ÖZET

İnci, E. (2026). Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Patogenezinde Rolü Olduğu Düşünülen Aday Genlerin Fonksiyonel Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) pulmoner arter vazokonstriksiyonu ve yeniden modellenmesi ile karakterizedir. Önceki çalışmamızda genç yaşta idiyopatik PAH (İPAH) tanısı alan bir hastada, patojenik olduğu tahmin edilen, hastalık patogenezinde rol oynayabilecek biyolojik yolaklarda görev alan, yeni ve nadir *SMAD5* ve *SLIT2* varyantları tüm ekzom dizileme ile heterozigot durumda saptanmıştır. Ayrıca, *SMAD5* ekspresyonunun İPAH olgularında azaldığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında, saptanan erken sonlandırma kodonu oluşturan *SMAD5*:c.694C>T, p.Gln232* ve yanlış anlamlı *SLIT2*:c.2852G>A, p.Gly951Glu varyantlarının yol açabileceği olası moleküler değişikliklerin PAH patogenezindeki potansiyel rolünün *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Varyantların etkileri patojenite tahmin araçları kullanılarak *in silico* değerlendirilmiştir. Sanger dizileme ile aile segregasyonu yapılmış ve ailede *SMAD5* mRNA ekspresyonu incelenmiştir. *In vitro* çalışmalarda, HEK293T hücreleri kullanılarak CRISPR/Cas9 yöntemiyle *SMAD5 knock-out* (KO) modelinin oluşturulması için çalışmalar gerçekleştirilmiş, *wild-type* (WT) hücrelerde siRNA aracılı *SLIT2* baskılanması ve BMP-4 stimülasyonu sağlanmıştır. BMP-4 uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi CCK-8 testi ile değerlendirilmiştir. Oluşturulan hücre kültürü koşullarında kantitatif gerçek zamanlı PCR ile *SLIT2* ve reseptörü *ROBO1*, BMP reseptörü *BMPR2*, R-SMAD ailesi üyeleri (*SMAD1*, *SMAD5* ve *SMAD8*), ortak SMAD olan *SMAD4* ile BMP sinyal yolunun aşağı akış hedefleri olan *ID1* ve *ID3* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca, Western blot ile SMAD5, fosforile SMAD5 (pSMAD5) ve aktif BMP sinyalizasyonunu gösteren fosforile SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8) protein kompleksi anlatım düzeyleri incelenmiştir.

In silico analizlerde her iki varyant patojenik sınıflandırılmış ve *SLIT2* varyantının protein stabilitesini azalttığı, *SMAD5* varyantının ise anlamsız kodon aracılı mRNA yıkımına sebep olacağı öngörülmüştür. *SMAD5* üzerindeki bu etki probanda ait cDNA örneğinin Sanger dizilemesiyle doğrulanmıştır. *SMAD5* varyantı proband dışında dört aile üyesinde heterozigot olarak saptanırken *SLIT2* varyantı yalnızca probandda saptanmıştır. Ailede varyant taşıyan dört bireyde taşımayanlara kıyasla *SMAD5* ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda, *SMAD5* KO modeli için oluşturulan altı farklı kolonide başlangıçta mRNA anlatımında %46 ile %87 arasında ve protein anlatımında %57 ile %92 arasında baskılanma belirlenmiş ancak bu baskılanmanın uzun dönemde stabilite gösteremediği saptanmıştır. WT HEK293T hücrelerinde siRNA uygulaması ile *SLIT2* gen ifadesinin %69 oranında baskılanması sağlanmıştır. BMP-4 uygulaması ile *ID1* ve *ID3* genlerinin ifadelerinin arttığı belirlenmiş ve yolağın aktivasyonu doğrulanmıştır. *SLIT2* ifadesinin baskılanması ile *BMPR2* gen anlatım düzeyinin arttığı, bunun yanında baskılama yapılan hücrelerde BMP-4 uygulaması ile *SMAD1* ve *SMAD8* ekspresyonlarının ilgili kontrollere göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Yalnızca BMP-4 uygulanan koşulda *SMAD8* gen ifadesinin kontrole göre arttığı saptanmıştır. *SLIT2* geninin baskılandığı koşullarda SMAD5, pSMAD5, pSMAD1/5/8 protein seviyelerinin ve pSMAD5/total SMAD5 oranını azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, *SLIT2* baskılanmasına bağlı SMAD5 protein düzeyi ve R-SMAD fosforilasyonundaki azalma, SLIT2 proteininin BMP/SMAD sinyal yolunda düzenleyici bir rol üstlendiğini ve *SMAD5* varyantı ile birlikte yalnızca probandda gözlenen ağır PAH fenotipini açıklayabilecek ortak bir moleküler mekanizmayı desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler : İPAH, BMP, BMP-4, *SMAD5*, *SLIT2*.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41871

Bu çalışma TÜBİTAK 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Tez çalışmalarında İstanbul Kalkınma Ajansı İSTisNA (No:TR10/22/TNH) projesi altyapısı kullanılmıştır.