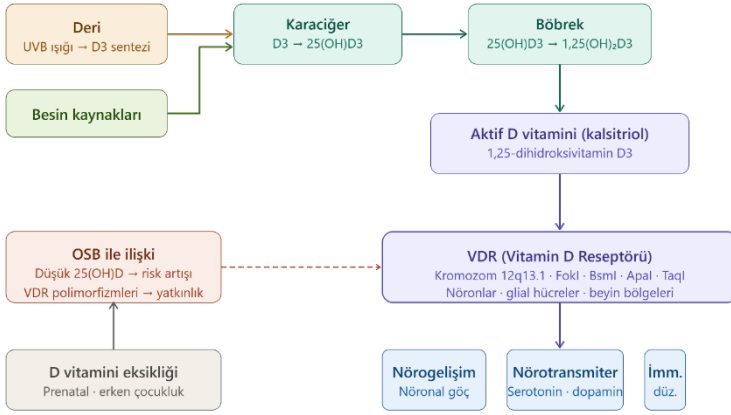
10. D VİTAMİNİ, VDR GENİ VE OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU

10.1. D Vitamininin Nörogelişimsel Rolü

D vitamini, uzun süre yalnızca kemik sağlığı ve kalsiyum metabolizması ile ilişkilendirilen bir steroid hormon olarak tanımlanmış; ancak son yıllarda beyin gelişimindeki kritik rolü giderek daha net biçimde ortaya konmaya başlanmıştır. "Güneş ışığı vitamini" olarak da bilinen D vitamini, deri tarafından UVB ışığına maruz kalma yoluyla sentezlenmekte; karaciğerde 25-hidroksivitamin D3'e [25(OH)D3], ardından böbrekte biyolojik aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D3'e [1,25(OH)2D3] dönüştürülmektedir (Wang, Huang, Liu ve diğerleri, 2022). D vitamininin deriden sentezlenerek aktif forma dönüşümü, VDR'ye bağlanması ve nörogelişimsel etkileri Şekil 2'de özetlenmiştir.

D vitamininin tüm genomik aktivitelerini, vitamin D reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. VDR, nöronlar ve glial hücrelerde ifade edilmekte; hipokampus, talamik çekirdekler, hipotalamus, substantia nigra, orbitofrontal

korteks ve amigdala gibi beyin bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Wang ve diğerleri, 2022). D vitamini; nörotransmitter sentezi (serotonin, dopamin), nörotrofin düzenlemesi, oksidatif stres kontrolü ve immünomodülasyon yoluyla beyin gelişimini etkilemektedir. Prenatal dönemde D vitamini eksikliğinin hücre proliferasyonu, nöronal göç ve sinaptogenezi bozarak nörogelişimsel sonuçlara olumsuz etkide bulunabileceği hayvan modelleri ve epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmektedir (Wang ve diğerleri, 2022).



Şekil 2. D vitamini metabolizma yolağı ve VDR'nin konumu.

10.2. D Vitamini Düzeyleri ve OSB İlişkisi

OSB'li çocuklarda serum 25(OH)D düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı ölçüde düşük olduğu çok sayıda çalışmada bildirilmiştir. 870 OSB tanılı çocuk ile 782 sağlıklı kontrolü kapsayan bir meta-analizde, OSB'li grupta 25(OH)D düzeylerinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğu gösterilmiştir (Zhang, Wu, Lu ve diğerleri, 2023). Bununla birlikte, bu ilişkinin nedensellik boyutu tartışmalı olmaya devam etmektedir: D vitamini eksikliği OSB'ye yatkınlık oluşturabilir ya da OSB ile ilişkili beslenme ve güneş maruziyeti

farklılıkları sonucunda ikincil olarak gelişebilir (Zhang ve diğerleri, 2023).

Prenatal D vitamini düzeylerinin de OSB riski ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. İkinci trimesterde düşük maternal 25(OH)D düzeyi (<20 ng/mL) ile çocukta daha fazla OSB ile ilişkili semptom, daha zayıf sosyal beceri ve daha yüksek davranış problemleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Wang ve diğerleri, 2022). D vitamini takviyesinin OSB semptomları üzerindeki etkisini değerlendiren randomize kontrollü çalışmaların meta-analizinde, takviyenin sosyal farkındalık ve tekrarlayan davranışlar gibi OSB belirtilerinde kısmi iyileşme sağlayabileceği gösterilmiş; ancak sonuçlar henüz kesin değildir ve büyük ölçekli uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2023).

10.3. Vitamin D Reseptör (VDR) Geni ve Polimorfizmleri

VDR geni, 12q13.1 kromozomal lokasyonunda yer almakta, dokuz ekzon ve sekiz introndan oluşmakta ve kollajen tip II alfa 1 (COL2A1) geninin yanında lokalize bulunmaktadır. Gen üzerinde işlevsel etkileri olduğu gösterilmiş çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın çalışılanlar; başlangıç kodonunda yer alan FokI (rs2228570), intron 8 bölgesindeki BsmI (rs1544410) ve ApaI (rs7975232), ve 3'UTR bölgesindeki TaqI (rs731236) polimorfizmleridir. Bu polimorfizmler VDR mRNA'sının stabilitesini, protein yapısını ve reseptörün transkripsiyon aktivitesini etkilemekte; dolayısıyla D vitamini sinyal yolağının etkinliğini doğrudan belirlemektedir (Wang ve diğerleri, 2022).

FokI polimorfizmi, VDR geninde tanımlanan tek protein polimorfizmi olma özelliğini taşımaktadır. Başlangıç kodonundaki T/C değişimi, 427 amino asitlik uzun (f alleli) veya 424 amino asitlik kısa (F alleli) olmak üzere iki farklı VDR

proteini oluşturmaktadır; kısa formun daha güçlü transkripsiyon aktivasyonu sergilediği gösterilmiştir.

10.4. VDR Polimorfizmleri ve OSB İlişkisine Dair Çalışmalar

VDR polimorfizmleri ile OSB arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar son on yılda belirgin biçimde artmıştır. Çalışmalar, farklı popülasyonlara göre değişen sonuçlar bildirmiş olmakla birlikte, özellikle TaqI ve FokI polimorfizmlerinin OSB yatkınlığı ile daha tutarlı bir ilişki gösterdiği gözlemlenmektedir. Türk popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada TaqI'nın CC genotipinin ve FokI'nın TT genotipinin OSB riskinde artışla anlamlı biçimde ilişkili olduğu bildirilmiş; ApaI genotipinin ise önemli bir risk faktörü oluşturmadığı ifade edilmiştir (Coşkun, Şimşek, Camkurt, Çim ve Çelik, 2016). Çin Han popülasyonunda yürütülen bir başka çalışmada ise TaqI rs731236'nın CT genotipinin ve C allelinin OSB riski artışıyla ilişkili olduğu saptanmış, diğer polimorfizmler için ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Zhang, Li, Yu ve Liu, 2018).

Öte yandan CHARGE (Genetik ve Çevre Kaynaklı Çocukluk Çağı Otizm Riskleri) çalışmasında, VDR geni üzerindeki rs731236'daki paternal CC genotipinin OSB riskini anlamlı ölçüde artırdığı bildirilmiş; bu ilişkinin tek başına değil, D vitamini metabolizması yolağındaki diğer gen varyasyonlarıyla kombinasyon halinde daha güçlü bir etki gösterdiği vurgulanmıştır (Schmidt ve diğerleri, 2015).

VDR polimorfizmlerinin OSB'deki rolüne ilişkin kanıtlar umut verici olmakla birlikte, popülasyonlar arası tutarsız sonuçlar ve küçük örneklem büyüklükleri nedeniyle kesin bir sonuca ulaşılamamaktadır. Bu alanda yürütülecek daha geniş kapsamlı, çok merkezli ve farklı etnik grupları içeren çalışmalar, VDR-OSB ilişkisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

11. SONUÇ

Otizm spektrum bozukluğu, etiyolojisinin karmaşıklığı ve fenotipik heterojenliği bakımından günümüz tıbbi araştırmalarının en zorlu konularından biri olmaya devam etmektedir. Bu bölümde ele alınan veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, OSB'nin tek bir nedenle açıklanamayacağı, aksine genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birbiriyle dinamik bir etkileşim içinde olduğu çok katmanlı bir hastalık modeli netlik kazanmaktadır.

İkiz ve aile çalışmaları, hastalığın güçlü bir kalıtsal bileşene sahip olduğunu tutarlı biçimde ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yüksek kalıtım oranı tek başına osb'nin "saf genetik" bir hastalık olduğu anlamına gelmemektedir; monozigot ikizlerdeki tam olmayan konkordans, paylaşılmış çevresel etkenler ile epigenetik mekanizmaların da tabloya katkıda bulunduğunu göstermektedir. CNV çalışmaları ve GWAS verileri, OSB'nin son derece heterojen bir genetik mimariye sahip olduğunu, yüzlerce risk geninin belirlendiğini ve bu genlerin büyük çoğunluğunun sinaptik işlev ile nöronal bağlantıyı düzenleyen yolaklarda yoğunlaştığını göstermektedir. Majör tek bir nedensel genin tespit edilemiyor olması, OSB'nin poligenik ve multifaktöriyel yapısının en belirgin yansımasıdır.

Epigenetik mekanizmalar — başta DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları — hastalığın etiyolojisinde giderek daha merkezi bir konuma taşınmaktadır. Bu mekanizmalar, genetik yatkınlığı prenatal dönem başta olmak üzere çevresel maruziyetlerle buluşturan kritik bir köprü işlevi üstlenmektedir. İleri ebeveyn yaşı, prenatal enfeksiyonlar, toksin maruziyetleri ve perinatal komplikasyonlar gibi çevresel risk faktörlerinin genetik zemin üzerine bindirilen epigenetik değişimler yoluyla OSB riskini artırabildiği günümüzde artık daha iyi anlaşılmaktadır.

Cinsiyete özgü farklılıklar da OSB araştırmalarının önemli bir gündem maddesi haline gelmiştir. Erkek yatkınlığını açıklayan "kadın koruyucu etki" modeli, kız çocuklarında OSB'nin ortaya çıkması için daha yüksek bir genetik yük eşiğine ihtiyaç duyulduğunu öngörmekte; bu öngörü geniş ölçekli genetik çalışmalarla desteklenmektedir. Kadın ve kız çocuklarındaki kamuflej ve maskeleye davranışları, tanısız gecikmelere yol açmakta ve mevcut tanı araçlarının cinsiyet duyarlılığı konusundaki sınırlılıklarını gün yüzüne çıkarmaktadır.

Son olarak, D vitamini ve VDR geni polimorfizmleri, OSB'nin çevresel ve genetik risk faktörlerinin kesişme noktasında ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturmaktadır. D vitamininin nörogelişimsel süreçlerdeki rolleri ve OSB'li bireylerde gözlemlenen düşük 25(OH)D düzeyleri, prenatal D vitamini durumunun ve VDR genindeki işlevsel polimorfizmlerin hastalık yatkınlığına katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir. Bu ilişkinin nedensellik boyutu ve klinik önemi, farklı popülasyonlarda yürütülecek daha kapsamlı çalışmalarla aydınlatılmayı beklemektedir.

Genetik analiz yöntemlerindeki hızlı ilerleme, tüm genom dizileme, uzun okuma dizileme ve tek hücre çözünürlüğünde epigenomik analiz gibi yeni teknolojiler OSB araştırmalarına ivme kazandırmaktadır. Bununla birlikte, OSB'nin gerçek anlamda anlaşılabilmesi için genetik verinin klinik fenotiplerle, çevresel ölçümlerle ve işlevsel nörobiyoloji bulgularıyla entegre edildiği bütüncül yaklaşımların benimsenmesi kaçınılmazdır. Erken tanı, biyobelirteç araştırmaları ve bireye özgü müdahale stratejilerinin geliştirilmesi, bu alandaki temel araştırma hedefleri olmaya devam etmektedir.

KAYNAKÇA

- Abedini, S. S., Akhavantabasi, S., Liang, Y., Heng, J. I., Alizadehsani, R., Dehzangi, I., Bauer, D. C., ve Alinejad-Rokny, H. (2024). A critical review of the impact of candidate copy number variants on autism spectrum disorder. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 794, 108509. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2024.108509>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5. baskı). American Psychiatric Publishing. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Coşkun, S., Şimşek, Ş., Camkurt, M. A., Çim, A., ve Çelik, S. B. (2016). Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene and serum 25-hydroxyvitamin D levels in children with autism spectrum disorder. *Gene*, 588(2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.004>
- Fernandez, B. A., ve Scherer, S. W. (2017). Syndromic autism spectrum disorders: Moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(4), 353–371. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.4/sscherer>
- Genovese, A., ve Butler, M. G. (2023). The autism spectrum: Behavioral, psychiatric and genetic associations. *Genes*, 14(3), 677. <https://doi.org/10.3390/genes14030677>
- Global Burden of Disease Study 2021 Autism Spectrum Collaborators. (2025). The global epidemiology and health burden of the autism spectrum: Findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Psychiatry*, 12(2), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(24\)00363-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(24)00363-8)

- Grove, J., Ripke, S., Als, T. D., Mattheisen, M., Walters, R. K., Won, H., ... ve Børglum, A. D. (2019). Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nature Genetics*, 51(3), 431–444. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0344-8>
- Havdahl, A., Niarchou, M., Starnawska, A., Uddin, M., van der Merwe, C., ve Warrier, V. (2021). Genetic contributions to autism spectrum disorder. *Psychological Medicine*, 51(13), 2260–2273. <https://doi.org/10.1017/S0033291721000192>
- Herrera, M. L., Paraíso-Luna, J., Bustos-Martínez, I., ve Barco, Á. (2024). Targeting epigenetic dysregulation in autism spectrum disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 30(11), 1028–1046. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.06.004>
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217–250.
- LaSalle, J. M. (2023). Epigenomic signatures reveal mechanistic clues and predictive markers for autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 28(5), 1890–1901. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01917-9>
- Love, C., Sominsky, L., O'Hely, M., Berk, M., Vuillermín, P., ve Dawson, S. L. (2024). Prenatal environmental risk factors for autism spectrum disorder and their potential mechanisms. *BMC Medicine*, 22, 393. <https://doi.org/10.1186/s12916-024-03617-3>
- Milner, V., Colvert, E., Hull, L., Cook, J., Ali, D., Mandy, W., ve Happé, F. (2024). Does camouflaging predict age at autism diagnosis? A comparison of autistic men and women. *Autism Research*, 17(3), 626–636. <https://doi.org/10.1002/aur.3059>

- Mintz, M. (2017). Evolution in the understanding of autism spectrum disorder: Historical perspective. *Indian Journal of Pediatrics*, 84(1), 44–52. <https://doi.org/10.1007/s12098-016-2080-8>
- Modabbernia, A., Velthorst, E., ve Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: An evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
- Napolitano, A., Schiavi, S., La Rosa, P., Rossi-Espagnet, M. C., Petrillo, S., Bottino, F., ... ve Vicari, S. (2022). Sex differences in autism spectrum disorder: Diagnostic, neurobiological, and behavioral features. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 889636. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.889636>
- Oner, O., ve Munir, K. M. (2020). Modified Checklist for Autism in Toddlers Revised (MCHAT-R/F) in an urban metropolitan sample of young children in Turkey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 50(9), 3312–3319. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-04160-4>
- Posar, A., ve Visconti, P. (2023). Autism spectrum disorder and the diagnostic and statistical manual of mental disorders—fifth edition (DSM-5): The experience of 10 years. *Turkish Archives of Pediatrics*, 58(6), 658–659. <https://doi.org/10.5152/TurkArchPediatr.2023.23149>
- Schmidt, R. J., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Sconberg, J. L., Schmidt, L. C., Volk, H. E., ve Tassone, F. (2015). Selected vitamin D metabolic gene variants and risk for autism spectrum disorder in the CHARGE Study. *Early Human Development*, 91(8), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.05.008>

- Schmidt, R. J., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Sconberg, J. L., Schmidt, L. C., ... ve Hertz-Picciotto, I. (2015). Selected vitamin D metabolic gene variants and risk for autism spectrum disorder in the CHARGE Study. *Early Human Development*, 91(8), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.05.008>
- Shaw, K. A., Williams, S., Patrick, M. E., Valencia-Prado, M., Durkin, M. S., Howerton, E. M., ... ve Maenner, M. J. (2025). Prevalence and early identification of autism spectrum disorder among children aged 4 and 8 years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 16 sites, United States, 2022. *MMWR Surveillance Summaries*, 74(2), 1–22. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7402a1>
- Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., ve Rijdsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 57(5), 585–595. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12499>
- Volkmar, F. R., ve Reichow, B. (2013). Autism in DSM-5: Progress and challenges. *Molecular Autism*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-13>
- Wang, J., Huang, H., Liu, C., Zhang, Y., Wang, W., Zou, Z., Yang, L., He, X., Wu, J., Ma, J., ve Liu, Y. (2022). Research progress on the role of vitamin D in autism spectrum disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 859151. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.859151>
- Wigdor, E. M., Weiner, D. J., Grove, J., Fu, J. M., Thompson, W. K., Carey, C. E., ... ve Robinson, E. B. (2022). The female protective effect against autism spectrum disorder. *Cell Genomics*, 2(6), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100134>

- Yoon, S. H., Choi, J., Lee, W. J., ve Do, J. T. (2020). Genetic and epigenetic etiology underlying autism spectrum disorder. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 966. <https://doi.org/10.3390/jcm9040966>
- Zhang, M., Wu, Y., Lu, Z., Song, M., Huang, X., Mi, L., Yang, J., ve Cui, X. (2023). Effects of vitamin D supplementation on children with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 21(2), 240–251. <https://doi.org/10.9758/cpn.2023.21.2.240>

FUNCTIONAL CONSEQUENCES AND PHENOTYPIC MANIFESTATIONS OF GENETIC VARIATIONS

Merve Dolunay UYANIK¹

Gönül Zişan ÖNCEL²

1. INTRODUCTION

Genetic variation refers to the hereditary differences in the DNA sequences of individuals of the same species. These differences are not only a fundamental source of biological diversity but also play a significant role in shaping evolutionary processes. Changes in the DNA sequence can range from the differentiation of a single nucleotide to major chromosomal rearrangements (Auton et al., 2015). Today, genomic research has revealed that the effect of a variant cannot be explained solely by changes in the DNA sequence. The biological outcome of a genetic change is shaped by the combined effects of many factors, including the genomic region where it is located, the regulatory elements it affects, epigenetic properties, and chromatin organization within the cell nucleus (ENCODE Project Consortium, 2012). Therefore, when evaluating the cellular and clinical consequences of genetic variations, the variant's location within the genome and its functional context must be considered together.

¹ Phd Student, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, TemelTıp Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0009-0004-6856-4002.

² Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, TemelTıp Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0003-4018-9920.

Single-base changes occurring in any region of the genome are defined as single-nucleotide variants (SNVs). Variants found at a frequency above a certain threshold in the population have traditionally been referred to as single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (Auton et al., 2015). Although a threshold of approximately 1% minor allele frequency has been used to distinguish between these categories for many years, large-scale genome projects and variation databases have shown that this threshold does not constitute a definitive biological boundary. The biological consequence of a genetic variation depends not only on the DNA sequence difference but also on the regulatory properties of the affected genomic region and its cellular context (Auton et al., 2015)

In the early days of genetics, biological functions were largely explained in terms of protein-coding genes. However, with the development of high-throughput sequencing technologies, it has become clear that genes are not independent entities. Gene expression is shaped by transcription factors, epigenetic regulation, chromatin accessibility, and the three-dimensional organization of the genome (ENCODE Project Consortium, 2012; Lieberman-Aiden et al., 2009). Therefore, the same variant can produce different outcomes in different cell types, tissues, or developmental stages (Center). To accurately interpret the effect of a variant, it is necessary to consider not only the change in the DNA sequence but also the conditions and the level of expression of the relevant gene.

Figure 1 summarizes how the molecular and phenotypic effects of genetic variations manifest at different biological levels. This section will address the mechanisms underlying genetic variation, the main types of variation, and how these changes affect cellular functions. Additionally, it will examine the regulation of gene expression, copy number variations, the functions of non-coding genomic regions, chromatin

organization, genotype–phenotype relationships, gene–gene interactions, and the genetic foundations of complex diseases.

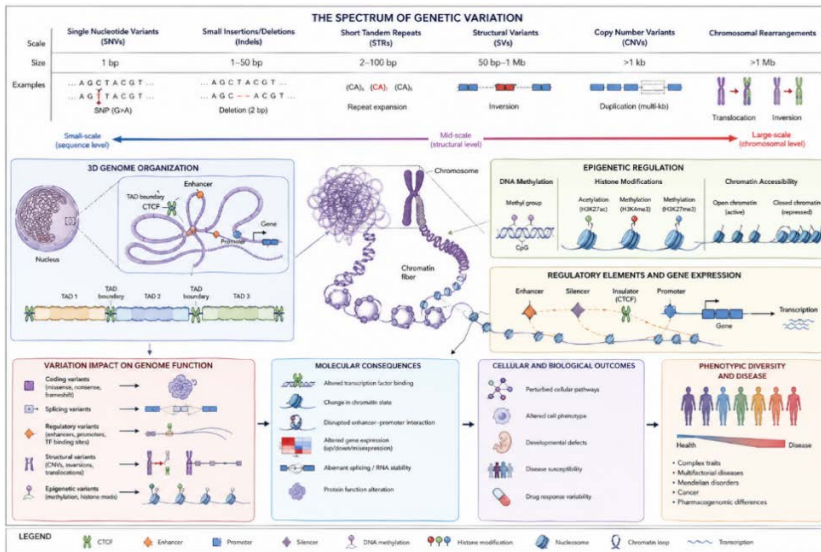


Figure 1. The spectrum of genetic variation and its functional effects. The effects of genomic changes—ranging from single-nucleotide variants to structural variations—on gene expression and the phenotype are illustrated.

2. MECHANISMS OF GENETIC VARIATION AND POPULATION DYNAMICS

Genetic variations arise from the interaction between DNA changes and the cellular mechanisms that correct them. A significant portion of new variants arises from errors during DNA replication. Although DNA polymerases work with high accuracy, they can occasionally incorporate the wrong base. Most of these errors are corrected by the 3'→5' proofreading activity of the polymerases and subsequent DNA repair systems. Nevertheless, some changes become permanent and can be incorporated into the genome as single-base changes or short insertions and deletions (Kunkel, 2004). In addition to replication

errors, DNA is exposed to endogenous damage generated during cellular metabolism and to various physical and chemical stresses from environmental factors.

One of the best-known examples of spontaneous DNA damage is cytosine deamination. In particular, the conversion of 5-methylcytosine to thymine accounts for a significant portion of the C→T transitions frequently observed in mammalian genomes. For this reason, methylated CpG dinucleotides are considered among the regions of the genome most prone to mutation (Cooper & Youssoufian, 1988). In contrast, CpG islands are often unmethylated and exhibit lower mutation rates. Reactive oxygen species generated within the cell can also cause oxidative base damage. Environmental sources of damage include pyrimidine dimers formed by ultraviolet radiation, double-strand breaks caused by ionizing radiation, and DNA alterations induced by various chemical mutagens (Hoeijmakers, 2009; Lindahl, 1993).

Whether a DNA damage event results in a permanent mutation depends largely on the effectiveness of repair systems. Base excision repair is responsible for repairing small base damage, while nucleotide excision repair removes large DNA lesions. The mismatch repair system corrects base-pairing errors that arise after replication, while double-strand breaks are repaired via homologous recombination or non-homologous end-joining mechanisms (Hoeijmakers, 2009). Genetic defects in these systems lead to an increase in the mutation burden and are associated with various hereditary cancer syndromes. Therefore, the amount of variation in the genome reflects not only the rate of mutation formation but also the cell's capacity to maintain DNA integrity.

Repetitive regions of the genome and mobile genetic elements also play important roles in generating genetic diversity.

Homologous recombination and crossing-over events that occur during meiosis increase diversity within a population by enabling alleles to form new combinations. In addition, mobile genetic elements and repetitive DNA sequences can create suitable regions for genomic rearrangements. Alu sequences, which are widely found in the human genome, are members of the SINE family and, together with LINE elements, can facilitate misalignment events. These events, occurring on segmental duplications and other repetitive regions, contribute to the formation of deletions, duplications, and more complex structural changes (Lee & Scherer, 2010). The key mechanisms involved in the emergence of structural variations are summarized in Figure 3.

Newly emerging variations are shaped over time by various evolutionary processes at the population level. Although a large portion of the human genome is shared among individuals, it contains millions of sites of variation (Auton et al., 2015). Variants with deleterious effects typically decline under negative selection, whereas alleles conferring a fitness advantage may become more prevalent through positive selection. Genetic drift, on the other hand, causes allele frequencies to change randomly, particularly in small populations. Demographic processes such as the founder effect, population bottlenecks, and migration also contribute to the variation in variant frequencies across populations. Therefore, the allele frequencies observed today are the result not only of mutation events but also of the evolutionary history of populations (Auton et al., 2015; Hartl, 2018).

One of the key factors determining the biological consequences of mutations is the cell type in which the change occurs. Changes that arise in sex e cells and can be passed on to subsequent generations are defined as germline variations. In contrast, somatic variations, which occur only in specific cells or tissues, are limited to the individual. While germline variations

underlie hereditary diseases and normal genetic diversity, somatic variations are particularly associated with cancer development and mosaicism. The accumulation of new mutations in cells throughout life leads to the somatic genome becoming increasingly heterogeneous, a process considered one of the molecular hallmarks of aging (Lodato et al., 2018).

The distribution of mutations observed in the genome is not random. Different mutation processes create their own distinctive patterns of change. Deamination of methylated cytosines, ultraviolet radiation, tobacco-derived carcinogens, or DNA repair defects can lead to the occurrence of specific mutation types at varying rates. These patterns are referred to as mutational signatures and are used, particularly in cancer genomes, to determine the origin of mutations (Alexandrov et al., 2020; Alexandrov et al., 2013). Mutation rates are also not homogeneous across the genome. While mutation accumulation is higher in regions that replicate late and exhibit heterochromatin characteristics, mutation rates are generally lower in regions that replicate early and exhibit an open chromatin structure (Schuster-Böckler & Lehner, 2012). This indicates that mutation formation depends not only on the DNA sequence but also on chromatin organization and genomic architecture (Lieberman-Aiden et al., 2009).

3. CLASSIFICATION OF GENETIC VARIATIONS

Genetic variations are generally classified into two groups based on the size of the DNA region they affect: small-scale variations and structural variations. While this classification is useful for descriptive purposes, the key factor determining a variant's biological effect is not the size of the change but rather which part of the genome it affects. Two variations of the same

size can lead to completely different biological outcomes depending on the genes or regulatory regions they affect (Auton et al., 2015). The spectrum of genomic variations in terms of size and scope is shown in Figure 2.

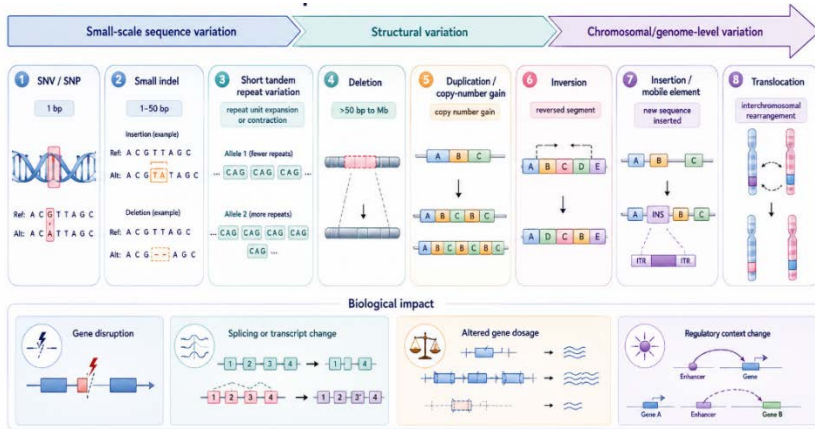


Figure 2. The scale spectrum of genomic variations.

3.1. Point Mutations and Small-Scale Variations

Small-scale variations include single-base changes, short insertions and deletions (indels), and short tandem repeat (STR) changes (Auton et al., 2015). Although their size is limited, they can have significant functional consequences when located in protein-coding regions, splice sites, promoters, enhancers, or non-coding regions (Maurano et al., 2012).

Single-base changes are classified into two groups based on their chemical properties: transitions and transversions. Transitions refer to changes that occur within the same base class, while transversions involve the conversion of a purine base into a pyrimidine base or vice versa. Although theoretically more transversions are possible, transitions are more common in the human genome due to deamination events that frequently occur in methylated CpG regions (Auton et al., 2015; Cooper & Youssoufian, 1988)

The biological effect of indels depends on the number of nucleotides altered. Insertions or deletions that are not multiples of three alter the reading frame, causing a frameshift. As a result, the downstream amino acid sequence may change, and early stop codons often arise. In contrast, when three or a multiple of three bases are inserted or deleted, the reading frame is preserved, and specific amino acids are either lost or gained in the protein (Pagel et al., 2017).

Short tandem repeats (STRs) typically consist of sequential repeats of sequences ranging from two to six base pairs in length. Because they exhibit high polymorphism, they are widely used in forensic genetics, pedigree analysis, and population studies. However, in some STR regions, an increase in repeat number beyond certain thresholds is associated with disease development. The expansion of CAG repeats in the HTT gene in Huntington's disease and the increase in CGG repeats in the FMR1 gene in Fragile X syndrome are among the best-known examples of this phenomenon (Bahlo et al., 2018).

At the core of repeat expansions lies the tendency of DNA polymerase to slip along repetitive sequences (replication slippage). This mechanism can increase or decrease the number of repeats. In many repeat expansion disorders, the tendency for repeat numbers to increase across generations underlies a phenomenon known as anticipation (Mirkin, 2007). For this reason, STR regions are considered one of the most dynamic sources of variation in the genome.

Variants in protein-coding regions are classified into different categories, such as synonymous, missense, nonsense, frameshift, loss of start codon, gain of stop codon, loss of stop codon, and splicing site variants. However, knowing the variant type alone is not sufficient to predict the functional outcome. The effect of a change must be evaluated in conjunction with the

gene's function, its level of evolutionary conservation, the tissues in which it is expressed, and available experimental evidence (Richards et al., 2015).

3.2. Structural Genomic Changes

Structural variations are generally defined as changes affecting DNA regions larger than 50 base pairs and include deletions, duplications, inversions, translocations, and large insertions (Stankiewicz & Lupski, 2010). These changes can affect not only a single gene but also large genomic regions containing numerous genes and regulatory elements.

Deletions refer to the loss of a specific DNA region, while duplications involve the formation of additional copies of the same region. In both cases, gene dose balance may change. Although inversions do not alter the total amount of DNA, functional consequences may arise if the breakpoints coincide with a gene or regulatory region. Translocations occur through the transfer of DNA segments between chromosomes; while balanced translocations preserve the total genetic material, unbalanced translocations can lead to changes in gene dosage. Insertions, on the other hand, often result from the activity of mobile genetic elements (Lee et al., 2007; Stankiewicz & Lupski, 2010).

Repetitive DNA regions play a significant role in the formation of structural variations. Segmental duplications and low-copy repeats are prone to misalignment and can lead to deletions or duplications via non-allelic homologous recombination (NAHR) (Lee & Scherer, 2010). In addition, non-homologous end joining, microhomology-mediated mechanisms, and replication-based processes also contribute to the formation of structural rearrangements. Replication fork stalling and template switching (FoSTeS) and microhomology-mediated break-triggered replication (MMBIR) are recognized as

important models, particularly in explaining complex genomic rearrangements (Hastings et al., 2009; Lee et al., 2007). The primary mechanisms of structural variation formation and their genomic consequences are summarized in Figure 3.

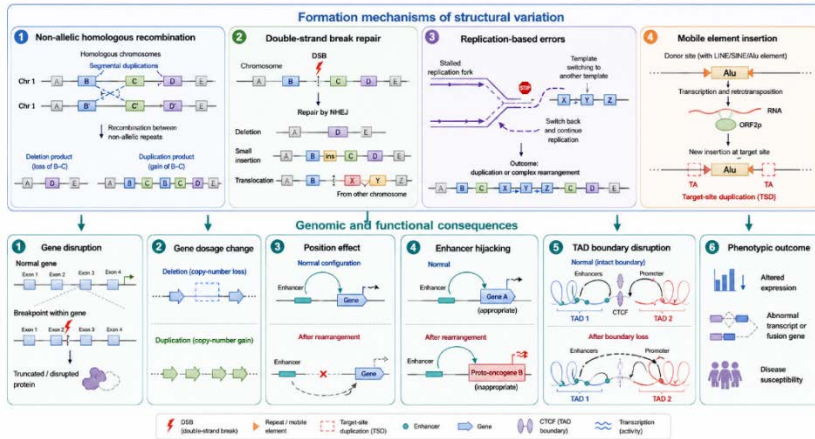


Figure 3. Mechanisms of structural variation formation and their genomic consequences. The effects of non-allelic homologous recombination, double-strand break repair, replication-based template switching, and mobile element insertions on the genome are schematized.

3.3. Functional Consequences of Structural Variations

The effect of structural variations often depends more on which region of the genome is affected than on the length of the change. Two deletions or duplications of the same size can lead to completely different phenotypes depending on the genes, regulatory elements, or chromosomal domains involved (Stankiewicz & Lupski, 2010).

When a structural change directly affects a gene, gene integrity may be compromised, resulting in abnormal transcripts, premature stop codons, or loss of function. However, some structural variations affect gene regulation without altering the

protein-coding sequence. A gene may become separated from its own enhancer region or come under the control of regulatory elements with which it normally does not interact. This can cause the gene to be expressed in the wrong tissue, at the wrong time, or at levels different from normal. This mechanism, known as the “position effect,” demonstrates that the evaluation of structural variations must take into account not only gene sequences but also regulatory regions and chromatin organization (Gröschel et al., 2014; Lupiáñez et al., 2015).

4. EFFECTS OF GENETIC VARIATIONS ON GENE EXPRESSION AND PROTEIN FUNCTION

The biological effect of a genetic variation depends on which stage of cellular processes it affects. In some cases, the same variant directly alters the amino acid sequence, while in others it may affect RNA processing, protein levels, or the protein’s function within the cell. Therefore, to assess the consequences of a variant, it is necessary to examine not only the DNA-level change but also its effects on gene expression and protein function.

4.1. Effects of Variations in Coding Regions

Missense mutations cause one amino acid to be replaced by another. The biological consequence of this change depends on the position of the affected amino acid within the protein and the physicochemical properties of the substituted amino acids. While changes occurring in active sites, ligand-binding regions, or evolutionarily conserved regions can significantly affect protein function, some variations may have more limited consequences (Ng & Henikoff, 2006).

Nonsense mutations and frameshift changes often result in more severe consequences. These variants can lead to premature stop codons, resulting in incomplete protein synthesis. The resulting transcripts are often removed by the nonsense-mediated decay (NMD) mechanism, thereby preventing the synthesis of potentially harmful proteins. However, this same process can also reduce the amount of normal protein in the cell (Kurosaki et al., 2019; Pagel et al., 2017).

For many years, it was believed that synonymous mutations were biologically insignificant. However, it is now known that these changes can affect codon usage preferences, ribosomal translation rate, mRNA structure, and splicing processes. Consequently, even if the amino acid sequence remains unchanged, alterations may occur in protein levels, folding, or the formation of different transcript isoforms (Bali & Bebok, 2015; Zeng & Bromberg, 2019). This demonstrates that the effects of variants cannot be explained solely by changes in the protein sequence.

4.2. RNA Processing and Transcript-Level Outcomes

Many genetic variations exert their effects at the RNA level, before protein synthesis. In particular, changes affecting intron-exon boundaries can disrupt normal splicing. This can result in events such as exon skipping, intron retention, or alternative splicing sites. Such changes can affect the reading frame, leading to the formation of abnormal proteins or the degradation of transcripts by the NMD mechanism (Anna & Monika, 2018).

Variants affecting RNA processing are not limited to classical splicing sites. Some changes in exonic regions can affect enhancer or repressor sequences that regulate splicing, leading to the formation of different transcript isoforms (Bali & Bebok, 2015).

Variations occurring in untranslated regions (UTRs) and other regulatory RNA regions, on the other hand, can affect mRNA stability and translation efficiency. Changes in these regions can alter motifs recognized by RNA-binding proteins, the secondary structure of mRNA, or degradation signals. As a result, while the lifespan of some transcripts within the cell may be shortened, others may be preserved for longer periods and contribute to increased protein synthesis (Leppek et al., 2018). The primary mechanisms involved in RNA processing and the consequences of splicing defects are summarized in Figure 4.

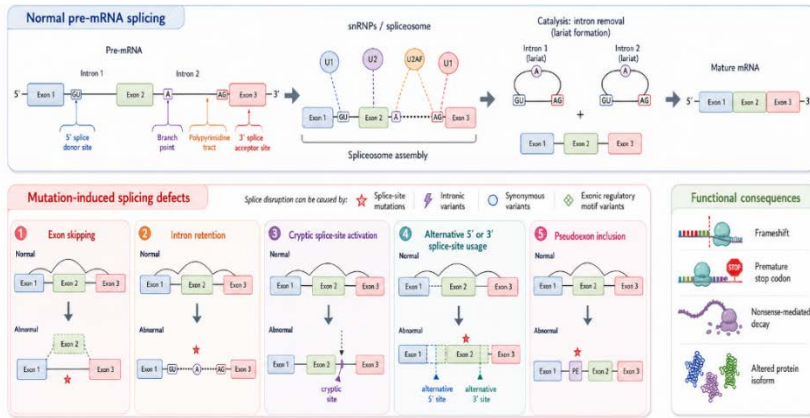


Figure 4. Splicing mechanisms and splicing defects caused by mutations.

4.3. Changes in Protein Structure and Function

The effects of variants at the protein level are not limited to changes in the amino acid sequence. Mutations can alter a protein's three-dimensional structure, stability, subcellular localization, post-translational modifications, and interactions with other proteins.

A variant can eliminate a protein's function (amorphic), partially reduce it (hypomorphic), confer a new trait (neomorphic), or suppress the effect of the normal allele (dominant-negative effect). Distinguishing between these

different outcomes is important for understanding inheritance patterns and disease mechanisms (Gerasimavicius et al., 2022).

Impaired protein folding is one of the fundamental mechanisms underlying many inherited and acquired diseases. The ubiquitin-proteasome system often removes misfolded proteins. Consequently, even if a protein is synthesized, the amount of functional protein available for use within the cell may be reduced. Some mutant proteins, however, may evade degradation and accumulate within the cell, disrupting proteostasis or triggering stress responses (Hartl, 2017).

Mutations can also affect the signal sequences that direct the intracellular targeting of proteins. Changes in sequences that direct proteins to the nucleus, mitochondria, cell membrane, or secretory pathways can prevent the protein from reaching the correct cellular location. In such cases, even if the protein is structurally intact, it may be unable to perform its biological function.

Similarly, changes in post-translational modification sites can affect a protein's activity, stability, and role in cellular signaling networks. Variations in protein-protein interaction surfaces, on the other hand, can disrupt existing complexes or lead to the emergence of new interactions. High-resolution structural studies conducted in recent years, in particular, have shown that the effects of many variants can alter not only individual proteins but also protein interaction networks (Sahni et al., 2015). The primary consequences of protein-level mutations are summarized in Figure 5.

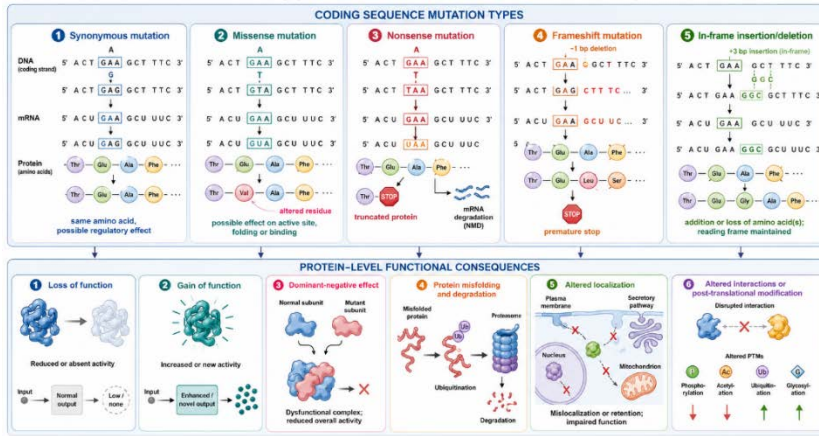


Figure 5. Protein-level consequences of mutation types. A schematic representation of the effects of different variations on protein structure, stability, intracellular localization, and biological functions.

5. COPY NUMBER VARIATIONS AND GENE DOSE EFFECTS

Copy number variations (CNVs) are situations in which a DNA segment is present in more than two copies in a diploid genome. These changes, which typically affect genomic regions ranging from kilobases to megabases, manifest as deletions or duplications and can span large regions containing a single gene or multiple genes. Consequently, CNVs can affect not only the function of the affected genes but also broader biological networks and cellular processes (Lee & Scherer, 2010; Riggs et al., 2020). Their mechanisms of formation are largely shared with structural variations and include non-allelic homologous recombination (NAHR), non-homologous end joining, and replication-based rearrangements (Hastings et al., 2009).

5.1. Dose Sensitivity and Gene Balance

Gene dose refers to the relationship between the number of copies of a gene in the genome and the amount of gene product produced. However, changes in copy number do not always result in a proportional increase or decrease in gene expression. Transcriptional feedback mechanisms, epigenetic regulations, and post-translational control processes can alter this relationship.

Genes do not respond to changes in copy number in the same way. In some genes, the loss of even a single copy can lead to significant phenotypic consequences. In this condition, known as haploinsufficiency, the remaining single functional allele is insufficient to meet normal biological requirements. Genes involved in developmental regulation, transcription factors, and cellular signaling networks are examples of this group (Riggs et al., 2020). Conversely, an increase in copy number in some genes can also lead to pathological outcomes. In this condition, defined as triplosensitivity, the excessive production of the gene product can disrupt cellular homeostasis.

One of the fundamental approaches explaining the effects of CNVs is the gene balance hypothesis. According to this view, for genes involved in multi-subunit protein complexes or regulatory networks, it is not only the absolute quantity but also the relative ratios of the components to one another that matter. An increase or decrease in a single component of the complex can disrupt biological function, even if the other components remain unchanged. Therefore, the effects of CNVs often stem not from the loss or gain of a single gene, but from a shift in the balance among multiple genes (He & Zhang, 2006).

One example illustrating the biological importance of gene dose is genomic imprinting. In imprinted regions, only the copy of certain genes derived from the mother or only the copy derived from the father is active. Consequently, these genes,

which are functionally dependent on a single copy, are more sensitive to changes in gene dose. The fact that a deletion in the same genomic region can result in different clinical presentations depending on its parental origin is a consequence of this phenomenon. Similarly, X chromosome inactivation in female mammals is also an important compensatory mechanism for regulating gene dose. The main consequences of haploinsufficiency, triplosensitivity, and changes in gene dose are summarized in Figure 6.

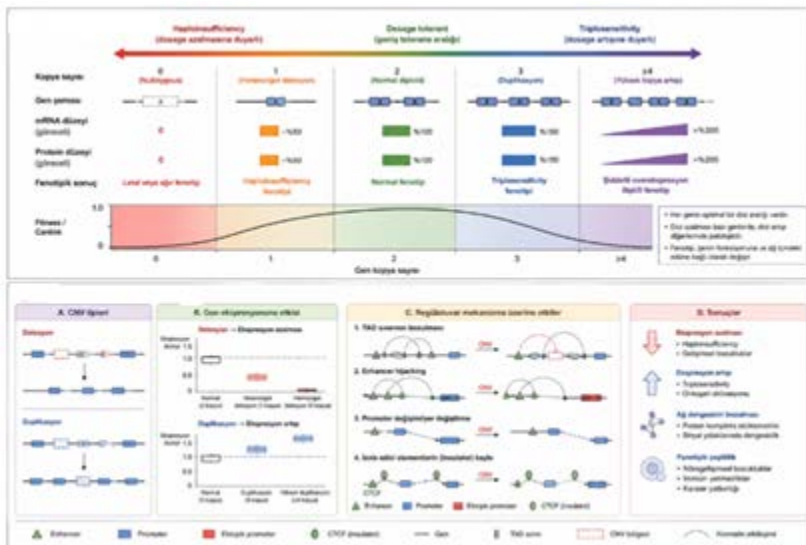


Figure 6. Schematic representation of the potential effects of gene dose, haploinsufficiency, triplosensitivity, and copy number variations.

5.2. Clinical Consequences of Copy Number Variations

The effects of copy number variations are not limited to the amount of DNA lost or gained. Some CNVs can affect gene regulation by altering the three-dimensional organization of chromatin. In particular, deletions and duplications that disrupt the boundaries of topologically associating domains (TADs) can

alter the normal interactions between enhancers and promoters. As a result, a gene may come under the control of regulatory elements with which it would not normally interact. This mechanism, known as enhancer hijacking, can lead to increased or decreased gene expression, or expression in the wrong tissues, without any changes to the coding sequence (Gröschel et al., 2014; Lupiáñez et al., 2015).

The clinical significance of CNVs stems from the fact that both copy losses and copy gains can be associated with disease. For example, in DiGeorge syndrome, which is associated with a 22q11.2 deletion, the loss of dose-sensitive genes in that region can lead to cardiovascular, immunological, and craniofacial developmental abnormalities. In contrast, in type 1A Charcot–Marie–Tooth disease, a duplication of the PMP22 gene disrupts myelin structure in peripheral nerves (Lee & Scherer, 2010).

Larger-scale copy number variations are classified as aneuploidy. The presence of an extra chromosome, as in trisomy 21, results in the simultaneous overexpression of hundreds of genes and gives rise to phenotypes affecting numerous organ systems. This demonstrates that changes in gene dose can have significant consequences not only at the single-gene level but also on a genome-wide scale. Today, the evaluation of CNVs takes into account not only the number of affected genes but also dose sensitivity, effects on regulatory regions, and the changes they induce in chromatin organization (Dixon et al., 2012; Riggs et al., 2020).

6. FUNCTIONAL VARIATIONS IN THE NON-CODING GENOME

While only a small portion of the human genome consists of protein-coding sequences, the remainder contains numerous functional elements that regulate gene expression. These non-

coding regions play a crucial role in the initiation, maintenance, and termination of transcription, as well as in regulating RNA processing, mRNA stability, and translation efficiency. Therefore, variations occurring in non-coding regions can affect gene expression without altering the protein sequence and can lead to phenotypic outcomes. In particular, in understanding the genetic basis of complex diseases, a significant portion of disease risk is associated with regulatory genomic regions (Maurano et al., 2012; Ward & Kellis, 2012).

6.1. Variations in Regulatory DNA Regions

Promoters, enhancers, silencers, and insulators are fundamental regulatory elements that control gene expression both spatially and temporally (Visel et al., 2009). Single-base changes or short indels in these regions can affect transcription factor binding sites, leading to altered gene expression. As a result, even if the protein-coding region remains entirely conserved, the gene's expression level, the cell type in which it is expressed, or its developmental timing may change (Maurano et al., 2012).

The effect of regulatory variants is often context-dependent at the cellular and tissue levels. An enhancer that is active in one cell type may not function in another cell type. Therefore, when evaluating a non-coding variant, one must consider not only its genomic location but also which cells the associated regulatory region is active in. Furthermore, since multiple enhancers control many genes, the effects of some regulatory changes may be partially offset by other regulatory elements. In contrast, even a single-nucleotide change at critical transcription factor binding sites can result in significant differences in expression (ENCODE Project Consortium, 2012).

The main effects of regulatory variations on gene expression are summarized in Figure 7.

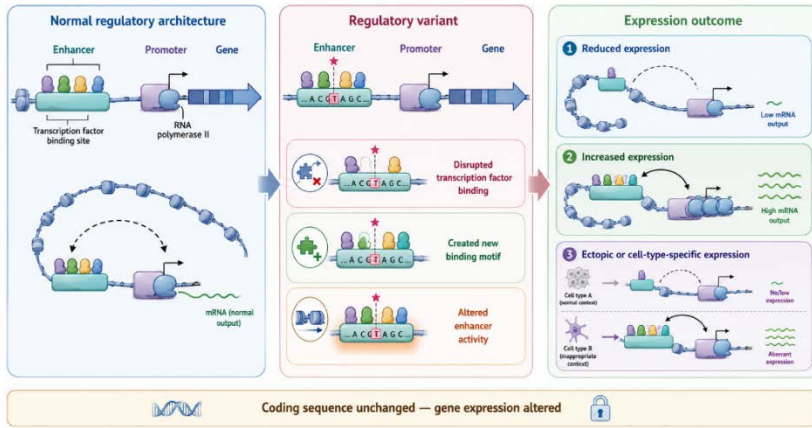


Figure 7. Enhancer-promoter interactions and the effects of regulatory variants on gene expression.

6.2. Variations Observed in Non-Coding RNAs

A significant portion of the non-coding genome encodes RNA molecules involved in gene regulation. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play a role in processes such as directing chromatin-regulating complexes to specific genomic regions, regulating transcription, and controlling RNA stability. Variations in these molecules can disrupt regulatory functions by altering RNA structure or interactions with other molecules (Sweta et al., 2019).

MicroRNAs (miRNAs), on the other hand, suppress translation or accelerate mRNA degradation by binding primarily to the 3' UTR regions of target mRNAs. Variations in miRNA genes can alter mature miRNA formation, target selection, or binding efficiency. In particular, changes in the seed region, which is responsible for target recognition, can have significant functional consequences. Similarly, variations in the 3' UTR regions of target genes can eliminate existing miRNA binding

sites or create new ones. Consequently, gene expression can be reshaped at the post- transcriptional level (Bartel, 2018).

miRNA biogenesis and the effects of variations on this process are illustrated in Figure 8.

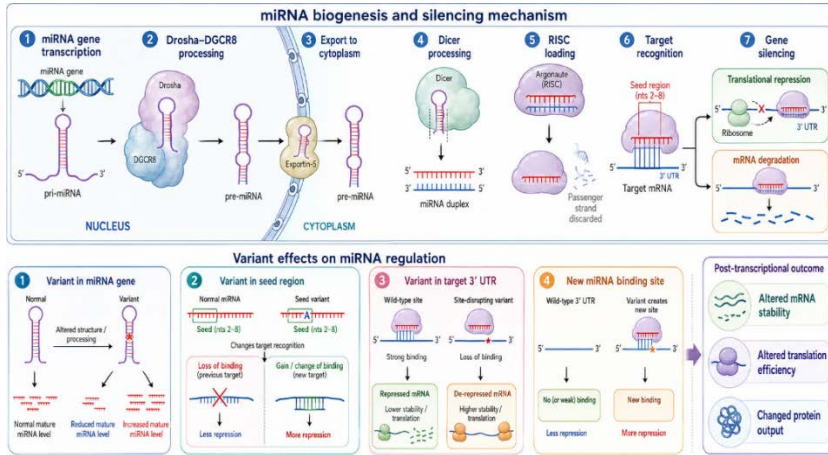


Figure 8. miRNA biogenesis, gene silencing mechanisms, and the effects of variations on these processes.

6.3. Functional Association Using eQTL and sQTL Approaches

One of the primary approaches for determining the functional consequences of non-coding variants is quantitative trait locus (QTL) analysis. Expression quantitative trait loci (eQTLs) reveal the relationship between a specific variant and gene expression levels, while splicing quantitative trait loci (sQTLs) allow for the assessment of the effects of variations on alternative splicing (Nica & Dermitzakis, 2013).

Large-scale data from different tissues have shown that the effects of many regulatory variants are tissue-specific. In particular, the GTEx project has demonstrated that the same variant can have opposite effects in different tissues (Center). However, the identification of a variant as an eQTL or sQTL is

not considered direct evidence of causality. Therefore, it must be supported by colocalization analyses, chromatin interaction data, and experimental validation studies (Zhu et al., 2016).

6.4. Genome-Wide Association Studies and Regulatory Variants

Genome-wide association studies (GWAS) have shown that the majority of variants associated with complex diseases are located in regulatory genomic regions rather than in protein-coding regions (Maurano et al., 2012). This finding demonstrates that disease risk cannot be explained solely by mutations that alter protein structure. In many cases, disease susceptibility is associated with changes in the level, timing, or tissue-specific regulation of gene expression.

Therefore, today, data on chromatin accessibility, histone modifications, transcription factor binding sites, and three-dimensional genome organization are used in conjunction to interpret non-coding variants (ENCODE Project Consortium, 2012; Ward & Kellis, 2012).

One method used to elucidate the functional effects of regulatory variants is allele-specific expression analysis. This approach allows determination of whether the two alleles in the same individual are expressed at different levels and serves as an important tool for directly demonstrating cis-acting regulatory variants (Castel et al., 2015). Similarly, quantitative locus analyses associated with DNA methylation levels (meQTLs) reveal the effects of genetic variation on epigenetic regulation. These findings demonstrate that genetic and epigenetic mechanisms work together to shape gene (Gaunt et al., 2016).

7. GENOME ORGANIZATION AND THE CONTRIBUTION OF SPATIAL ORGANIZATION TO THE EFFECTS OF VARIANTS

Genome function does not depend solely on the information encoded in the DNA sequence. The positions of chromosomes within the cell nucleus and the three-dimensional organization of chromatin also play important roles in the regulation of gene expression. Chromatin interaction mapping methods developed in recent years have revealed that the genome is not a randomly packaged structure but rather exhibits hierarchical organization at multiple levels (Dixon et al., 2012; Lieberman-Aiden et al., 2009).

One of the fundamental components of this organization is the topologically associating domain (TAD). TADs are chromatin regions that exhibit strong self-interactions and are relatively isolated from neighboring regions. These structures contribute to gene regulation by ensuring that interactions between enhancers and promoters occur within specific boundaries (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). CTCF binding sites and the cohesin complex play a primary role in the formation of TAD boundaries. According to the current loop extrusion model, cohesin moves along DNA to facilitate the formation of chromatin loops, a process that often terminates at oppositely oriented CTCF-binding sites (Davidson & Peters, 2021).

Disruption of chromatin organization can lead to significant changes in gene expression. In particular, deletions, duplications, or inversions affecting TAD boundaries can cause regulatory regions that are normally separated to fall within the same interaction domain. As a result, a gene may be influenced by enhancers that are not normally under its control, leading to expression at inappropriate times, in inappropriate tissues, or at

different levels. This mechanism has been shown to be associated with developmental anomalies and certain hereditary diseases (Lupiáñez et al., 2015). The effects of TAD boundary disruptions on enhancer-promoter interactions are summarized in Figure 9.

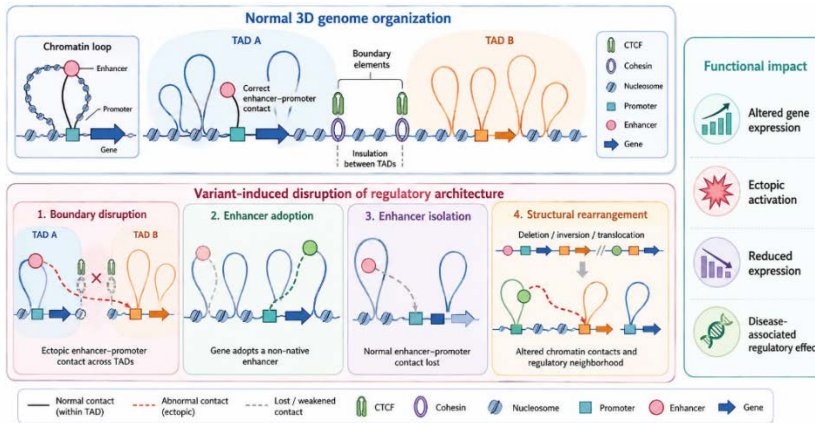


Figure 9. Three-dimensional genomic organization and associated regulatory effects. Schematic representation of the consequences of TAD boundary disruptions on enhancer-promoter interactions and gene expression, compared to normal TAD structures.

Genome organization is not limited to the TAD level. On a larger scale, chromatin is typically divided into A compartments, which are rich in active genes and exhibit open chromatin characteristics, and B compartments, which are more tightly packed and transcriptionally repressed (Lieberman-Aiden et al., 2009). While A compartments are mostly located in the inner regions of the nucleus, B compartments are frequently found in regions associated with the nuclear lamina. It has been shown that during cell differentiation, certain genomic regions can shift between A and B compartments, and these shifts are associated with differences in gene expression (Bonev & Cavalli, 2016).

Changes in three-dimensional genomic organization can affect not only enhancer-promoter interactions but also chromatin

accessibility, epigenetic regulation, and the positioning of genes within the nucleus. Therefore, the biological consequences of some structural variations cannot be explained solely by changes in the DNA sequence. To accurately interpret the effect of a variant, the location of the affected region within the chromatin architecture and its interactions with other regulatory elements must also be taken into account. Today, the use of three-dimensional genomic data in the evaluation of variants associated with many diseases contributes to a more accurate understanding of the relationship between genotype and phenotype (ENCODE Project Consortium, 2012; Lupiáñez et al., 2015).

8. FACTORS DETERMINING THE RELATIONSHIP BETWEEN GENOTYPE AND PHENOTYPE

The presence of a genetic variant does not mean that the associated phenotype will manifest in the same way in all individuals. While the same variation may cause pronounced clinical findings in some individuals, in others it may present with milder symptoms or result in no phenotypic consequences at all. These differences are shaped by the biological function of the gene in question, the tissues in which it is expressed, its role in developmental processes, its interactions with other genes, and the influence of environmental. Therefore, the relationship between genotype and phenotype is viewed not as a linear causality but as a dynamic process influenced by numerous biological variables acting in concert.

8.1. Penetrance, Expressivity, and Pleiotropy

Penetrance refers to the proportion of individuals carrying a specific genotype in whom the associated phenotype manifests. If the disease phenotype is observed in all carriers, it is considered full penetrance; if it appears in only some carriers, it is considered

incomplete penetrance. Large-scale genomic data have revealed that some variants previously considered to have high effect may exhibit lower penetrance than expected (Minikel et al., 2016).

Expressivity, on the other hand, describes differences in the severity, age of onset, or clinical presentation of the phenotype among individuals carrying the same genetic variation. The same variant may cause mild symptoms in one individual, while leading to a more severe or earlier-onset condition in another.

Pleiotropy refers to the effect of a single gene or variant on multiple phenotypic traits. This is often due to the gene product functioning in different tissues or being involved in fundamental cellular processes (He & Zhang, 2006). When penetrance, expressivity, and pleiotropy are considered together, it becomes easier to understand why the same genetic variation can lead to different outcomes in different individuals.

Another group of variations that plays a significant role in the genotype–phenotype relationship is de novo mutations. These changes are not present in the parents and appear for the first time in the child. They play a particularly important role in early-onset neurodevelopmental disorders and certain congenital anomalies. One of the main reasons high-impact variants under strong negative selection continue to be observed clinically is the re-emergence of de novo mutations in every generation. Furthermore, the increase in the frequency of de novo mutations with paternal age highlights the importance of ongoing germline mutation processes (Kong et al., 2012)

8.2. Genetic Background and Environmental Factors

When evaluating the effect of a variant, the other genetic changes carried by the individual must also be taken into account. This factor, known as genetic background, is one of the key factors explaining why the same variant can lead to different phenotypes in different individuals. Modifier genes can enhance,

attenuate, or alter the clinical presentation of the underlying variant. These genes are often those that function in the same biological pathway or indirectly influence the relevant process.

Environmental factors also play a significant role in phenotype formation. Factors such as diet, infections, medication use, exposure to toxic substances, physical activity, and psychosocial stress can alter the manifestation of genetic predisposition. The fact that individuals sharing the same genetic risk exhibit different clinical outcomes due to varying environmental conditions is a key indicator of this relationship (Favé et al., 2018). Therefore, the phenotype is often the result of the interaction between genetic makeup and environmental conditions.

8.3. Biological Buffering and Polygenic Susceptibility

Cells possess various protective mechanisms that can limit the effects of genetic changes. These mechanisms include the activation of alternative biological pathways, feedback mechanisms, protein quality control systems, and metabolic adaptation processes. This is related to the concept of “canalization,” which refers to the maintenance of developmental processes with a certain degree of stability (El-Brolosy & Stainier, 2017).

However, the capacity of these protective systems is not unlimited. The accumulation of multiple variants involved in the same biological process, an increase in the total genetic load, or the introduction of environmental stress factors can disrupt this balance, causing changes that were previously not reflected in the phenotype to become clinically apparent.

A significant portion of complex diseases exhibits polygenic inheritance. In these diseases, rather than a single high-impact mutation, numerous low-impact variants located in different regions of the genome play a combined role. When the

cumulative effect of these variants exceeds a certain threshold, the risk of disease can increase significantly. This approach explains why, in complex diseases, risk and susceptibility are observed at varying levels rather than a clear-cut distinction between patients and healthy individuals (Fahed et al., 2020).

The main factors shaping the relationship between genotype and phenotype are summarized in Figure 10.

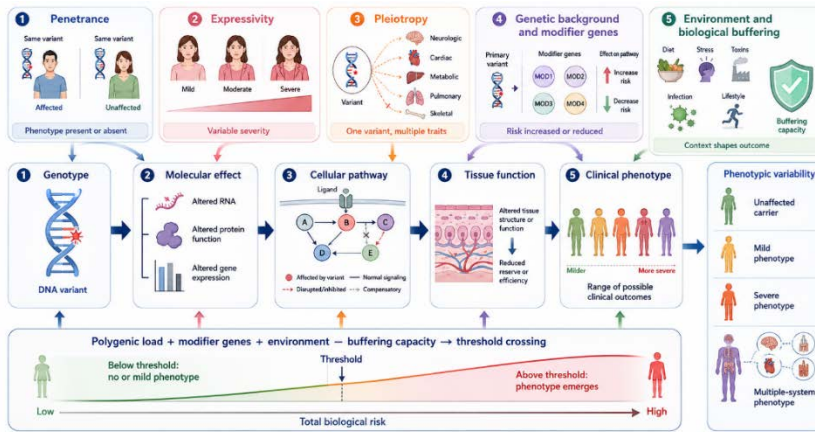


Figure 10. Key factors influencing the relationship between genotype and phenotype. A schematic representation of the contributions of penetrance, expressivity, pleiotropy, modifier genes, environmental effects, biological buffering mechanisms, and polygenic susceptibility to phenotype formation.

9. INTERACTIONS BETWEEN GENES AND PHENOTYPIC OUTCOMES

The effects of genetic variations on the phenotype often cannot be explained by the function of a single gene. A large portion of cellular processes is carried out by genes and proteins that interact with one another. Therefore, the biological outcome of a variant depends not only on the characteristics of the gene in question but also on its interactions with other genes and the

biological networks in which it is embedded. Particularly in complex traits and multifactorial diseases, interactions between genes are a major source of phenotypic variation (Mackay, 2014).

Epistasis refers to the situation in which the effect of a gene on the phenotype changes depending on the presence of another gene or genes. Consequently, the phenotype is often not simply the sum of the independent effects of individual genes. The effect of a variation in one gene can be enhanced, reduced, or completely suppressed by a change in another gene. In quantitative genetic studies, epistatic interactions are recognized as a major component of non-additive genetic effects (Mackay, 2014).

At the core of epistatic relationships lies the fact that gene products do not function independently of one another within the cell. In many biological processes, proteins function within the same signaling pathways, metabolic networks, or multimeric protein complexes. Therefore, a change in one gene can directly or indirectly affect the functions of other genes. In particular, changes in regulatory proteins that function at the upper levels of signaling pathways can alter the activity of numerous target genes and lead to broad phenotypic consequences.

One of the most striking examples of epistatic interactions is the concept of synthetic lethality. In this scenario, while the loss of function in either gene alone allows the cell to survive, the simultaneous loss of function in both genes leads to cell death. This mechanism has gained significant clinical relevance, particularly in cancer biology. In tumor cells with loss of function in the BRCA1 or BRCA2 genes, homologous recombination-mediated DNA repair is impaired. These cells become more dependent on alternative repair mechanisms. When PARP inhibitors are used, these alternative pathways are also inhibited, leading to selective cell death in tumor cells. Thus, while normal

cells are largely spared, tumor cells can be targeted (Bryant et al., 2005).

Another important concept related to gene-gene interactions is genetic buffering. Cells possess various mechanisms that can mitigate the effects of genetic alterations. Gene redundancy, alternative biological pathways, feedback mechanisms, and molecular chaperone systems are prime examples of these protective processes. In particular, it has been shown that chaperone proteins such as HSP90 can suppress the effects of certain mutations and limit the emergence of phenotypic diversity (Rutherford & Lindquist, 1998). Therefore, the observation of different clinical presentations in individuals carrying the same mutation may depend not only on the specific variant but also on cellular buffering capacity.

Systems biology approaches developed in recent years have demonstrated that genes should be evaluated not in isolation but as components of complex biological networks. When protein-protein interaction networks, signaling pathways, and regulatory networks are examined together, it becomes evident that certain genes serve as central nodes within these networks. Changes in these genes can affect many components of the network, leading to broader biological consequences than expected (Barabási et al., 2011).

Therefore, when evaluating the effect of a variant, examining only the function of the relevant gene is often insufficient. The biological pathways in which the gene product is involved, as well as the other proteins with which it interacts and the cellular networks, must also be taken into account. This approach makes significant contributions, particularly to understanding the genetic basis of complex diseases and to individual risk assessments. The main mechanisms of gene-gene interactions are summarized in Figure 11.

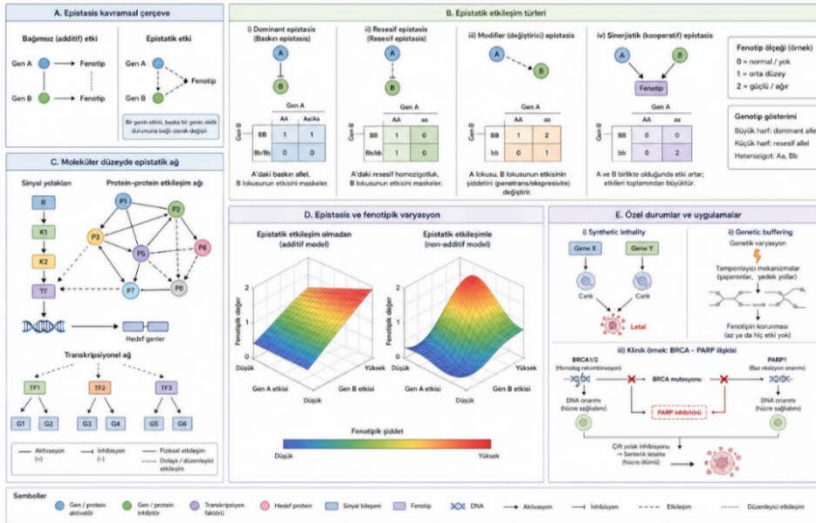


Figure 11. Fundamental mechanisms of epistatic interactions.
Schematic representation of epistatic relationships arising through signal transduction pathways, protein complexes, and regulatory networks, along with examples of synthetic lethality and genetic buffering.

10. THE GENETIC BASIS OF COMPLEX DISEASES

Complex diseases are conditions that cannot be explained by a single genetic change but arise from the combined effects of numerous genetic and environmental factors. Type 2 diabetes, coronary artery disease, hypertension, obesity, asthma, Alzheimer's disease, and many psychiatric disorders fall into this category. In these diseases, the phenotype is shaped by the interaction of numerous variants, each with varying degrees of effect, and environmental factors. Consequently, the relationship between genotype and phenotype in complex diseases is more

complex than the relationships observed in classical Mendelian inheritance (Manolio et al., 2009).

10.1. Genome-Wide Association Studies and Polygenic Inheritance

One of the most widely used methods in investigating the genetic basis of complex diseases is genome-wide association studies (GWAS). These studies aim to identify genomic regions associated with disease risk by comparing variant frequencies between patient and control groups. Thousands of GWAS studies conducted over the past two decades have identified numerous loci associated with complex diseases and quantitative traits (Visscher et al., 2017).

GWAS findings have shown that, for the majority of complex diseases, numerous low-effect variants act in combination rather than a single high-effect variant. This has reinforced the concept of polygenic inheritance. Although the contribution of each variant is often small, the combined effect of these variants can determine an individual's overall genetic risk (Boyle et al., 2017).

One of the clinical applications of this approach is polygenic risk scores (PRS). In PRS calculations, the effects of numerous variants are combined to estimate an individual's relative genetic risk for a specific disease. It has been demonstrated that PRS applications can contribute to risk stratification, particularly for common diseases such as coronary artery disease, type 2 diabetes, and breast cancer (Khera et al., 2018). However, significant limitations include the fact that these scores do not perform with the same accuracy across different populations and do not fully account for environmental factors.

10.2. The Problem of Incomplete Heritability

Although family and twin studies have shown that many complex traits are significantly heritable, the variants identified through GWAS studies can explain only a portion of this heritability. This situation is defined in the literature as the “missing heritability” problem (Manolio et al., 2009)).

Possible causes of missing heritability include low-frequency or rare variants, structural variations, gene-gene interactions, gene-environment interactions, and epigenetic effects that are difficult to measure. Additionally, the fact that the effect of many variants is too small to be statistically detected contributes to this problem (Eichler et al., 2010).

With the widespread adoption of next-generation sequencing technologies, the role of rare variants in complex diseases has begun to be examined in greater detail. In some cases, it has been shown that rare variants can have greater effects than common variants. For this reason, it is now widely accepted that both common and rare variants must be evaluated together to elucidate the genetic architecture of complex diseases.

10.3. Gene–Environment Interactions

In complex diseases, genetic predisposition often manifests as a phenotype in conjunction with environmental factors. Individuals with the same genetic risk may exhibit different clinical outcomes due to differences in lifestyle or environmental conditions. Dietary habits, physical activity levels, smoking, infections, medications, and environmental toxins are among the factors influencing this process (Favé et al., 2018).

Gene–environment interactions may cause certain variants to exert a phenotypic effect only under specific conditions. This explains why the same genetic variation can lead to different outcomes in different populations or in individuals

with different living conditions. For this reason, it is important to consider genetic information in conjunction with environmental factors when assessing the risk of complex diseases.

10.4. The Omnigenic Model and Network Approach

One of the models developed to explain the genetic components of complex diseases is the omnigenic model. According to this model, in addition to core genes directly associated with the disease, numerous other genes within the same regulatory network may also contribute indirectly to the phenotype. Thus, even small, effective variants in genes that do not appear to be directly biologically linked to the disease can become part of the overall genetic risk (Boyle et al., 2017).

This approach helps explain why complex diseases are associated with so many genomic regions. It also demonstrates that genes should be viewed not as independent units, but as parts of interconnected biological networks. Network-based analyses and systems biology approaches contribute to a more detailed understanding of the molecular mechanisms underlying complex diseases (Barabási et al., 2011).

The genetic basis of complex diseases and the primary factors contributing to disease risk are summarized in Figure 12.

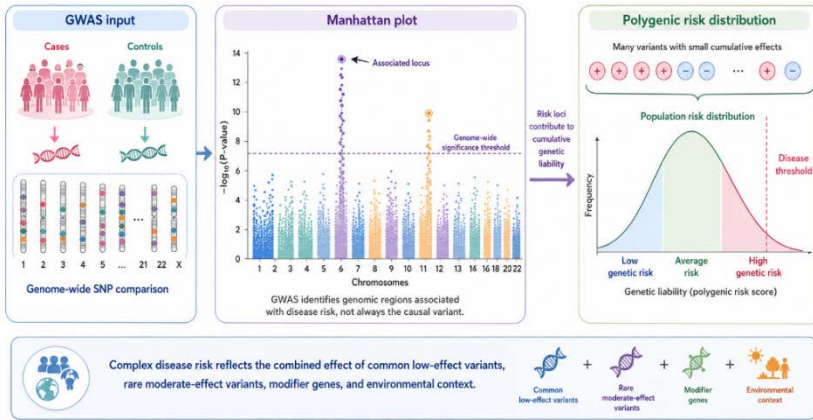


Figure 12. A schematic representation of the polygenic risk approach, illustrating the key steps followed from the identification of association signals in GWAS studies to the evaluation of potential biological mechanisms.

11. FROM FUNCTIONAL GENOMICS TO CLINICAL APPLICATIONS

Assessing the effects of genetic variations is not limited to identifying changes in the DNA sequence. Understanding how a variant affects gene expression, RNA processing, chromatin structure, or protein function is becoming increasingly important for clinical interpretation. Functional genomics methods developed in recent years have enhanced the clinical utility of genomic data by enabling the direct examination of the biological consequences of variants.

11.1. Clinical Variant Assessment

One of the primary goals in clinical genetics is to reliably assess the association between identified variants and disease. In the international classification systems used for this purpose, various types of evidence—such as population frequency, bioinformatics predictions, functional studies, segregation

analyses, and de novo occurrence—are evaluated collectively. Based on these data, variants are classified as pathogenic, likely pathogenic, of uncertain significance (VUS), likely benign, or benign (Richards et al., 2015).

The group that poses the greatest challenge in clinical practice consists of variants classified as VUS. The available data for these variants are insufficient to definitively determine whether they are disease-associated. Therefore, functional studies, family analyses, and information obtained from large population databases play a significant role in the interpretation process. However, the fact that some widely used databases today overrepresent certain populations can complicate variant interpretation across different populations. Therefore, it is important to expand genomic databases to increase population diversity (Landry & Rehm, 2018).

11.2. Functional Genomic Approaches

Advances in high-throughput analysis technologies have made it possible to directly investigate the biological effects of variants. While RNA sequencing methods allow for the assessment of gene expression and alternative splicing events, ATAC-seq is used to identify open chromatin regions (Buenrostro et al., 2013). ChIP-seq analyses provide information on transcription factor binding sites and histone modifications, while Hi-C and similar methods reveal the three-dimensional organization of chromatin (Lieberman-Aiden et al., 2009).

In addition to these methods, experimental approaches aimed at directly measuring the functional effects of variants have also been developed. Massively parallel reporter assays (MPRA) enable the evaluation of thousands of regulatory variants within a single experiment (Tewhey et al., 2016). CRISPR-based screens, on the other hand, allow for the systematic investigation of specific genes or regulatory regions (Shalem et al., 2014).

One of the significant advancements in the field of functional genomics is the use of saturation genome editing approaches. In these methods, the functional effects of the numerous variants that may occur within a specific gene can be determined through experimental evaluation. Studies conducted particularly on clinically important genes such as BRCA1 have provided functional information about many variants that were previously uninterpretable (Findlay et al., 2018). It is believed that this approach could help reduce the number of variants of uncertain significance.

11.3. Single-Cell Technologies and Computational Analyses

One of the most significant advancements in genomic research is the ability to perform analyses at the single-cell level. Single-cell RNA sequencing methods have made it possible to examine different cell populations within the same tissue separately, thereby revealing cellular heterogeneity. These technologies have provided new insights, particularly in studies of tumor biology, immunology, and developmental biology (Tang et al., 2009).

Spatial transcriptomics methods, on the other hand, allow for the assessment not only of the quantity of gene expression but also of its location within a tissue. This enables a more detailed examination of the relationships between cells and their surroundings, as well as tissue organization (Ståhl et al., 2016).

Advances in computational biology have also significantly influenced variant interpretation processes. Machine learning and deep learning-based models are used in areas such as the identification of regulatory regions, the prediction of splicing changes, and the assessment of variant pathogenicity (Eraslan et al., 2019). However, for these systems to be reliably used in clinical applications, they must be validated across

different populations, and their results must be biologically interpretable.

Pharmacogenomics is a key example of translating functional genomic information into clinical practice. Variations in genes involved in drug metabolism can influence drug efficacy and the risk of adverse effects. Therefore, taking an individual's genetic characteristics into account can aid in selecting the appropriate drug and dosage. Pharmacogenomic applications are increasingly being incorporated into clinical decision-making processes for many drugs today (Relling & Evans, 2015).

12. CONCLUSION

The biological effects of genetic variations are not as simple as they might seem—they cannot be explained solely by changes in the DNA sequence. The consequences of a variant can be more accurately understood by evaluating the genomic region where it is located, its role in gene regulation, chromatin organization, cellular context, and environmental factors together.

High-throughput sequencing methods, functional genomics technologies, and computational analysis tools developed in recent years have made it possible to examine the effects of variants in greater detail. In particular, understanding regulatory genomic regions, three-dimensional genomic organization, and intercellular differences has significantly expanded our knowledge of genotype–phenotype relationships.

However, translating genomic data into clinical applications still presents significant challenges. The main challenges include uncertainties in variant interpretation, insufficient representation of different populations in genomic

databases, and the lack of experimental validation data for many variants.

In the future, the combined evaluation of different omics approaches, the widespread adoption of single-cell-level analyses, and the increasing availability of functional genomic data will enable a more accurate interpretation of the biological and clinical effects of variants. These developments will contribute to the more effective use of genetic information in diagnosis, risk assessment, and treatment planning.

REFERENCES

- Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A., & Bergstrom, E. N. (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *nature*, 578(7793), 94-101.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., & Børresen-Dale, A.-L. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *nature*, 500(7463), 415-421.
- Anna, A., & Monika, G. (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of applied genetics*, 59(3), 253-268.
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., Donnelly, P., Eichler, E. E., & Flicek, P. (2015). A global reference for human genetic variation. *nature*, 526(7571), 68.
- Bahlo, M., Bennett, M. F., Degorski, P., Tankard, R. M., Delatycki, M. B., & Lockhart, P. J. (2018). Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1736.
- Bali, V., & Bebok, Z. (2015). Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 64, 58-74.
- Barabási, A.-L., Gulbahce, N., & Loscalzo, J. (2011). Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 56-68.
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan micrnas. *Cell*, 173(1), 20-51.

- Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews Genetics*, 17(11), 661-678.
- Boyle, E. A., Li, Y. I., & Pritchard, J. K. (2017). An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic. *Cell*, 169(7), 1177-1186.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *nature*, 434(7035), 913-917.
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods*, 10(12), 1213-1218.
- Castel, S. E., Levy-Moonshine, A., Mohammadi, P., Banks, E., & Lappalainen, T. (2015). Tools and best practices for data processing in allelic expression analysis. *Genome biology*, 16(1), 195.
- Center, B. S. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues.
- Cooper, D. N., & Youssoufian, H. (1988). The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics*, 78(2), 151-155.
- Davidson, I. F., & Peters, J.-M. (2021). Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(7), 445-464.
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *nature*, 485(7398), 376-380.

- Eichler, E. E., Flint, J., Gibson, G., Kong, A., Leal, S. M., Moore, J. H., & Nadeau, J. H. (2010). Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nature Reviews Genetics*, 11(6), 446-450.
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics*, 13(7), e1006780.
- ENCODE Project Consortium, a. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *nature*, 489(7414), 57.
- Eraslan, G., Avsec, Ž., Gagneur, J., & Theis, F. J. (2019). Deep learning: new computational modelling techniques for genomics. *Nature Reviews Genetics*, 20(7), 389-403.
- Fahed, A. C., Wang, M., Homburger, J. R., Patel, A. P., Bick, A. G., Neben, C. L., Lai, C., Brockman, D., Philippakis, A., & Ellinor, P. T. (2020). Polygenic background modifies penetrance of monogenic variants for tier 1 genomic conditions. *Nature communications*, 11(1), 3635.
- Favé, M.-J., Lamaze, F. C., Soave, D., Hodgkinson, A., Gauvin, H., Bruat, V., Grenier, J.-C., Gbeha, E., Skead, K., & Smargiassi, A. (2018). Gene-by-environment interactions in urban populations modulate risk phenotypes. *Nature communications*, 9(1), 827.
- Findlay, G. M., Daza, R. M., Martin, B., Zhang, M. D., Leith, A. P., Gasperini, M., Janizek, J. D., Huang, X., Starita, L. M., & Shendure, J. (2018). Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *nature*, 562(7726), 217-222.
- Gaunt, T. R., Shihab, H. A., Hemani, G., Min, J. L., Woodward, G., Lyttleton, O., Zheng, J., Duggirala, A., McArdle, W. L., & Ho, K. (2016). Systematic identification of genetic

influences on methylation across the human life course. *Genome biology*, 17(1), 61.

Gerasimavicius, L., Livesey, B. J., & Marsh, J. A. (2022). Loss-of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure. *Nature communications*, 13(1), 3895.

Gröschel, S., Sanders, M. A., Hoogenboezem, R., de Wit, E., Bouwman, B. A., Erpelinck, C., van der Velden, V. H., Havermans, M., Avellino, R., & van Lom, K. (2014). A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell*, 157(2), 369-381.

Hartl, D. L. (2018). *Essential genetics and genomics*. Jones & Bartlett Learning.

Hartl, F. U. (2017). Protein misfolding diseases. *Annual review of biochemistry*, 86(1), 21-26.

Hastings, P., Ira, G., & Lupski, J. R. (2009). A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS genetics*, 5(1), e1000327.

He, X., & Zhang, J. (2006). Toward a molecular understanding of pleiotropy. *Genetics*, 173(4), 1885-1891.

Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England journal of medicine*, 361(15), 1475-1485.

Khera, A. V., Chaffin, M., Aragam, K. G., Haas, M. E., Roselli, C., Choi, S. H., Natarajan, P., Lander, E. S., Lubitz, S. A., & Ellinor, P. T. (2018). Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nature genetics*, 50(9), 1219-1224.

- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., & Jonasdottir, A. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *nature*, 488(7412), 471-475.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895-16898.
- Kurosaki, T., Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(7), 406-420.
- Landry, L. G., & Rehm, H. L. (2018). Association of racial/ethnic categories with the ability of genetic tests to detect a cause of cardiomyopathy. *JAMA cardiology*, 3(4), 341-345.
- Lee, C., & Scherer, S. W. (2010). The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert reviews in molecular medicine*, 12, e8.
- Lee, J. A., Carvalho, C. M., & Lupski, J. R. (2007). A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 131(7), 1235-1247.
- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(3), 158-174.
- Lieberman-Aiden, E., Van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., & Dorschner, M. O. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *science*, 326(5950), 289-293.

- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362(6422), 709-715.
- Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., & Laxova, R. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, 161(5), 1012-1025.
- Mackay, T. F. (2014). Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene–gene interactions. *Nature Reviews Genetics*, 15(1), 22-33.
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., & Chakravarti, A. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *nature*, 461(7265), 747-753.
- Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., Reynolds, A. P., Sandstrom, R., Qu, H., & Brody, J. (2012). Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *science*, 337(6099), 1190-1195.
- Minikel, E. V., Vallabh, S. M., Lek, M., Estrada, K., Samocha, K. E., Sathirapongsasuti, J. F., McLean, C. Y., Tung, J. Y., Yu, L. P., & Gambetti, P. (2016). Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Science translational medicine*, 8(322), 322ra329-322ra329.
- Mirkin, S. M. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *nature*, 447(7147), 932-940.
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2006). Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 7(1), 61-80.

- Nica, A. C., & Dermitzakis, E. T. (2013). Expression quantitative trait loci: present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1620), 20120362.
- Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., Van Berkum, N. L., Meisig, J., & Sedat, J. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *nature*, 485(7398), 381-385.
- Pagel, K. A., Pejaver, V., Lin, G. N., Nam, H.-J., Mort, M., Cooper, D. N., Sebat, J., Iakoucheva, L. M., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2017). When loss-of-function is loss of function: assessing mutational signatures and impact of loss-of-function genetic variants. *Bioinformatics*, 33(14), i389-i398.
- Relling, M. V., & Evans, W. E. (2015). Pharmacogenomics in the clinic. *nature*, 526(7573), 343-350.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., & Spector, E. (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), 405-423.
- Riggs, E. R., Andersen, E. F., Cherry, A. M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., Raca, G., Ritter, D. I., South, S. T., & Thorland, E. C. (2020). Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). In: Elsevier.

- Rutherford, S. L., & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *nature*, 396(6709), 336-342.
- Sahni, N., Yi, S., Taipale, M., Bass, J. I. F., Coulombe-Huntington, J., Yang, F., Peng, J., Weile, J., Karras, G. I., & Wang, Y. (2015). Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. *Cell*, 161(3), 647-660.
- Schuster-Böckler, B., & Lehner, B. (2012). Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *nature*, 488(7412), 504-507.
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., & Doench, J. G. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *science*, 343(6166), 84-87.
- Ståhl, P. L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J. F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J. O., & Huss, M. (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *science*, 353(6294), 78-82.
- Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. (2010). Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annual review of medicine*, 61(1), 437-455.
- Sweta, S., Dudnakova, T., Sudheer, S., Baker, A. H., & Bhushan, R. (2019). Importance of long non-coding RNAs in the development and disease of skeletal muscle and cardiovascular lineages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 228.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., & Siddiqui, A.

- (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods*, 6(5), 377-382.
- Tewhey, R., Kotliar, D., Park, D. S., Liu, B., Winnicki, S., Reilly, S. K., Andersen, K. G., Mikkelsen, T. S., Lander, E. S., & Schaffner, S. F. (2016). Direct identification of hundreds of expression-modulating variants using a multiplexed reporter assay. *Cell*, 165(6), 1519-1529.
- Visel, A., Rubin, E. M., & Pennacchio, L. A. (2009). Genomic views of distant-acting enhancers. *nature*, 461(7261), 199-205.
- Visscher, P. M., Wray, N. R., Zhang, Q., Sklar, P., McCarthy, M. I., Brown, M. A., & Yang, J. (2017). 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *The American Journal of Human Genetics*, 101(1), 5-22.
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nature biotechnology*, 30(11), 1095-1106.
- Zeng, Z., & Bromberg, Y. (2019). Predicting functional effects of synonymous variants: a systematic review and perspectives. *Frontiers in genetics*, 10, 914.
- Zhu, Z., Zhang, F., Hu, H., Bakshi, A., Robinson, M. R., Powell, J. E., Montgomery, G. W., Goddard, M. E., Wray, N. R., & Visscher, P. M. (2016). Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nature genetics*, 48(5), 481-487.

**TIBBİ BİYOLOJİ ALANINDA
AKADEMİK TARTIŞMALAR**

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com