

Ding Cao
Dr. med.

Characterization of *SMAD5* gene variants identified in pulmonary arterial hypertension patients

Fach/Einrichtung: Humangenetik
Doktormutter: Prof. Dr. Christina A. Eichstaedt

Die pulmonale arterielle Hypertonie ist eine fortschreitende und seltene Erkrankung, die mit Genmutationen einhergeht. Eine pulmonale arterielle Hypertonie spezifisches Genpanel wurde für 325 Patienten verwendet, um zum einen, bekannte pulmonale arterielle Hypertonie Gene zu sequenzieren und zum anderen Kandidatengene zu untersuchen, um für die Erkrankung neue Gene zu entdecken.

Es wurden zwei Varianten im Gen SMAD-Family Member 5 (*SMAD5*) identifiziert, die zunächst als Varianten unklarer Signifikanz eingestuft wurden. Die erste Variante, c.1175T>C p.(Leu392Pro), wurde in einer ukrainischen hereditären pulmonal arteriellen Hypertonie Familie gefunden. Die Variante war in der Kontrolldatenbank GnomAD (>800.000 veröffentlichte Exome) nicht vorhanden und wurde vom *in silico*-Vorhersageprogramm REVEL mit einem Score von 0,97 als pathogen vorhergesagt. Sie lag innerhalb der Proteinbindungsdomäne des *SMAD5* Proteins.

Die zweite Variante in *SMAD5*, c.277T>A p.(Trp93Arg), wurde bei einer Patientin mit einem angeborenen Herzfehler assoziiert mit PAH gefunden. Der *in silico* Vorhersagewert deutete auf ihre Pathogenität hin. Wie die erste Variante war auch sie in keinen Kontrollen zu finden. Zudem lag sie innerhalb der DNA-Bindungsdomäne des *SMAD5* Proteins.

Um die Frage zu beantworten, ob diese beiden Varianten pathogen oder benigne waren, wurde eine Reihe von Experimenten *in vitro* durchgeführt. Die beiden Varianten wurden mit Hilfe eines Plasmid-Gen-Überexpressionssystems in glatten pulmonal arteriellen Muskelzellen induziert. Die c.1175T>C p.(Leu392Pro)-Varianten induzierten Zellen zeigten eine signifikant höhere Zellviabilität aufgrund einer deutlich erhöhten Zellproliferation im Vergleich zu *SMAD5*-Wildtyp Kontrollzellen. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass Patienten mit der c.1175T>C p.(Leu392Pro)-Variante möglicherweise stärker proliferierende glatten pulmonale arterielle Muskelzellen haben, wodurch eine verengte Lungenarterie den Flusswiderstand und den pulmonalen vaskulären Druck in der Lungenarterie erhöhen könnte.

Glatte pulmonal arterielle Muskelzellen mit der c.277T>A p.(Trp93Arg) Variante zeigten eine stark verringerte Zellviabilität aufgrund erhöhter Apoptose. Obwohl die c.277T>A p.(Trp93Arg) induzierten Zellen unterschiedliche Ergebnisse zeigten, je nachdem in welcher kommerziellen Zellcharge sie exprimiert wurden, zeigten beide Zellchargen eine signifikant veränderte Zellviabilität im Vergleich zu *SMAD5* Wildtypzellen. Dieses Ergebnis deuteten jedoch darauf hin, dass komplexe Mechanismen die Zellviabilität in Zellen mit der c.277T>A p.(Trp93Arg) Variante steuern, zu welchen genetische, epigenetische oder weitere äußere Einflussfaktoren beitragen könnten.

Insgesamt zeigten die funktionellen Untersuchungen, dass beiden *SMAD5* Varianten c.1175T>C p.(Leu392Pro) und c.277T>A p.(Trp93Arg) als wahrscheinliche pathogen re-klassifiziert werden konnten. Somit sollte das *SMAD5*-Gen als neues Gen für PAH angesehen

und bei der molekulargenetischen Diagnostik bei pulmonal arteriellen Hypertonie Patienten mit untersucht werden.