



Noregs miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgåve 2019 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Genetisk og klinisk karakterisering av moyamoyasjukdom hos pasientar av skandinavisk opphav

Genetic and Clinical Characterization of Moyomoya
Disease in Patients of Scandinavian Origin

Ingunn Vespestad Steinsvåg

Master i bioteknologi

Forord

Arbeidet med denne oppgåva blei utført i Kaja Kristine Selmer si forskingsgruppe ved Seksjon for forskning og utvikling, Avdeling for medisinsk genetikk, Oslo universitetssjukehus etter initiativ frå Markus K. H. Wiedmann. Arbeidet blei utført i tidsrommet august 2018 til mai 2019. Arbeidet er i hovudsak finansiert av driftsmidlar tilgjengeleg frå Selmers forskingsgruppe.

Eg vil gjerne takka rettleiaren min, Kaja Kristine Selmer, som har leia prosjektet. Takk for godt samarbeid og for at du har gitt meg høve til å utføra denne spanande masteroppgåva. Takk for framifrå oppfølging gjennom heile prosessen, konstruktive tilbakemeldingar og gode diskusjonar.

Eg vil også takka medrettleiarane mine. Takk til Magnus D. Vigeland for opplæring i analyse av eksomdata, svar på spørsmål undervegs og nyttige samtalar og tilbakemeldingar. Takk til Markus K. H. Wiedmann for å ha tatt initiativ til prosjektet og sett oss i kontakt med pasientane og for informative samtalar om dei kliniske aspekta ved sjukdommen. Takk til Thore Egeland, ved Noreg miljø- og biovitenskaplege universitet, for hjelp med praktiske ting undervegs og informasjon om rutinar ved universitetet.

Takk til alle i forskingsgruppa til Kaja Kristine Selmer for å ha tatt meg godt imot og for alle innspel undervegs i arbeidet. Spesielt takk til Hanne S. Hjorthaug for opplæring og hjelp på laboratoriet, Inger-Lise Mero for lærerike og interessante diskusjonar om kandidatgena og Ying Sheng for bioinformatisk handtering av sekvenseringsresultata.

Til slutt vil eg takka pasientane som har samtykka til å vera med i studien og bidratt med sin historie og sitt arvemateriale.

Mai 2019

Ingunn Vespestad Steinsvåg

Samandrag

Innleiing

Dei siste 15 åra har det vore stor utvikling av nye teknologiar for DNA-sekvensering. Dette har opna opp for mange nye bruksområde av desse teknologiane. Utviklinga av neste generasjons sekvensering (NGS) har ført til nye metodar for å undersøka den genetiske årsaka til monogene sjukdommar. Dette kan blant anna gjerast ved hjelp av heileksomsekvensering (WES), noko som ofte er føremålstenleg då om lag 85% av sjukdomsframkallande variantar ligg i eksomet.

Moyamoyasjukdom (MMD) er ein cerebrovaskulær sjukdom karakterisert av stenose eller okklusjon som senker blodtilføringa til hjernen, som leder til kollaterale arterienettverk over stenosen/okklusjonen. MMD er ein svært sjeldan sjukdom blant kaukasiske pasientar, men er mindre sjeldan i asiatiske land. MMD kjem oftast til uttrykk som hjerneinfarkt eller hjernebløding. Det er antatt at genetiske faktorar spelar ei rolle i utviklinga av MMD, men desse faktorane er enda ikkje fullstendig identifisert.

Formålet med denne studien var å kartlegga MMD-pasientar med skandinavisk opphav, både klinisk og genetisk karakterisering.

Pasientar og metodar

I denne studien blei seks skandinaviske pasientar med MMD rekruttert. Pasientane blei delt inn i familiære (n=3) og sporadiske (n=3) pasientar. To friske foreldre til ein av dei sporadiske pasientane blei også inkludert i studien. Frå blodprøvar tatt av pasientane blei DNA isolert, før eksomet blei isolert og opprika. Eksomet blei deretter sekvensert. Det blei gjort analysar av dei genetiske sekvensane i FILTUS for å identifisera kandidatgen for utviklinga av MMD. Desse analysane inkluderte familiebasert analyse av familiære pasientar, *de novo*-analyse av ein sporadiske pasient og friske foreldre og undersøking av tidlegare identifiserte kandidatgen hos alle pasientane. Me identifiserte då variantar i fleire interessante kandidatgen.

Resultat

Pasientane i denne studien hadde eit klinisk bilete som var foreinleg med andre studiar på kaukasiske pasientar. Me identifiserte åtte kandidatgen; *NR4A3*, *PDZRN3*, *TNFAIP2*, *AGXT2*, *NOS3*, *ITGAV*, *FGFR3* og *GBR7*. Sjølv om det ikkje blei identifisert ein felles variant eller eit felles gen hos alle pasientane, blei det identifisert interessante samanhengar mellom fleire av gena. Proteina koda av *NOS3*, *ITGAV*, *NR4A3*, *AGXT2* og *GBR7* er alle involvert i produksjon av nitrogenmonooksid (NO) i cellene, som er viktig for angiogenese. Alle pasientane hadde minst ein variant i minst eit av desse fem gena.

Konklusjon

I denne studien blei det ikkje identifisert éin felles monogen årsak hos alle pasientane, men det blei observert fleire interessante variantar i ulike gen. Resultata frå denne studien og nokre tidlegare studiar tydar på at endringar i NO-produksjon er viktig for utviklinga av MMD i kaukasiske pasientar. Det er imidlertid ikkje mogleg å gi nokre sikre svar ut frå denne studien, då variantane blei observert i få pasientar, og det trengs difor meir forskning på området.

Abstract

Introduction

In the past 15 years, there has been a great development of new technologies for DNA sequencing. The development of next generation sequencing (NGS) has led to new methods for investigating the genetic cause of monogenic diseases. This can be done by means of whole exome sequencing (WES), which often is advantageous since about 85% of pathogenic variants lie in the exome.

Moyamoya disease (MMD) is a cerebrovascular disease characterized by stenosis or occlusion that lowers blood flow to the brain which leads to new collateral artery networks over this stenosis/occlusion. MMD is rarely seen among Caucasian patients, but is more commonly seen in Asian patients. The initial manifestations of MMD are usually ischemic stroke or intracranial hemorrhage. It is believed that genetic factors play a role in the development of MMD, but these factors are not yet fully identified.

The purpose of this study was to characterize MMD patients with Scandinavian origin, both clinically and genetically.

Patients and methods

In this study, six Scandinavian patients with MMD were enrolled. The patients were familial (n=3) and sporadic (n=3) patients. Two healthy parents of one of the sporadic patients were also included in the study. From blood samples drawn from the patients, DNA was isolated before the exome was captured and enriched. The exome was then sequenced. Analyzes were performed in FILTUS to identify candidate genes for the development of MMD. These analyzes included family-based analysis of familial patients, *de novo* analysis of one sporadic patient and healthy parents, and examination of previously identified candidate genes in all patients. Based on a set of criteria, we evaluated identified variants in candidate genes.

Results

The patients in this study had clinical characteristics compatible with other studies of Caucasian patients. Eight genes of interest were identified in this study; *NR4A3*, *PDZRN3*, *TNFAIP2*, *AGXT2*, *NOS3*, *ITGAV*, *FGFR3* and *GBR7*. Although there was not identified any shared variant or candidate variants in a single shared gene, the proteins encoded by several of the genes we identified, *NOS3*, *ITGAV*, *NR4A3*, *AGXT2* and *GBR7*, were found to be involved in production of nitric oxide (NO) in the cells, which is important for angiogenesis. All patients had at least one variant in at least one of these five genes.

Conclusion

In this study, no single monogenic cause was identified for all the patients, but candidate variants and genes were identified. These genes encoded proteins involved in the NO production in the cells, and we believe this is an important clue for the pathogenesis of MMD in Caucasian patients. This hypothesis needs to be further tested and replicated in further research.

Forkortingar

ACA	Fremre hjernepulsåre
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
AMPure XP	Agencourt AmpureXP
bp	Basepar
CADD	Combined Annotation–Dependent Depletion
CI	Konfidensintervall
CNV	Kopinummervariant
CRF	Case report form
CRT	Syklisk reversibel terminering
ddNTP	Dideoksynukleotid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotida
dsDNA	Dobbeltråda DNA
ECM	Ekstracellulære matriks
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FGF-ar	Fibroblast growth factors
GME	Greater Middle East
gnomAD	Genome Aggregation Database
GoF	Gain-of-function
GWAS	Genomvide assosiasjonsstudiar
hg	Humant genom
HTS	Storskala sekvenseringsteknikkar («High throughput»-sekvensering)
ICA	Indre halsarterie
indels	Insertjonar og delesjonar
LOD score	Log of the odds score
LoF	Loss-of-function

MAF	Minor allele frequency
MCA	Midtre hjernepulsåre
miRNA	MikroRNA
MMD	Moyamoyasjukdom
MRA	Magnetresonans-angiografi
ng	Nanogram
NGS	Neste generasjons sekvensering
NO	Nitrogenmonooksid
NOS	Nitrogenoksyd syntase
OR	Odds ratio
OUS	Oslo universitetssjukehus
PCR	Polymerasekjedereaksjon
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Oksygenradikal
SBS	Sekvensering ved hjelp av syntese (sequencing by synthesis)
SNP	Enkeltnukleotidpolymorfisme
SNV	Enkeltnukleotidvariant
TIA	Forbigående iskemisk episode (drypp)
VSMC	Vaskulære glatte muskelceller
WES	Heileksomsekvensering
WGS	Heilgenomsekvensering
μL	Mikroliter

Innholdsliste

Forord	1
Samandrag	2
Abstract	3
Forkortingar	4
1. Innleiing.....	9
1.1. Genetiske sjukdommar	9
1.1.1. Arvemønster.....	9
1.1.2. Penetrans og variabel ekspressivitet	9
1.1.3. Imprinting.....	10
1.1.4. Genetisk heterogenitet	10
1.1.5. De novo-variantar	10
1.1.6. Ulike mekanismar for sjukdomsframkalling	11
1.1.7. Som å finna nåla i høystakken.....	11
1.2. Genetiske analysar.....	12
1.2.1. Sanger-sekvensering	12
1.2.2. Neste generasjons sekvensering.....	13
1.2.3. Heileksomsekvensering	16
1.2.4. Samanlikning av WES med andre genetiske analysar	17
1.2.5. Statistiske analysar innanfor genetik.....	18
1.3. Moyamoyasjukdom	20
1.3.1. Epidemiologi.....	20
1.3.2. Årsak og patogenese	22
1.3.3. Symptom og klinisk presentasjon	22
1.3.4. Diagnostisering	23
1.3.5. Behandling og prognose.....	24
1.3.6. Forskjellar mellom asiatisk og europeisk moyamoya sjukdom	25
1.3.7. Genetiske faktorar identifisert i asiatiske pasientar	25
1.3.8. Genetiske faktorar identifisert i kaukasiske pasientar	27
1.4. Hypotese og målsetting	28
2. Material og metode.....	29
2.1. Utarbeiding av spørreskjema (CRF)	30
2.2. Rekruttering av pasientar, samtale med pasient og kirurg og blodprøvetaking	30
2.3. Generelle laboratorieteknikar	31
2.3.1. Måling av DNA-konsentrasjon.....	31
2.3.2. Kvalitetskontroll av fragmentstorleik	31

2.3.3.	<i>Reinsing av DNA ved hjelp av magnetiske kuler</i>	31
2.4.	Eksom-preparering	32
2.4.1.	<i>Laging av DNA-bibliotek</i>	33
2.4.2.	<i>Hybridisering og capture</i>	34
2.4.3.	<i>Indeksing av prøvane</i>	35
2.5.	Sekvensering, variantbestemming og annotering	36
2.5.1.	<i>Sekvensering av prøvane</i>	36
2.5.2.	<i>Variantbestemming og annotering</i>	36
2.6.	Genetiske analysar	37
2.6.1.	<i>Filtrering</i>	37
2.6.2.	<i>Familiebasert analyse</i>	38
2.6.3.	<i>De novo-analyse</i>	38
2.6.4.	<i>Analyse basert på kandidatgenlister</i>	38
2.6.5.	<i>Analyse av autozygote variantar</i>	39
2.6.6.	<i>Analyse basert på allereie identifiserte gen</i>	39
2.7.	Vurdering av variantar identifisert i genetiske analysar	40
2.7.1.	<i>Vurdering basert på populasjonsfrekvens</i>	40
2.7.2.	<i>Vurdering basert på varianttype</i>	40
2.7.3.	<i>Vurdering basert på prediksjonsverktøy</i>	40
2.7.4.	<i>Vurdering basert på proteinet sin funksjon</i>	41
3.	Resultat	42
3.1.	Karakterisering av pasientane	42
3.1.1.	<i>Familiære pasientar og familiehistorie</i>	42
3.1.2.	<i>Sporadiske pasientar</i>	44
3.2.	Konsentrasjonen og kvaliteten til prøvane under eksom-prepareringa	45
3.3.	Eksomsekvensering	46
3.4.	Identifisering av gen av interesse	46
3.4.1.	<i>Familiebasert analyse</i>	47
3.4.2.	<i>De novo-analyse</i>	48
3.4.3.	<i>Analyse basert på kandidatgen frå litteratur</i>	48
3.4.4.	<i>Analyse basert på kandidatgen frå angiogeneseliste</i>	48
3.4.5.	<i>Analyse av autozygote område</i>	49
3.4.6.	<i>Analyse av kandidatgen med funn i minst ein pasient</i>	49
4.	Diskusjon	50
4.1.	Kliniske observasjonar av skandinaviske pasientar	50
4.2.	Avgrensingar ved eksomsekvensering	50

4.2.1.	<i>Tekniske avgrensingar</i>	50
4.2.2.	<i>Biologiske avgrensingar</i>	51
4.3.	Aspekt ved filtrerings- og analysestrategiar	52
4.3.1.	<i>Sjukdomsframkallande variantar kan vera synonyme</i>	52
4.3.2.	<i>Bruk av databasar over populasjonsfrekvensar</i>	52
4.3.3.	<i>Bruk av prediksjonsverktøy</i>	53
4.4.	Biokjemisk tolking av variantane i kandidatgena	54
4.4.1.	NR4A3	54
4.4.2.	PDZRN3	54
4.4.3.	TNFAIP2	54
4.4.4.	AGXT2	55
4.4.5.	NOS3	55
4.4.6.	ITGAV	55
4.4.7.	FGFR3	55
4.4.8.	GBR7	56
4.5.	Reaksjonsvegar kandidatgena er involvert i og funksjonen til kandidatgena	56
4.5.1.	<i>Integrin-reaksjonsveg; ITGAV og GRB7</i>	56
4.5.2.	<i>NO-avhengig reaksjonsveg; NOS3 og AGXT2</i>	57
4.5.3.	<i>Gen som påverkar nivået av ROS; NOS3 og NR4A3</i>	58
4.5.4.	<i>Andre kandidatgen; FGFR3, TNFAIP2 og PDZRN3</i>	58
4.6.	Kan hypotesane vera feil?	59
4.6.1.	<i>Arv og miljø?</i>	59
4.6.2.	<i>Ikkje dominant arv</i>	60
4.6.3.	<i>Genetisk heterogenitet: Ikkje felles årsak blant pasientane</i>	60
4.7.	Etiske aspekt ved sekvensering	61
4.7.1.	<i>Identifiserbar informasjon og anonymisering</i>	61
4.7.2.	<i>Tilfeldige funn</i>	62
5.	Konklusjon og framtidsutsikter	63
	Referansar	64
	Appendiks	74
	Appendiks 1 – Case report form (CRF)	74
	Appendiks 2 – Kandidatgenliste frå litteratur	81
	Appendiks 3 – Kandidatgen frå angiogeneseliste frå Qiagen	82

1. Innleiing

1.1. Genetiske sjukdommar

Gregor Mendel beskrev korleis eigenskapar blir arva frå ein generasjon til den neste i 1865.¹ Det tok over 30 år frå han publiserte resultatane sine til andre forskarar anerkjente og bekrefta resultatane hans, men då dette endeleg skjedde på starten av 1900-talet la dei grunnlaget for korleis me i dag forstår arv.² Ut frå resultatane til Mendel er det utvikla tre prinsipp for arv; 1) Prinsippet om dominans, 2) Prinsippet om segregering, og 3) Prinsippet om uavhengig fordeling.³ Desse prinsippa er framleis i bruk når det gjeld arv av monogene eigenskapar, det vil seie der berre eitt gen er involvert,³ men som det vil bli tydeleg seinare er det sjeldan så enkelt når ein ser på meir genetisk komplekse sjukdommar hos menneske.

1.1.1. Arvemønster

Den enklaste forma for arv er monogen arv, som vil seia at ein sjukdom er forårsaka av ein variant i eit enkelt gen.³ Når ein skal undersøka genetisk årsak til ein ny sjukdom er dette den enklaste antakinga ein kan jobba utifrå. Det er derimot mange komplikasjonar til denne enkle antakinga.³ Først og fremst er det svært vanleg at sjukdommar med varierende fenotypar er forårsaka av variantar i fleire gen.³ Ved sjukdommar forårsaka av fleire gen kan ein skilje mellom oligogen arv og polygen arv.³ Oligogene sjukdommar er sjukdommar som er forårsaka av nokre få gen.³ Om ein sjukdom til dømes er bestemt av to gen er det nødvendig med sjukdomsframkallande variantar i begge gena for at sjukdommen skal komma til uttrykk.³

Polygene sjukdommar er forårsaka av variantar i mange gen, og om ein tar med påverkinga av miljøfaktorar blir desse sjukdommane ofte kalla multifaktorielle sjukdommar eller genetisk komplekse sjukdommar.^{3,4} Ved slike multifaktorielle sjukdommar er det gjerne fleire genetiske risikofaktorar som saman med risikofaktorar frå miljøet og livsstilen som forårsakar sjukdommen.² Det kan likevel vera vanskeleg å setja ei skiljelinje mellom enkle monogene sjukdommar og multifaktorielle sjukdommar,³ noko som oligogene sjukdommar er eit døme på. Alle genetiske sjukdommar ligg på ein skala mellom monogen og polygen, og det er viktig å veta omtrent kor på denne skalaen sjukdommen ein er interessert i ligg.³ I tillegg til polygen arv er det andre fenomen som kompliserer monogen arv, og desse vil bli kort beskrive under.

1.1.2. Penetrans og variabel ekspressivitet

Eit fenomen som kompliserer monogen arv er redusert penetrans. Penetrans er definert som sannsynet for å få ein sjukdom gitt ein spesifikk genotype.³ Om sannsynet er 1 har ein fullstendig penetrans, og alle med den gitte genotypen vil få sjukdommen.³ Om sannsynet derimot er mindre enn 1 vil det finnast personar med genotypen som aldri utviklar sjukdommen.³ Det sistnemnte er tilfellet for mange sjukdommar,^{5,6} og også antatt for nokre sjukdommar der arvemønsteret framleis er under diskusjon, inkludert for moyamoyasjukdom,⁷ som vil bli beskrive seinare.

Redusert penetrans kan vera med på å forklara korleis eit barn med friske foreldre kan få ein arveleg sjukdom.⁵ Utreiinga av redusert penetrans er blitt betre kjend etter at neste generasjons sekvensering blei introdusert. Redusert penetrans kan gjera det vanskelegare å skilja mellom monogen og polygen arv,⁵ då dette gjer at sjukdommen ikkje nødvendigvis segregerer med

variantane som forårsakar den. Eit omgrep som ikkje må forvekslast med penetrans er variabel ekspressivitet, der dei som får sjukdommen har forskjell i graden av sjukdomsmanifestasjon.³

Ein kategori av redusert penetrans er aldersavhengig penetrans. Ved aldersavhengig penetrans har alderen noko å seia for risikoen for å få sjukdom, og dette er spesielt viktig å ta omsyn til når sjukdomen ein studerer har ulik insidens i ulike aldergrupper.³ Debutalders-distribusjonen er eit viktig verktøy for å få kunnskap om dette, og det er viktig å inkludera denne i dei genetiske analysane.³ Til dømes, når penetransen for ein genotype aukar med alderen kan ein ikkje veta om «friske» unge personar faktisk er friske eller om dei berre ikkje har utvikla sjukdommen enda. Det er viktig å ta omsyn til dette slik at ein brukar rett genetisk modell for analysen.

1.1.3. *Imprinting*

Imprinting er eit anna fenomen som kompliserer monogen arv, og dette er framleis ikkje fullstendig forstått.³ Imprinting er eit fenomen der uttrykket av eit allel er bestemt av kven av foreldra allelet er arva frå.² Maternell imprinting vil seia at allelet arva frå mor er inaktivert og allelet arva frå far blir uttrykt, medan paternell imprinting er det motsette.² Dette vil igjen seie at ved maternell imprinting vil ein person berre bli sjuk om den har arva sjukdomsallelet frå far, og motsett.³ Dette gjer at om ein person er heterozygot for eit slikt allel er det vesentleg kven dei ulike allela er arva frå. Det er difor viktig å ta omsyn til dette i analysane viss det er kan tenkast at imprinting spelar ei rolle for sjukdommen.³

1.1.4. *Genetisk heterogenitet*

Viss ulike variantar forårsakar den same fenotypen blir det kalla genetisk heterogenitet.³ Det blir skilt mellom to typar genetisk heterogenitet; allelisk heterogenitet og locus-heterogenitet.³ Locus-heterogenitet er at sjukdommen kan vera forårsaka av sjukdomsframkallande variantar i ulike gen.² Allelisk heterogenitet er at det er fleire sjukdomsframkallande variantar i eit gen.² Allelisk heterogenitet gjer at kunnskap om variasjon både i sjuke og friske er viktig for å tolka om ein gitt variant er årsak til sjukdom eller ikkje. Det er også viktig at forskingsresultat blir reproduserte, sidan ein variant som er identifisert som sjukdomsframkallande i eit individ ikkje nødvendigvis forårsakar sjukdommen i alle individ med same sjukdom.

1.1.5. *De novo-variantar*

Alle individ har i teorien arva halve genomet sitt frå mor og det andre halve frå far, men i tillegg til dette har kvart individ nokre nyoppståtte variantar som verken mor eller far har, og desse blir kalla *de novo*-variantar.⁸ Dei fleste *de novo*-variantane er enkelt nukleotidvariantar (SNVs),⁹ og for desse er raten i kimceller $1,0-1,8 \times 10^{-8}$ per nukleotid per generasjon.⁸ Dette vil seie at kvart individ i gjennomsnitt har mellom 44 og 82 *de novo* SNVs i genomet sitt.⁸ Blant desse SNVs vil om lag 1-2 variantar påverka den proteinkodande sekvensen.⁸ Det er vist at om lag 80% av SNVs oppstår i kimcellene kjem frå far og at høgare alder hos far aukar talet på *de novo*-variantar hos barnet.^{8,9} Dette skyldast at produksjonen av sædceller og eggceller er ulik og det skjer mange fleire celledelingar under produksjon av sædceller.⁸ Då det er under DNA-replikasjon at dei fleste *de novo*-variantane oppstår vil auka tal på celledelingar også auka talet på *de novo*-variantar.⁸

De novo-variantar har vist seg å spela ei viktig rolle for menneskelege sjukdommar, spesielt alvorlege genetiske sjukdommar som oppstår sporadisk i ung alder.⁸ *De novo*-variantar er ein viktig grunn til at

sjukdommar som gjer at dei affiserte ikkje kan få barn, ikkje forsvinn ut av populasjonen.^{8,9} Det at *de novo*-variantar oppstår frå ein generasjon til neste gjer at dei i mykje mindre grad er gjenstand for seleksjon, noko som igjen gjer at desse variantane er av særdeles stor interesse som kandidatar til å forårsaka sjukdom.⁹

1.1.6. Ulike mekanismar for sjukdomsframkalling

Når ein har funne ein kandidatvariant som kan vera sjukdomsframkallande, er det viktig å ta stilling til kva mekanisme varianten forårsakar sjukdom med. Det blir hovudsakleg skilt mellom to typar mekanismar; loss-of-function (LoF) og gain-of-function (GoF).² LoF-variantar kan gjera at proteinet mistar funksjonen sin.² Det er mange variantar som kan gjere at eit protein kan mista funksjonen sin og det er difor mange ulike variantar som kan føra til den same fenotypen ved denne mekanismen.² Ved recessive sjukdommar er det nødvendig med sjukdomsframkallande variantar i begge allela. Dette kan forårsakast enten ved same variant i begge allela, eller ved ulike variantar i dei to allela, kalla kombinert heterozygositet (compound heterozygosity).² Dominante negative variantar har ein mekanisme som fører til LoF sjølv om det berre er ein variant i eit allel, og dette skjer ved at allelet med sjukdomsvarianten både mister funksjonen sin og inhiberer normal proteinaktivitet.² Variantar med ein LoF-mekanisme er dei enklaste å gjera funksjonelle studiar på, då det er tilstrekkeleg å fjerne genet med den sjukdomsframkallande varianten.

Variantar med ein GoF-mekanisme vil derimot gjere at proteinet blir meir aktivt eller får ein heilt ny funksjon.² Dette gjer at ein spesifikk variant kan gi ein heilt unik fenotype,² som ingen andre variantar gir. Dette gjer at ein ved funksjonelle studiar er avhengig av å tilføra nøyaktig den varianten som er sjukdomskandidaten for å undersøka mekanismen. GoF-variantar er i tillegg ofte dominante slik at det er nok med varianten i eit allel for å få sjukdomsfenotypen.² Dette gjer at funksjonelle studiar av GoF-mekanismar må vera meir målretta enn funksjonelle studiar av LoF-variantar.

1.1.7. Som å finna nåla i høystakken

Når ein leiter etter den genetiske årsaka til ein sjukdom leiter ein gjerne etter ein sjukdomsframkallande variant i eit gen. Dette kan vera ei veldig vanskeleg oppgåve og det er grunna to problem.² Det første problemet er at det humane genomet er stort og inneheld ein utruleg stor mengde variasjon.² Mellom eit individ og referansegnetomet, eit standardiserte humant genom (hg) basert på fleire individ, er det faktisk forskjellar ved så mykje som 3 millionar stadar på genomet.² Det andre problemet er at ingen sekvenseringsmetodar er 100% riktige eller klarar å sekvensera 100% av genomet.² Desse problema kan til ein viss grad løysast ved å gjenta sekvenseringa og ved å filtrera sekvensdataa på spesifikke måtar for å luke ut tekniske feil og for å finna sjeldne og øydeleggjande variantar.² Desse metodane vil bli beskrive i neste del.

1.2. Genetiske analysar

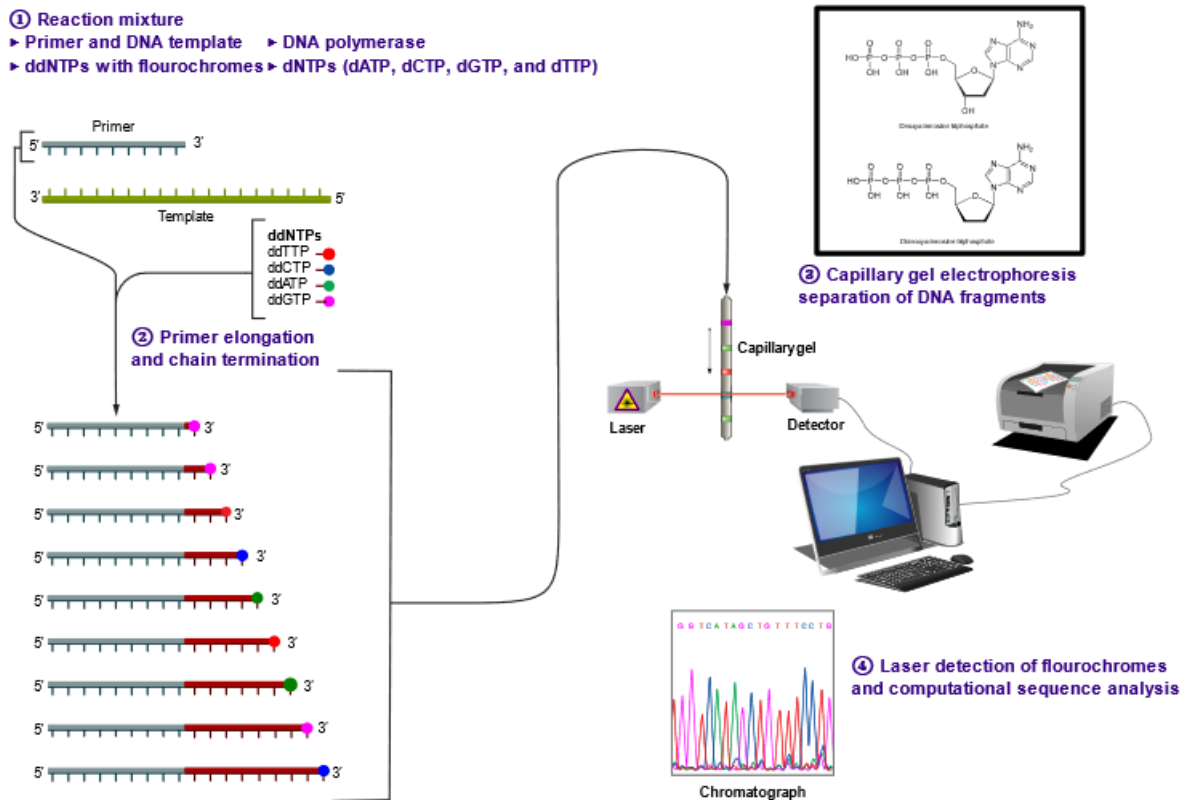
Etter at Hershey og Chase viste at DNA-molekylet var arvestoffet i cellene i 1952¹⁰ og Watson og Crick beskrev strukturen til DNA i 1953,¹¹ blei det rask stor interesse for å finna teknikkar for bestemma baserekkefølga til ulike DNA-molekyl.¹² Å bestemma baserekkefølga var som å lesa eit språk ingen kunne, og det tok over 20 år før den første gode teknikken for å bestemma baserekkefølga til DNA,¹² den såkalla Sanger-sekvenseringa,¹³ kom. Denne sekvenseringsteknikken var den rådande i mange år.¹⁴ Dei siste 15 åra har det vore stor utvikling av nye teknologiar for DNA-sekvensering¹² og dette har gitt forskarar mange nye moglegheiter og bruksområde for sekvensering.

1.2.1. Sanger-sekvensering

På slutten av 1970-talet utvikla Sanger og kollegaer¹³ ein metode for sekvensering av DNA kalla Sanger-sekvensering.³ Metoden er også kjend som dideoksey-sekvensering og kjedeterminerings-sekvensering,³ som er meir informative namn enn oppkallinga etter Sanger. Det er nemleg slik at Sanger-sekvensering baserer seg på terminering av den voksende DNA-kjeda ved hjelp av dideoksynukleotid (ddNTP)-trifosfat,³ som er eit nukleotid der 3'-posisjonen ikkje er reaktiv.¹²

I den originale prosedyren til Sanger var det nødvendig med fire separate reaksjonar, der kvar av dei inneheldt ein blanding av alle deoksynukleotida (dNTP) og eit av ddNTPa med eit radioaktivt merke.^{12, 13} I kvar av desse reaksjonane blei nukleotid inkorporerte i den voksende DNA-kjeda heilt til eit ddNTP blei inkorporert og terminerte DNA-kjeda.¹² Dette gjorde at det blei danna DNA-fragment med ulike lengder, og når desse blei analysert på ein gel var det mogleg å identifisera baserekkefølga ut frå lengda på fragmenta.¹² Det var nødvendig med fire separate reaksjonar fordi alle nukleotida gav same signal, nemleg ein mørk strek på gelen.¹²

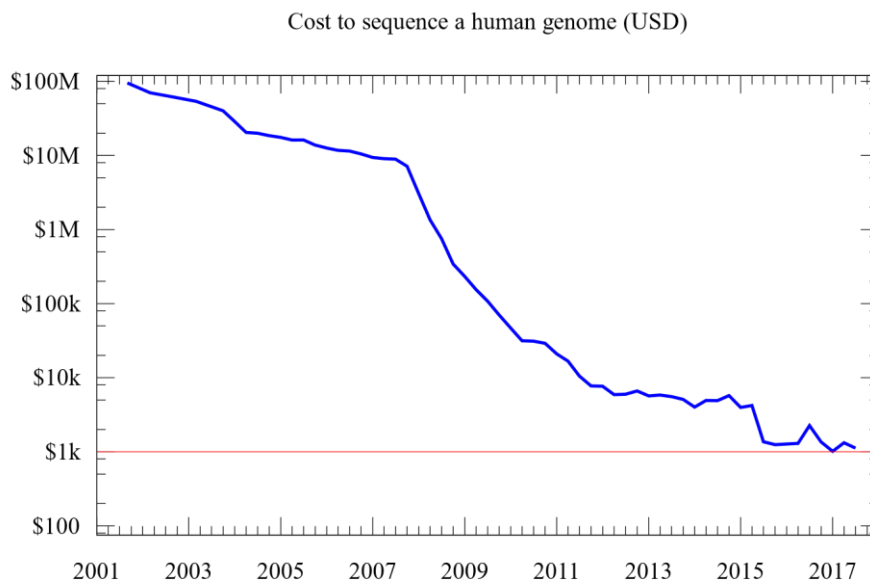
I dag er framleis hovudprinsippa frå Sanger sin metode i bruk, men prosedyren er blitt automatisert (figur 1.1).¹² No blir ddNTPa merka med fluorescerande fargestoff, noko som gjer det mogleg å merka dei med ulike fargar og dermed køyra alle fire reaksjonane i same tube.¹² Deretter blir fragmenta separert ved hjelp av elektroforese og baserekkefølga blir identifisert ved hjelp av ein laser som detekterer fluorescens-signala (figur 1.1).¹² Ein av dei store ulempene med Sanger-sekvensering er den avgrensa kapasiteten.¹⁵ Dei beste elektroforesemaskinane som blir brukt kan berre køyra 96 reaksjonar parallelt, og i kvar reaksjon kan det vera DNA-fragment på 500-1000 basepar (bp).¹⁵ Dette gjer at denne metoden i dag er mest brukt for målretta sekvensering av enkelt-variantar eller enkelt-gen, der det er tilstrekkeleg med sekvensering av små DNA-fragment.¹⁵



Figur 1.1: Stega i automatisert Sanger-sekvensering. 1) Reaksjonsmiksen, som inneheld dideoksynukleotid (ddNTP) merka med fluorescerande fargestoff, 2) DNA-fragmentet blir syntetisert til det blir terminert av eit ddNTP, 3) DNA-fragmenta blir separert i ein kapillærgel og ein laser detekterer fluorescens-signala, og 4) produktet av Sanger-sekvenseringa er ein chromatograf som viser baserekkefølga i DNA-fragmentet. (Reprodusert frå Estevezj (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>), «Sanger-sequencing», <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>)

1.2.2. Neste generasjons sekvensering

Sanger-sekvensering var lenge den dominerande teknologien for DNA-sekvensering, og det var denne teknologien som blei brukt for å sekvensera det humane genomet for første gong.¹⁴ Den første sekvenseringa av det humane genomet, kalla «Human Genome Project», tok heile 13 år¹⁴ og er estimert til å ha kosta 70 millionar dollar.¹⁵ Då det humane genomet var ferdig sekvensert i 2001 var det difor klart at det var nødvendig med meir effektive og billigare teknologiar om ein skulle kunna bruka heilgenomsekvensering (WGS) rutinemessig.^{14, 16} Dette førte til utviklinga av nye sekvenseringsteknikkar.¹⁶ Det blei sett som eit mål at kostnaden for å sekvensera eit heilt genom skulle nå US\$1000 innan 2016,¹² noko som i 2001 virka helt utenkjeleg. Dette målet blei nådd (figur 1.2),¹² og dei nye teknikkane har ført til at DNA-sekvensering har blitt brukt i større skala i klinikken og no er eit dominerande verktøy både innan forskning og diagnostikk.^{16, 17}

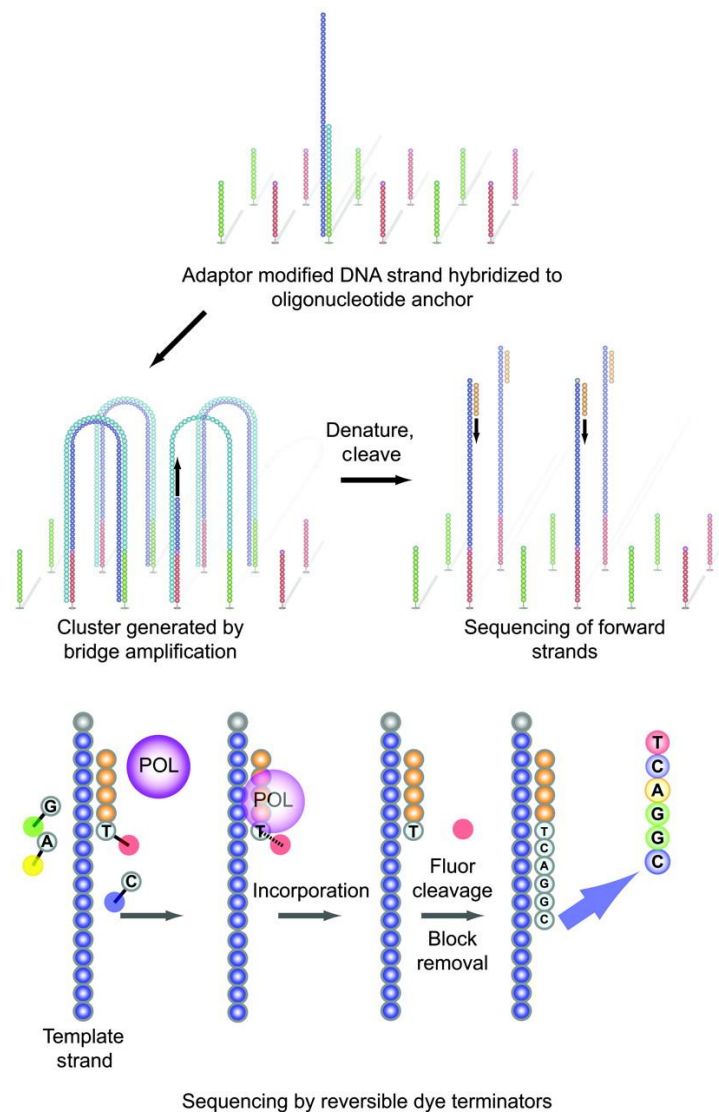


Figur 1.2: Kostnadsutviklinga for å sekvensera eitt humant genom, frå 2001 til 2017. (Reprodusert frå Originally Ben Moore, rewritten by grendel |khan. [Public domain], https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Historic_cost_of_sequencing_a_human_genome.svg)

Dei nye teknikkane er kjent under fleire namn som blir brukte om kvarandre, men som alle er samleomgrep for dei same sekvenseringsteknikkane. Namnet neste generasjons sekvensering (NGS) blir brukt, då introduksjonen av dei nye teknikkane var så revolusjonerande at det opna for at WGS blei tilgjengeleg for mange fleire forskarar.¹² Namnet «high throughput»-sekvensering (HTS, storskala sekvenseringsteknikkar) blir brukt grunna den store kapasiteten samanlikna med Sanger-sekvensering og at denne type sekvensering produserer store mengder data på kort tid.¹⁵ Det tredje namnet som blir brukt er «massively parallel»-sekvensering og dette namnet beskriv at store mengder DNA blir sekvensert parallelt i ein reaksjon.¹⁵

Det er utvikla fleire ulike NGS-teknologiar dei siste åra.¹⁶ Felles for mange av teknologiane er at dei fragmenterer DNA-et, festar adapterer til endane og amplifiserer desse fragmenta.¹² Deretter blir fragmenta sekvenserte parallelt og mappa (kartlagt) til eit referansegеном.¹² Denne parallelliseringa er ein av dei store fordelane med NGS,¹² og noko av det som gjer at NGS har ein mykje større kapasitet enn tradisjonell Sanger-sekvensering.¹⁶ Det er likevel også nokre ulemper med NGS; NGS gir ein høgare feil-rate og generelt kortare leselengde (read lengths) enn Sanger-sekvensering,¹⁶ og dette, saman med den store mengda data som blir produsert,¹⁶ gjer at det trengs høg kompetanse for å analysa resultatata.

Ein av NGS-teknologiane er sekvensering ved hjelp av syntese (sequencing by synthesis, SBS), og denne teknologien liknar på tradisjonell Sanger-sekvensering.¹⁶ Illumina har utvikla ein SBS-teknologi kalla syklisk reversibel terminering.¹⁶ Denne reaksjonen går i syklusar, men før syklusane startar blir det fragmenterte DNA-biblioteket amplifisert på ei flytcelle (flow cell) slik at det blir danna kluster med replikert DNA rundt kvart av dei originale fragmenta (figur 1.3).¹² Deretter startar syklusane og for kvar syklus blir ein blanding av alle dNTPa tilført, og eit dNTP blir inkorporert til DNA-tråden.¹² Alle dNTPa har ein blokkert 3'-posisjon og er merka med ulike fluorescerande fargestoff.¹² Ubrukte dNTP blir vaska bort, og overflata blir avbilda for å bestemma kva dNTP som er blitt inkorporert ved kvart kluster (figur 1.3).¹² Deretter blir blokkeringa og dei fluorescerande fargestoffa fjerna, og prosessen blir gjentatt.¹²



Figur 1.3: Prinsippa for syklisk reversibel terminering. DNA-fragmenta blir først hybridisert og amplifisert i kluster, for så å bli sekvensert. Sjølve sekvenseringa går føre seg ved at korrekt deoksynukleotid blir inkorporert til DNA-tråden. Deretter blir ubrukte deoksynukleotid vaska bort, og overflata blir avbildet for å bestemme kva deoksynukleotid som er blitt inkorporert ved kvart kluster. (Reprodusert med tillating frå Voelkerding, K. V., Dames, S. A. & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 55 (4): 641-58. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789.¹⁸⁾

To omgrep som er viktige når det er tale om NGS er sekvenseringsdjupne (sequencing depth) og sekvenseringsdekning (sequencing coverage),¹⁹ og desse må ikkje forvekslast. Sekvenseringsdjupne beskriv kor mange gonger eit gitt nukleotid er sekvensert under eksperimentet, mens sekvenseringsdekning beskriv kor stor del av den ønska sekvensen som er sekvensert.¹⁹

NGS har mange bruksområde innan medisinsk forskning og diagnostisering.^{15, 16, 20} WGS er eit av dei største bruksområda for NGS,¹⁶ og grunna den store reduksjonen i pris for sekvensering vil WGS bli enda meir brukt i framtida.¹⁵ For tida er framleis heileksomsekvensering (WES) eller målretta sekvensering ofte meir kostnadseffektiv og ein kan då sekvensera fleire individ med større sekvenseringsdjupne.^{15, 16} WES blir mykje brukt i forskning på genetiske sjukdommar, då

sjukdomsframkallande variantar ofte ligger i kodande område av DNA,² og vil bli beskrive i meir detalj i neste kapittel. Andre bruksområde for NGS er til dømes deteksjon av mosaikkmutasjonar,²⁰ karakterisering av patogene mikroorganismar,²⁰ sekvensering av cellefritt DNA¹⁵ og karakterisering av genetiske og epigenetiske trekk ved sjukdommar.^{15, 16}

1.2.3. Heileksomsekvensering

Eksomet er den delen av genomet som kodar for protein, og av dei om lag 3 milliardar basepara det humane genomet består av er eksomet berre 1-2% av dette.²¹ Det er no estimert at eksomet består av 23 000 protein-kodande gen,¹² og det er estimert at om lag 85% av dei sjukdomsframkallande variantane i genomet ligg i eksomet.²¹ Ved å undersøke variantar som ligg i eksomet kan ein i tillegg forstå direkte korleis dei endrar aminosyrerekkefølga til proteinet.² Dette, saman med det faktum at WES framleis er billigare enn WGS, gjer at WES i mange tilfelle kan vere ein tilfredsstillande metode for undersøking av genetisk årsak for sjukdommar. WES gir ein god dekking av genomet og høve til relativt handterleg tolking av resultata med tanke på pris.²¹ WES har likevel nokre ulemper samanlikna med WGS; WES krev ein større sekvenseringsdjupne for å oppnå den same sekvenseringsdekninga som WGS, og WES har fleire falske-positive enn WGS.^{22, 23} WES har vist seg å vera effektivt for å identifisera sjukdomsgen for sjeldne monogene sjukdommar,^{24, 25} mens forskning på multifaktorielle sjukdommar ikkje har hatt like stor nytte av denne nye metoden.²²

Ved WES er det nødvendig å lage eit bibliotek av DNA-fragment som berre kjem frå eksomet før sekvensering (figur 1.4).²¹ Dette kan gjerast på ulike måtar, men felles for dei fleste er at DNA-et først blir fragmentert.²¹ Deretter blir adapterer festa til endane på DNA-fragmenta, og til slutt blir eksona målretta opprika for å danna biblioteket (figur 1.4).²¹ Dei opprika fragmenta blir så hybridiserte til magnetiske kuler og amplifisert før dei blir sekvensert ved hjelp av NGS-teknologi.²¹ Etter at eksomet er sekvensert blir det gjort variantbestemming («variant calling») for å identifisera alle variantar som skil seg frå det humane referansegnetomet (figur 1.4).²¹ Til slutt blir dei identifiserte variantane annotert, noko som vil seie at det blir innhenta informasjon om variantane for seinare analysar og tolking.²¹

WES produserer store mengder data (figur 1.4).²¹ Det er ein stor mengde bakgrunnstøy i dessa dataa,²¹ både med tanke på den store variasjonen mellom individ,² men også med tanke på det faktum at eit humant genom i gjennomsnitt inneheld 100 LoF-variantar, som saman inaktiverer om lag 20 gen.²⁶ Dette gjer det nødvendig med effektiv filtrering for å finna den eine varianten som er sjukdomsframkallande blant alle variantane i eksomet.²¹ Filtringa er blant anna basert på predikert påverking på proteinet, frekvens hos den friske befolkninga og tidlegare identifiserte kandidatgen.²¹ Desse og fleire andre filtreringsstrategiar vil bli beskrive i meir detalj under.

Den første filtreringa som ofte blir gjort er kvalitetskontroll.²¹ Det er svært viktig at variantane som skal analyserast har tilstrekkeleg sekvenseringsdjupne for å oppnå ein tilfredsstillande sensitivitet og spesifisitet.²¹ Under kvalitetskontrollen vil ein også ekskludera falske positive, og dette kan blant anna gjerast ved å sjå på dårleg sekvenssamanstilling (alignment) rundt pseudogen og ulikskap mellom dei komplementære DNA-trådane.²¹ Ein annan viktig filtreringsstrategi tidleg i prosessen er å fjerna synonyme variantar, altså variantar som ikkje endrar aminosyrene i proteinet, då det er lite sannsynleg at slike variantar er sjukdomsframkallande.²¹ Ein tredje strategi er å fjerna vanlege variantar, då det er lite sannsynleg at vanlege variantar forårsakar sjeldne sjukdommar.²¹ Dette blir gjort ved å bruke databasar over genetisk variasjon frå antekne friske menneske med allelfrekvensar frå den aktuelle populasjonen.²¹ Deretter blir sjeldne variantar definert som variantar med minor allele frequency (MAF) under ein viss grenseverd, ofte <0,01.²¹

I tillegg til filtreringsstrategiane som er beskrive over er det nødvendig med nokre fleire strategiar for å redusera mengda aktuelle variantar tilstrekkeleg, til eit tal som er mogleg å undersøka vidare.²¹ Eit nyttig verktøy er å predikera kva effekt ein variant vil ha på proteinet.²¹ Ved slike prediksjonar har leserammeending-, nonsense- og spleisestadvariantar oftast størst påverknad på proteinet, då desse kan gjere at store delar av proteinet blir translatert feil eller ikkje translatert.² Filtrering basert på segregasjon i familiar kan også redusera talet på variantar, men dette krev sekvensering av fleire familiemedlemmer og utfyllande sjukdomshistorie for desse,²¹ og dette er ikkje alltid tilgjengeleg. Om sjukdommen allereie er beskrive og det finst kandidatgen for sjukdommen, vil det vera nyttig og av stor interesse å undersøke variantar i desse gena nøye.²¹ Undersøkingar av tidlegare beskrive kandidatgen kan, om ein er heldig, føra til rask identifisering av sjukdomsframkallande variantar.

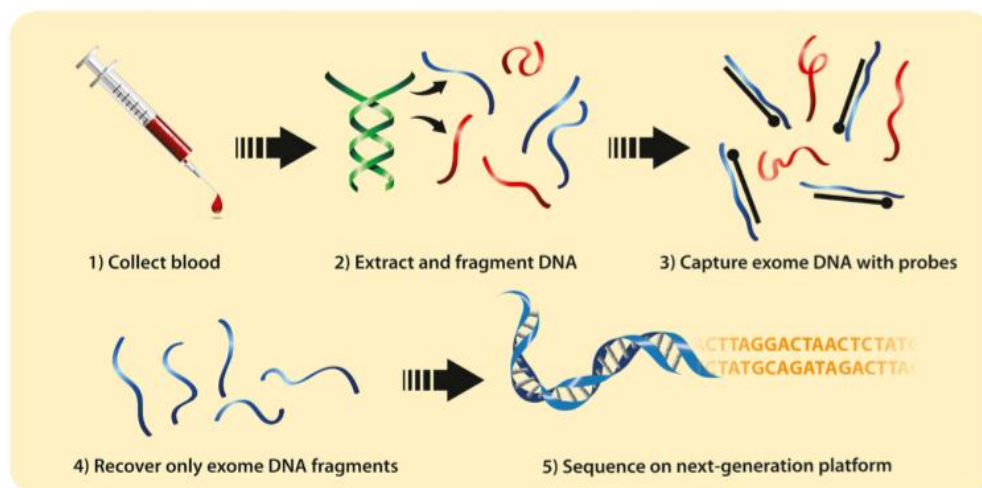


Fig. 1-A

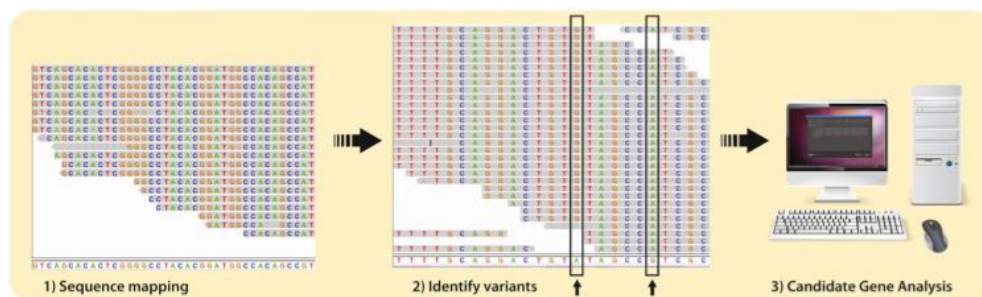


Fig. 1-B

Figur 1.4: Prinsippa for heileksomsekvensering, der A viser stega fram til sekvensering og B viser stega etter sekvensering. A) Blodprøve blir tatt (1) og DNA-et blir ekstrahert og fragmentert (2). Deretter blir eksomet isolert og henta ut (3-4) for til slutt å bli sekvensert (5).

B) Sekvensane blir mappa til eit referansegenom (1), variasjonen blir identifisert (2) og variantane blir til slutt analysert for å finna kandidatgen (3). (Reprodusert med tillating frå Paria, N., Copley, L. A., Herring, J. A., Kim, H. K., Richards, B. S., Sucato, D. J., Wise, C. A. & Rios, J. J. (2013). Whole-exome sequencing: discovering genetic causes of orthopaedic disorders. *J Bone Joint Surg Am*, 95 (23): e1851-8. doi: 10.2106/jbjs.L.01620.²⁷)

1.2.4. Samanlikning av WES med andre genetiske analysar

WES er ein relativt ny metode for å finna genetisk årsak for sjukdommar.²² Det finst mange andre metodar som har vore mykje brukt tidlegare, og mange av desse er framleis i bruk i dag. For å forstå tidlegare forskning og forskning frå andre forskingsgrupper er det difor viktig å ha ei forståing for nokre

av dei andre genetiske analysane som er i bruk. Alle metodane har sine fordelar og ulemper, og det gjeld også WES. Det vil no bli presentert eit utval analysemetodar som er av spesiell interesse for forskning på moyamoyasjukdom, som er sjukdommen som blir undersøkt i denne oppgåva.

Kopplingsanalyse (linkage analysis) er basert på genetisk kopling, som vil seie at gen som ligg nær kvarandre på same kromosom ikkje følger Mendels lov om uavhengig fordeling.² Genetisk kopling blir brukt ved at plasseringa til eit sjukdomsgen blir bestemt basert på kopling til ein genetisk markør med ein kjent plassering.² Kopplingsanalyse er ein god metode for å identifisera plassering til sjeldne variantar med stor effekt på sjukdommen, men område som blir identifisert er ofte store og det er ein fordel med familiar med fleire affiserte individ for å identifisera områda.²⁸ Kopplingsanalyse gir ein god statistisk støtte til at området som er identifisert er involvert i sjukdommen, noko WES aleine ikkje kan gjere,⁶ men det er vanskeleg å identifisera sekvensvarianten, då områda ofte er store.²⁸ I nyare tid er det imidlertid gjort familiebaserte analysar der WES-data er brukt i kopplingsanalysar, og desse har vist seg å ha fordelar frå begge analysemetodane.⁶

Før det var kostnadmessig mogleg å sekvensera heile genom/eksom til mange individ blei det ofte gjort målretta sekvensering av kandidatgen.²⁹ Dette blei gjort som forsøk på å identifisera sjukdomsframkallande variantar i gen kanskje involvert i sjukdommen. Målretta sekvensering har fleire ulemper. Det er nødvendig med tidlegare analysar som identifiserer eit område der sjukdomsgenet kan vere eller andre metodar for å identifisera moglege kandidatgen.²⁹ Ofte blei kopplingsanalysar brukt til å identifisera slike område.²⁶ Desse områda var ofte store, slik at det ikkje var mogleg å sekvensera heile område, og det gjorde det nødvendig med ein utveljingsprosess av kandidatgen.²⁶ Dette gjer det sannsynleg at det faktiske sjukdomsgenet blir ekskludert, noko ein unngår om WES blir bruk. Når ein har identifisert sjukdomsgenet kan målretta sekvensering vera ein god metode å bruka for diagnostisering i klinikken og til å replikera tidlegare resultat, då det framleis er billigare enn WES.¹⁵

Genomvide assosiasjonsstudiar (GWAS) har blitt svært populære dei siste åra.⁶ GWAS blir brukt til å undersøka om det er genetiske risikofaktorar i multifaktorielle sjukdommar.⁶ I GWAS blir mange enkelt nukleotidpolymorfismer (SNPs) undersøkt og nærværet av SNPs blir samanlikna mellom to grupper, ei gruppe med pasientar med sjukdommen av interesse og ei gruppe med friske kontrollar.¹² Om det er ein signifikant forskjell i frekvensen av ein SNP mellom gruppene blir denne definert som signifikant assosiert med sjukdommen.² Ved GWAS er det dermed ikkje nødvendig å anta kva gen som kan vera involvert på førehand,¹² noko GWAS har til felles med WES. Der er likevel framleis nødvendig med finmapping av områda identifisert av GWAS i etterkant for å identifisera sjukdomsvarianten.¹² GWAS gir likevel ofte mindre områder og finare mapping enn kopplingsanalysar.⁶ Det har vist seg at GWAS er betre til å identifisera vanlege variantar med liten effekt enn sjeldne variantar med stor effekt,⁶ noko som gjer GWAS meir passande til å undersøka multifaktorielle sjukdommar enn enkle monogene sjukdommar. Difor krev GWAS eit større tal på pasientar og kontrollar enn WES for å få eit statistisk signifikant resultat.²

1.2.5. Statistiske analysar innanfor genetikk

Statistikk er ein stor del av genetikken. Ei oppfatning som nokre genetikarar deler er at WES/WGS er hypotesefrie strategiar for å finna årsaka til ein sjukdom,¹⁷ men dette kan diskutast. Når ein leiter etter årsak ved hjelp av WES/WGS leiter ein etter genetisk årsak, altså har ein ein hypotese om at årsaka til sjukdommen er genetisk. Når WES blir brukt er det i tillegg nødvendig å anta at sjukdomsvarianten ligg i eksomet, noko som ikkje alltid er tilfelle.²¹ Det har lenge vore vanskeleg å sekvensera lange strekker av DNA,¹⁶ noko som har gjort det vanskeleg å detektera store

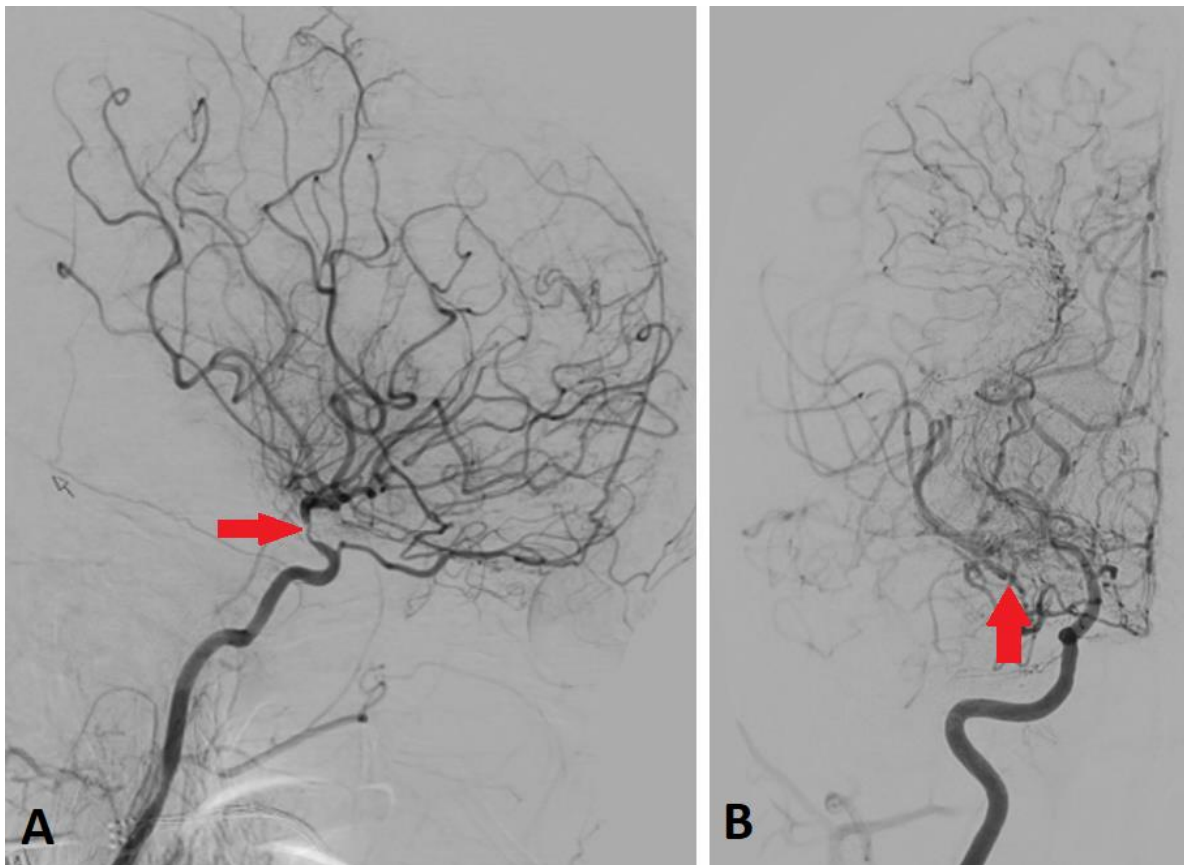
innsettingar/delesjonar (indels) og genomiske omorganiseringar ved bruk av WES/WGS.²⁶ Dette gjer at ein i prinsippet også må anta at sjukdommen er forårsaka av ein variant som er sekvensbasert, altså ein substitusjon eller ein liten indel.

Når ein arbeider med den store datamengda som genetikarar gjer i dag er det viktig å ha statistiske metodar for å gi statistisk styrke til resultata sine. To viktige omgrep som vil bli beskrive er log of the odds score (LOD score)² og odds ratio (OR).³⁰ LOD score blir brukt til å bestemme om ein har tilstrekkeleg data til å konkludera med at ein genetisk markør er genetisk kopla til eit sjukdomsogen.² LOD score blir rekna ut frå forholdet mellom sannsynet for resultata gitt at dei to loci er kopla og sannsynet for resultata gitt at dei ikkje er kopla.^{2, 6} Ved rimelege antakingar, er det vist at LOD score $\geq 3,3$ korresponderer til p-verdi i storleiksorden $5 \cdot 10^{-5}$, og gir eit genomvidt signifikansnivå i storleiksorden 5%.^{6, 31} Litt enklare forklart vil ein LOD score på 3 seie at det er 1000 gongar meir sannsynleg at loci er kopla enn at dei ikkje er det.^{2, 31} Sidan LOD score er ein logaritme kan ein summere LOD score frå ulike uavhengige slektstre med same sjukdom til ein har nok data til å konkludera at loci er kopla.²

OR er forholdet mellom oddsen for å ei hending gitt ein risikofaktor og den same hendinga utan risikofaktoren.³⁰ I genetikken er hendinga ein sjukdom og risikofaktoren ein variant i genomet. OR blir ofte brukt i case-control-studiar, der ein undersøker individ med ein bestemt sjukdom og friske kontrollar, og gir informasjon om effekten av risikofaktoren.³⁰ Ein OR på 1 vil seie at det ikkje er noko forskjell mellom gruppene,³⁰ altså at varianten under undersøking ikkje har noko å seie for sjukdommen. Ein OR > 1 vil seie at varianten aukar risikoen for å få sjukdommen, medan med ein OR < 1 vil varianten minske risikoen for sjukdommen.³⁰ Det er viktig å sjå OR i samanheng med absolutt risiko, som er sannsynet for å få sjukdommen i populasjonen, uavhengig av risikofaktorar.³⁰

1.3. Moyamoyasjukdom

Moyamoyasjukdom (MMD, frå engelsk moyamoya disease) er ein cerebrovaskulær sjukdom som også vert kalla «spontaneous occlusion of the circle of Willis».³² MMD blei først beskrive i Japan av Takeuchi og Shimizu i 1957³³ og seinare namngitt av Suzuki og Takaku i 1969.³⁴ MMD er karakterisert av stenose (forsnevring) eller okklusjon (tilstopping) av terminal del av den indre halsarterien (ICA) og/eller proksimale del av fremre hjernepulsåre (ACA) og midtre hjernepulsåre (MCA) (figur 1.5A).³⁴
³⁵ Over denne stenosen/okklusjonen vil det danne seg nye kollaterale arterienettverk som kan minna om «ei sky av røyk» på angiografi (figur 1.5B), difor namnet «moyamoya» som er eit uttrykk for noko disig, som ei sky av røyk drivande i lufta, på japansk.³⁴



Figur 1.5: Angiografi av hjernen til ein person med moyamoyasjukdom. A) Den raude pila viser kor stenosen er. B) Den raude pila indikerer området kor det er blitt danna nye kollaterale arterienettverk (moyamoya-blodårer), som liknar ei sky av røyk.

1.3.1. Epidemiologi

MMD er ein sjeldan sjukdom. Den er svært sjeldan i vestlege land, men er noko mindre sjeldan i Aust-Asia, spesielt i Japan og Korea.³⁶ Dette gjer epidemiologiske studiar krevjande, og gjev ulike tal på insidensen og prevalensen, sjølv i same land til omtrent same tid (tabell 1..1). Pasientane i studiane er rekrutterte på ulike måtar og det gjer det vanskeleg å samanlikna studiane direkte.³²

I Japan er insidensen og prevalensen rapportert til å vera høvesvis 0,54 nye tilfelle per 100 000 innbyggjar per år og 6,03 tilfelle per 100 000 innbyggjar i ein studie³⁷ og 0,94 per 100 000 innbyggjar per år og 10,5 per 100 000 innbyggjar i ein anna studie (tabell 1.1).³⁸ I Korea viser studiar at både insidensen og prevalensen er noko høgare enn i Japan, høvesvis 1,7-2,3 per 100 000 innbyggjar per år

og 16,1 per 100 000 innbyggjar (tabell 1.1).³⁹ Det er også vist at insidensen og prevalensen har auka i Aust-Asia dei siste åra, men det kan skyldast betre diagnostisering og overleving.^{37, 39} Kina har ein lågare prevalens enn dei andre aust-asiatiske landa; 3,92 per 100 000 innbyggjar (tabell 1.1).⁴⁰

Sidan MMD er så sjeldan i vestleg land finst det få epidemiologiske studiar med kaukasiske pasientar. Ein studie frå USA anslo insidensen i den amerikanske befolkninga til å vera 0,086 per 100 000 innbyggjar per år (tabell 1.1).⁴¹ I denne studien blei det også vist at insidensen var høgare blant personar med asiatiske etnisitet.⁴¹ I ein studie frå Danmark var insidensen i den danske befolkninga 0,047 per 100 000 innbyggjar per år (Tabell 1.1), men i denne studien var det ikkje oppgitt etnisitet.⁴² Dette gjer det vanskeleg å seia noko om den faktiske insidensen blant den kaukasiske delen av den danske befolkninga.

Tabell 1.1: Insidens og prevalens av MMD i ulike land

Forfattarar	År	Land	Insidens (per 100 000 innbyggjar per år)	Prevalens (per 100 000 innbyggjar)
Birkeland and Lauritsen ⁴²	1994-2015	Danmark	0,047	
Ahn et al. ³⁹	2007-2011	Korea	1,7-2,3	16,1
Miao et al. ⁴⁰	2000-2007	Kina, Nanjing	0,43	3,92
Kuriyama et al. ³⁷	1988-2003	Japan	0,54	6,03
Baba et al. ³⁸	2002-2006	Japan	0,94	10,5
Uchino et al. ⁴¹	1987-1998	USA	0,086	

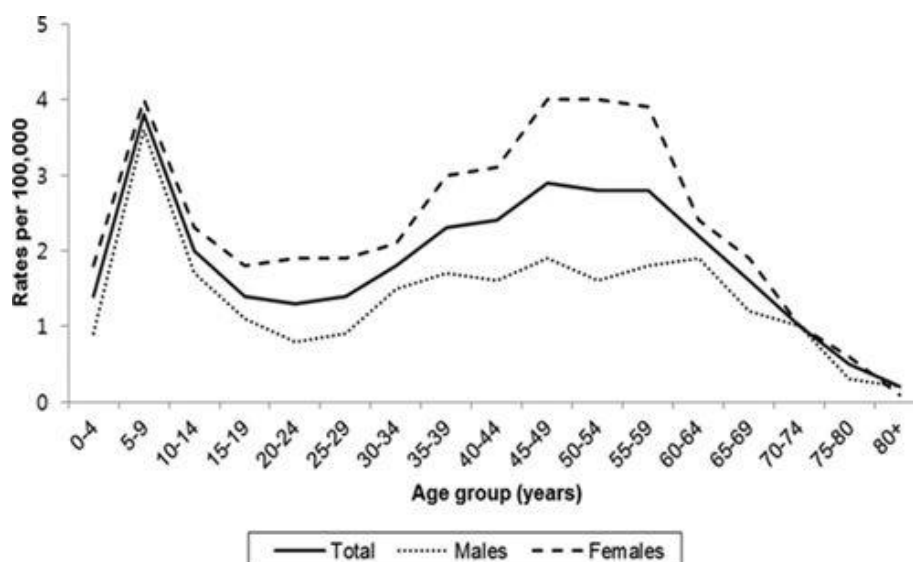
MMD er omtrent dobbelt så vanleg hos kvinner enn hos menn i alle undersøkte populasjonar,^{37-39, 41,} bortsett frå i Kina, der om lag like mange kvinner som menn har MMD (Tabell 1.2).⁴⁰ MMD finst som både familiære tilfelle, der fleire i familien har sjukdommen, og sporadiske tilfelle, der berre ein i familien har sjukdommen. Om lag 12-15% av tilfella i Japan er familiære,^{37, 38} medan berre 1,48% av tilfella er familiære i Kina (Tabell 1.2).⁴⁰

MMD har ein distinkt aldersdistribusjon med to alderstoppar for symptomstart; ein topp i barndommen og ein topp i vaksen alder (figur 1.6).³² Alder for toppane varierer litt mellom ulike studiar. Alderstoppen i barndommen er for det meste vist å vera om lag mellom fem og ni år (Tabell 1.2).³⁸⁻⁴² Alderstoppen i vaksen alder varierer meir, og det er blant anna vist at den er 30-39 år^{40, 42} og 45-54 år (Tabell 1.2).^{38, 39} Ein studie frå Japan skil seg frå dei andre ved at den gjev opp ulike alderstoppar for kvinner og menn.³⁷ Utifrå denne studien har menn sin første alderstopp mellom 10 og 14 år, mens kvinner sin første alderstopp er mellom 20 og 24 år.³⁷ Den andre alderstoppen er 35-39 år for menn og 50-54 år for kvinner, og i tillegg har menn ein tredje alderstopp ved 55-59 år.³⁷

Tabell 1.2: Epidemiologiske data for MMD

Forfattarar	Land	Familiære tilfelle	Kjønns-ratio (K:M)	Alderstoppar	
				Barn	Vaksne
Birkeland and Lauritsen ⁴²	Danmark	7,10%	2,1:1	0-10 år	30-39 år
Ahn et al. ³⁹	Korea		1,8:1	5-14 år	45-54 år
Miao et al. ⁴⁰	Kina, Nanjing	1,48%	0,9:1	5-9 år	35-39 år
Kuriyama et al. ³⁷	Japan	12,1%	1,8:1	10-24 år*	35-59 år*
Baba et al. ³⁸	Japan	15,4%	2,2:1	5-9 år	45-49 år
Uchino et al. ⁴¹	USA		2,2:1	5-9 år	55-59 år

* Studien skil mellom kvinner og menn når det gjeld alderstoppane, her er begge kjønna samla i ein kategori.



Figur 1.6: Aldersdistribusjon av insidensen av moyamoyasjukdom i Korea. Denne viser tydeleg ein spiss og høg topp på 5-14 år og ein lågare og breiare topp på 45-54 år. Den viser også at det er fleire kvinner enn menn som får moyamoyasjukdom, spesielt i den eldste gruppa. (Reprodusert med tillating frå Ahn, I. M., Park, D. H., Hann, H. J., Kim, K. H., Kim, H. J. & Ahn, H. S. (2014). Incidence, prevalence, and survival of moyamoya disease in Korea: a nationwide, population-based study. *Stroke*, 45 (4): 1090-5. doi: 10.1161/strokeaha.113.004273.³⁹⁾

1.3.2. Årsak og patogenese

Årsaka til MMD er framleis ukjent, og patogenesen er uklar.^{36, 43} Nokre patologiske endringar og prosessar er likevel karakteristiske for MMD, og gjer at MMD skil seg frå andre steno-okklusive sjukdommar. Blant anna er det ikkje observert arteriosklerotiske eller inflammatoriske endringar i blodårene.⁴⁴ Den ytre diameteren av blodårene som er affisert av stenosen/okklusjonen er redusert.⁴⁵ Intima, det indre laget av blodåra, er tjukkare,⁴⁶ og dette skyldast akkumulering av nekrotiske cellekomponentar i bindevevet,⁴⁷ formeining av vaskulære glatte muskelceller⁴⁷ og uregelmessig bølging av den elastiske membranen i blodåra.⁴⁵ Den siste endringa er at media, det midtarste laget av blodåra, er tynnare og svakare⁴⁵ grunna degenerering av glatte muskelceller.⁴⁷

Moyamoya-blodårene, dei nye kollaterale arterienettverka, har også spesifikke patologiske kjenneteikn. Desse inkluderer fibrin i blodåreveggen, svekka media og fragmentert elastisk membran.⁴⁸ I tillegg kan det dannast mikroaneurismer,⁴⁸ som er utposingar i blodåreveggen.⁴⁹ Desse mikroaneurismane kan seinare sprekka og dermed forårsaka hjerneblødning.⁴⁹

Det er observert at nivået av visse vekstfaktorar, transkripsjonsfaktorar, og enzym er auka hos pasientar med MMD, til dømes TGFB1 (transforming growth factor beta 1) og FGF2 (fibroblast growth factor 2).^{44, 47} Genetiske faktorar er antatt å spela ei rolle i utviklinga av MMD.⁴⁷

1.3.3. Symptom og klinisk presentasjon

MMD kjem oftast til uttrykk som hjerneslag, og det kan skiljast mellom to ulike typar hjerneslag; hjerneinfarkt (iskemisk hjerneslag) og hjerneblødning (hemorragisk hjerneslag). Hjerneinfarkt skyldast stenosen/okklusjonen,³⁵ medan hjerneblødninga skyldast sprokne moyamoya-blodårer eller sprokne aneurismer.⁴³ MMD kan også oppdagast i forbindelse med utgreiing for hovudpine, men dette er mindre vanleg.⁴⁷

Det er forskjell på startsymptomet for barnepasientar og vaksne pasientar.⁴³ Blant barnepasientane er det i all hovudsak hjerneinfarkt eller forbigåande iskemisk episode (transient ischemic attack, TIA) som er første symptom.⁴³ Hjerneinfarkt skjer som oftast på same side, men kan også skifte mellom høgre og venstre.⁴⁷ Desse hendingane kan bli forårsaka av hyperventilering, til dømes ved fysisk aktivitet, feber og grining.⁴⁷ Dei kan gi relaterte symptom som; hovudpine, nedsett muskelkraft, bevisstheitsforstyrning, sensorisk svekking og/eller utydeleg tale.^{35, 47}

Blant vaksne pasientar, derimot, er det om lag like vanleg å ha hjernebløding og hjerneinfarkt/TIA som første symptom.⁴³ Hjerneblødingane er ofte plutslege, og hovudpine, nedsett muskelkraft, bevisstheitsforstyrning og/eller utydeleg tale er også relaterte symptom for vaksne pasientar.⁴⁷ Kva symptom pasienten får er avhengig av kor i hjernen blødinga skjer.⁴⁷ Både hjerneinfarkta og hjerneblødingane kan gi varige nevrologiske skader og mental endring.⁴⁷

I tillegg til startsymptoma er det fleire kroniske, og gjerne mindre vanleg, symptom som er beskrive i samanheng med MMD. Eit av dei vanlegaste kroniske symptoma er migrene-liknande hovudpine, og dette symptomet er til stades hos opp til 63% av pasientane.⁴⁴ Hos barn med MMD er det også rapportert epilepsi og redusert kognitiv funksjon.³⁵

1.3.4. Diagnostisering

Dei generelle diagnosekriteria for MMD er 1) stenose eller okklusjon av terminal del av den indre halsarterien eller proksimale del av fremre og/eller midtre hjernepulsår, 2) unormale vaskulære nettverk i nærleiken av stenosen/okklusjonen i arteriefasen og 3) 1 og 2 er funne bilateralt.⁴⁷ I tillegg må visse sjukdommar som kan gi moyamoya-syndrom utelukkast.⁴³ Moyamoya-syndrom er når moyamoya-blodårene i hjernen er ein sekundær tilstand.⁴³ Dømes på slike sjukdommar er; autoimmun sjukdom, hjernehinnebetennelse, sigdcelleanemi, aterosklerose og Down's syndrom.⁴⁷ Det er mogleg å bli diagnostisert med definitiv MMD eller sannsynleg MMD.⁴⁷

Ved definitiv MMD hos vaksne pasientar må alle tre kriterium vera oppfylte.⁴⁷ Hos barnepasientar, derimot, er det ikkje nødvendig at kriterium 3 er oppfylt. Det er nok med kriterium 1 og 2 på ei side og stenose rundt terminal del av den indre halsarterien på den andre sida for å setje diagnosen definitiv MMD.⁴⁷ Ved sannsynleg MMD er det berre kriterium 1 og 2 som må oppfyllast,⁴⁷ altså er det nok med unilateral involvering for å få denne diagnosen. Det er vist at unilateral involvering ofte utviklar seg til bilateral involvering.^{43, 47}

MMD blir vanlegvis diagnostisert ved hjelp av konvensjonell cerebral angiografi.⁴³ Konvensjonell angiografi er ein type biletediagnostikk der eit kontrastmiddel blir sprøyt direkte inn i blodårene på halsen før det deretter blir tatt bilete av området av interesse.⁵⁰ Magnetresonans-angiografi (MRA) blir alltid forsøkt først, då dette ikkje er ein invasiv metode, og MRA kan ofte gi ein sikker diagnose.³⁵ Om MRA viser teikn til MMD går ein vidare med utredning, og då blir ofte cerebral angiografi, som er ein invasiv prosedyre brukt.⁴⁷ Cerebral angiografi er framleis gullstandard for diagnose,⁴⁷ og er kravd om pasienten har unilateral MMD og når diagnose ikkje kan stillast ved hjelp av MRA.³⁵

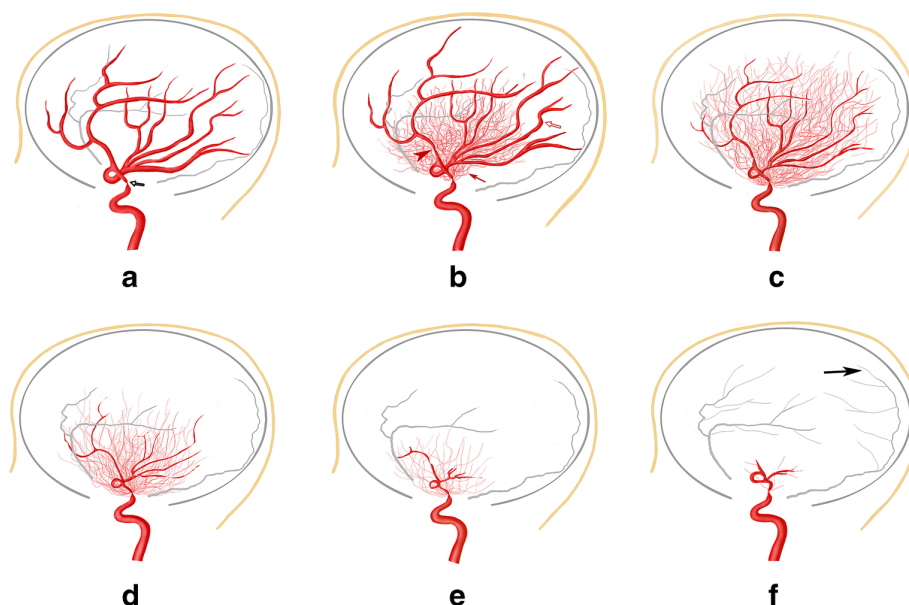
Sjukdomsprogresjonen blir klassifisert ved hjelp av Suzuki-stadia,³⁴ som er seks stadium basert på angiografiske undersøkingar (

Tabell 1.3, figur 1.7).⁴⁷ Desse stadia blei først beskrive av Suzuki og Takaku³⁴ i 1969, og er framleis i bruk.⁴⁷ Denne klassifiseringa baserer seg på tilstedeværinga av stenose/okklusjon og utsjånaden til moyamoya-blodårene (figur 1.7).³⁴ Dei typiske moyamoya-blodårene kan bli sett i stadia II-V (

Tabell 1.3).⁴⁴ MMD er ein progressiv sjukdom, og difor kan sjukdomsstadiet til pasientar endre seg gjennom sjukdomsforlaupet.³⁵

Tabell 1.3: Suzuki-stadia^{34, 47}

Stadium	Definisjon
I	innsnevring av den indre halsarterien
II	initiering av moyamoya-blodårer (kollaterale arterienettverk)
III	intensivering av moyamoya-blodårene
IV	minimalisering av moyamoya-blodårene
V	redusering av moyamoya-blodårene
VI	moyamoya-blodårene forsvinn



Figur 1.7: Progresjonen av sjukdommen basert på Suzuki-stadia. a) Suzuki-stadium I; innsnevring av den indre halsarterien, b) Suzuki-stadium II; initiering av moyamoya-blodårer (kollaterale arterienettverk), c) Suzuki-stadium III; intensivering av moyamoya-blodårene, d) Suzuki-stadium IV; minimalisering av moyamoya-blodårene, e) Suzuki-stadium V; redusering av moyamoya-blodårene, f) Suzuki-stadium VI; moyamoya-blodårene forsvinn. (Reprodusert med tillating frå Shang, S., Zhou, D., Ya, J., Li, S., Yang, Q., Ding, Y., Ji, X. & Meng, R. (2018). Progress in moyamoya disease. *Neurosurg Rev.* doi: 10.1007/s10143-018-0994-5.³⁶)

1.3.5. Behandling og prognose

Det finst ingen behandling som reverserer utviklinga av MMD.⁴⁴ Behandlinga går difor ut på å redusera risikoen for hjerneslag, og dette blir oftast gjort ved hjelp av kirurgisk revaskularisering som aukar blodtilstrøyminga til hjernen.⁴⁴ For pasientar med mild MMD eller der operasjon blir sett på som svært risikofylt blir platehemmarar brukt, men effekten er ikkje godt dokumentert.⁴⁷

Kirurgisk revaskularisering blir generelt delt inn i tre grupper: direkte bypass-operasjon, indirekte bypass-operasjon og kombinert bypass-operasjon.⁴³ Ein bypass-operasjon er ein operasjon som gir blodstraumen ein ny veg forbi stenosen/okklusjonen.⁵¹ Ved direkte bypass-operasjon blir ei ekstern blodåre operert inn på ei overflattisk hjerneblodåre, slik at den forsyner det området den stenotiske blodåra ikkje lenger forsyner med blod.⁴³ Denne operasjonen gjenoppretter blodstraumen med ein

gong, men prosedyren er teknisk utfordrande og pasientane treng nøye oppfølging etter operasjonen.⁴³

Ved indirekte bypass-operasjon blir ei ekstern blodåre operert inn under skallen, slik at den kjem i direkte kontakt med hjernen.⁵² Deretter vil spontan angiogenese skje.⁴³ Dette er ein naturleg prosess der nye blodkar vil vokse inn i den underliggande hjernen.⁴³ Denne typen operasjon er ein enklare prosedyre enn direkte bypass-operasjon, men grunna angiogenesen tar det nokre månadar før blodstraumen er tilfredsstillande.⁴³ Kombinert bypass-operasjon er ein kombinasjon av direkte og indirekte bypass-operasjon og har dermed fordelar frå begge prosedyrane.⁴³

Det naturlege sjukdomsforløpet til MMD er lite studert og dermed dårleg forstått.⁴³ Utfallet er generelt avhengig av den nevrologiske statusen ved behandling,⁴⁴ og pasientar som ikkje får kirurgisk behandling har generelt eit dårleg utfall med nedsett intellektuell kapasitet hos barn og gjentatte hjerneslag hos både barn og vaksne.^{43, 47, 53} Etter operasjon blir talet på hjerneinfarkt redusert hos både barn og vaksne.^{43, 53, 54} Hos barn blir også hyppigheita av hovudpine redusert.⁴⁷ Hos vaksne med hjernebløding har ein studie vist at bypass-operasjon har ein effekt og reduserer risikoen for nye blødingar, men denne effekten var berre akkurat signifikant.^{47, 55}

1.3.6. Forskjellar mellom asiatisk og europeisk moyamoya sjukdom

MMD er som nemnt ein svært sjeldan sjukdom i Europa, og det er difor få studiar som ser på europeisk MMD. Dei studiane som undersøker europeisk og amerikansk MMD finn ofte forskjellar mellom asiatisk og vestleg MMD, samtidig som europeisk og amerikansk MMD har mange fellestrekk.⁵⁶⁻⁶²

Ein viktig forskjell mellom asiatisk og vestleg MMD er alder ved symptomstart. Det er godt etablert at MMD har ein binomial (to-toppa) aldersdistribusjon.³² Dette er derimot ikkje alltid tilfellet for vestleg MMD, der alderstoppen i barndommen har vore fråverande i fleire studiar.⁵⁸⁻⁶⁰ I desse studiane var gjennomsnittsalderen for symptomstart mellom 31 og 33 år.⁵⁹⁻⁶¹ Andre studiar har vist at vestleg MMD har ein seinare start hos barn,^{57, 62} der ein studie har rapportert den første alderstoppen til å vera mellom 11 og 18 år.⁵⁷

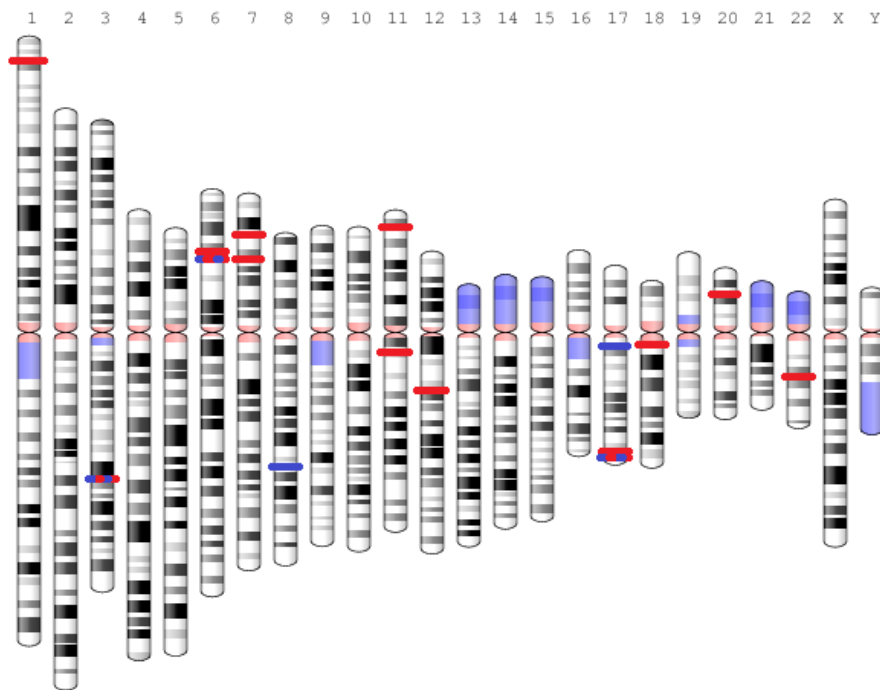
Ein anna viktig forskjell er at det blant vestlege pasientar er færre vaksne pasientar som får hjerneblødning.^{56, 59-62} Det er foreslått at vestlege pasientar har eit betre utvikla kollateralt arterienettverk, og dette kan vera forklaringa på at færre pasientar får hjerneblødning.⁵⁶ Denne utviklinga skjer grunna eit mildare sjukdomsbilete hos vestlege pasientar, der ein ser saktare progresjon av sjukdommen og færre barn med sjukdommen.⁵⁷

Blant vestlege MMD-pasientar er det ein større andel kvinner enn det er for asiatisk MMD.⁵⁶⁻⁶¹ For asiatiske pasientar er det omtrent dobbelt så mange kvinner som menn,³⁷ mens det for vestlege pasientar er blitt rapportert ein kvinne-mann ratio på 2,8:1⁵⁸ og 4,25:1.⁵⁹ Det er også funne lågare andel av familietilfelle i vestlege populasjonar, men dette kan skyldast tilfeldigheit grunna svært få studieobjekt.^{56, 57} I ein nyare studie med 200 kaukasiske pasientar er det funne 5,7% familiære tilfelle.⁶¹ Grunna færre familietilfelle i vestlege land er det foreslått at genetiske faktorar er viktige for forskjellane mellom asiatisk og vestleg MMD.⁵⁷

1.3.7. Genetiske faktorar identifisert i asiatiske pasientar

Det er antatt at genetiske faktorar spelar ei viktig rolle i utviklinga av MMD.⁴⁴ Dette er grunna den store forskjellen i prevalens mellom ulike etnisitetar og at over 10% av pasientane har

familiemedlemmar med MMD.³⁵ Blant japanske familiar med MMD er det vist at sjukdommen blir nedarva dominant med redusert penetrans.⁷ I dette studiet var alle typar medarving tilstades (mor-dotter, mor-son, far-dotter, far-son), men det var fleire kvinner enn menn med MMD.⁷ Dei foreslo difor at genomisk imprinting kunne vera assosiert med sjukdommen.⁷ Sjølv om MMD kan vera arveleg er det også ein stor andel sporadiske tilfelle. Dette gjer at det også kan tenkast at underliggende genetisk disposisjon i kombinasjon med miljøfaktorar forårsakar MMD.^{44, 47} Det er gjort mange genetiske studiar på asiatiske MMD og figur 1.8 viser ei oversikt over kva område på det humane genomet som har blitt identifisert i ulike studiar.



Figur 1.8: Oversikt over kor i genomet det er funne kandidatgen for moyamoyasjukdom hos asiatar. Raude og mørkeblå strekar viser område som er identifisert i genetiske studiar på asiatiske moyamoyasjukdom. Raude strekar svarar til assosiasjonsstudiar og mørkeblå strekar svarar til koplingsstudiar. Genet *RNF213* som no har vist seg å vera sterkast assosiert med moyamoyasjukdom ligg ved i kromosomområdet 17q25.3. (Laga ved hjelp av «Genome Decoration Page», <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>.⁶³)

Dei første genetiske studiane på MMD blei utført før år 2000 og tidleg på 2000-talet og omhandla *HLA* (figur 1.8).^{35, 64-68} Alle desse studiane fann assosiasjon mellom MMD og ein eller fleire *HLA*-markørar, og det blei funne både negativ assosiasjon⁶⁷ og positiv assosiasjon.⁶⁵⁻⁶⁸ Det var ingen av studiane som fann assosiasjon med dei same markørane, og «relative risk»(RR)/OR var låg.⁶⁵⁻⁶⁸ To nyare studiar, ein koreansk frå 2009⁶⁹ og ein kaukasisk frå 2012⁷⁰, fann begge assosiasjon med *HLA-DRB1*.

Tidleg på 2000-talet blei koplingsanalysar (linkage analysis) meir tilgjengelege, og fleire koplingsanalyse-studiar om MMD blei utført.⁷¹⁻⁷⁴ Ikeda et al.⁷¹ utførte ein genomvid analyse og fann signifikant kopling mellom MMD og ein markør på kromosomområde 3p24.2-p26 (figur 1.8).⁷¹ Inoue et al.⁷² gjorde ein målretta koplingsanalyse av området på kromosom 6 der *HLA*-gena ligg og fann kopling mellom MMD og kromosomområde 6q25 (figur 1.8).⁷² Yamauchi et al.⁷³ gjorde også ein målretta koplingsanalyse, men av kromosomområde 17q25, og dei fann kopling mellom MMD og

17q25 (LOD score = 4,58) (figur 1.8).⁷³ I 2004 gjorde Sakurai et al.⁷⁴ ein gemonvid koplingsanalyse og fann signifikant kopling mellom MMD og kromosomområde 8q23 (LOD score = 3,6) (figur 1.8) og antyding til kopling mellom MMD og kromosomområde 12p12 (LOD score = 2,3).⁷⁴ Av desse funna er det berre funnet til Yamauchi et al.⁷³ med kopling til kromosomområde 17q25 som har blitt reproduisert i seinare studiar.

Etter desse første koplingsanalysane blei det interesse for å undersøka moglege sjukdomsgen på kromosoma som var kopla til MMD. Nanba et al.⁷⁵ sekvenserte 9 utvalde kandidatgen blant 65 gen på kromosomområde 17q25, men fann ingen variantar relatert til MMD.⁷⁵ Kang et al.⁷⁶ sekvenserte eit gen på kromosomområde 3p24.2-p26 og eit på 17q25, og fann assosiasjon til ein variant i *TIMP2* på kromosomområde 17q25 (OR = 10,50, 95% konfidensintervall (CI): 2,02-54,55) (figur 1.8).⁷⁶ Dette er imidlertid eit av gena Nanba et al.⁷⁵ undersøkte utan å finna noko assosiasjon, men dette kan skyldast at Nanba et al.⁷⁵ berre undersøkte ein familie med 4 affiserte individ. I åra etter blei det utført to genomvide koplingsanalysar som begge fann kopling til kromosomområde 17q25.3, men utan at dei klatre å identifisera eit kandidatgen.^{77, 78}

I 2011 blei *RNF213* (ring finger protein 213) på kromosomområde 17q25.3 identifisert som det første kandidatgenet for MMD i to studiar (figur 1.8).^{79, 80} Begge studiane fann at varianten p.R4810K (NM_001256071.2: c.14429G>A (rs112735431))³⁵ var assosiert med MMD, med OR på 190,8 (95% CI: 71,7-507,9)⁷⁹ og 111,8 (95% CI: 64-195)⁸⁰ i asiatiske populasjonar. Liu et al.⁸⁰ viste at p.R4810K hadde ein sterkare assosiasjon med MMD i japanske pasientar (OR = 338,9, 95% CI: 148-777) enn i koreanske (OR = 135,6, 95% CI: 43-428) og kinesiske (OR = 14,7, 95% CI: 3-71) pasientar, og at varianten var heilt fråverande i kaukasiske pasientar.⁸⁰ I tillegg viste dei at varianten var til stades i 2,4% av dei asiatiske kontrollane.⁸⁰ Assosiasjonen mellom p.R4810K og asiatisk MMD har seinare blitt bekrefta gjentatte gongar.⁸¹⁻⁸⁶

Blant japanske og koreanske MMD-pasientar er p.R4810K den vanlegaste varianten i *RNF213* assosiert med MMD,^{87, 88} men varianten er ikkje detektert hos alle pasientane^{81, 82} og den er også til stades med låg frekvens i den friske populasjonen.⁸⁹ I kinesiske populasjonar er p.R4810K berre funne i 31,4% av MMD-pasientane,⁸³ og den har også ein lågare frekvens i den friske populasjonen.⁸⁹ Blant kinesiske pasientar er der derimot funne assosiasjon til andre variantar i *RNF213*,⁸³ og også andre gen.⁸⁴ I ein stor studie, med 1492 pasientar og 5084 kontrollar, frå 2018 er likevel p.R4810K den sterkaste risikofaktoren for MMD i kinesiske pasientar (OR = 54,06).⁸⁴ Varianten p.R4810K er ikkje funne i ikkje-asiatiske MMD-pasientar.⁹⁰⁻⁹²

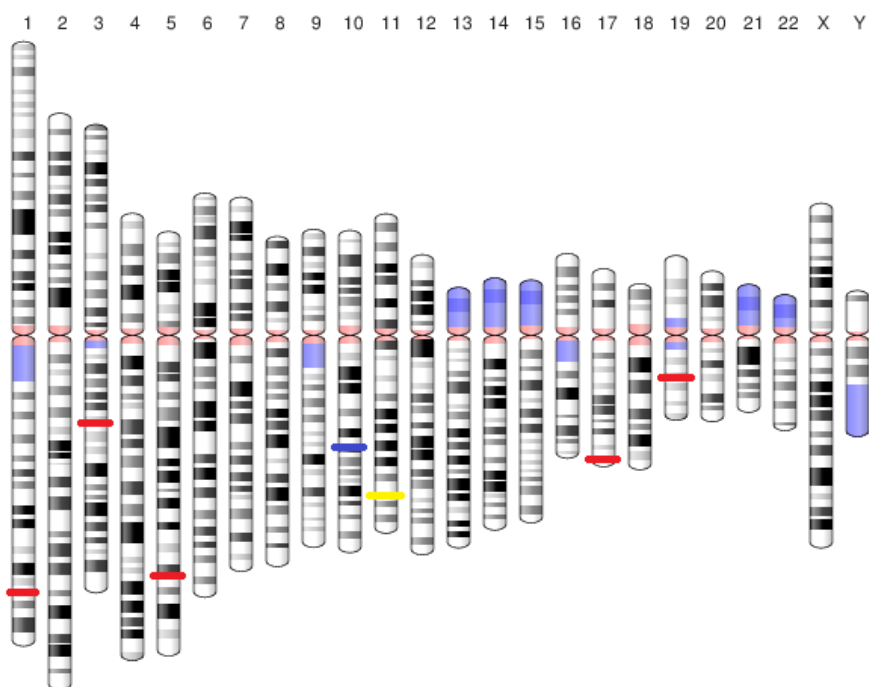
Varianten p.R4810K i *RNF213* er vanlegare i pasientar med familiær MMD enn i pasientar med sporadisk MMD både hos japanske⁸⁵ og koreanske⁸⁶ pasientar. Det er også vist at pasientar som er homozygote for p.R4810K har ein meir alvorleg sjukdom og får sjukdommen tidlegare enn pasientar som er heterozygote for varianten.^{85, 86} Duan et al.⁸⁴ gjorde nyleg ei stor assosiasjonsstudie (1492 pasientar og 5084 kontrollar) og fann at ein anna risikovariant i *RNF213* (rs9916351) var sterkare assosiert med tidleg start med MMD enn sein start med MMD. Dette tyder på at variantar i *RNF213* kan påverka ved kva alder MMD kjem til uttrykk.⁸⁴

1.3.8. Genetiske faktorar identifisert i kaukasiske pasientar

Den genetiske forskinga på kaukask MMD har heile tida kome litt etter asiatisk MMD, mykje grunna det låge talet på kaukasiske MMD-pasientar. Fleire moglege gen har tidlegare blitt undersøkt (figur 1.9). Guo et al.⁹³ fann ein kopling mellom *ACTA2* og MMD, men nokre år seinare undersøkte Roder et al.⁹⁴ same gen og fann ingen assosiasjon mellom *ACTA2* og MMD. Roder et al.⁹⁵ fann i ein anna studie, med sporadiske pasientar, ein assosiasjon mellom MMD og *PDGFRB* (OR = 1,81, 95% CI: 1,03-

3,17) og *TGFB1* (OR = 7,65, 95% CI: 0,97-59,95), men disse resultata har ikkje blitt reproduisert.³⁵ Ein studie har funne at homozygote variantar i genet *GUCY1A3* fører til moyamoya-fenomen assosiert med akalasi i tre familiar.⁹⁶ Seinare er det også vist at endringar i dette genet kan føra til MMD og hypertensjon.⁹⁷ Dette blei imidlertid berre funne i to av 96 pasientar, og er dermed ein sjeldan årsak til MMD.⁹⁷

Varianten p.R4810K i *RNF213* er ikkje funne i kaukasiske pasientar, og lenge fann ein heller ikkje andre variantar av *RNF213* hos desse pasientane.^{78, 90, 92} I dei seinare åra har det blitt funne sjeldne variantar i *RNF213* i kaukasiske pasientar, men desse har ikkje nådd eit signifikant nivå.^{98, 99} Guey et al.¹⁰⁰ fann ein signifikant assosiasjon mellom sjeldne *RNF213*-variantar og moyamoya-angiopati, noko som inkluderer pasientar med moyamoya-fenomen som sekundær tilstand, og det er difor vanskeleg å seie noko om MMD-pasientar ut frå denne studien.



Figur 1.9: Oversikt over kor i genomet det er funne kandidatgen for moyamoyasjukdom hos kaukasiar. Raude, mørkeblå og gule strekar viser område som er identifisert i genetiske studiar på kaukassisk moyamoyasjukdom (MMD). Raude strekar svarar til assosiasjonsstudiar, mørkeblå strekar svarar til koplingsstudiar og gule strekar svarar til studiar der nyoppståtte variantar er identifisert. Det er identifisert færre område for kaukassisk MMD enn for asiattisk MMD. (Laga ved hjelp av «Genome Decoration Page», <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>.⁶³)

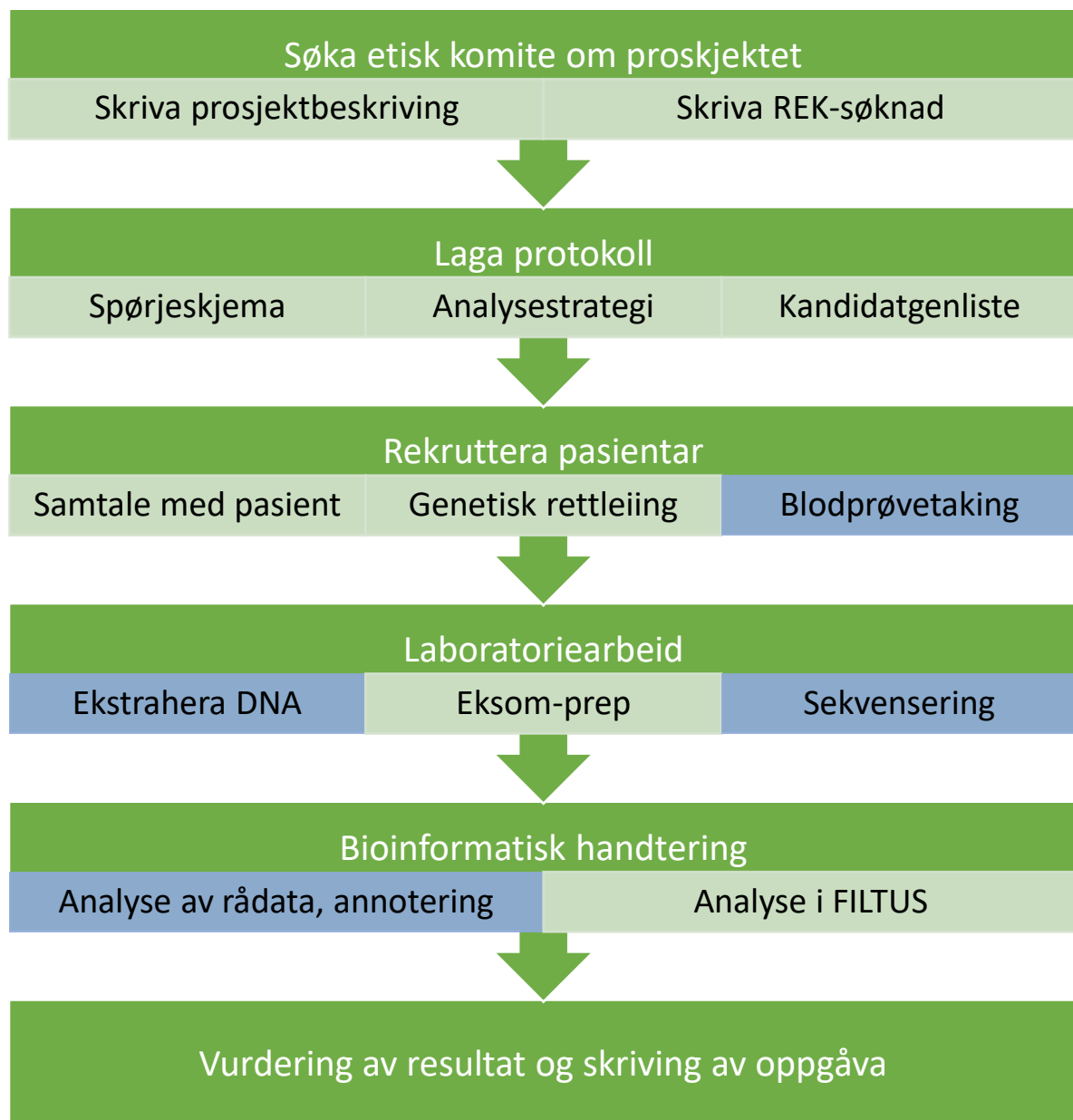
1.4. Hypotese og målsetting

Forsking tyder på at genetikken til MMD-pasientar med ikkje-asiatisk opphav er annleis enn for pasientar med asiattisk opphav. I denne studien er hypotesen at MMD har ein monogen, autosomal dominant arv. Viss dette er tilfelle er det er forventa å finne ein felles sjukdomsframkallande variant hos dei tre pasientane i familien, og at dei sporadiske pasientane har ein *de novo*-variant som er sjukdoms-framkallande. Det vil styrka resultata om fleire av pasientane har same variant eller ulike variantar i same gen.

Det overordna målet er å kartlegga MMD-pasientar med skandinavisk opphav. Det overordna målet kan delast inn i to delmål; klinisk karakterisering og genetisk karakterisering av pasientane.

2. Material og metode

Figur 2.1 viser den overordna gangen i prosjektet.



Figur 2.1: Oversikt over framdrifta i prosjektet. Grøn farge tyder at eg har vore med på å utføra punktet og blå farge tyder at eg ikkje har vore med på å utføra punktet.

2.1. Utarbeiding av spørreskjema (CRF)

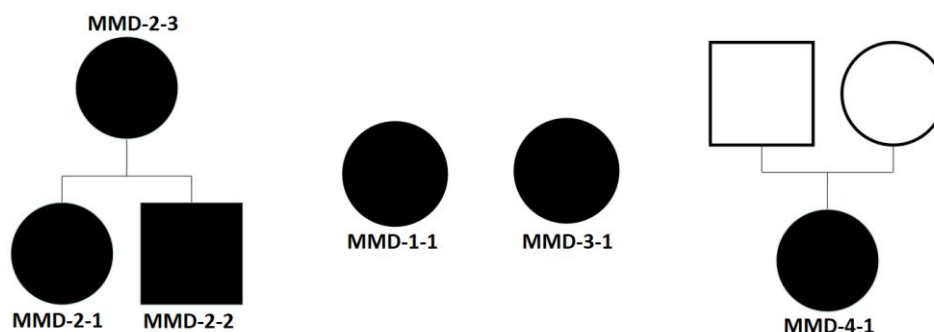
Spørreskjemaet (case report form, CRF) er utarbeida i samarbeid med behandlande lege og genetikar, og er vedlagt i appendiks 1. Det blei gjort litteratursøk i PubMed etter artiklar om kliniske og genetiske studiar av moyamoya. Eit utval artiklar publisert på engelsk blei undersøkt for kva kliniske karakteristikk dei rapporterte, og CRF bli utarbeida basert på desse artiklane.

Spørsmål om generelle epidemiologiske data, etnisitet og familiens sjukehistorie blei tatt med i CRF.^{43, 101-106} Første symptom og andre og/eller kroniske symptom blei også tatt med.^{43, 57, 102, 103} Det blei tatt med spørsmål om sjukdomshistorie og livsstilval, spesielt dei som aukar risikoen for slag.^{35, 62, 103, 105, 107-111} Det finst mange underliggande sjukdommar som kan forårsaka moyamoya syndrom,⁴⁰ der moyamoya-effekten har ein kjent årsak, og det blei tatt med spørsmål om desse var utelukka.

Kva diagnostiske undersøkingar som var gjort blei tatt med i CRF.^{47, 59} I samband med diagnostisering blei blant anna spørsmål om karakteristikken til stenosen og blodtilføringa til hjernen undersøkt.^{62, 105, 106, 110} Suzuki stage blei brukt for å gradera sjukdomsutviklinga.^{34, 102} Kva behandling pasienten fekk blei spurt om⁶² og modifisert Rankinskala blei brukt for å beskriva kor stort utbytte pasienten har hatt av behandlinga.^{62, 103, 105, 110}

2.2. Rekruttering av pasientar, samtale med pasient og kirurg og blodprøvetaking

I denne studien blei seks skandinaviske pasientar (figur 2.2) med MMD rekruttert frå Oslo universitetssjukehus (OUS) eller gjennom familiemedlem behandla ved OUS. Rekrutteringa skjedde i tidsrommet oktober 2018 til januar 2019. Pasientane blei diagnostisert etter kriteria beskrive i «Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis)».⁴⁷ Pasientar utan familiehistorie med MMD blei definert som sporadiske pasientar, medan pasientar med ein familiehistorie med MMD blei definert som familiære pasientar. I tillegg blei foreldra til den eine sporadiske pasienten inkludert som friske kontrollar (figur 2.2). Alle pasientane gav skriftleg samtykke om å vera med i studien, og dei fekk genetisk rettleiing før dei samtykkja til å vera med i studien. Den regionale komitéen for medisinsk og helsefagleg forskningsetikk har godkjent prosjektet.



Figur 2.2: Oversikt over pasientane med pasientnummer. Sirkel markerer kvinne og kvadrat markerer mann. Farga figur markerer affisert av moyamoyasjukdom, ufarga figur markerer ikkje affisert av moyamoyasjukdom. Alle pasientane var av skandinavisk opphav.

Dei sporadiske pasientane og ein av dei familiære pasientane blei rekrutterte gjennom Markus K. H. Wiedmann, som er behandlande lege for pasientane. Dei resterande familiære pasientane blei rekrutterte gjennom den allereie rekrutterte familiemedlemmen. Pasientinformasjon og

sjukdomshistorie blei henta inn ved hjelp av samtale med pasient og lege. Utgangspunktet for samtalen var CRF-en beskrive i kapittel 2.1 og vedlagt i appendiks 1.

Det blei tatt to blodprøvar av kvar pasient ved inkludering, ein EDTA-blodprøve for DNA-analysar og ein i PAX-røyr for eventuelle framtidige mRNA-analysar. DNA-ekstraksjon blei gjort ved Enhet for preanalytisk virksamhet ved Avdeling for medisinsk genetikk, OUS. PAX-røyra blei lagra ved -20°C for eventuell seinare RNA-ekstraksjon og analyse.

2.3. Generelle laboratorieteknikar

Dette kapittelet beskriv generelle metodar brukt gjentatte gongar gjennom heile eksom-prepareringa i kapittel 2.4.

2.3.1. Måling av DNA-konsentrasjon

Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) er eit instrument som bestemm konsentrasjonen til DNA, RNA og protein basert på fluorosens.¹¹² Fluoriserande fargestoff vert tilsett til prøven og bind seg spesifikt til dsDNA (double stranded DNA/dobbeltrådig DNA). Desse gir berre ut fluorosens når dei er bunde til dsDNA, og ved å måla fluorescensen kan ein dermed bestemma konsentrasjonen til dsDNA.¹¹² Denne metoden er svært spesifikk og minimerer effekten av forureining av t.d. salt, frie nukleotid, løysemiddel, vaskemiddel og protein.¹¹³ Kit for Qubit (DNA HS assay (ThermoFisher Scientific, cat.no. Q32851)) blei brukt, og prosedyren beskrive under er basert på protokollen «QUICK REFERENCE Qubit™ Assays».¹¹⁴

Det blei laga arbeidsløysing for prøver og for to standardar med 199 µL buffer og 1 µL fluoriserande farge for kvar prøve og standard. Deretter blei det tilsett 190 µL arbeidsløysing og 10 µL standard i kvart sitt Qubit-røyr og 198 µL arbeidsløysing og 2 µL prøve i kvart sitt Qubit-røyr. Blandinga blei inkubert i 2 minutt i romtemperatur. Til slutt blei det laga standardkurve ved hjelp av standarane på Qubit® Fluorometer, og prøvane blei deretter lest av.

2.3.2. Kvalitetskontroll av fragmentstorleik

TapeStation 2200 (Agilent) er et instrument for automatisert elektroforese.¹¹⁵ Det blir brukt til kvalitetskontroll av DNA- og RNA-prøvar, og kan analysere storleiken, konsentrasjonen og kvaliteten til prøvane.¹¹⁶ Instrumentet tar seg av lastinga og separeringa av prøvane og analyserer og presenterer resultata.¹¹⁵ Dette gjer prosedyren rask, enkel og påliteleg¹¹⁵ og minimerer hands-on preparering av prøvane.¹¹⁶ Kit for TapeStation D1000 (Agilent Technologies, #5067-5582 og #5067-5583) blei brukt, og prosedyren beskrive under er basert på protokollen «Agilent D1000 ScreenTape System Quick Guide».¹¹⁷

Det blei tilsett 3 µL «D1000 Sample Buffer» og 1 µL «D1000 Ladder» til eit røyr og 3 µL «D1000 Sample Buffer» og 1 µL DNA-prøve til kvart sitt røyr. Prøvane blei vortexa i 1 minutt ved 2000 rpm og spunne ned. Til slutt blei prøvane analyser i TapeStation-instrumentet.

2.3.3. Reinsing av DNA ved hjelp av magnetiske kuler

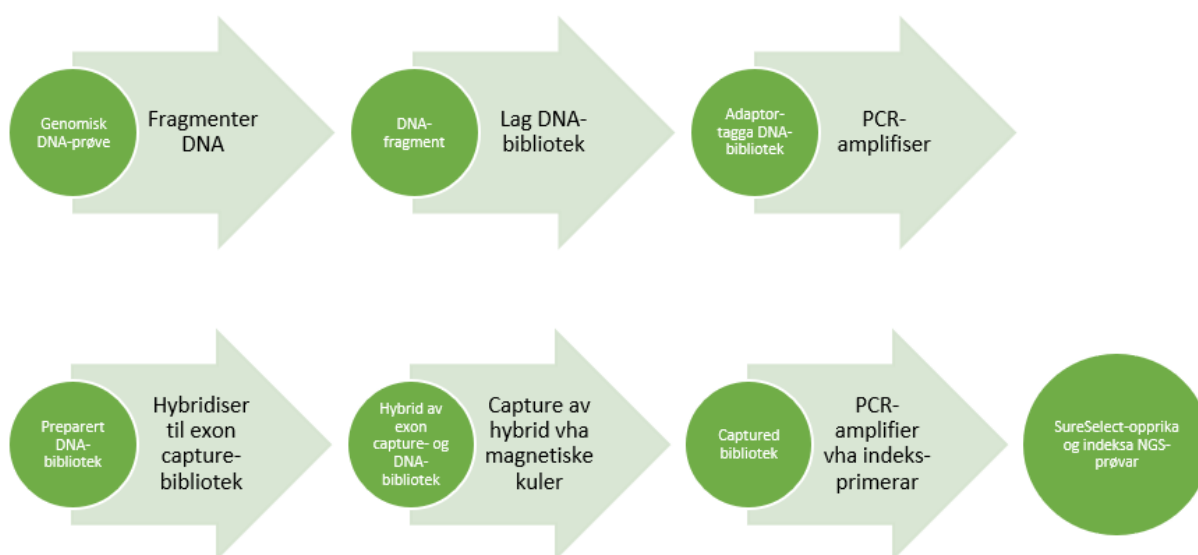
Reinsing av DNA blei gjort ved hjelp av AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, #A63880), og denne baserer seg på at DNA bind seg til magnetiske kuler i visse løysningar.¹¹⁸ AMPure XP bind DNA-molekyl ≥ 100 bp, og kan effektivt skilja DNA frå overflødige primerar, nukleotid, salt og enzym utan

bruk av sentrifuge eller vakuumfiltrasjon.¹¹⁸ Storleiken på bundne DNA-molekyl avhenger av volumforholdet mellom AMPureXP og prøve, og dette gjer det mogleg med presis seleksjon på storleik.¹¹⁸ Prosedyren beskrive under er basert på protokollen «SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Protocol».¹¹⁹

Det blei tilsett romtempererte AMPure XP kuler til kvar prøve og blanda. Prøvane blei inkubert i 5 minutt i romtemperatur, før dei blei sett på ein magnetisk separator for fjerning av supernatanten. Deretter blei dei vaska to gonga ved å tilsette 200 µL 70% etanol til prøverøyra, vente i 1 minutt og fjerne og kaste etanolen. Etter siste vask blei prøverøyra fjerna frå magneten og pelleten blei tørka i romtemperatur. Til slutt blei prøvane eluert i nukleasefritt vatn ved å tilsetta vatn til prøverøyra, blanda godt og inkubera i 2 minutt i romtemperatur, før dei blei sett på magnet og supernatanten blei beholden.

2.4. Eksom-preparering

Prinsippa for WES er beskrive i kapittel 1.2.3. Det vil her bli gjort greie for prosessen for å førebu DNA-prøvar til sekvensering. Ein oversikt over dei ulike stega er skissert i figur 2.3. Formålet med denne førebuinga er å isolera og opprika eksona, slik at berre dei proteinkodande områda av genomet blir sekvensert.



Figur 2.3: Oversikt over dei ulike stega i førebuinga av prøvane til eksomsekvensering.

I dette kapittelet blei reagensane og kitta beskrive i tabell 2.1 brukt. Prosedyren beskrive i kapittelet er basert på protokollen «SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Protocol».¹¹⁹

Tabell 2.1: Reagensar og kit brukt i kapittel 2.4. Eksom-preparering

Kit eller reagens	Produsent	Artikkelnummer
SureSelectXT Human All Exon V5	Agilent Technologies	5190-6208
SureSelectXT Reagent Kit	Agilent Technologies	G9611A
Herculase II Fusion DNA Polymerases	Agilent Technologies	600677
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	ThermoFisher Scientific	65601

2.4.1. Laging av DNA-bibliotek

For å kunna sekvensera eksomet må det først lagast eit genomisk bibliotek av DNA-fragment.¹¹⁹ Dette blir gjort ved å først fragmentera DNA ved hjelp av Covaris LE220 (Covaris, Inc). Covaris er ein maskin som fragmenterer DNA ved hjelp av høgfokuserte akustiske sjokkbølger.¹²⁰ Sidan prosessen blir utført i eit isotermalt og ikkje-kontakt-miljø vil berre akustisk energi gå inn i prøvebeholdaren og DNA-et blir fragmentert svært presist.¹²⁰ Deretter blir endane reparert ved å fjerna 3'-endeoverheng og fylla 5'-endeoverheng.¹²¹ Etter reperasjonen blir det sett på adenin på 3'-enden til fragmenta for at adapterar skal kunna ligera til fragmenta.¹²¹ Så blir det ligert adapterar til fragmenta, for at desse skal kunna køyrast med «paired end»-sekvensering.¹¹⁹ Til slutt i biblioteklaginga blir dei adapterligerte DNA-fragmenta amplifisert ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR).¹¹⁹

Før prosedyren starta blei konsentrasjonen målt som beskrive i kapittel 2.3.1. DNA blei fragmentert ved hjelp av Covaris til ein gjennomsnittslengde på 250 bp. Dette blei gjort ved å først fortynna 3 µg DNA i 1X Low TE Buffer til eit totalt volum på 130 µL, for så å overføre prøven til ei «Covaris 96 microTube»-plate og setta plata inn i Covaris-maskinen. Maskinen blei køyrd med innstillingane: peak power: 450,0, duty factor: 30,0 og cycles/burst: 200. Når køyringa var ferdig, blei det fragmenterte DNA-et overført til nye røyr. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 180 µL av AMPure XP kuler og eluert i 50 µL nukleasefritt vatn og fragmentstorleiken blei kontrollert som beskrive i kapittel 2.3.2.

Endane blei reparert ved å laga mastermiks som beskrive i tabell 2.2 og blanda 52 µL av mastermiksen med kvar av DNA-prøvane. Dei blei inkubert i ein PCR-maskin i 30 minutt ved 20°C. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 180 µL av AMPure XP kuler og eluert i 32 µL nukleasefritt vatn.

Tabell 2.2: Mastermiks for reperasjon av endane

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Nukleasefritt vatn	35,2
10x End Repair Buffer	10
dNTP Mix	1,6
T4 DNA Polymerase	1
Klenow DNA Polymerase	2
T4 Polynukleotid Kinase	2,2
Totalt	52

3'-endane på DNA-fragmenta blei adenylert ved å laga mastermiks som beskrive i tabell 2.3 og blanda 20 µL av mastermiksen med kvar av DNA-prøvane. Dei blei inkubert i ein PCR-maskin i 30 minutt ved 37°C. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 90 µL av AMPure XP kuler og eluert i 15 µL nukleasefritt vatn.

Tabell 2.3: Mastermiks for adenylering av 3'-endane på DNA-fragmenta

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Nukleasefritt vatn	11
10x Klenow Polymerase Buffer	5
dATP	1
Exo(-) Klenow	3
Totalt	20

Adapter-ligering blei gjort ved å laga mastermiks som beskrive i tabell 2.4 og blanda 37 µL av mastermiksen med kvar av DNA-prøvane. Dei blei inkubert i ein PCR-maskin i 15 minutt ved 20°C. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 90 µL av AMPure XP kuler og eluert i 32 µL nukleasefritt vatn.

Tabell 2.4: Mastermiks for adapter-ligering

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Nukleasefritt vatn	15,5
5x T4 DNA Ligase Buffer	10
SureSelect Adapter Oligo Mix	10
T4 DNA Ligase	1,5
Totalt	37

Adapter-ligert DNA blei amplifisert ved å laga mastermiks som beskrive i tabell 2.5 og blanda 35 µL av mastermiksen og 15 µL av DNA-prøvane i kvart sitt prøverøyr. PCR-programmet som er beskrive i tabell 2.6 blei køyrd. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 90 µL av AMPure XP kuler og eluert i 30 µL nukleasefritt vatn. Til slutt blei fragmentstorleiken kontrollert som beskrive i kapittel 2.3.2. og konsentrasjonen blei målt som beskrive i kapittel 2.3.1.

Tabell 2.5: Mastermiks for amplifisering av adapter-ligert DNA

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Nukleasefritt vatn	21
SureSelect Primer	1,25
SureSelect Indexing Pre Capture PCR Reverse Primer	1,25
5X Herculanase II Rxn Buffer	10
100 mM dNTP Mix	0,5
Herculanase II Fusion DNA Polymerase	1
Totalt	35

Tabell 2.6: PCR-program for amplifisering av adapter-ligert DNA

Steg	Tal på syklusar	Temperatur	Tid
1	1	98°C	2 minutt
2	6 eller 10	98°C	30 sekund
		65°C	30 sekund
		72°C	1 minutt
3	1	72°C	10 minutt
4	1	4°C	For alltid

2.4.2. Hybridisering og capture

Etter at det er laga eit genomisk DNA-bibliotek blir DNA-et hybridisert til eit Capture-bibliotek, som i dette tilfellet representerer heile eksomet til menneske.¹¹⁹ Etter hybridiseringa blir eksomet fanga opp ved hjelp av magnetiske kuler.¹¹⁹ Denne fanginga blei gjort ved hjelp av streptavidin-biotin-bindingar,¹²² der dei magnetiske kulene var streptavidin-dekka og Capture-biblioteket var merka med biotin.

Amplifisert DNA blei alikvotert til hybridisering ved å først ta ut 750 ng DNA av kvar prøve i kvar sin brønn i ei PCR-plate. Prøvane blei vakuumsentrifugert på 40°C til det ikkje var væske igjen, ca. 15-20 minutt, før dei blei tilsett vatn til eit totalt volum på 3,4 µL.

Deretter blei DNA-prøvane hybridisert til Capture-biblioteket. Det blei først laga SureSelect Block Mix som beskrive i tabell 2.7 og 5,6 µL av SureSelect Block Mix blei blanda med kvar DNA-prøve. Dei blei inkubert i PCR-maskin i 5 minutt ved 95°C og deretter minst 5 minutt ved 65°C. Det blei deretter laga hybridiseringsbuffer som beskrive i tabell 2.8. Den blei varma til 65°C i 5 minutt og sto deretter i romtemperatur til den skulle brukast. Det blei også laga 2 µL 1:3-fortynning av SureSelect RNase Block per reaksjon. Når inkuberinga av SureSelect Block Mix og DNA var ferdig, blei Capture Hybridiseringsmix laga som beskrive i tabell 2.8 og 20 µL av Capture Hybridiseringsmix blei blanda med kvar DNA-prøve mens dei framleis var på 65°C. Prøvane sto deretter på 65°C i 16-24 timar.

Tabell 2.7: SureSelect Block Mix

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
SureSelect Indexing Block # 1	2,5
SureSelect Block # 2	2,5
SureSelect ILM Indexing Block # 3	0,6
Totalt	5,6

Tabell 2.8: Capture Hybridiseringsmix

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Hybridiseringsbuffer	13,0
<i>SureSelect Hyb # 1</i>	6,63
<i>SureSelect Hyb # 2</i>	0,27
<i>SureSelect Hyb # 3</i>	2,65
<i>SureSelect Hyb # 4</i>	3,45
Fortynning av RNase Block (1:3)	2,0
SureSelect Human All Exon RNA Library (50Mb)	5,0
Totalt	20

Resuspenderte streptavidin-dekka magnetiske kuler (50 µL for kvar prøve) blei vaska tre gongar ved å resuspendere kulene 200 µL SureSelect Binding Buffer og sette røyra på magnet for fjerning av supernatanten. Etter siste vask blei kulene resuspendert i 200 µL SureSelect Binding Buffer. Kulene blei så brukt til «capture» av hybridisert DNA. Prøvane blei tilsett kulene og inkubert i ein plateristar (1400-1800 rpm) ved romtemperatur i 30 minutt. Prøvane blei sett på magnet for fjerning av supernatanten. Deretter blei kulene resuspendert i 200 µL SureSelect vaskebuffer 1 og inkubert ved romtemperatur i 15 minutt, før dei blei sett på magnet for fjerning av supernatanten. Kulene blei så vaska tre gongar ved å resuspendere kulene i 200 µL SureSelect vaskebuffer 2 (forvarma til 65°C), inkubera prøvane ved 65°C i 10 minutt og setta prøvane på magnet for fjerning av supernatanten. Etter siste vask blei det tilsett 30 µL nukleasefritt vatn til kvar prøve.

2.4.3. Indeksing av prøvane

Etter at eksomet er skild ut frå resten av genomet får kvar prøve ein individuell indeks slik at prøvane kan sekvenserast saman, men framleis kunna skiljast for analyse.¹¹⁹ Dei utskilde eksombiblioteka får indeksar medan dei blir amplifisert.¹¹⁹

«Captured» bibliotek blei amplifisert med indeks-primarar ved å laga mastermiks som beskrive i tabell 2.9 på is og tilsette 31 µL av mastermiksen, 5 µL av ulike indeks-primarar og 14 µL DNA-prøve til kvar sitt nye PCR-røyr. Prøvane blei køyrd på PCR-programmet beskrive i tabell 2.10. Prøvane blei deretter reinsa som beskrive i kapittel 2.3.3. med 90 µL av AMPure XP kuler og eluert i 15 µL

nukleasefritt vatn. Til slutt blei fragmentstorleiken kontrollert som beskrive i kapittel 2.3.2. og konsentrasjonen blei målt som beskrive i kapittel 2.3.1.

Tabell 2.9: Mastermiks for post-capture PCR

Reagens	Volum per reaksjon (µL)
Nukleasefritt vatn	18,5
5X Herculanase II Rxn Buffer	10
100 mM dNTP Mix	0,5
Herculanase II Fusion DNA Polymerase	1
SureSelect ILM Indexing Post Capture PCR (Forward) Primer	1
Totalt	31

Tabell 2.10: PCR-program for amplifisering av «captured» bibliotek med indeks-primarar

Steg	Tal på syklusar	Temperatur	Tid
1	1	98°C	2 minutt
2	10	98°C	30 sekund
		57°C	30 sekund
		72°C	1 minutt
3	1	72°C	10 minutt
4	1	4°C	For alltid

For nokre av prøvane måtte amplifisering av adapter-ligert DNA og amplifisering av «captured» bibliotek med indeks-primarar gjentakast med eit høgare tal på syklusar for å oppnå tilfredsstillande DNA-konsentrasjon.

2.5. Sekvensering, variantbestemming og annotering

2.5.1. Sekvensering av prøvane

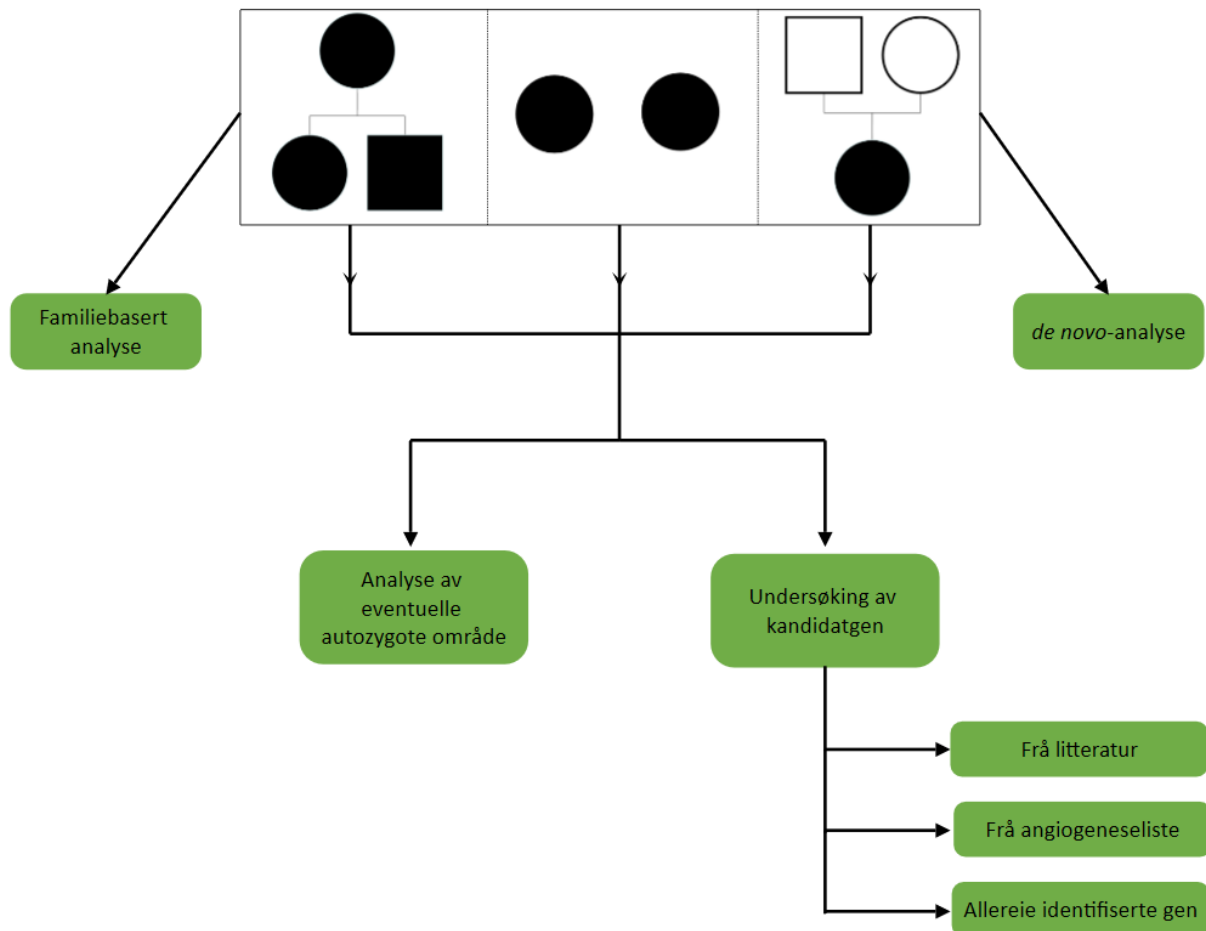
Sekvenseringstenesta blei levert av Norsk sekvenseringssenter (www.sequencing.uio.no), ei nasjonal teknologiplattform ved OUS og Universitetet i Oslo, finansiert av Noregs forskingsråd og Helse Sør-Øst. Dei utførte også kvalitetskontroll og konsentrasjonsmåling av prøvane. Kvalitetskontrollen blei gjort ved hjelp av kvantitativ PCR (qPCR). Deretter blei prøvane blanda saman og normaliserte for multiplexed sekvensering. Prøvane blei sekvensert ved hjelp av Illumina HiSeq3000-teknologi. Det blei utført «paired end»-sekvensering med leselengde på 150 bp. Prinsippa for sekvenseringa er beskrive i kapittel 1.2.2.

2.5.2. Variantbestemming og annotering

Sekvensane blei mappa til det humane referansegnetomet (hg19) ved bruk av bwa mem (v0.7.12).¹²³ Sekvenssamanstillingane blei deretter raffinert ved hjelp av Genome Analysis Toolkit (GATK, Version 3.3)^{124, 125} og PCR-duplikat blei merka av Picard (v1.124).¹²⁶ Variantbestemminga blei gjort med HaplotypeCaller by GATK (Version 3.3).^{124, 125} For dei prøvane der familiemedlem var tilgjengeleg blei det gjort felles variantbestemming. Variantane blei deretter annotert ved hjelp av annovar (v2017Jul16).¹²⁷ Resultatet av dette er variantfiler, organisert slik at kvar rad inneheld éin variant, og kvar kolonne gir ein bestemt opplysning om varianten, til dømes kromosom, posisjon, gentilhøyrse, allelfrekvensar, osv.

2.6. Genetiske analysar

Figur 2.4 viser oversikt over pasientar og analysestrategiar. Analysane og filtreringa blei gjort i FILTUS (versjon 1.0.5).¹²⁸



Figur 2.4: Oversikt over pasientar og analysestrategiar. Sirkel markerer kvinne og kvadrat markerer mann.

2.6.1. Filtrering

Før kvar av analysane blei variantane filtrert basert på ulike kriterium. Kva annoteringakolonner som blei brukt i kvar analyse er beskrive i kapitla som omhandlar dei ulike analysane. Dette kapitlet beskriv kort kva kvar av annoteringskolonnane betyr.

Annoteringskolonnen «FILTER» samanfatar bevis for at det er observert ein variant i den gitte posisjonen. Om kolonnen ikkje har verdien «PASS» er dette eit teikn på at det ikkje er ein sann variant, og dette kan blant anna skyldast låg sekvenseringsdjupne eller skeiv allelfordeling. Kolonnen «genomicSuperDups» markerer områder som kan vera genomiske duplikasjonar. Desse områda er problematiske i sekvenssamanstillinga, og gir ofte falske positive variantar. Kolonnen «DP» gir sekvenseringsdjupna ved posisjonen til den gitte varianten. Variantar med låg «DP» er ofte falske, og blir difor fjerna. «Func.refGene» fortel kva del av eksomet varianten ligg i, til dømes om den er eksonisk, intronisk eller intergenisk. Denne kolonnen kan brukast til å berre inkludera visse variantar (t.d. eksoniske og spleisevariantar) og/eller ekskludera visse variantar (t.d. ikkje-kodande RNA og intergeniske variantar).

Det blei brukt tre offentlege databasar for å filtrera på populasjonsfrekvens. Desse databasane var Genome Aggregation Database¹²⁹ (gnomAD) for eksom (gnomAD_exome) og genom (gnomAD_genome) og Greater Middle East (GME) Variome.¹³⁰ gnomAD inneheld 125 748 eksom og 15 708 genom av høg kvalitet frå personar som ikkje er i slekt,¹²⁹ medan GME inneheld 2 497 eksom.¹³⁰ Alle databasane er delt inn i ulike etnisitetar, noko som gjer at ein kan velja mellom å bruka gjennomsnittet av alle etnisitetar, ein spesifikk etnisitet eller den etnisiteten med høgast frekvens for ein gitt variant. I denne studien blei både den etnisiteten med høgast frekvens for ein gitt variant (kalla «popmax») og gjennomsnittet av alle etnisitetar brukt i ulike analysar.

2.6.2. Familiebasert analyse

I tilfellet der fleire frå same familie var affisert var den genetiske modellen familiebasert. Modellen var dominant og undersøkte kva variantar dei affiserte familiemedlemmane hadde felles. I denne analysen blei følgande filter brukt: FILTER=PASS; ekson/spleise; DP>5; allelfrekvens<0,0001; ikkje genomicSuperDups.

2.6.3. De novo-analyse

For den sporadiske pasienten der foreldra var tilgjengeleg blei det gjort *de novo*-analyse. Dette er ein genetisk analyse der ein ser kva nyoppståtte mutasjonar eit barn har. Dette er mogleg når ein kan samanlikna det affiserte barnet sine variantar med dei friske foreldra sine variantar. Variantar som finnes hos barnet, men ikkje hos foreldra, er av interesse. Analysen rekna ut eit sannsyn for at variantar er *de novo* basert på genotypesannsynet og prosenten av alternative allel hos barn og foreldre.¹²⁸ Mutasjonsraten blei sett til 10^{-8} . I denne analysen blei følgande filter brukt: FILTER=PASS; ikkje intergenisk; DP>9; allelfrekvens<0,01; ikkje genomicSuperDups.

2.6.4. Analyse basert på kandidatgenlister

For alle pasientane blei det undersøkt om dei hadde variantar i aktuelle kandidatgen. Det blei undersøkt kaukasiske kandidatgen frå litteratur (tabell 2.11, appendiks 2), asiatiske kandidatgen frå litteratur (appendiks 2) og gen som har ein funksjon i angiogenese (appendiks 3).¹³¹ Lista over gen involvert i angiogenese blei henta frå QIAGEN.¹³¹ Desse gena er av interesse då angiogenese er viktig for blodåreutvikling. Kandidatgena frå litteraturen var henta frå artiklar som undersøkte genetikken til MMD, og tabell 2.11 viser ei oversikt over desse gena med beskriving av kvifor dei er aktuelle gen. Desse kandidatgena var *RNF213*, *GUCY1A3*, *ACTA2*, *PDGFRB*, *TGFB1*, *ZXDC*, *OBSCN* og *CLB* (tabell 2.11).

I denne analysen blei det brukt liberale filter for å få med alle interessante variantar då desse gena tidlegare er vist å vera assosierte med MMD og/eller angiogenese. Modellen var dominant og dei affiserte pasientane var definert som «cases», medan dei friske foreldra var definert som «controls». I denne analysen blei følgande filter brukt: ikkje intergenisk; DP>5; allelfrekvens<0,01; ikkje genomicSuperDups.

Tabell 2.11: Tidlegare identifiserte kandidatgen for kaukasiske pasientar med moyamoyasjukdom (MMD)

Kandidatgen	Bakgrunn for inkludering	Kva funksjon har genet
RNF213 ^{98, 100}	Ein variant assosiert med asiatisk MMD, andre variantar funne i kaukasisk MMD.	Assosiasjon med MMD tyder på at genet spelar ei rolle i utviklinga av blodårer, involvert i angiogenese. Ein studie har vist at RNF213 er involvert i blodåreutvikling ved å hemme Wnt-signalvegen og fremme «vessel regression».
GUCY1A3 ^{96, 97}	Homozygote variantar fører til moyamoya-fenomen assosiert med akalasi. Det er også vist at variantar kan føra til MMD og hypertensjon.	Subeining i hovudreseptoren for nitrogenmonooksid. Viktig i reguleringa av avslapping av glatt muskelceller og blodplatefunksjon.
ACTA2 ^{93, 94}	Nokre studiar har funne variantar i dette i MMD-pasientar, men ein studie fann ingen av dei tidlegare beskrive variantane.	Viktig for samantrekking av glatte muskelceller som blant anna ligg i blodåreveggane til arteriane. Det er viktig for at arteriane skal behalda forma si.
PDGFRB ⁹⁵	Ein SNP i promoterregionen assosiert med MMD i ein studie.	Involvert i cellesignalisering, i celler av mesenchymalt opphav. Viktig for normal utvikling av det kardiovaskulære systemet.
TGFB1 ⁹⁵	Ein SNP i første ekson assosiert med MMD i ein studie.	Er involvert i danninga av blodårer, utvikling av muskelvev og inflammatoriske prosessar i.
ZXDC ⁹¹	Ein variant tilstades i 10 av 68 kaukasiske MMD-pasientar i ein studie, men har ein frekvens på 4% i kaukasiske populasjonar.	Fremmer (saman med <i>CIITA</i>) transkripsjon av MHC klasse 1- og MHC klasse 2-gen.
OBSCN ⁹¹	«Collapsing variant methodology» rangerte OBSCN som mest opprika i kaukasisk populasjon i ein studie.	Kan vera involvert i danninga av muskelfibriler i muskelceller. Ein variant assosiert med hypertrophic cardiomyopathy.
CBL ¹³²	<i>De novo</i> -variant identifisert i ein kaukasisk trio og ein ikkje-kaukasisk trio med MMA.	Fungerer som negativ regulator for mange signalveger, blant anna <i>PDGFRB</i> . Deltar i signaltransduksjonen i hematopoietiske celler.

2.6.5. Analyse av autozygote variantar

Det blei undersøkt om pasientane hadde autozygote område i eksomet, det vil seie område begge foreldra har arva frå ein felles forfader. Denne analysen blei gjort sjølv om det ikkje var mistanke om at pasientane hadde autozygote område, då dette er ein analyse som blir gjort rutinemessig i alle prosjekt. Analysen blei gjort ved hjelp av AutEx-algoritmen i FILTUS.¹²⁸ For pasientar som hadde slike område blei det gjort ein analyse på desse områda. Modellen var recessive homozygot, og følgande filter blei brukt: FILTER=PASS; ekson/spleise; DP>5; allelfrekvens<0,015; ikkje genomicSuperDups.

2.6.6. Analyse basert på allereie identifiserte gen

Dei gena som blei sett på som interessante i ein av analysane blei i tillegg undersøkt i dei resterande pasientane med liberale filter. Dette blei gjort for å oppdaga alle interessante variantar hos alle pasientane i desse gena. Denne analysen gjorde også at det blei oppdaga om fleire pasientar hadde

like variantar eller variantar i dei same gena. Modellen var dominant og dei affisert pasientane var definert som «cases», medan dei friske foreldre var definert som «controls». I denne analysen blei følgande filter brukt: ikkje intergenisk; DP>5; allelfrekvens<0,01; ikkje genomicSuperDups.

2.7. Vurdering av variantar identifisert i genetiske analysar

Variantane som blei identifisert i dei ulike analysane beskrive i kapittel 2.6. blei vidare vurdert basert på ulike kriterium. Dei blei vurdert basert på populasjonsfrekvens, varianttype, prediksjon av korleis variantane påverkar proteinet og eksisterande kunnskap om dei aktuelle gena sin funksjon.

2.7.1. Vurdering basert på populasjonsfrekvens

Variantane blei vurdert basert på populasjonsfrekvens, og ved denne vurderinga var variantar som var svært sjeldne eller variantar som ikkje var observert før mest interessante. Ved denne vurderinga blei databasane gnomAD og inHouse-databasen til OUS brukt. inHouse-databasen til OUS er ein database over alle personar som er blitt sekvensert på OUS, og denne gir eit bilete på kva variantar som er vanlege i den norske populasjonen. inHouse-databasen til OUS gir eit godt tilskudd til gnomAD (som også blei brukt i filtreringa).

2.7.2. Vurdering basert på varianttype

Variantar som endrar proteinet er oftast meir alvorlege enn variantar som ikkje endrar proteinet. Under vurderinga var difor desse variantane av større interesse enn variantar som ikkje endrar proteinet. Denne vurderinga blei gjort ved å sjå på kva konsekvens varianten har for proteinet. Dette inneber at variantar som er eksoniske eller som er i spleisesete, blei gitt stort interesse. Deretter blei ikkje-synonyme variantar, nonsense-variantar og insersjonar og delesjonar (indels) som gir leserammeendring (frameshift) sett på som mest interessante, medan synonyme variantar og indels som ikkje gir leserammeendring (nonframeshift) var mindre interessante.

2.7.3. Vurdering basert på prediksjonsverktøy

Ikkje alle variantar som endrar aminosyresekvensen til proteinet vil endra strukturen og/eller funksjonen til proteinet. Difor blei variantane vurdert basert på prediksjon av kor skadelege dei er. Det er mange faktorar som påverkar om ein variant er skadeleg eller ikkje.¹³³ Desse inkluderer blant anna evolusjonær konservering av nukleotidet eller aminosyra, plasseringa i proteinet og biokjemiske konsekvensar.¹³³

Strategiane prediksjonsverktøya brukar kan delast i tre kategoriar, sekvensbasert, strukturbasert og annoteringsbasert, og kvar av verktøya i tabell 2.12 bruker ein eller fleire av desse strategiane.¹³⁴ Sekvensbaserte strategiar baserer seg på blant anna på biokjemiske og fysiokjemiske eigenskapar, sekvensinformasjon og evolusjonær informasjon.¹³⁴ Strukturbaserte strategiar baserer seg blant anna på proteinet sin sekundære og tertiære struktur og eigenskapane til overflata til proteinet.¹³⁴ Annoteringsbaserte strategiar baserer seg i hovudsak på annotering frå SWISS-PROT og/eller prediksjonspoeng frå andre prediksjonsverktøy.¹³⁴

Under vurderinga blei i hovudsak Combined Annotation–Dependent Depletion¹³⁵ (CADD) brukt, mens dei andre verktøya blei brukt til supplementerande prediksjon. Ein CADD-verdi på ≥ 20 vil seie at varianten er predikert til å vera blant dei 1% mest skadeleg variantane som finst, mens ein CADD-

verdi på ≥ 30 vil seie at varianten er predikert til å vera blant dei 0,1% mest skadeleg variantane som finst, osv.^{135, 136}

Tabell 2.12: Predikasjonsverktøy^{133, 134}

Namn	Strategi og basis
<i>CADD</i>	Kontrasterer annotering av fikserte/nesten fikserte avleidde allel hos menneske med simulerte variantar
<i>GERP</i>	Sekvensbasert, genomisk evolusjonær rate profilering
<i>SIFT</i>	Evolusjonær konservering
<i>PolyPhen-2</i>	Proteinstruktur/funksjon og evolusjonær konservering
<i>LRT</i>	Sekvensbasert
<i>MutationTaster</i>	Proteinstruktur/funksjon og evolusjonær konservering
<i>MutationAssessor</i>	Evolusjonær konservering
<i>FATHMM</i>	Evolusjonær konservering
<i>PROVEAN</i>	Samanstilling og måling av likskapar mellom variantsekvens- og proteinsekvens-homologar

2.7.4. Vurdering basert på proteinet sin funksjon

Variantane blei vurdert basert på eksisterande kunnskap om genet sin funksjon. Dette blei gjort ved hjelp av litteratursøk og søk i databasar over kjente sjukdomsframkallande gen. I denne vurderinga blei gen som hadde ein funksjon i angiogenese, blodåreutvikling, vaskulær remodellering og/eller andre funksjonar relatert til blodårer sett på som interessante. Gen som var kjent for å gi sjukdommar som likna på MMD var også av interesse.

3. Resultat

3.1. Karakterisering av pasientane

Det blei totalt inkludert seks pasientar (tabell 3.1) og to friske foreldre i studien. Av pasientane var tre i same familie og tre var sporadiske. Alle pasientane var av skandinavisk opphav. Pasientgruppa bestod av fem kvinner og ein mann. Gjennomsnittsalderen var 33 år ved inkludering, 25 år ved symptomstart og 30 år ved diagnose. Det første symptomet var hovudpine for to av pasientane, TIA for to av pasientane, hjerneslag for ein pasient og epilepsi-liknande anfall for ein pasient. Av dei familiære pasientane har ein pasient hatt hjerneslag og av dei sporadiske pasientane har to pasientar hatt hjerneslag. Det var berre dei tre pasientane som var i familie som hadde opplevd gjentatte TIA eller hjerneslag. Blant kroniske symptom var hovudpine og generell utmatting dei vanlegaste, og desse blei rapportert av høvesvis fire og fire pasientar. Fire av pasientane hadde bilateral MMD og det mangla informasjon for to pasientar. Fem av pasientane fekk både medisinsk og kirurgisk behandling, medan ein pasient fekk inga behandling.

3.1.1. Familiære pasientar og familiehistorie

Pasientane MMD-2-1 (dotter), MMD-2-2 (son) og MMD-2-3 (mor) er i slekt (figur 3.1). Det er berre desse tre i familien som er diagnostisert med MMD, men det har vore hjerneslag i familien. Det er fleire tilfelle av slag i ung alder på mor til MMD-2-3 si side. Blant anna døydde MMD-2-3 sine to tanter, som var tvillingar, i ung alder, den eine av slag og den andre av ukjent grunn i barsel (figur 3.1).

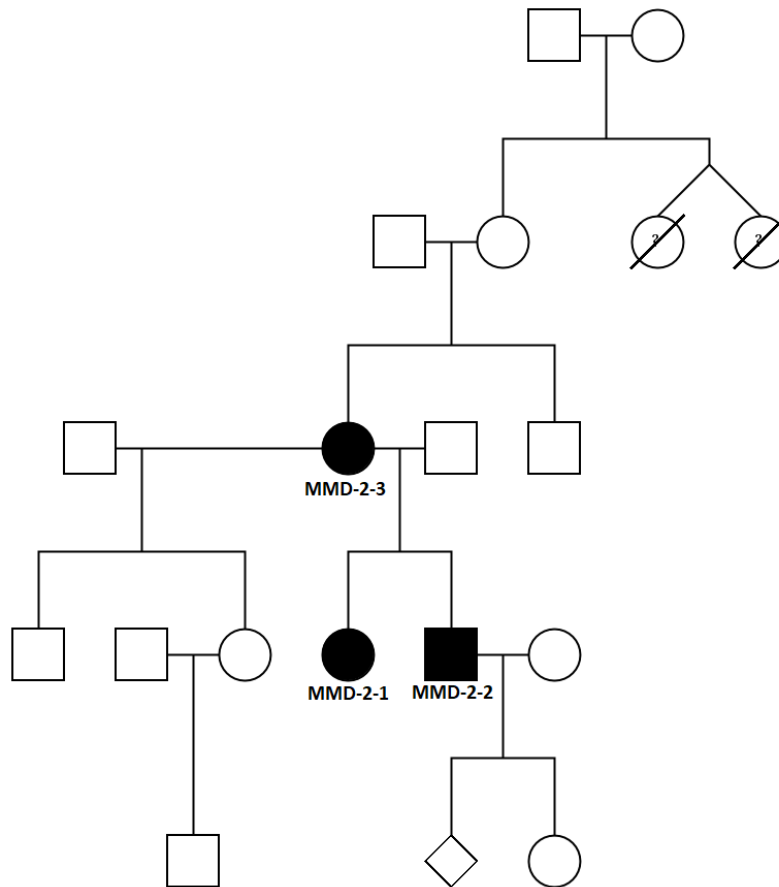
MMD-2-3 er ei 56 år gamal kvinne. Ho starta å få TIA då ho var rundt 40 år. Ho opplevde deretter jamlege TIA i mange år før ho fekk diagnosen MMD då ho var 49 år. Ho har fått tre operasjonar, ein på høgge side, ein på venstre side og ein midt oppå hovudet. Ho fekk sitt første hjerneslag under den første operasjonen. Ho fekk eit nytt hjerneslag om lag to år etter det første. Ho får framleis TIA. Ho har høgt blodtrykk og går på blodtrykksmedisin.

MMD-2-2 er ein 23 år gamal mann. Han fekk sitt første TIA då han var 21 år og grunna mora sin diagnose blei han også diagnostisert med MMD då han var 21 år. Han har hatt to fleire TIA. Han har også høgt blodtrykk. Han har ikkje hatt operasjon og får ikkje medisinsk behandling på det noverande tidspunktet.

MMD-2-1 er ei 24 år gamal kvinne. Ho starta med symptom i 12-årsalderen, i form av hovudpine. Ho opplevde også frå 12-årsalderen TIA der ho mista følelsen i venstre arm og fekk hovudpine. Då ho var 22 år opplevde ho tre TIA tett etter kvarandre, og dette førte til utgreiing og seinare diagnostisering ved hjelp av cerebral angiografi. Ho har bilateral MMD, og ved diagnose hadde ho Suzuki-stage 3. På høgge side hadde ICA >90% innsnevring og på venstre side hadde ACA 50-90% innsnevring. Då ho var 23 år fekk ho eit slag, og seinare same år fekk ho ein direkte bypass-operasjon på høgge side. Ho opplever framleis små TIA. Ho får medisinsk behandling i form av Albyl-E. Modifisert Rankin-score var 1 preoperativt, 1 postoperativt og 1 ved oppfølging.

Tabell 3.1: Oversikt over epidemiologiske, kliniske, diagnostiske og behandlingsmessige karakteristikk hos pasientene.

	Familiære	Sporadiske	Totalt
Tal på pasientar	3	3	6
Kjønn			
<i>Kvinne</i>	2	3	5
<i>Mann</i>	1	0	1
Gjennomsnittsalder			
<i>Noverande</i>	34	32	33
<i>Ved symptomstart</i>	24	26	25
<i>Ved diagnose</i>	31	29	30
Etnisitet			
<i>Skandinavisk</i>	3	3	6
Hjerneslag i familien	3	2	5
Startsymptom			
<i>Hovudpine</i>	1	1	2
<i>TIA</i>	2	0	2
<i>Slag</i>	0	1	1
<i>Andre</i>	0	1	1
Gjentatte slag	3	0	3
Andre symptom			
<i>Hovudpine</i>	3	1	4
<i>Epilepsi</i>	0	0	0
<i>Generell utmatting</i>	1	3	4
<i>Konsentrasjonsvanskar</i>	0	1	1
<i>Språkvanskar</i>	0	2	2
<i>Redusert hukommelse</i>	0	2	2
<i>Svimmelheit</i>	0	1	1
<i>Synsproblem</i>	0	1	1
Plassering			
<i>Bilateral</i>	1	3	4
<i>Unilateral</i>	0	0	0
<i>NA</i>	2	0	2
Suzuki-stage ved diagnose			
<i>1</i>	0	0	0
<i>2</i>	0	0	0
<i>3</i>	1	1	2
<i>4</i>	0	1	1
<i>5</i>	0	0	0
<i>6</i>	0	1	1
<i>NA</i>	2	0	2
Behandling			
<i>Medisinsk</i>	2	3	5
<i>Kirurgisk</i>	2	3	5
<i>Ingen behandling</i>	1	0	1



Figur 3.1: Familietre for dei familiære pasientane, MMD-2-1, MMD-2-2 og MMD-2-3. Sirkel markerer kvinne og kvadrat markerer mann. Farga figur markerer affisert av moyamoyasjukdom (MMD), ufarga figur markerer ikkje affisert av MMD og spørjeteikn markerer ikkje diagnostisert, men mistanke om MMD. Strek gjennom figuren markerer at personen er døyd.

3.1.2. Sporadiske pasientar

Pasient MMD-1-1 er ei 26 år gamal kvinne. Det har vore hjerneslag i familien hennar, men ikkje MMD. Tante på mors side døde av slag i ein alder av 54 år. Pasienten fekk symptom i form av hovudpine for første gong då ho var 15 år. Deretter sleit ho med migreneliknande hovudpine i seks år før rett diagnose blei satt. Då ho var 21 år fekk ho eit hjerneslag som førte til utgreiing og deretter til diagnose. Ho har ikkje hatt gjentatte hjerneslag. Ho blei diagnostisert ved hjelp av cerebral angiografi og hadde Suzuki-stage 6 på høgre side og 1-2 på venstre side ved diagnose. Ho har bilateral MMD med proksimal ICA med >90% innsnevring på høgre side og distal ICA med <50% innsnevring på venstre side. Ho har fått direkte bypass-operasjon på venstre side og får medisinsk behandling i form av Albyl-E. Modifisert Rankin-score var 2 preoperativt og 2 postoperativt.

Pasient MMD-3-1 er ei 44 år gamal kvinne. Det har vore hjerneslag i familien hennar, men ikkje MMD. Mor hennar har hatt eit TIA. Pasienten fekk eit TIA då ho var 42 år, og dette var første gong sjukdommen kom til uttrykk. Ho har ikkje hatt gjentatte hjerneslag. Ho blei diagnostisert ved hjelp av cerebral angiografi same år som ho opplevde TIA. Ho har bilateral MMD, og hadde Suzuki-stage 3 ved diagnose. På høgre side hadde ACA >90% innsnevring. På venstre side hadde ICA 50-90% innsnevring og ACA og MCA hadde >90% innsnevring. Ho har fått direkte bypass-operasjon på venstre side og får

medisinsk behandling i form av Albyl-E. Modifisert Rankin-score var 2 preoperativt, 2 postoperativt og 1 ved oppfølging.

Pasient MMD-4-1 er ei 26 år gammel kvinne. Det har ikkje vore hjerneslag i familien hennar, og heller ikkje MMD. Ho fekk første symptom då ho var 21 år, og dette var anfall i form av rykkingar i høgre arm og bein. Deretter hadde ho slike anfall jamleg fram til diagnostisering. Då ho var 23 år fekk ho eit hjerneslag. Ho blei diagnostisert ved hjelp av cerebral angiografi då ho var 24 år. Ho har også lett mitral insuffisiens grad 1. Ho har bilateral MMD, og ved diagnosetidspunktet hadde ho Suzuki-stage 4. På høgre side hadde ICA, MCA og ACA >90% innsnevring, og på venstre side hadde ICA >90% innsnevring og MCA og ACA 50-90% innsnevring. Ho har fått direkte bypass-operasjon og får medisinsk behandling i form av Albyl-E. Modifisert Rankin-score var 2 preoperativt, 2 postoperativt og 1 ved oppfølging.

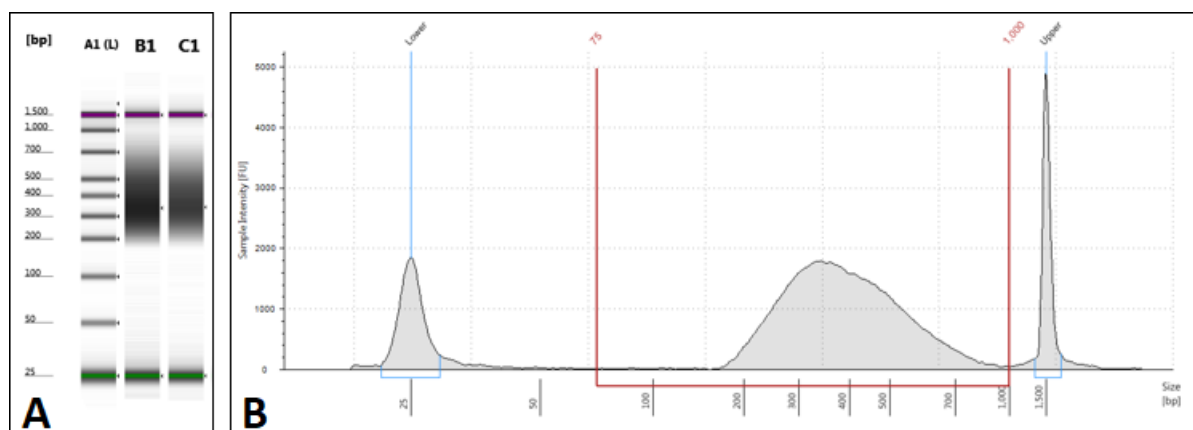
3.2. Konsentrasjonen og kvaliteten til prøvane under eksom-prepareringa

For å sikra at prøvane hadde høg nok konsentrasjon og var av god nok kvalitet for sekvensering blei det gjennom heile eksom-prepareringa gjort konsentrasjonsmålingar og andre kvalitetssikringar. Her blir den første og siste av desse målingane presentert (tabell 3.2). Før eksom-prepareringa starta blei konsentrasjonen målt og denne var utgangspunktet for kva volum av prøven som blei brukt i prepareringa. I tillegg blei A260/A280 målt. Når denne verdien ligg på $\approx 1,8$ er prøven rekna som å ikkje vera forureina av protein. I tabell 3.2 er det vist at denne verdien er tilfredsstillande nære 1,8.

Etter eksom-prepareringa blei konsentrasjonen målt på nytt (tabell 3.2) for å vera sikker på at det var nok DNA igjen i prøven. Det varierte litt mellom prøvane kor mykje DNA dei inneheldt, men alle hadde tilfredsstillande mengde for sekvensering. I tillegg blei det utført ein analyse på TapeStation (kapittel 2.3.3.) for å undersøka om eksombiblioteket hadde ønska lengde. Gjennomsnittslengda på biblioteket er forventa å ligga mellom 300-450 bp og tabell 3.2 viser at nesten alle prøvane ligg innanfor dette intervallet, men to av prøvane ligg rett over, høvesvis 458 bp og 457 bp. Figur 3.2 viser eit eksempel på resultat frå prøven til pasient MMD-2-1 der ein tydeleg ser at toppen ligg mellom 300 og 450 bp.

Tabell 3.2: Konsentrasjon og kvalitet til prøvane

Pasient	Konsentrasjon før eksom-preparering	A260/A280	Konsentrasjon etter eksom-preparering	Gjennomsnittslengde på eksombiblioteka
MMD-1-1	242 ng/ μ L	1,88	12,3 ng/ μ L	410 bp
MMD-2-1	226 ng/ μ L	1,88	7,5 ng/ μ L	404 bp
MMD-2-2	89,8 ng/ μ L	1,77	7,7 ng/ μ L	457 bp
MMD-2-3	99,4 ng/ μ L	1,74	8,28 ng/ μ L	424 bp
MMD-3-1	179 ng/ μ L	1,89	4,0 ng/ μ L	458 bp
MMD-4-1	88,2 ng/ μ L	1,84	9,44 ng/ μ L	421 bp
MMD-4-2	100,0 ng/ μ L	1,79	8,76 ng/ μ L	426 bp
MMD-4-3	64,0 ng/ μ L	1,79	17,0 ng/ μ L	418 bp



Figur 3.2: Gelelektroforese av eksombiblioteket til pasient MMD-2-1. A) Tradisjonelt gelbilet med storleiksmarkør i kolonne A1 og pasient MMD-2-1 i kolonne C1. B) Elektroferogram som viser fordeling av fragmenta basert på storleik og mengde (jo sterkare signal, jo fleire fragment).

3.3. Eksomsekvensering

For at resultatane frå dei genetiske analysane skal vera pålitelege er det viktig å sikra at kvaliteten på sekvenseringa er god. Tabell 3.3 viser ei oversikt over nokre kvalitetsindikatorar for sekvenseringa. Som det er vist i tabell 3.3 hadde alle prøvane ein høg gjennomsnittleg sekvenseringsdjupne av områda som blei henta ut under eksom-prepareringa, og gjennomsnittet over alle prøvane var 209. Det kan også trekkast fram at sekvenseringsdekning (avlesne >10 gongar) av basane i desse områda var >99% for alle prøvane (tabell 3.3).

Tabell 3.3: Kvalitetsindikatorar for sekvenseringa av prøvane og talet på variantar hos kvar pasient.

	MMD-1-1	MMD-2-1	MMD-2-2	MMD-2-3	MMD-3-1	MMD-4-1	MMD-4-2	MMD-4-3
Prosent av basar med basekvalitet >30	85,70	88,20	89,20	89,80	88,20	90,40	89,70	90,20
Gjennomsnittleg sekvenseringsdjupne i «captured» område	238	257	204	189	205	232	166	181
Prosent av basar i «captured» område dekkja med >10 avlesingar	99,16	99,17	99,25	99,08	99,10	99,17	99,02	99,11
Tal på variantar	89109	89191	99493	98212	88562	100712	95420	97167

3.4. Identifisering av gen av interesse

I denne studien blei det identifisert åtte gen av interesse. Det blei ikkje identifisert eit felles gen som alle pasientane hadde variant(ar) i, og det var difor ikkje eit enkelt gen som stakk seg ut som openberr kandidat for sjukdomsframkallinga. Kandidatgena som blei identifisert er vist i tabell 3.4 og vil bli beskrive i dette kapittelet. Alle variantane var heterozygote utanom varianten i *GRB7* som var homozygot.

Tabell 3.4: Identifiserte gen av interesse hos våre pasientar.

Gen	Variant	Frekvens (gnomAD, «popmax»)	CADD-verdi	Analysemetode for identifikasjon	Pasient (MMD-)
<i>NR4A3</i>	NM_006981: c.872C>T; p.Thr291Met	0,00006	24,8	Familieanalyse	2-1, 2-2 og 2-3
<i>NR4A3</i>	NM_006981: c.1578C>G; p.Ser526Arg	0,00014	16,01	Analyse av identifiserte gen	3-1
<i>PDZRN3</i>	NM_001303139: c.1362C>G; p.Ser454Arg	Ikkje observert før	25,6	Familieanalyse	2-1, 2-2 og 2-3
<i>TNFAIP2</i>	NM_006291: c.1240C>G; p.Gln414Glu	Ikkje observert før	NA	Familieanalyse	2-1, 2-2 og 2-3
<i>AGXT2</i>	NM_001306173: c.703C>T; p.Pro235Ser	Ikkje observert før	13,9	<i>de novo</i> -analyse	4-1
<i>NOS3</i>	NM_001160109: c.1684G>A; p.Glu562Lys	0,00003	33	Angiogeneseliste	1-1
<i>ITGAV</i>	NM_001145000: c.1313A>T; p.Asn438Ile	Ikkje observert før	26,8	Angiogeneseliste	1-1
<i>FGFR3</i>	NM_000142: c.1136A>G; p.Tyr379Cys	Ikkje observert før	25,3	Angiogeneseliste	3-1
<i>GBR7</i>	NM_001030002: c.869G>A; p.Arg290His	0,00089	32	Autozygote område	1-1

3.4.1. Familiebasert analyse

I den familiebaserte analysen (kapittel 2.6.2.) blei det identifisert 28 ulike variantar i 28 gen som alle dei tre familiære pasientane hadde felles. Alle dei 28 variantane blei vurdert basert på varianttype, populasjonsfrekvens, prediksjon av skadelegheitsgrad og genet sin funksjon, og etter denne vurderinga stod tre gen igjen som interessante gen; *NR4A3*, *PDZRN3* og *TNFAIP2* (tabell 3.4).

I genet *NR4A3* (nuclear receptor subfamily 4 group A member 3) blei det identifisert ein variant (NM_006981: c.872C>T; p.Thr291Met) i posisjonen 102591196 på kromosom 9. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av tre andre predikasjonsverktøy. Det er vist at *NR4A3* påverkar produksjonen av oksygenradikalar (ROS) i vaskulære glatte muskelceller (VSMC).¹³⁷ Det er også vist at overuttrykking av *NR4A3* fører til større grad av danning av neointima etter skade på blodårene.¹³⁸

I genet *PDZRN3* (PDZ domain containing ring finger 3) blei det identifisert ein variant (NM_001303139: c.1362C>G; p.Ser454Arg) i posisjonen 73433449 på kromosom 3. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av fem andre predikasjonsverktøy. Det er vist at *PDZRN3* spelar ei rolle i retningsbestemt og koordinert forlenging av endotelceller,¹³⁹ og at det regulerer vaskulær permeabilitet.¹⁴⁰

I genet *TNFAIP2* (TNF alpha induced protein 2) blei det identifisert ein variant (NM_006291: c.1240C>G; p.Gln414Glu) i posisjonen 103597429 på kromosom 14. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og eit anna predikasjonsverktøy predikerte den til å vera skadeleg. Ein studie har vist at uttrykket av *TNFAIP2* er auka under danninga av kapillærøyr-strukturar,¹⁴¹ og det er seinare vist at *TNFAIP2* spelar ei rolle i angiogenese.¹⁴²

3.4.2. De novo-analyse

I *de novo*-analysen (kapittel 2.6.3.) blei det identifisert fire ulike variantar i fire gen med eit sannsyn for å vera ekte *de novo* >0,99. Dei fire variantane blei vurdert basert på varianttype, populasjonsfrekvens, prediksjon av skadelegheitsgrad og genet sin funksjon, og etter denne vurderinga stod eit gen igjen som interessant gen. Det genet var *AGXT2* (tabell 3.4), og dette vil bli beskrive under. Dei andre gena er beskrive i tabell 3.5 og blei ekskludert på ulike grunnlag. *TMPRSS11E* blei ekskludert grunna varianttype, som var UTR5. *KLHL24* og *DMC1* blei ekskludert fordi dei hadde ein funksjon som ikkje kunne koplast til sjukdomsmekanismane for MMD.

I genet *AGXT2* (alanine-glyoxylate aminotransferase 2) blei det identifisert ein variant med eit sannsyn for å vera ekte *de novo* på 0,9994. Varianten (NM_001306173: c.703C>T; p.Pro235Ser) var i posisjonen 35032903 på kromosom 5. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av to andre prediksjonsverktøy. Det er vist at *AGXT2* er viktig i metabolismen av asymmetric dimethylarginine (ADMA),¹⁴³ eit molekyl som kan hindra funksjonen til enzym som er viktige i angiogenese.¹⁴⁴

Tabell 3.5: Variantar identifisert i *de novo*-analysen som ikkje blei att med vidare.

Gen	Varianttype	Variant	Frekvens (gnomAD, «popmax»)	CADD-verdi	Genfunksjon
KLHL24	Eksonisk, stopgain	NM_001349415: c.C364T; p.Q122X	Ikkje observert før	36	GoF i startkodon assosiert med veikskap i huda og dilatert kardiomyopati. ¹⁴⁵
DMC1	Eksonisk, ikkje-synonym	NM_001278208: c.G310A; p.G104R	0,00007	28,7	Viktig for DNA-rekombinasjon i meiose. ¹⁴⁶
TMPRSS11E	UTR5	NM_014058: c.-34C>T	0,00004	10,99	Kan ha funksjonar i epidermis, oralt og reproduktivt epitel. ¹⁴⁷

3.4.3. Analyse basert på kandidatgen frå litteratur

I analysen basert på kandidatgen frå litteraturen (kapittel 2.6.4.) blei det identifisert 22 variantar i 11 gen. Tre av variantane var delt av to pasientar og to av variantane var delt av tre pasientar. Av desse 11 gena var det fem som berre var kaukasiske kandidatgen, fem som berre var asiatiske kandidatgen og eit som var både kaukasisk og asiatisk kandidatgen. Etter vurdering basert på varianttype, populasjonsfrekvens og prediksjon av skadelegheitsgrad var det ingen av variantane som stod igjen som interessante variantar.

3.4.4. Analyse basert på kandidatgen frå angiogeneseliste

I analysen basert på kandidatgen frå angiogeneseliste (kapittel 2.6.4.) blei det identifisert 61 variantar i 35 gen. 14 av variantane var delt av to pasientar og fem av variantane var delt av tre pasientar, men alle desse fem av delt av dei familiære pasientane. Etter vurdering basert på varianttype, populasjonsfrekvens og prediksjon av skadelegheitsgrad stod tre gen igjen som interessante gen; *NOS3*, *ITGAV* og *FGFR3* (tabell 3.4). Alle desse gena blei identifisert i sporadiske pasientar. For kvart av gena hadde minst ein pasient ein eksonisk og ikkje-synonym variant i genet, og for nokre av gena hadde same og/eller andre pasientar ein intronisk variant i genet i tillegg. Det blei ikkje identifisert same eksoniske variant for fleire av pasientane i desse gena, men nokre pasientar hadde same introniske variant.

I genet *NOS3* (nitric oxide synthase 3) blei det identifisert to variantar; ein eksonisk og ein intronisk variant. Ein pasient (MMD-1-1) hadde både den introniske varianten og den eksoniske varianten, medan ein anna pasient (MMD-4-1) berre hadde den introniske varianten. Den introniske varianten hadde låg kvalitet og vil ikkje bli beskrive vidare. Den eksoniske varianten (NM_001160109: c.1684G>A; p.Glu562Lys) var i posisjonen 150699324 på kromosom 7. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av fem andre prediksjonsverktøy. Det er vist at *NOS3* spelar ei viktig rolle i VEGF-indusert angiogenese og vaskulær permeabilitet.¹⁴⁸ *NOS3* er ein nitrogenoksid-syntase og dannar nitrogenmonooksid (NO), eit molekyl som er viktig for angiogenese.¹⁴⁹

I genet *ITGAV* (integrin subunit alpha V) blei det identifisert ein variant i ein pasient (MMD-1-1). Varianten (NM_001145000: c.1313A>T; p.Asn438Ile) var i posisjonen 187516732 på kromosom 2. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av fem andre prediksjonsverktøy. *ITGAV* er ei alfa-subeining i integrin-familien, og kvar integrin-reseptor består av ei alfa- og ei beta-subeining.¹⁵⁰ Det er vist at samhandlinga mellom alfaVbeta3-integrin og *VEGFR2* er ein viktig prosess for angiogenese.¹⁵¹

I genet *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3) blei det identifisert fire variantar; ein eksonisk variant (hos MMD-3-1), to introniske variantar (ein hos MMD-3-1 og ein hos MMD-2-2 og MMD-2-3) og ein UTR3-variant (hos MMD-1-1). Den eksoniske varianten er den einaste som vil bli beskrive her og denne varianten (NM_000142: c.1136A>G; p.Tyr379Cys) var i posisjonen 1806117 på kromosom 4. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av sju andre prediksjonsverktøy. Det er vist at signal via diverse FGFR er ein viktig regulator for vaskulær utvikling.¹⁵² Det er også vist at *FGFR3* fremmer angiogenese i blant anna leverkreft.¹⁵³

3.4.5. Analyse av autozygote område

I analysen av autozygote område (kapittel 2.6.5.) blei det identifisert ein pasient med slike område i eksomet sitt, og dette var pasient MMD-1-1. I analysen av desse områda blei det identifisert 15 variantar i 15 gen. Etter vurdering basert på varianttype, populasjonsfrekvens, prediksjon av skadelegheitsgrad og genet sin funksjon, stod eit gen igjen som interessant; *GRB7*.

I genet *GRB7* (growth factor receptor bound protein 7) blei det identifisert ein variant (NM_001030002: c.869G>A; p.Arg290His) i posisjonen 37900873 på kromosom 17. Pasienten som hadde denne varianten var homozygot for varianten. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av fem andre prediksjonsverktøy. Sjølv om varianten var observert i gnomAD, var den ikkje observert homozygot tidlegare. Det er vist at *GRB7* spelar ei rolle i signalveggar involvert i cellemigrering,¹⁵⁴ blant anna gjennom eit kompleks med *FAK*.¹⁵⁵

3.4.6. Analyse av kandidatgen med funn i minst ein pasient

I analysen basert på allereie identifiserte gen (kapittel 2.6.6.) blei det identifisert 14 variantar i 9 gen. Av desse var det berre ein ny variant som ikkje var identifisert tidlegare. I genet *NR4A3*, som blei identifisert i familieanalysen, blei det identifisert ein variant hos MMD-3-1. Varianten (NM_006981: c.1578C>G; p.Ser526Arg) var i posisjonen 102609842 på kromosom 9. «Popmax» i gnomAD og CADD-verdien er vist i tabell 3.4, og varianten blei i tillegg predikert til å vera skadeleg av tre andre prediksjonsverktøy.

4. Diskusjon

4.1. Kliniske observasjonar av skandinaviske pasientar

Det er beskrive fleire ulikskapar mellom asiatisk og kaukaskisk MMD, og våre pasientar har mange likskapar med den kaukasiske pasientgruppa. Pasienttalet i denne studien er så lågt at det ikkje kan ekstrapolerast til skandinaviske pasientar generelt, og det er heller ikkje gjort noko kvantitative analysar. Det kan imidlertid vera vanskeleg å definera etnisitet. I denne studien blei pasientane definert som skandinaviske basert på deira gjengiving av si familiehistorie.

Det er likevel formålstenleg med ei samanlikning mellom våre pasientar og andre studiar av kaukasiske pasientar då det er beskrive så få kaukasiske pasientar med MMD at alle tilskot av kliniske data er viktig. Av dei få studiane som beskriv kaukasiske pasientar er det ingen som beskriv skandinaviske pasientar, utanom ein studie som beskriv finske pasientar med MMD.¹⁵⁶ I tillegg beskriv dei fleste kaukasiske studiane moyamoya angiopati, eit omgrep som inkluderer både MMD og moyamoya syndrom. Det at det ikkje er eit klart skilje mellom desse er problematisk, då MMD og moyamoya syndrom er antatt å ha ulike årsaker for moyamoya fenomenet.

Kaukaskisk MMD har ikkje den typiske binomiale aldersdistribusjonen for symptomstart som asiatisk MMD har, og denne var også fråverande for pasientane i denne studien. Pasientane våre hadde ein gjennomsnittleg alder ved symptomstart på 25 år (12-42 år), noko som er lågare enn det andre studiar har rapportert, som er mellom 31 og 33 år.^{60, 61} Våre resultat er likevel nærare kaukasiske studiar enn asiatiske studiar med binomial distribusjon. Blant våre pasientar var det fem kvinner og berre ein mann. Dette er foreinleg med kvinnedominansen bland kaukasiske pasientar.⁶¹ Alle våre pasientar har hatt TIA og/eller hjerneslag og ingen av dei har hatt hjernebløding. Dette samsvarar godt med at hjernebløding er sjeldan hos kaukasiske pasientar.⁶¹ Tidlegare studiar har imidlertid beskrive ein liten andel pasientar med hjernebløding,⁶¹ men det blei ikkje funne her.

Av våre pasientar var tre i same familie og tre var sporadiske. Dette er ein mykje større andel familiære pasientar enn i andre studiar. Dette skyldast antakeleg få pasientar og rekrutteringsmetode. Studien har få pasientar og blant dei fire pasientane som blei behandla ved OUS hadde ein familiemedlemmer med MMD. Desse familiemedlemmane blei deretter rekruttert gjennom denne pasienten. Når det i utgangspunktet var så få pasientar vil det at ein av pasientane tilfeldigvis har familiemedlemmar med sjukdommen gjere at denne familien blir ein stor del av studien. Tilfeldigheit grunna få pasientar kan også vera grunnen til dei andre observasjonane som avviker frå andre kaukasiske pasientar med MMD.

4.2. Avgrensingar ved eksomsekvensering

Alle metodar har sine avgrensingar, og dette inkluderer også WES. I dette kapittelet vil desse avgrensingane bli diskutert, og dei er delt opp i tekniske avgrensingar og biologiske avgrensingar. Tekniske avgrensingar er avgrensingar som har direkte med metoden å gjera, medan biologiske avgrensingar er avgrensingar som har med underliggende biologi å gjera.

4.2.1. Tekniske avgrensingar

WES har fleire tekniske avgrensingar som kan gjera at enkelte områder av eksomet blir dårlegare dekkja og at variantar ikkje blir oppdaga. Det er avgrensingar i alle stega av prosessen, både under eksom-prepareringa, sekvenseringa, sekvenssamanstillinga og variantbestemminga.

Under eksom-prepareringa blir eksomet henta ut av genomet og opprika. I denne prosessen blir mesteparten av eksomet henta ut og det er estimert at over 90% av målbasane blir dekkja $\geq 10X$.²¹ Det er imidlertid ein risiko for å mista områder i eksomet i laupet av prosedyren. Under prepareringa blir det gjort fleire PCR-reaksjonar, og i desse kan korte sekvensar fort bli ein større andel av eksombiblioteket då desse lettare blir amplifisert.¹⁵⁷ Det er spesielt vist at GC-rike område ofte vert mista og difor får lågare sekvenseringsdekking.¹⁵⁷ Det er difor viktig å ikkje køyre fleire PCR-syklusar enn nødvendig. Det er også viktig å vera klar over at målområda som blir henta ut er basert på databasar over eksomsekvensar, og det er mogleg at desse databasane ikkje inneheld alle dei kodande områda i genomet. Om den sjukdomsframkallande varianten ligg i eit slikt område vil den ikkje bli oppdaga ved hjelp av WES.

Sekvenssamanstilling byr på fleire utfordringar. Hovudutfordringa er lengda på sekvensane som skal samanstillast til det humane referansegnetomet. Desse sekvensane er relativt korte, og korrekt samanstilling kan difor vera utfordrande. Dette er spesielt vanskeleg for repetitive delar av genomet, pseudogen og ulike gen innanfor same genfamilie. Dette er fordi desse typene av område har liknande sekvensar mange stadar i genomet, og det er vanskeleg å vita kvar i genomet sekvensen høyrer til.

For å få pålitelege resultat er det viktig med ein tilfredsstillande sekvenseringsdjupne. Det er både viktig at den gjennomsnittlege sekvenseringsdjupna er god og at sekvenseringsdjupna er god over alle variantar i heile eksomet. Om sekvenseringsdjupna er for låg er det fare for feil under variantbestemming. I denne studien blei det oppnådd ein god sekvenseringsdjupne, med eit gjennomsnitt på 209X over alle prøvane. Det er difor lite sannsynleg at låg sekvenseringsdjupna skapa eit problem for variantbestemminga i denne studien, og resultatane av dei seinare analysane kan difor sjåast på som pålitelege.

4.2.2. *Biologiske avgrensingar*

WES kan ikkje oppdaga alle typar endringar i eksomet/genomet, og dette gjeld spesielt store, strukturelle endringar og endringar som ikkje ligg i eksomet. Strukturelle endringar inkluderer store indels, duplikasjonar av gen, kopinummervariantar (CNV) og omorganisering av kromosomet. Desse endringar er for store til at dei kan oppdagast ved hjelp av WES. Dette er fordi dei er større enn leselengda til sekvenseringsprosedyren (150 bp). Om ein skulle ha oppdaga desse måtte ein gjort genomsekvensering med djup leselengde, lengre leselengde og spesialiserte bioinformatiske program.²⁶ Teknologiar med lengre leselengde blir no også utvikla, såkalla «long reads», og desse kan i større grad oppdaga variasjon som spenner over eit stort område på genomet.¹⁶

CNV er variantar der ein sekvens blir repetert eit visst tal gongar. Sekvensen som blir gjentatt kan vera alt frå 2-3 bp lang til heile gen og større område.^{2, 12} Talet på repetisjonar varierer mellom individ. Variasjon i talet på repetisjonar er ofte observert der sjukdommen debuterer i yngre alder hos affiserte barn av affiserte foreldre. Dette er ein av mekanismene som kan føra til anticipation. Det skyldast at talet på repetisjonar er ustabil, og dermed er det ein sjanse for at barnet får fleire repetisjonar og tidlegare debut av sjukdommen. Denne mekanismen blir også kalla ekspansjon og er godt kjent for til dømes Huntington's sjukdom.² For MMD er det beskrive nokre tilfelle av anticipation,¹⁵⁸ og det blei også observert i familien i denne studien, der begge barna hadde ein tidlegare sjukdomsdebut enn mora. Slike endringar kan ikkje oppdagast ved hjelp av metodane brukt i denne studien, men det er av interesse å undersøka denne familien for CNV ved eit seinare høve.

Ved WES undersøker ein berre dei variantane som ligg i eksomet, og dette er ofte føremålstenleg då det er estimert at om lag 85%²¹ av sjukdomsframkallande SNPs ligg i eksomet. Dette talet er imidlertid nokså selektert, grunna stor grad av forskning på sjukdomsframkallande variantar i eksomet og mindre grad av forskning på sjukdomsframkallande variantar andre stadar i genomet. I tillegg er WES raskare og billegare enn WGS. Det er likevel slik at om lag 15% av sjukdomsframkallande SNPs er estimert å ligga andre stadar i genomet, og desse variantane vil ikkje bli oppdaga ved bruk av metodane i denne studien.

Det er fleire delar av det ikkje-kodande genomet som kan påverka proteina. Det kan til dømes vera variantar som endrar promotere eller enhancere. Om desse endringane gjer slik at transkripsjonsfaktorar ikkje kan binde til promoteren eller enhanceren vil det påverka uttrykket av genet sjølv om gensekvensen ikkje blir endra.¹⁵⁹ Dette kan i verste fall føra til at proteinet ikkje blir uttrykt og det kan forårsaka sjukdom. Ein anna type av ikkje-kodande variantar som kan endra proteinet er variantar i intronet.¹⁶⁰ Desse variantane kan til dømes introdusera eit spleisesete inni intronet.¹⁶⁰ Dette kan føra til at mRNA-et blir spleisa feil, og at proteinet dermed får ein anna aminosyresekvens. Kva verknad dette får for proteinet avhenger av kor stor og kva endring varianten fører til.

Somatisk variasjon er ein anna type variasjon som ikkje kan oppdagast ved metodane brukt i denne studien. Det er vist at det oppstår nye variantar i genomet gjennom heile livet.⁹ Det vil seie at ulike celletypar har ulike variantar, og desse variantane som ikkje er felles for alle celler i kroppen blir kalla somatiske variantar. I denne studien blei berre blodceller sekvensert, og det er difor ikkje mogleg å oppdaga somatiske variantar i til dømes blodårevevet i hjernen. Dette kunne vore interessant, men blei ikkje gjort då det ikkje var tilgang på relevant prøvemateriale. Det er også vanskeleg å oppdaga somatiske variantar i blodet. Dette er fordi oppdaging av somatiske variantar enten treng eit anna vev og samanliknast med og/eller sekvensering med svært høg lesedjupne.⁹ Av våre pasientar der informasjonen var tilgjengeleg har alle bilateral MMD, altså MMD på begge sider, og dette gjer det sannsynleg at det ikkje er snakk om somatisk variasjon hos pasientane i denne studien. Det er også lite sannsynleg at dette er tilfelle for dei familiære pasientane, då somatiske variantar utanfor kjønnscellene ikkje blir arva.

4.3. Aspekt ved filtrerings- og analysestrategiar

4.3.1. Sjukdomsframkallande variantar kan vera synonyme

Sidan variantar som ikkje endrar aminosyrerekkefølga i proteinet svært ofte ikkje er skadelege blei desse variantane vurdert i mindre grad. Det er likevel vist at nokre synonyme variantar kan føra til sjukdom, og at om lag 50 sjukdommar er assosiert med synonyme SNPs.¹⁶¹ Eit døme på dette er sjukdommen Crohn's sjukdom, der det er antydning at ein synonym SNP i eit gen er ein sannsynleg kausal variant grunna endring i miRNA-basert regulering.¹⁶² Om ein synonym variant er årsaka til MMD vil den med stort sannsyn ikkje bli oppdaga med vurderingsgrunnlag brukt i denne studien.

4.3.2. Bruk av databasar over populasjonsfrekvensar

Under filtreringa av variantane blei det brukt offentlege databasar over populasjonsfrekvensar for å filtrera vekk vanlege variantar og det var i hovudsak to databasar som blei brukt, gnomAD og inHouse-databasen til OUS. I gnomAD blei frekvensparameteren «popmax» brukt, og dette gjer generelt filtreringa betre.¹⁶³ Det kan tenkast at sidan alle pasientane var av skandinavisk opphav at

det hadde vore best å berre bruke populasjonsfrekvensen til den europeiske populasjonen. Dette er imidlertid ikkje nødvendigvis tilfellet då høg frekvens av ein variant i ein vilkårleg etnisitet gjer det mindre sannsynleg at varianten er skadeleg. Dette gjer at bruk av «popmax» gjer filtreringa betre,¹⁶³ ved at den i større grad lukar ut variantar som er vanlege og dermed mest sannsynleg ikkje skadelege.

inHouse-databasen til OUS inneheld i hovudsak norske individ, og sjølv om mange av dei har sjukdommar er desse sjukdommane antatt å ikkje vera relatert til MMD. gnomAD har ikkje in eigen kategori for norske individ og inHouse-databasen gir difor eit godt tilskot til «popmax»-kategorien i gnomAD. Å berre bruke inHouse-databasen ville derimot ikkje vore bra. Dette er fordi den inneheld relativt få individ og individa den inneheld er ei nokså homogen gruppe. Denne databasen aleine er difor ikkje eit godt verktøy for å vurdere variantane på populasjonsfrekvens.

Bruken av desse databasane er svært nyttig, men det er viktig å vera klar over avgrensingane til bruken av slike databasar. Ein kan ikkje anta at desse databasane inneheld sekvensar berre frå friske individ, og databasane vil difor også innehalde skadelege variantar.¹³³ Dette er spesielt viktig å vera klar over for sjukdommar som debuterer i vaksen alder og/eller har låg penetrans, slik som MMD. Sidan databasane inneheld sekvensar frå individ i ulik alder vil tilsynelatande friske unge individ kunne ha variantar som gjer at dei utviklar sjukdommar seinare i livet. Det er difor viktig å ikkje utelukke alle variantane som finst i databasane, men sette ein grundig vurdert grenseverdi for kor vanleg ein tillet at ein sjukdomsframkallande variant er.

Bestemming av grenseverdien bør basera seg på fleire ting, blant anna arvemønster og prevalens av sjukdommen. Ved recessiv arv vil ein kunne tillata ein høgare populasjonsfrekvens for skadelege variantar enn ved dominant arv. Dette er fordi databasane då også inneheld berarar av sjukdomsallelet som ikkje er affisert. Ved monogen, dominant arv vil ein ikkje forventa at ein sjukdomsframkallande variant er vanlegare i ein populasjon enn prevalensen for sjukdommen i populasjonen, og grenseverdien kan difor setjast ved om lag same frekvens som prevalensen. For MMD ligg prevalensen på 0,006-0,016% i Japan og Korea,^{37, 39} og for kaukasiske pasientar er den så låg at det ikkje er rapportert pålitelege tal. Dette gjer at ein dette tilfellet kan og bør sette grenseverdien lågt. Om ein skadeleg variant likevel er vanlegare i databasen enn grenseverdien som er sett, vil denne varianten bli oversett med filtreringsstrategiane og vurderingsgrunnlag brukt i denne studien.

4.3.3. *Bruk av prediksjonsverktøy*

Det er anbefalt å bruka fleire prediksjonsverktøy samtidig, men dette vil ikkje seie at styrken til prediksjonen til dømes er dobbelt så stor ved bruk av to presisjonsverktøy som ved bruk av eit. Verktøya brukar liknande strategiar for å predikera verknaden av ein baseendring, og dei kan difor ikkje bli sett på som uavhengige. Når det er sagt, vil det likevel lønne seg å bruke fleire verktøy og samanlikna prediksjonen frå ulike verktøy. Dette er fordi dess fleire verktøy som gir den same prediksjonen, dess større er sannsynet for at denne prediksjonen er riktig. Det er også viktig å merke seg at dette er prediksjonsverktøy og at ein ikkje skal stole blindt på svara desse verktøya gir.

Sidan dette er prediksjonsverktøy er det mogleg at den sjukdomsframkallande varianten ikkje blir predikert til å vera skadeleg for proteinet. Om ingen av prediksjonsverktøya predikerer ein variant som skadeleg vil det vera lite sannsynleg at den er skadeleg, men om den mot forventning skulle vera skadeleg vil det grunna prediksjonen vera liten interesse for denne. Dette gjer at desse prediksjonsverktøya i tillegg til å gi god informasjon om moglege skadelege variantar også kan bidra

til at faktiske sjukdomsframkallande variantar blir oversett. Ein skal difor bruke desse verktøya med omhug, sjølv om dei er til stor hjelp ved å redusera talet på interessante variantar.

4.4. Biokjemisk tolking av variantane i kandidatgena

Kandidatgena som blei valt ut var *NR4A3*, *PDZRN3*, *TNFAIP2*, *AGXT2*, *NOS3*, *ITGAV*, *FGFR3* og *GBR7*. Ei oversikt over desse gena og kva pasientar dei blei observert i er vist i tabell 3.4 i kapittel 3.4. I dette kapittelet vil den biokjemiske konsekvensen av aminosyreendringa for kvar variant blir diskutert. Funksjonen til gena er kort beskrive i kapittel 3.4 og vil bli beskrive i meir detalj i kapittel 4.5.

4.4.1. *NR4A3*

I *NR4A3* blei det observert to variantar, p.Thr291Met og p.Ser526Arg. Begge variantane var observert i gnomAD tidlegare, noko som senker sannsynet for at dei er skadelege. Dei var imidlertid observert med låg frekvens, og dette gjer det mogleg at dei likevel er skadeleg, spesielt med tanke på at det er beskrive redusert penetrans for MMD. Variantane vil no bli diskutert kvar for seg.

Varianten p.Thr291Met blei observert hos alle dei tre familiære pasientane, MMD-2-1, MMD-2-2 og MMD-2-3. Endringa frå treonin til metionin fører til ei endring frå ei polar til ei upolar aminosyre. Denne endringa kan påverka proteinet sin evne til å binde til andre protein og molekyl. Det kan også endra den tertiære strukturen til proteinet, både ved at dei tar opp ulik plass i rommet og at dei bind ulikt til nærliggande aminosyrer. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar tyder på at endringa påverkar proteinet, og at minst ein av forklaringane over er tilfellet.

Varianten p.Ser526Arg blei observert i pasient MMD-3-1. Endringa frå serin til arginin fører til at ei lita polar aminosyre blir bytta ut med ei stor basisk aminosyre. Dette er ei stor endring som både kan påverka bindinga til andre protein eller molekyl og den tertiære strukturen til proteinet. Den tertiære strukturen kan bli påverka både av at det kjem inn ei aminosyre som tar større plass og ved at den nye aminosyra bind annleis til nærliggande aminosyrer. Den middels høge CADD-verdien og andre prediksjonar antyd at endringa har ein effekt, men at denne effekten ikkje er så alvorleg som endringa ved første augekast tilseier. Dette kan forklarast med at endringa er i utkanten av proteinet og/eller at den er i ein ikkje-funksjonell del av proteinet.

4.4.2. *PDZRN3*

I *PDZRN3* blei varianten p.Ser454Arg observert i pasientane MMD-2-1, MMD-2-2 og MMD-2-3. Dette er same aminosyreendring som varianten p.Ser526Arg i genet *NR4A3*, og blir difor ikkje diskutert om igjen her. Sjå kapittel 4.4.1. for diskusjon av denne aminosyreendringa. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar talar for at varianten er skadeleg. Varianten er ikkje observert tidlegare, noko som gjer det meir sannsynleg at den er skadeleg enn om den hadde vore vanleg i normalbefolkninga.

4.4.3. *TNFAIP2*

I *TNFAIP2* blei varianten p.Gln414Glu observert i pasientane MMD-2-1, MMD-2-2 og MMD-2-3. Glutamin og glutaminsyre er like store, og endringa frå glutamin til glutaminsyre fører til ei endring frå ei polar aminosyre til ei sur aminosyre. Dette er ikkje ei veldig drastisk endring, noko som blir spegla av få skadelege prediksjonar. Varianten er imidlertid ikkje observert i gnomAD tidlegare, noko

som gjer det meir sannsynleg at den er skadeleg enn om den hadde vore vanleg i normalbefolkninga, men det er også mogleg at varianten er sjeldan og tolerert.

4.4.4. AGXT2

I *AGXT2* blei varianten p.Pro235Ser observert i pasient MMD-4-1. Endringa frå prolin til serin fører til ei endring frå ei upolar aminosyre til ei polar aminosyre. I tillegg er serin litt mindre enn prolin. Dette kan i noko grad endra den tertiære strukturen til proteinet, men det påverkar i større grad interaksjonen med andre protein/molekyl. Varianten har ein middels stor CADD-verdi, og er elles predikert til å vera skadeleg av eit mindretal av prediksjonsverktøya brukt i denne studien. Dette er ein indikasjon på at endringa har noko, men moderat, påverknad på funksjonen til proteinet. Varianten er ikkje observert tidlegare, noko som gjer det meir sannsynleg at den er skadeleg enn om den hadde vore vanleg i normalbefolkninga.

4.4.5. NOS3

I *NOS3* blei varianten p.Glu562Lys observert i pasient MMD-1-1. Det blei i tillegg observert ein intronisk variant, men denne vil, som beskrive i kapittel 3.4.4., ikkje bli diskutert vidare. Endringa frå glutaminsyre til lysin fører til ei endring frå ei sur til ei basisk aminosyre. Aminosyrene har ikkje så stor skilnad i storleik, men dei ha stor skilnad i eigenskapar. Denne endringa vil kunne påverka bindinga til andre protein eller molekul i stor grad. Den kan også endra den tertiære strukturen, då bindinga til nærliggande aminosyrer vil endra seg. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar er ein indikasjon på at varianten har ein effekt på funksjonen til proteinet. Varianten er observert tidlegare, men har ein låg frekvens i gnomAD. Den låge frekvensen er foreinleg med tanken om at varianten er skadeleg.

4.4.6. ITGAV

I *ITGAV* blei varianten p.Asn438Ile observert i pasient MMD-1-1. Endringa frå asparagin til isoleucin er ei endring frå ei polar til ei upolar aminosyre. Denne endringa kan ha konsekvensar for proteinet, då den kan forstyrre bindingar som er avhengige av ei polar aminosyre, både bindingar innad i proteinet og bindingar med andre molekul/protein. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar talar for at denne endringa faktisk er skadeleg og påverkar funksjonen til proteinet. Varianten er ikkje observert tidlegare, noko som gjer det meir sannsynleg at den er skadeleg enn om den hadde vore vanleg i normalbefolkninga.

4.4.7. FGFR3

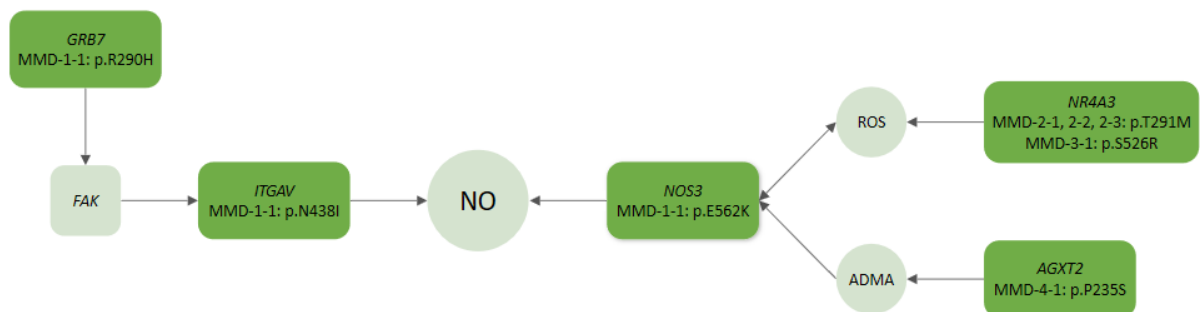
I *FGFR3* blei varianten p.Tyr379Cys observert i pasient MMD-3-1. Det blei i tillegg observert nokre variantar utanfor eksona, men dei vil ikkje bli diskutert i detalj her. Endringa frå tyrosin til cystein fører til ei endring frå ei stor polar aminosyre til ei lita og upolar aminosyre. Dette kan føra til endring i bindinga til andre protein eller molekul. Det kan også endra tertiærstrukturen til proteinet, både ved at cystein tar mindre plass, men også ved at cystein kan danna svovelbruer med andre cystein i nærleiken. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar talar for at endringa påverkar funksjonen til proteinet. Varianten er ikkje observert tidlegare, noko som gjer det meir sannsynleg at den er skadeleg enn om den hadde vore vanleg i normalbefolkninga.

4.4.8. GBR7

I *GRB7* blei varianten p.Arg290His observert i pasient MMD-1-1. Både arginin og histidin er basiske og nokså stor aminosyrer, men arginin er langstrakt og histidin er ringforma, noko som gjer at dei tar opp ulik plass i proteinet, og endringa kan dermed føre til noko endring i tertiærstrukturen til proteinet. Den høge CADD-verdien og andre prediksjonar tyder på at endringa er skadeleg. Varianten er observert i gnomAD, men pasienten var homozygot for denne varianten, og den er ikkje observert homozygot i gnomAD. Dette kan tyda på at varianten er tolerert i heterozygot form, men skadeleg om den opptretr homozygot.

4.5. Reaksjonsvegane kandidatgena er involvert i og funksjonen til kandidatgena

Fleire av kandidatgena hadde funksjonar i same reaksjonsveg, eller reaksjonsvegane som kan koplest saman, og ei oversikt over desse er vist i figur 4.1. Reaksjonsvegane kan delast inn i integrin-reaksjonsveg, NO-avhengig reaksjonsveg og ROS-avhengig reaksjonsveg. NO er eit molekyl som er viktig for angiogenese og står i sentrum i alle reaksjonsvegane. I dette kapittelet vil desse reaksjonsvegane bli beskrive og diskutert med tanke på kva funksjon kandidatgena har og korleis dette kan koplest til sjukdomsmekanismen i MMD. Alt som blir beskrive i dette kapittelet er spekulasjonar og nye hypotesar, då det grunna det låge talet på pasientar i denne studien ikkje er mogleg å gi nokre sikre svar.



Figur 4.1: Oversikt over moglege samanhengar mellom nokre av kandidatgena identifisert. Desse samanhengane er ikkje nødvendigvis godt etablert, men er identifisert gjennom ulike artiklar. Firkant indikerer gen, sirkel indikerer molekyl. Kandidatgena har mørk grøn farge, medan lys grøn farge indikerer eit molekyl eller protein som er viktig for samanhengen mellom kandidatgena. Under kvart kandidatgen er det informasjon om kva pasient varianten er observert i. Pilene viser korleis gena og molekyla verkar på kvarandre. Forkortingar: ROS: oksygenradikalar; ADMA: asymmetric dimethylarginine; NO: nitrogenmonooksid.

4.5.1. Integrin-reaksjonsveg; ITGAV og GRB7

Integrin adhesjonsreseptorar er blant mange molekyl som er vist å bidra til utviklinga av det vaskulære systemet.¹⁶⁴ Integriner er dei viktigaste reseptorane for ekstracellulære matriks (ECM) protein, og er difor svært viktige for celleadhesjonen til ECM.¹⁶⁴ Remodellering av matriks er viktig for angiogenese,¹⁶⁴ og difor er integriner interessante som regulatorar av angiogenese. I tillegg er reaksjonsvegane som involverer integriner viktige for mange andre prosessar involvert i angiogenese.¹⁶⁴ Integriner er ein del av mange kjende og basale reaksjonsvegane i cellene.¹⁶⁴ Ein av desse er PKB/Akt-reaksjonsvegen, som blant anna er med på å stimulera produksjon av NO.¹⁶⁴ Kva rolla NO spelar i angiogenese vil bli beskrive i kapittel 4.5.2.

ITGAV er ein del av integrin-familien, og er blant anna ein del av integrinen $\alpha V\beta 3$. $\alpha V\beta 3$ er ein av integrin-heterodimerane som er uttrykt i endotelceller.¹⁵¹ Den er lavt uttrykt i kvilande endotelceller (quiescent endothelial cells), men høgt uttrykt i endotelceller under angiogenese.¹⁵¹ Dette tyder på at $\alpha V\beta 3$ er ein viktig reseptor for angiogenese. Studiar tyder på at $\alpha V\beta 3$ regulerer fleire viktige responsar under angiogenese, blant anna regulerer den VEGFR2-signalering.¹⁵¹ Det er imidlertid usikkert om $\alpha V\beta 3$ er ein positiv eller negativ regulator for angiogenese, då det også er vist at mus utan $\alpha V\beta 3$ blant anna har betra angiogeneserespons ved oksygenmangel.¹⁶⁴

GRB7 er med på å stimulera cellemigrering.¹⁵⁵ Dette skjer ved at *GRB7* samhandlar med *FAK* og at dette komplekset er ein del av integrin-reaksjonsvegen.¹⁵⁵ *FAK* er eit av molekyla som kan stimulera fleire av integrin-reaksjonsvegane,¹⁶⁴ og dette viser at *GRB7* spelar ei rolle i integrin-reaksjonsvegar, og at det er slik dette proteinet påverkar cellemigrering. Det er vist at endringar i *GRB7* blant anna svekker cellemigrering og celleadhesjonen til ECM,¹⁵⁴ noko som igjen talar for at *GRB7* har ein funksjon i angiogenese.

Variantane i desse to gena var observert i pasient MMD-1-1. I tillegg hadde denne pasienten ein variant i *NOS3*, som er viktig for reguleringa av NO-konsentrasjonen i cellene (kapittel 4.5.2.).¹⁶⁵ Sidan alle desse tre gena kan koplast til NO-regulering, kan det tenkast at det er kombinasjonen av variantar i desse gena som forårsakar sjukdommen for denne pasienten.

4.5.2. NO-avhengig reaksjonsveg; *NOS3* og *AGXT2*

NO er eit fritt radikal med kort halveringstid som fungerer som eit intracellulært messenger-molekyl.¹⁶⁵ Reaksjonsvegen avhengig av NO fører til avslapping av muskelceller i blodåreveggane.¹⁶⁵ Sidan MMD har med blodåreveggane å gjera, er protein som påverkar produksjonen og degraderinga av NO interessante som kandidatgen for MMD. NO kan også stimulera cellemigrering, og dette skjer gjennom integrin-reaksjonsvegar, som er beskrive i kapittel 4.5.1. I tillegg kan, som tidlegare nemnt, integrin-reaksjonsvegar påverka produksjonen av NO. Det er imidlertid andre protein som i hovudsak påverkar mengda NO i cellene, blant anna *NOS3*.

NO blir produsert av NO-syntaser (*NOS*).¹⁶⁵ Det finst tre *NOS*, og det er i hovudsak *NOS3* som står for produksjonen av NO i endotel.¹⁶⁵ Dette fører til at endringar i *NOS3* er interessante som kandidatar for sjukdommar i blodåresystemet. Det har vist seg at både auka og minka produksjon av NO fører til dysfunksjon i endotelet.¹⁶⁵ Dette tyder på at både LoF- og GoF-variantar i *NOS3* kan forårsaka sjukdom. *NOS3* fungerer som ein dimer, og om denne dimeren ikkje blir danna korrekt kan *NOS3* danne ROS i staden for NO. Dette vil bli beskrive meir i kapittel 4.5.3.

Aktiviteten til *NOS3* kan bli direkte hemma av ADMA som kan binda seg til det aktive sete og dermed hindra produksjon av NO.¹⁶⁵ Dermed vil auka mengde av ADMA senka produksjonen av NO, som igjen kan føra til at *NOS3* produserer ROS heller enn NO. *AGXT2* er eit av to protein som kan degradera ADMA, og dette genet har vist seg å påverka kardiovaskulære sjukdommar.¹⁴³ Ein lågare aktivitet av *AGXT2* vil dermed auka konsentrasjonen av ADMA, som igjen vil senka den NO-produserande aktiviteten til *NOS3*. Dermed kan *AGXT2* indirekte påverka konsentrasjonen av NO, og dermed også angiogenese-prosessar avhengig av NO. Det er imidlertid slik at også eit anna protein (*DDAH*) kan degradera ADMA,¹⁶⁵ og det kan dermed tenkast at aktiviteten til dette proteinet i noko grad kan kompensera for manglande funksjon av *AGXT2*.

Variantane i gena *NOS3* og *AGXT2* blei observert i høvesvis pasient MMD-1-1 og MMD-4-1. Som nemnt tidlegare hadde pasient MMD-1-1 også variantar i to andre gen og desse gena er involvert i integrin-reaksjonsvegar. Dette er teikn på at reaksjonsvegar som inkluderer NO kan vera viktige for

utviklinga av MMD, og at variantar i ulike gen i desse reaksjonsvegane kan påverka utviklinga av MMD. Det er tidlegare vist at endringar i genet *GUCY1A3*, som er hovudreseptoren for NO, fører til MMD i nokre få pasientar.^{96, 97} I tillegg er det vist av pasientar med MMD har høgare konsentrasjon av NO-metabolittar i cerebrospinalvæske enn kontrollar utan MMD.¹⁶⁶ Desse studiane styrker mistanken om at regulering av NO er viktig for utviklinga av MMD.

4.5.3. Gen som påverkar nivået av ROS; NOS3 og NR4A3

Ein viss mengde ROS er viktig for funksjonar som cellesignalering og samantrekning av VSMC, men for høge mengder av ROS i cellene fører til oksidativt stress som kan føra til sjukdommar i kardiovaskulært system.^{137, 165} ROS kan oksidera ein av kofaktorane til *NOS3*, noko som fører til at *NOS3* ikkje kan danna dimeren som er avgjerande for NO-produksjonen.¹⁶⁵ Mangel på danning av dimeren fører igjen til at *NOS3* dannar meir ROS i staden for å danna NO.¹⁶⁵ Dette vil altså seie at ei auke i konsentrasjonen av ROS både senker produksjonen av NO og aukar produksjonen av ROS ytterlegare.

NR4A3 har nyleg vist seg å påverka konsentrasjonen av ROS i VSMC.¹³⁷ Ein studie har vist at eit auka uttrykk av *NR4A3* førte til ein auka produksjon av ROS gjennom auka uttrykk av *NOX1*, og at dette førte til ein auka cellemigrasjon.¹³⁷ Sidan auka uttrykk av *NR4A3* aukar produksjonen av ROS kan det også tenkast at *NR4A3* indirekte kan senka konsentrasjonen av NO, men dette er ikkje ein etablert samanheng. Ein anna aspekt ved *NR4A3* er at det er vist at auka uttrykk av *NR4A3* fører til tjukkare neointima og høgare prosent av stenose etter vaskulær skade.¹³⁸ Sjølv om denne studien undersøker kva som skjer etter vaskulær skade og ikkje utan skade, er resultata deira eit teikn på at *NR4A3* har ein funksjon i oppretthalding av eit friskt vaskulært system. Det kan også tenkast at pasientar med MMD har fått ein liten skade på blodåra, og at sjukdommen deretter er forårsaka av for høgt uttrykka av *NR4A3*, men dette er vanskeleg å seie noko om utan funksjonelle studiar av dei spesifikke variantane observert i denne studien.

Funksjonen til *NR4A3* og *NOS3* peiker igjen på at produksjonen av NO i cellene er ein mekanisme for MMD. Ein samanheng mellom *NR4A3* og NO-produksjon er imidlertid ikkje etablert i forskingsmiljøet, men sidan begge har med ROS å gjera kan det tenkast at denne samanhengen berre ikkje er godt nok undersøkt enda.

4.5.4. Andre kandidatgen; FGFR3, TNFAIP2 og PDZRN3

Dei resterande kandidatgena kan ikkje koplart til ein felles reaksjonsveg på same måte, men det har for alle blitt vist at dei kan ha ein funksjon i angiogenese og/eller vaskulær utvikling. *FGFR3* er ein av fleire reseptorar for ulike fibroblast growth factors (FGF-ar).¹⁵² Det er vist at signalering gjennom FGF-ar og FGF-reseptorar er ein viktig regulator for vaskulær utvikling.¹⁵² Denne studien viste imidlertid at nedregulering av *FGFR3* aleine ikkje hadde noko effekt, men at nedregulering av både *FGFR3* og *FGFR1* reduserte cellemigrering og cellespreiing.¹⁵² Dette kan tyda på at variantar i *FGFR3* aukar risikoen for utvikling av sjukdom, heller enn å vera ein monogen årsak. Ein anna studien har vist at *FGFR3* spelar ei rolle i kreft-angiogenese,¹⁵³ og dette gir auka tyngde til at *FGFR3* spelar ein rolle i angiogenese.

TNFAIP2 er eit gen som blir indusert av TNF- α .¹⁴² Dette betyr at *TNFAIP2* er ein del av nokre av responsane til TNF- α . TNF- α har vist seg å vera viktig i inflammatorisk respons.¹⁴¹ *TNFAIP2* er blant anna indusert under danninga av kapillærrør-struktur og uttrykt under angiogenese,¹⁴¹ noko som tydar på at *TNFAIP2* har ein funksjon i angiogenese. Dette tyder også på at det er ein overlapp

mellom gen induisert av TNF- α og gen induisert under angiogenese.¹⁴¹ *TNFAIP2* kan også induserast av andre molekyl, blant anna FGF-ar,¹⁴² noko som gjer at det kanskje kan trekkast ei kopling mellom *TNFAIP2* og *FGFR3*, men dette er ikkje vist i noko forskning til no.

Ein studie har vist at *PDZRN3* har ein funksjon i embryonal angiogenese gjennom å ha ein viktig rolle i retningsbestemt og koordinert forlenging av endotelceller.¹³⁹ Denne studien viste også at LoF av *PDZRN3* førte til defektar i vaskulær forgreining i netthinna til mus etter fødsel.¹³⁹ Nokre av dei same forskarane har seinare vist at *PDZRN3* regulerer vaskulær permeabilitet gjennom å regulera celle til celle-forbindingar.¹⁴⁰ Dei viste blant anna at for høgt uttrykk av *PDZRN3* auka permeabiliteten og induserte bløding hos embryo.¹⁴⁰ Sjølv om funksjonane til *PDZRN3* ikkje like tydeleg kan koplast til sjukdomsmekanismens til MMD viser desse studia at *PDZRN3* har ein funksjon kopla til det vaskulære systemet. Det kan også nemnast at MMD med hjernebløding som symptom er vanleg blant vaksne asiatiske pasientar, og dermed kan det tenkast at *PDZRN3* har ein funksjon i utviklinga av MMD. Hjernebløding er imidlertid ikkje vanleg blant kaukasiske pasientar med MMD.

4.6. Kan hypotesane vera feil?

For at me skal kunna oppdaga genetisk årsak til MMD må hypotesen vår vera rett. Hypotesen er i dette tilfellet at MMD har ein monogen og dominant arv. Dette vil seie at det er forventa å finne eit felles sjukdomsframkallande gen hos alle tre pasientane i familien og at dei sporadiske pasientane har ein *de novo*-variant som er sjukdomsframkallande. Det vil også forsterka styrken i resultata om fleire av pasientane har same variant eller ulike variantar i same gen. Det er imidlertid mogleg at heile eller delar av denne hypotesen er feil, og om dette er tilfellet vil det svekke vår moglegheit til å oppdaga genetisk årsak til MMD.

4.6.1. Arv og miljø?

Ein del av hypotesen vår er at MMD har ein monogen arv og dette er blitt vist i tidlegare studiar.^{7, 77} Den høge andelen av sporadiske pasientar og det faktum at det er beskrive einnegga tvillingar⁴⁴ der berre ein av tvillingane har MMD nyanserer tanken om rein monogen arv. Det er difor framleis under diskusjon kor stor påverknad genetiske faktorar har og kva som er bestemt av miljøfaktorar.

Det er godt kjent at genetiske faktorar spelar ei viktig rolle for utviklinga av MMD, men at dei ikkje nødvendigvis er einaste årsak.⁴⁴ Mange familiære tilfelle viser seg å vera polygeniske,⁴⁴ og ein ny GWAS av nesten 1500 pasientar identifiserte heile 11 risikoloci for MMD.⁸⁴ Denne studien taler i retning av at fleire enn eit gen påverkar sårbarheita for å utvikla MMD. Ein anna hypotese er difor at nokre personar har ein genetisk sårbarheit og at miljøfaktorar påverkar om dei får sjukdommen eller ikkje.⁴⁴

Ein del av hypotesen om monogen arv var at dei sporadiske pasientane hadde ein *de novo*-variant som forårsaka MMD. Det var berre mogleg å inkludera foreldra til ein av dei tre sporadiske pasientane, og dette førte til ein svakare analyse enn ønska. Dette avgrensa kva analysar som kunne gjerast på eksoma til desse pasientane og gjorde det at det var vanskelegare å oppdaga ein monogen årsak hos desse pasientane. Sidan det verken kan bekreftast eller avkreftast at variantane funne i desse pasientane er *de novo* er desse resultata meir usikre enn resultata frå *de novo*- og familieanalysen. Det er også vanskeleg å seie om variantane identifisert i dei sporadiske pasientane er monogene årsaker eller om dei er ein del av ein multifaktoriell arv.

Med tanke på det låge talet på pasientar i studien hadde det vore ein styrke å samanlikna sikre *de novo*-variantar med variantane identifisert i familieanalysen, spesielt sidan familieanalysen ikkje identifisert ein tydeleg kandidatvariant. Sidan det ikkje blei identifisert ein klar kandidatvariant, men heller fleire interessante variantar i familien kan det tenkast at det er multifaktoriell arv som er forklaringa, men det at MMD så tydeleg er arva frå mor til barn i denne familien taler imot dette. Det kan tenkast at barna har arva fleire risikofaktorar og i tillegg har blitt utsett for miljøfaktorar, men då det er snakk om så mange faktorar i dette tilfelle er det lite sannsynleg at dette er forklaringa. Det er meir sannsynleg at det i dette tilfellet er snakk om monogen arv, men at metodane i denne studien ikkje klarte å identifisera den eine årsaka. Om det til døme hadde blitt sekvensert friske familiemedlem eller blitt gjort WGS kunne sannsynet for å finna årsaka vore høgare.

4.6.2. *Ikkje dominant arv*

Hypotesen vår baserer seg også på at MMD har ein dominant arv. Det er tidlegare vist at MMD vert nedarva dominant med redusert penetrans.⁷ Redusert penetrans kompliserer arvemønsteret då det gjer at det ikkje er rein dominant arv. Dette gjer at sjukdommen kan «hoppa over» generasjonar og at sannsynet for at barn av affiserte personar får sjukdommen er lågare, og sannsynet avhenger av penetransen. Ved redusert penetrans kan også friske personar ha varianten som forårsakar sjukdommen, noko som gjer spesielt *de novo*-analysen vanskelegare. Ein anna kompliserande faktor er variabel ekspresjon.

Det kan tenkast at ein av foreldra til sporadiske pasientar har ein sjukdomsframkallande variant, men at variabel ekspresjon fører til at sjukdommen har eit så lite og utydeleg uttrykk hos foreldra at ein diagnose ikkje er stilt. Dette er imidlertid lite sannsynleg då det ikkje er beskrive noko sjukdomshistorie hos foreldra som kan likna på MMD. Eit meir sannsynleg tilfelle er at foreldra til sporadiske pasientar har ein sjukdomsframkallande variant, men at redusert penetrans har ført til at MMD ikkje kjem til uttrykk hos foreldra. Om dette er tilfelle vil varianten bli filtrert vekk og vil ikkje bli oppdaga. Sidan redusert penetrans er beskrive for MMD kan det ikkje utelukkast at den sanne sjukdomsframkallande varianten er filtrert vekk i dette tilfellet.

Eit anna arvemønster som gjer at ein sjukdom berre dukkar opp i ein generasjonar er recessiv arv. Redusert penetrans er beskrive for MMD,⁷ men det kan det tenkast at det ikkje er redusert penetrans, men heller recessiv arv, sidan begge desse arvemønstra senker sjansen for å arva ein eigenskap. Sidan dei fleste menneske får få barn, vil tilfeldigheit spelar ei rolle i kor mange av barna som arva ein eigenskap, uavhengig av arvemønster. Studien som beskriv arvemønsteret for MMD hadde nokså få pasientar og det er dermed mogleg at det er tilfeldigheit som gjer at dei landar på dominant arv med redusert penetrans og ikkje recessiv arv. Recessiv arv kan også forklara andelen med sporadiske pasientar, då desse med recessiv arv ikkje nødvendigvis er sporadiske, men at foreldra deira er berarar av eit recessivt allel. Det er imidlertid ikkje observert noko stor grad av affiserte sysken og friske foreldre for MMD, noko som er vanleg med recessiv arv, og dette taler imot at MMD blir arva recessivt.

4.6.3. *Genetisk heterogenitet: Ikkje felles årsak blant pasientane*

Om me hadde funne ein felles genetisk årsak hos alle pasientane ville dette gitt større styrke til resultata, men det er også mogleg at ein eventuell genetisk årsak ikkje er lik for alle pasientane. Mekanisme for utviklinga av MMD er enda ikkje kjent,⁴³ og dette gjer at ein ikkje veit om alle pasientar har ein felles årsak og mekanisme for utviklinga av MMD. Det er beskrive fleire ulike underliggande sjukdommar som fører til moyamoya-fenomen som ein sekundær tilstand,⁴³ og desse

underliggende sjukdommane har ulike årsaker. Dette viser at moyamoya-fenomenet kan utviklast av ulike årsaker, og det taler også for at personar med MMD kan ha ulike årsaker for utviklinga av sjukdommen. Dette gjer at det er mogleg at våre pasientar har ulike årsaker for sin MMD, og det gjer det vanskelegare å finne ein felles årsak med høg styrke blant pasientane.

Ein forklaring på at me ikkje finn ein felles genetisk årsak kan vera at pasientane har feil i ulike gen, men at alle desse gena er ein del av ein felles reaksjonsveg som er viktig for til dømes angiogenese. Resultat i denne studien kan tyda på at dette er tilfelle for våre pasientar, då fleire av kandidatgena identifisert kan koplast til NO-produksjon i cellene. Alle pasientane hadde minst ein variant i eit gen kopla til ein av dei tre reaksjonsvegane beskrive for NO-produksjon, og ein av pasientane hadde variantar i tre av gena. Dette tyder på at desse reaksjonsvegen kan vera viktig for utviklinga av MMD.

Ein anna forklaring kan vera at pasientane har ulik genetisk arkitektur for MMD. Dette vil seie at det er mogleg at nokre pasientar har monogen arv med ein variant i eit gen med høg effekt, medan andre pasientar kan ha multifaktoriell arv med fleire variantar i eit eller fleire gen med låg effekt. Dette gjer det mogleg at fleire av gena me har identifisert er sjukdomsframkallande for ulike pasientar, og at dei har ulik effekt for pasientane. Dette er vist å vera tilfelle for fleire kjende sjukdommar, til dømes epilepsi og Parkinsons sjukdom.

Det kan også tenkast at ein kombinasjon av ulik genetisk arkitektur og variantar i gen i felles reaksjonsveg er forklaringa på at pasientane ikkje har ein felles monogen årsak for utviklinga av MMD. Det kan til dømes tenkast at dei familiære pasientane har ein variant med stor effekt for deira utvikling av MMD. Samstundes kan årsaka for pasient MMD-1-1, som har tre variantar i tre ulike gen i same reaksjonsveg, vera ein kombinasjon av ein låg effekt av kvar av desse tre variantane. For pasient MMD-4-1, som har ein *de novo*-variant, kan årsaka enten vera at denne varianten har ein stor effekt, eller at denne varianten har ein moderat effekt, medan andre variantar som ikkje er oppdaga her kan ha låge tilleggseffektar. Samstundes som dette beskriv ulike genetisk arkitektur, er alle desse gena som nemnt i same reaksjonsveg. Det er likevel ikkje mogleg å gi nokre sikre svar då me har for få pasientar med variantar i same gen og ikkje har gjort noko funksjonelle studiar av dei observerte variantane.

4.7. Etiske aspekt ved sekvensering

4.7.1. Identifiserbar informasjon og anonymisering

Det er eit mål at pasientar som samtykkjer til å vera med i eit forskingsprosjekt er anonyme for offentlegheita. Dette gjer at det er visse forholdsreglar som må tas, men det fører også til nokre utfordringar, spesielt med små pasientgrupper og sjeldne diagnosar. Desse utfordringane og forholdsreglane vil bli beskrive i dette kapittelet.

Det må skiljast mellom avidentifisering og anonymisering. Avidentifisering vil seie at ein ikkje oppgir direkte identifiserbar informasjon, medan anonymisering vil seie at det ikkje er mogleg å kjenne igjen pasientane ut frå informasjonen som blir oppgitt. Grensa for når anonymisering er mogleg ligg på fem pasientar, og med våre seks pasientar er me dermed rett over denne grensa. Sidan pasientane i denne studien har ein svært sjeldan diagnose vil total anonymisering vera svært vanskeleg. Personar som kjenner pasientane godt kan komme til å kjenne dei igjen gjennom sjukdomshistoria deira. Dette blei imidlertid pasientane opplyste om før dei samtykkja til å vera med i studien.

Det er viktig å vera bevisst på korleis ein oppbevarer og handterer sensitiv og identifiserbar informasjon om pasientar. Slik informasjon skal ikkje distribuerast over nett, og kan dermed ikkje sendast på mail mellom prosjektmedarbeidarar. Dette er viktig for sikker handtering av informasjon, men har også bydd på utfordringar. Det var ikkje mogleg å få pasientjournal tilsendt frå andre sjukehus og dette er årsaka til den manglande informasjonen om pasientane som ikkje var behandla ved OUS.

Resultata frå WES er også identifiserbar informasjon og må handterast med same varsamheit som anna identifiserbar informasjon. I resultatfilene frå sekvenseringa er det store mengder data og desse dataa gir informasjon om både vanlege og sjeldne variantar hos kvar enkelt pasient. Kombinasjonen av dei nærare 100 000 variantane kvar pasient har er heilt unik for pasienten. Dette gjer at pasientane kan gjenkjennast ut frå denne informasjonen. Desse døma illustrerer korleis balansegangen mellom personvern og høve til å gjera forskning nokre gongar kan vera vanskeleg. Eit sterkt personvern er sjølvsagt viktig, men det er synd om dette kjem i vegen for god forskning.

4.7.2. Tilfeldige funn

Når ein handterer den store mengda informasjon som blir produsert under WES er det fare for å komme over såkalla tilfeldige funn. Tilfeldige funn er funn i gen som ikkje har noko med sjukdommen ein er interessert i å gjera. Slike funn blir i regelen ikkje rapportert tilbake til pasientane, då det ofte er usikkert kva konsekvens dei har. Eit unntak er om det blir oppdaga ein variant med kjent konsekvens og der nærare oppfølging og/eller behandling er anbefalt. Pasientane må i forkant av samtykkje ta stilling til om dei ønsker tilbakemelding om slike variantar eller ikkje. Det er viktig med genetisk rettleiing før pasientane tar dette valet og også i ettertid om det blir gitt tilbakemelding om slike funn. Risikoen for tilfeldig funn er imidlertid ikkje unik for genetiske analysar. Det er også mogleg å komma over tilfeldige funn ved bruk av andre medisinske undersøkingar, som til dømes biletediagnostikk.

5. Konklusjon og framtidsutsikter

I denne studien blei det ikkje identifisert éin felles monogen årsak hos alle pasientane, men det blei observert fleire interessante variantar i ulike gen. Desse gena var *NR4A3*, *PDZRN3*, *TNFAIP2*, *AGXT2*, *NOS3*, *ITGAV*, *FGFR3* og *GBR7*. Sjølv om det ikkje blei identifisert ein felles årsak blei det identifisert interessante samanhengar mellom fleire av gena. Gena *NOS3*, *ITGAV*, *NR4A3*, *AGXT2* og *GBR7* viste seg å kunna koplast til NO-produksjon i cellene og NO er eit molekyl som er viktig for angiogenese. Alle pasientane hadde minst ein variant i minst eit av desse gena, og dette kan vera eit teikn på at endringar i NO-produksjon er viktig for utviklinga av MMD i kaukasiske pasientar. Det er imidlertid ikkje mogleg å gi nokre sikre svar ut frå denne studien, då variantane blei observert i få pasientar, og det trengs difor meir forskning på området.

Ein svakheit med denne studien og mange andre studiar på MMD er det låge talet på pasientar. Dette gjeld spesielt studiar på kaukasisk MMD. Dette skyldast at MMD er ein svært sjeldan diagnose. I framtidige studiar bør ein difor forsøka å rekruttera eit større tal på pasientar. Dette kan gjerast gjennom å rekruttera over ein lengre tidsperiode. Det vil også vera føremålstenleg å etablera samarbeid mellom fleire behandlingsstadar for å auka pasientgruppa. For MMD vil internasjonale samarbeid med kaukasiske pasientar frå heile Europa kunna auka talet på pasientar og dermed også gi meir sikre svar.

I framtidige studiar vil det også vera ein fordel å undersøka genetikken til pasientane ved hjelp av WGS heller enn WES. Dette er fordi det ikkje er sikkert at ein eventuell genetisk årsak for MMD ligg i eksomet. Årsaka kan også ligga andre stadar i genomet og om dette er tilfelle kan det berre oppdagast ved hjelp av WGS. WGS er framleis dyrare enn WES, men prisskilnaden vil truleg søkke ettersom meir effektive sekvenseringsmetodar blir utvikla. Dette gjer at det i framtida sannsynlegvis vil bli større bruk av WGS og dermed kan ein oppdaga genetiske årsaker som ligg utanfor eksomet.

I tillegg til at det trengs meir genetisk forskning på MMD, og då spesielt på kaukasisk MMD, trengs det også vidare forskning på variantar og gen som blir identifisert i genetiske studiar. Å visa at ein variant har ein genetisk samanheng med MMD er ikkje nok til å seia noko om kvifor og korleis denne varianten eventuelt forårsakar MMD. For å kunna bevisa ein årsak-verknad-samanheng trengs det funksjonelle studiar på dei aktuelle variantane og gena. Dette kan blant anna gjerast ved hjelp av mRNA-analysar av blodet til pasienten eller ved å undersøka korleis proteinet oppfører seg i hudceller frå pasienten. Dette blei ikkje gjort som ein del av denne masteroppgåva, men det er innhenta tillating til å gjere desse analysane om det blir sett på som føremålstenleg.

Referansar

1. Gregor Mendel. (1865). Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865*, Abhandlungen: 3–47.
2. Hartwell, L. (2015). *Genetics : from genes to genomes*. 5th ed. utg. New York: McGraw-Hill.
3. Ziegler, A. & Koenig, I. R. (2014). *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications, with an e-Learning Platform*. 2nd ed. utg.: Germany: Wiley-Blackwell.
4. Hoffjan, S. (2016). Dissecting the genetic background of multifactorial diseases and traits - A major challenge for genetic research. *Mol Cell Probes*, 30 (6): 345. doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.003.
5. Shawky, R. M. (2014). Reduced penetrance in human inherited disease. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15 (2): 103-111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2014.01.003>.
6. Ott, J., Wang, J. & Leal, S. M. (2015). Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 16 (5): 275-284. doi: 10.1038/nrg3908.
7. Mineharu, Y., Takenaka, K., Yamakawa, H., Inoue, K., Ikeda, H., Kikuta, K. I., Takagi, Y., Nozaki, K., Hashimoto, N. & Koizumi, A. (2006). Inheritance pattern of familial moyamoya disease: autosomal dominant mode and genomic imprinting. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (9): 1025-9. doi: 10.1136/jnnp.2006.096040.
8. Acuna-Hidalgo, R., Veltman, J. A. & Hoischen, A. (2016). New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol*, 17 (1): 241. doi: 10.1186/s13059-016-1110-1.
9. Veltman, J. A. & Brunner, H. G. (2012). De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet*, 13 (8): 565-75. doi: 10.1038/nrg3241.
10. Hershey, A. D. & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*, 36 (1): 39-56.
11. Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18: 123-31.
12. Lesk, A. M. & Oxford University, P. (2017). *Introduction to genomics*. Oxford: Oxford University Press.
13. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12): 5463-7.
14. McGinn, S. & Gut, I. G. (2013). DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol*, 30 (4): 366-72. doi: 10.1016/j.nbt.2012.11.012.
15. Rizzo, J. M. & Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5 (7): 887-900. doi: 10.1158/1940-6207.Capr-11-0432.
16. Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17 (6): 333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.
17. Lohmann, K. & Klein, C. (2014). Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*, 11 (4): 699-707. doi: 10.1007/s13311-014-0288-8.
18. Voelkerding, K. V., Dames, S. A. & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 55 (4): 641-58. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789.
19. Brunstein, J. (2014). In-depth coverage: some useful NGS terms. *MLO Med Lab Obs*, 46 (11): 32-3.
20. Behjati, S. & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98 (6): 236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340.
21. Seaby, E. G., Pengelly, R. J. & Ennis, S. (2016). Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics*, 15 (5): 374-84. doi: 10.1093/bfpg/elv054.
22. Ku, C. S., Cooper, D. N. & Patrinos, G. P. (2016). The Rise and Rise of Exome Sequencing. *Public Health Genomics*, 19 (6): 315-324. doi: 10.1159/000450991.

23. Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q. B., Antipenko, A., Shang, L., Boisson, B., Casanova, J. L. & Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (17): 5473-8. doi: 10.1073/pnas.1418631112.
24. Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E. E., et al. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461 (7261): 272-6. doi: 10.1038/nature08250.
25. Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., Huff, C. D., Shannon, P. T., Jabs, E. W., Nickerson, D. A., et al. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nature genetics*, 42 (1): 30-35. doi: 10.1038/ng.499.
26. Petersen, B. S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D. & Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet*, 18 (1): 14. doi: 10.1186/s12863-017-0479-5.
27. Paria, N., Copley, L. A., Herring, J. A., Kim, H. K., Richards, B. S., Sucato, D. J., Wise, C. A. & Rios, J. J. (2013). Whole-exome sequencing: discovering genetic causes of orthopaedic disorders. *J Bone Joint Surg Am*, 95 (23): e1851-8. doi: 10.2106/jbjs.L.01620.
28. Bailey-Wilson, J. E. & Wilson, A. F. (2011). Linkage analysis in the next-generation sequencing era. *Hum Hered*, 72 (4): 228-36. doi: 10.1159/000334381.
29. Zhang, X. (2014). Exome sequencing greatly expedites the progressive research of Mendelian diseases. *Front Med*, 8 (1): 42-57. doi: 10.1007/s11684-014-0303-9.
30. Andrade, C. (2015). Understanding relative risk, odds ratio, and related terms: as simple as it can get. *J Clin Psychiatry*, 76 (7): e857-61. doi: 10.4088/JCP.15f10150.
31. Lander, E. & Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11 (3): 241-7. doi: 10.1038/ng1195-241.
32. Kim, J. S. (2016). Moyamoya Disease: Epidemiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Journal of Stroke*, 18 (1): 2-11. doi: 10.5853/jos.2015.01627.
33. Takeuchi, K. & Shimizu, K. (1957). Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries. *Brain Nerve*, 9: 37-43.
34. Suzuki, J. & Takaku, A. (1969). Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*, 20 (3): 288-99.
35. Guey, S., Tournier-Lasserre, E., Herve, D. & Kossorotoff, M. (2015). Moyamoya disease and syndromes: from genetics to clinical management. *Appl Clin Genet*, 8: 49-68. doi: 10.2147/tacg.S42772.
36. Shang, S., Zhou, D., Ya, J., Li, S., Yang, Q., Ding, Y., Ji, X. & Meng, R. (2018). Progress in moyamoya disease. *Neurosurg Rev*. doi: 10.1007/s10143-018-0994-5.
37. Kuriyama, S., Kusaka, Y., Fujimura, M., Wakai, K., Tamakoshi, A., Hashimoto, S., Tsuji, I., Inaba, Y. & Yoshimoto, T. (2008). Prevalence and clinicoepidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Stroke*, 39 (1): 42-7. doi: 10.1161/strokeaha.107.490714.
38. Baba, T., Houkin, K. & Kuroda, S. (2008). Novel epidemiological features of moyamoya disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (8): 900-4. doi: 10.1136/jnnp.2007.130666.
39. Ahn, I. M., Park, D. H., Hann, H. J., Kim, K. H., Kim, H. J. & Ahn, H. S. (2014). Incidence, prevalence, and survival of moyamoya disease in Korea: a nationwide, population-based study. *Stroke*, 45 (4): 1090-5. doi: 10.1161/strokeaha.113.004273.
40. Miao, W., Zhao, P.-L., Zhang, Y.-S., Liu, H.-Y., Chang, Y., Ma, J., Huang, Q.-J. & Lou, Z.-X. (2010). Epidemiological and clinical features of Moyamoya disease in Nanjing, China. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112 (3): 199-203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.11.009>.

41. Uchino, K., Johnston, S. C., Becker, K. J. & Tirschwell, D. L. (2005). Moyamoya disease in Washington State and California. *Neurology*, 65 (6): 956-8. doi: 10.1212/01.wnl.0000176066.33797.82.
42. Birkeland, P. & Lauritsen, J. (2018). Incidence of Moyamoya Disease in Denmark: A Population-Based Register Study. *Acta Neurochir Suppl*, 129: 91-93. doi: 10.1007/978-3-319-73739-3_13.
43. Kuroda, S. & Houkin, K. (2008). Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*, 7 (11): 1056-66. doi: 10.1016/s1474-4422(08)70240-0.
44. Scott, R. M. & Smith, E. R. (2009). Moyamoya disease and moyamoya syndrome. *N Engl J Med*, 360 (12): 1226-37. doi: 10.1056/NEJMra0804622.
45. Bang, O. Y., Fujimura, M. & Kim, S. K. (2016). The Pathophysiology of Moyamoya Disease: An Update. *J Stroke*, 18 (1): 12-20. doi: 10.5853/jos.2015.01760.
46. Ikeda, E. (1991). Systemic vascular changes in spontaneous occlusion of the circle of Willis. *Stroke*, 22 (11): 1358-62.
47. Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis & Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Infractable Diseases. (2012). Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 52 (5): 245-66.
48. Yamashita, M., Oka, K. & Tanaka, K. (1983). Histopathology of the brain vascular network in moyamoya disease. *Stroke*, 14 (1): 50-8.
49. Forfang, K. & Vetrhus, M. (2018). *Aneurisme*. Online. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/aneurisme> (lest 28. september 2018).
50. Borthne, A. & Brekke, M. (2018). *Angiografi*. Online. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/angiografi> (lest 1. oktober 2018).
51. Steigen, T. (17. november 2017). *Bypass Operasjon*. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/bypass-operasjon> (lest 2. oktober 2018).
52. Boston Children's Hospital. (15.03.2016). *Moyamoya disease diagnosis and treatment*.
53. Choi, J. U., Kim, D. S., Kim, E. Y. & Lee, K. C. (1997). Natural history of moyamoya disease: comparison of activity of daily living in surgery and non surgery groups. *Clin Neurol Neurosurg*, 99 Suppl 2: S11-8.
54. Imaizumi, T., Hayashi, K., Saito, K., Osawa, M. & Fukuyama, Y. (1998). Long-term outcomes of pediatric moyamoya disease monitored to adulthood. *Pediatr Neurol*, 18 (4): 321-5.
55. Miyamoto, S., Yoshimoto, T., Hashimoto, N., Okada, Y., Tsuji, I., Tominaga, T., Nakagawara, J. & Takahashi, J. C. (2014). Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic moyamoya disease: results of the Japan Adult Moyamoya Trial. *Stroke*, 45 (5): 1415-21. doi: 10.1161/strokeaha.113.004386.
56. Hever, P., Alamri, A. & Tolias, C. (2015). Moyamoya angiopathy - Is there a Western phenotype? *Br J Neurosurg*, 29 (6): 765-71. doi: 10.3109/02688697.2015.1096902.
57. Acker, G., Goerdes, S., Schneider, U. C., Schmiedek, P., Czabanka, M. & Vajkoczy, P. (2015). Distinct clinical and radiographic characteristics of moyamoya disease amongst European Caucasians. *Eur J Neurol*, 22 (6): 1012-7. doi: 10.1111/ene.12702.
58. Kleinloog, R., Regli, L., Rinkel, G. J. & Klijn, C. J. (2012). Regional differences in incidence and patient characteristics of moyamoya disease: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83 (5): 531-6. doi: 10.1136/jnnp-2011-301387.
59. Kraemer, M., Heienbrok, W. & Berlit, P. (2008). Moyamoya disease in Europeans. *Stroke*, 39 (12): 3193-200. doi: 10.1161/strokeaha.107.513408.
60. Chiu, D., Shedden, P., Bratina, P. & Grotta, J. C. (1998). Clinical features of moyamoya disease in the United States. *Stroke*, 29 (7): 1347-51.
61. Kraemer, M., Schwitalla, J. C., Diesner, F., Aktas, O., Hartung, H. P. & Berlit, P. (2019). Clinical presentation of Moyamoya angiopathy in Europeans: experiences from Germany with 200 patients. *J Neurol*. doi: 10.1007/s00415-019-09277-1.

62. Hallemeier, C. L., Rich, K. M., Grubb, R. L., Jr., Chicoine, M. R., Moran, C. J., Cross, D. T., 3rd, Zipfel, G. J., Dacey, R. G., Jr. & Derdeyn, C. P. (2006). Clinical features and outcome in North American adults with moyamoya phenomenon. *Stroke*, 37 (6): 1490-6. doi: 10.1161/01.STR.0000221787.70503.ca.
63. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. (2018). *Nucleic Acids Res*, 46 (D1): D8-d13. doi: 10.1093/nar/gkx1095.
64. Roder, C., Nayak, N. R., Khan, N., Tatagiba, M., Inoue, I. & Krischek, B. (2010). Genetics of Moyamoya disease. *J Hum Genet*, 55 (11): 711-6. doi: 10.1038/jhg.2010.103.
65. Kitahara, T., Okumura, K., Semba, A., Yamaura, A. & Makino, H. (1982). Genetic and immunologic analysis on moya-moya. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 45 (11): 1048-52.
66. Aoyagi, M., Ogami, K., Matsushima, Y., Shikata, M., Yamamoto, M. & Yamamoto, K. (1995). Human leukocyte antigen in patients with moyamoya disease. *Stroke*, 26 (3): 415-7.
67. Inoue, T. K., Ikezaki, K., Sasazuki, T., Matsushima, T. & Fukui, M. (1997). Analysis of class II genes of human leukocyte antigen in patients with moyamoya disease. *Clin Neurol Neurosurg*, 99 Suppl 2: S234-7.
68. Han, H., Pyo, C. W., Yoo, D. S., Huh, P. W., Cho, K. S. & Kim, D. S. (2003). Associations of Moyamoya patients with HLA class I and class II alleles in the Korean population. *J Korean Med Sci*, 18 (6): 876-80. doi: 10.3346/jkms.2003.18.6.876.
69. Hong, S. H., Wang, K. C., Kim, S. K., Cho, B. K. & Park, M. H. (2009). Association of HLA-DR and -DQ Genes with Familial Moyamoya Disease in Koreans. *J Korean Neurosurg Soc*, 46 (6): 558-63. doi: 10.3340/jkns.2009.46.6.558.
70. Kraemer, M., Horn, P. A., Roder, C., Khan, N., Diehl, R. R., Berlit, P. & Heinemann, F. M. (2012). Analysis of human leucocyte antigen genes in Caucasian patients with idiopathic Moyamoya angiopathy. *Acta Neurochirurgica*, 154 (3): 445-454. doi: 10.1007/s00701-011-1261-5.
71. Ikeda, H., Sasaki, T., Yoshimoto, T., Fukui, M. & Arinami, T. (1999). Mapping of a familial moyamoya disease gene to chromosome 3p24.2-p26. *American Journal of Human Genetics*, 64 (2): 533-537.
72. Inoue, T. K., Ikezaki, K., Sasazuki, T., Matsushima, T. & Fukui, M. (2000). Linkage analysis of moyamoya disease on chromosome 6. *J Child Neurol*, 15 (3): 179-82. doi: 10.1177/088307380001500307.
73. Yamauchi, T., Tada, M., Houkin, K., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kuroda, S., Abe, H., Inoue, T., Ikezaki, K., Matsushima, T., et al. (2000). Linkage of familial moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) to chromosome 17q25. *Stroke*, 31 (4): 930-5.
74. Sakurai, K., Horiuchi, Y., Ikeda, H., Ikezaki, K., Yoshimoto, T., Fukui, M. & Arinami, T. (2004). A novel susceptibility locus for moyamoya disease on chromosome 8q23. *J Hum Genet*, 49 (5): 278-81. doi: 10.1007/s10038-004-0143-6.
75. Nanba, R., Tada, M., Kuroda, S., Houkin, K. & Iwasaki, Y. (2005). Sequence analysis and bioinformatics analysis of chromosome 17q25 in familial moyamoya disease. *Childs Nerv Syst*, 21 (1): 62-8. doi: 10.1007/s00381-004-1005-4.
76. Kang, H. S., Kim, S. K., Cho, B. K., Kim, Y. Y., Hwang, Y. S. & Wang, K. C. (2006). Single nucleotide polymorphisms of tissue inhibitor of metalloproteinase genes in familial moyamoya disease. *Neurosurgery*, 58 (6): 1074-80; discussion 1074-80. doi: 10.1227/01.Neu.0000215854.66011.4f.
77. Mineharu, Y., Liu, W., Inoue, K., Matsuura, N., Inoue, S., Takenaka, K., Ikeda, H., Houkin, K., Takagi, Y., Kikuta, K., et al. (2008). Autosomal dominant moyamoya disease maps to chromosome 17q25.3. *Neurology*, 70 (24 Pt 2): 2357-63. doi: 10.1212/01.wnl.0000291012.49986.f9.

78. Liu, W., Hashikata, H., Inoue, K., Matsuura, N., Mineharu, Y., Kobayashi, H., Kikuta, K.-i., Takagi, Y., Hitomi, T., Krischek, B., et al. (2010). A rare Asian founder polymorphism of Raptor may explain the high prevalence of Moyamoya disease among East Asians and its low prevalence among Caucasians. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 15 (2): 94-104. doi: 10.1007/s12199-009-0116-7.
79. Kamada, F., Aoki, Y., Narisawa, A., Abe, Y., Komatsuzaki, S., Kikuchi, A., Kanno, J., Niihori, T., Ono, M., Ishii, N., et al. (2011). A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*, 56 (1): 34-40. doi: 10.1038/jhg.2010.132.
80. Liu, W., Morito, D., Takashima, S., Mineharu, Y., Kobayashi, H., Hitomi, T., Hashikata, H., Matsuura, N., Yamazaki, S., Toyoda, A., et al. (2011). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*, 6 (7): e22542. doi: 10.1371/journal.pone.0022542.
81. Miyawaki, S., Imai, H., Takayanagi, S., Mukasa, A., Nakatomi, H. & Saito, N. (2012). Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*, 43 (12): 3371-4. doi: 10.1161/strokeaha.112.663864.
82. Jang, M. A., Chung, J. W., Yeon, J. Y., Kim, J. S., Hong, S. C., Bang, O. Y. & Ki, C. S. (2017). Frequency and significance of rare RNF213 variants in patients with adult moyamoya disease. *PLoS One*, 12 (6): e0179689. doi: 10.1371/journal.pone.0179689.
83. Zhang, Q., Liu, Y., Zhang, D., Wang, R., Zhang, Y., Wang, S., Yu, L., Lu, C., Liu, F., Zhou, J., et al. (2017). RNF213 as the major susceptibility gene for Chinese patients with moyamoya disease and its clinical relevance. *J Neurosurg*, 126 (4): 1106-1113. doi: 10.3171/2016.2.Jns152173.
84. Duan, L., Wei, L., Tian, Y., Zhang, Z., Hu, P., Wei, Q., Liu, S., Zhang, J., Wang, Y., Li, D., et al. (2018). Novel Susceptibility Loci for Moyamoya Disease Revealed by a Genome-Wide Association Study. *Stroke*, 49 (1): 11-18. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017430.
85. Miyatake, S., Miyake, N., Touho, H., Nishimura-Tadaki, A., Kondo, Y., Okada, I., Tsurusaki, Y., Doi, H., Sakai, H., Saitsu, H., et al. (2012). Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*, 78 (11): 803-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f.
86. Kim, E. H., Yum, M. S., Ra, Y. S., Park, J. B., Ahn, J. S., Kim, G. H., Goo, H. W., Ko, T. S. & Yoo, H. W. (2016). Importance of RNF213 polymorphism on clinical features and long-term outcome in moyamoya disease. *J Neurosurg*, 124 (5): 1221-7. doi: 10.3171/2015.4.Jns142900.
87. Ma, J., Liu, Y., Ma, L., Huang, S., Li, H. & You, C. (2013). RNF213 polymorphism and Moyamoya disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurol India*, 61 (1): 35-9. doi: 10.4103/0028-3886.107927.
88. Wang, Y., Mambiya, M., Li, Q., Yang, L., Jia, H., Han, Y. & Liu, W. (2018). RNF213 p.R4810K Polymorphism and the Risk of Moyamoya Disease, Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion, and Quasi-Moyamoya Disease: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 27 (8): 2259-2270. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.04.013.
89. Liu, W., Hitomi, T., Kobayashi, H., Harada, K. H. & Koizumi, A. (2012). Distribution of moyamoya disease susceptibility polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian populations. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 52 (5): 299-303.
90. Cecchi, A. C., Guo, D., Ren, Z., Flynn, K., Santos-Cortez, R. L., Leal, S. M., Wang, G. T., Regalado, E. S., Steinberg, G. K., Shendure, J., et al. (2014). RNF213 rare variants in an ethnically diverse population with Moyamoya disease. *Stroke*, 45 (11): 3200-7. doi: 10.1161/strokeaha.114.006244.
91. Shoemaker, L. D., Clark, M. J., Patwardhan, A., Chandratillake, G., Garcia, S., Chen, R., Morgan, A. A., Leng, N., Kirk, S., Chen, R., et al. (2016). Disease Variant Landscape of a Large Multiethnic Population of Moyamoya Patients by Exome Sequencing. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 6 (1): 41.

92. Liu, W., Senevirathna, S. T., Hitomi, T., Kobayashi, H., Roder, C., Herzig, R., Kraemer, M., Voormolen, M. H., Cahova, P., Krischek, B., et al. (2013). Genomewide association study identifies no major founder variant in Caucasian moyamoya disease. *J Genet*, 92 (3): 605-9.
93. Guo, D. C., Papke, C. L., Tran-Fadulu, V., Regalado, E. S., Avidan, N., Johnson, R. J., Kim, D. H., Pannu, H., Willing, M. C., Sparks, E., et al. (2009). Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet*, 84 (5): 617-27. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.04.007.
94. Roder, C., Peters, V., Kasuya, H., Nishizawa, T., Wakita, S., Berg, D., Schulte, C., Khan, N., Tatagiba, M. & Krischek, B. (2011). Analysis of ACTA2 in European Moyamoya disease patients. *Eur J Paediatr Neurol*, 15 (2): 117-22. doi: 10.1016/j.ejpn.2010.09.002.
95. Roder, C., Peters, V., Kasuya, H., Nishizawa, T., Takehara, Y., Berg, D., Schulte, C., Khan, N., Tatagiba, M. & Krischek, B. (2010). Polymorphisms in TGFB1 and PDGFRB are associated with Moyamoya disease in European patients. *Acta Neurochir (Wien)*, 152 (12): 2153-60. doi: 10.1007/s00701-010-0711-9.
96. Herve, D., Philippi, A., Belbouab, R., Zerah, M., Chabrier, S., Collardeau-Frachon, S., Bergametti, F., Essongue, A., Berrou, E., Krivosic, V., et al. (2014). Loss of alpha1beta1 soluble guanylate cyclase, the major nitric oxide receptor, leads to moyamoya and achalasia. *Am J Hum Genet*, 94 (3): 385-94. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.01.018.
97. Wallace, S., Guo, D. C., Regalado, E., Mellor-Crummey, L., Bamshad, M., Nickerson, D. A., Dauser, R., Hanchard, N., Marom, R., Martin, E., et al. (2016). Disrupted nitric oxide signaling due to GUCY1A3 mutations increases risk for moyamoya disease, achalasia and hypertension. *Clin Genet*, 90 (4): 351-60. doi: 10.1111/cge.12739.
98. Kobayashi, H., Brozman, M., Kyselova, K., Vizslayova, D., Morimoto, T., Roubec, M., Skoloudik, D., Petrovicova, A., Juskanic, D., Strauss, J., et al. (2016). RNF213 Rare Variants in Slovakian and Czech Moyamoya Disease Patients. *PLoS One*, 11 (10): e0164759. doi: 10.1371/journal.pone.0164759.
99. Raso, A., Biassoni, R., Mascelli, S., Nozza, P., Ugolotti, E., E, D. I. M., P, D. E. M., Merello, E., Cama, A., Pavanello, M., et al. (2016). Moyamoya vasculopathy shows a genetic mutational gradient decreasing from East to West. *J Neurosurg Sci*.
100. Guey, S., Kraemer, M., Herve, D., Ludwig, T., Kossorotoff, M., Bergametti, F., Schwitalla, J. C., Choi, S., Broseus, L., Callebaut, I., et al. (2017). Rare RNF213 variants in the C-terminal region encompassing the RING-finger domain are associated with moyamoya angiopathy in Caucasians. *Eur J Hum Genet*, 25 (8): 995-1003. doi: 10.1038/ejhg.2017.92.
101. Wakai, K., Tamakoshi, A., Ikezaki, K., Fukui, M., Kawamura, T., Aoki, R., Kojima, M., Lin, Y. & Ohno, Y. (1997). Epidemiological features of Moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide survey. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 99: S1-S5. doi: [https://doi.org/10.1016/S0303-8467\(97\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0303-8467(97)00031-0).
102. Wan, M., Han, C., Xian, P., Yang, W. Z., Li, D. S. & Duan, L. (2015). Moyamoya disease presenting with subarachnoid hemorrhage: Clinical features and neuroimaging of a case series. *Br J Neurosurg*, 29 (6): 804-10. doi: 10.3109/02688697.2015.1071327.
103. Jang, D. K., Lee, K. S., Rha, H. K., Huh, P. W., Yang, J. H., Park, I. S., Ahn, J. G., Sung, J. H. & Han, Y. M. (2014). Clinical and angiographic features and stroke types in adult moyamoya disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 35 (6): 1124-31. doi: 10.3174/ajnr.A3819.
104. Kainth, D., Chaudhry, S. A., Kainth, H., Suri, F. K. & Qureshi, A. I. (2013). Epidemiological and clinical features of moyamoya disease in the USA. *Neuroepidemiology*, 40 (4): 282-7. doi: 10.1159/000345957.
105. Liu, X. J., Zhang, D., Wang, S., Zhao, Y. L., Teo, M., Wang, R., Cao, Y., Ye, X., Kang, S. & Zhao, J. Z. (2015). Clinical features and long-term outcomes of moyamoya disease: a single-center experience with 528 cases in China. *J Neurosurg*, 122 (2): 392-9. doi: 10.3171/2014.10.Jns132369.

106. Zhang, Q., Zhang, D., Wang, R., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, S. & Zhao, J. (2016). Clinical and Angiographic Features of Patients with Moyamoya Disease and the p.R4810K Heterozygous Variant. *World Neurosurg*, 90: 530-538.e3. doi: 10.1016/j.wneu.2015.12.093.
107. Klasen, H., Britton, J. & Newman, M. (1999). Moyamoya disease in a 12-year-old Caucasian boy presenting with acute transient psychosis. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 8 (2): 149-53.
108. Lubman, D. I., Pantelis, C., Desmond, P., Proffitt, T. M. & Velakoulis, D. (2003). Moyamoya disease in a patient with schizophrenia. *J Int Neuropsychol Soc*, 9 (5): 806-10. doi: 10.1017/s1355617703950132.
109. Behere, R. V., John, M., Sureshkumar, R., Varambally, S., Rao, N. P., Venkatasubramanian, G. & Gangadhar, B. (2012). Mood disorder in association with moyamoya disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 66 (2): 163-164. doi: 10.1111/j.1440-1819.2011.02317.x.
110. Huang, Z., Ding, X., Men, W., Zhang, D., Zhao, Y., Wang, R., Wang, S. & Zhao, J. (2015). Clinical features and outcomes in 154 patients with haemorrhagic moyamoya disease: comparison of conservative treatment and surgical revascularization. *Neurol Res*, 37 (10): 886-92. doi: 10.1179/1743132815y.0000000073.
111. Kraemer, M., Huynh, Q. B., Wiecek, D., Balliu, B., Mikat, B. & Boehringer, S. (2018). Distinctive facial features in idiopathic Moyamoya disease in Caucasians: a first systematic analysis. *PeerJ*, 6: e4740. doi: 10.7717/peerj.4740.
112. Life Technologies Corporation. (2010). *Qubit® 2.0 Fluorometer User Manual*. Online. Tilgjengelig fra: http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf (lest 03.12.2018).
113. Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). *Qubit® dsDNA HS Assay Kits*. Online. Tilgjengelig fra: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf&title=User%20Guide:%20Qubit%20dsDNA%20HS%20Assay%20Kits (lest 03.12.2018).
114. Thermo Fisher Scientific Inc. (2017). *QUICK REFERENCE Qubit™ Assays*. Online. Tilgjengelig fra: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017210_Qubit_4_Assays_QR.pdf (lest 03.12.2018).
115. Agilent Technologies. (2015). *Agilent 2200 TapeStation System User Manual*. Online. Tilgjengelig fra: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2964-90000_TapeStation_USR_ENU.pdf (lest 03.12.2018).
116. Agilent Technologies. (2018). *TapeStation Automated Electrophoresis*. Online. Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/en/product/tapestation-automated-electrophoresis> (lest 03.12.2018).
117. Agilent Technologies. (2015). *Agilent D1000 ScreenTape System Quick Guide*. Online. Tilgjengelig fra: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/ScreenTape_D1000_QG.pdf (lest 03.12.2018).
118. BeckmanCoulter, I. (2016). *Agencourt AMPure XP Information For Use Guide PCR Purification*. Online. Tilgjengelig fra: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419> (lest 18.03.2019).
119. Technologies, A. (2017). *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Protocol*. Online. Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G7530-90000.pdf> (lest 03.12.2018).
120. COVARIS, I. (2018). *Covaris® Technology How It Works*. Online. Tilgjengelig fra: <https://covaris.com/pre-analytical/how-it-works/> (lest 03.12.2018).
121. Illumina. (2008). *Preparing Samples for Multiplexed Paired-End Sequencing*. Online. Tilgjengelig fra: https://medicine.yale.edu/keck/ycga/sequencing/Illumina/10_21600_284_12501_v1.pdf (lest 03.12.2018).

122. Thermo Fisher Scientific Inc. (2018). *Dynabeads streptavidin products for manual and automated protocols*. Online. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Fdynabeads-streptavidin-manual-automated-brochure.pdf&title=QnJvY2h1cmU6IER5bmFiZWFKcyBzdHJlcHRhdmlkaW4gcHJvZHVidHMgZm9yIG1hbnVhbCBhbmQgYXV0b21hdGVkIHByb3RvY29scw==> (lest 01.04.2019).
123. Li, H. & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26 (5): 589-95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698.
124. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, 20 (9): 1297-303. doi: 10.1101/gr.107524.110.
125. Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., et al. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 43: 11.10.1-33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43.
126. Broad Institute of MIT and Harvard. (2019). *Picard*. Online. Tilgjengelig fra: <http://broadinstitute.github.io/picard/> (lest 15.04.2019).
127. Hakonarson, H., Li, M. & Wang, K. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38 (16): e164-e164. doi: 10.1093/nar/gkq603.
128. Vigeland, M. D., Gjøtterud, K. S. & Selmer, K. K. (2016). FILTUS: a desktop GUI for fast and efficient detection of disease-causing variants, including a novel autozygosity detector. *Bioinformatics*, 32 (10): 1592-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btw046.
129. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., et al. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv*: 531210. doi: 10.1101/531210.
130. Scott, E. M., Halees, A., Itan, Y., Spencer, E. G., He, Y., Azab, M. A., Gabriel, S. B., Belkadi, A., Boisson, B., Abel, L., et al. (2016). Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. *Nat Genet*, 48 (9): 1071-6. doi: 10.1038/ng.3592.
131. QIAGEN. (2018). *Angiogenesis gene list*. Online. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/it/resources/resourcedetail?id=5cfae487-3a26-4ead-aaf9-92742a173c36&lang=en> (lest 13.03.2019).
132. Guey, S., Grangeon, L., Brunelle, F., Bergametti, F., Amiel, J., Lyonnet, S., Delaforge, A., Arnould, M., Desnoux, B., Bellesme, C., et al. (2017). De novo mutations in CBL causing early-onset paediatric moyamoya angiopathy. *J Med Genet*, 54 (8): 550-557. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104432.
133. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., et al. (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: 405. doi: 10.1038/gim.2015.30
<https://www.nature.com/articles/gim201530#supplementary-information>.
134. Wu, J. & Jiang, R. (2013). Prediction of Deleterious Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphism for Human Diseases. *The Scientific World Journal*, 2013: 10. doi: 10.1155/2013/675851.
135. Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M. & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, 46 (3): 310-5. doi: 10.1038/ng.2892.

136. Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J. & Kircher, M. (2019). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*, 47 (D1): D886-d894. doi: 10.1093/nar/gky1016.
137. Alonso, J., Canes, L., Garcia-Redondo, A. B., de Frutos, P. G., Rodriguez, C. & Martinez-Gonzalez, J. (2018). The nuclear receptor NOR-1 modulates redox homeostasis in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 122: 23-33. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.08.002.
138. Rodriguez-Calvo, R., Guadall, A., Calvayrac, O., Navarro, M. A., Alonso, J., Ferran, B., de Diego, A., Muniesa, P., Osada, J., Rodriguez, C., et al. (2013). Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet*, 22 (10): 1949-59. doi: 10.1093/hmg/ddt042.
139. Sewduth, R. N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., et al. (2014). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat Commun*, 5: 4832. doi: 10.1038/ncomms5832.
140. Sewduth, R. N., Kovacic, H., Jaspard-Vinassa, B., Jecko, V., Wavasseur, T., Fritsch, N., Pernot, M., Jeaningros, S., Roux, E., Dufourcq, P., et al. (2017). PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKCzeta-containing polarity complex to increase vascular permeability. *Sci Signal*, 10 (464). doi: 10.1126/scisignal.aag3209.
141. Sarma, V., Wolf, F. W., Marks, R. M., Shows, T. B. & Dixit, V. M. (1992). Cloning of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro. *J Immunol*, 148 (10): 3302-12.
142. Jia, L., Shi, Y., Wen, Y., Li, W., Feng, J. & Chen, C. (2018). The roles of TNFAIP2 in cancers and infectious diseases. *J Cell Mol Med*, 22 (11): 5188-5195. doi: 10.1111/jcmm.13822.
143. Hu, X. L., Li, M. P., Song, P. Y., Tang, J. & Chen, X. P. (2017). AGXT2: An unnegligible aminotransferase in cardiovascular and urinary systems. *J Mol Cell Cardiol*, 113: 33-38. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.09.010.
144. Amir, M., Hassanein, S. I., Abdel Rahman, M. F. & Gad, M. Z. (2018). AGXT2 and DDAH-1 genetic variants are highly correlated with serum ADMA and SDMA levels and with incidence of coronary artery disease in Egyptians. *Mol Biol Rep*, 45 (6): 2411-2419. doi: 10.1007/s11033-018-4407-1.
145. Bolling, M. C. & Jonkman, M. F. (2019). KLHL24: Beyond Skin Fragility. *J Invest Dermatol*, 139 (1): 22-24. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.010.
146. Sehorn, M. G., Sigurdsson, S., Bussen, W., Unger, V. M. & Sung, P. (2004). Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature*, 429 (6990): 433-7. doi: 10.1038/nature02563.
147. Hobson, J. P., Netzel-Arnett, S., Szabo, R., Rehault, S. M., Church, F. C., Strickland, D. K., Lawrence, D. A., Antalis, T. M. & Bugge, T. H. (2004). Mouse DESC1 is located within a cluster of seven DESC1-like genes and encodes a type II transmembrane serine protease that forms serpin inhibitory complexes. *J Biol Chem*, 279 (45): 46981-94. doi: 10.1074/jbc.M403299200.
148. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L. & Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (5): 2604-9. doi: 10.1073/pnas.041359198.
149. Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G. & Luo, J. (2012). Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res*, 95 (1): 7-18. doi: 10.1093/cvr/cvs143.
150. Plow, E. F., Meller, J. & Byzova, T. V. (2014). Integrin function in vascular biology: a view from 2013. *Curr Opin Hematol*, 21 (3): 241-7. doi: 10.1097/moh.0000000000000042.
151. Somanath, P. R., Malinin, N. L. & Byzova, T. V. (2009). Cooperation between integrin alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*, 12 (2): 177-85. doi: 10.1007/s10456-009-9141-9.

152. Yu, P., Wilhelm, K., Dubrac, A., Tung, J. K., Alves, T. C., Fang, J. S., Xie, Y., Zhu, J., Chen, Z., De Smet, F., et al. (2017). FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature*, 545 (7653): 224-228. doi: 10.1038/nature22322.
153. Liu, X., Jing, X., Cheng, X., Ma, D., Jin, Z., Yang, W. & Qiu, W. (2016). FGFR3 promotes angiogenesis-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma via facilitating MCP-1-mediated vascular formation. *Med Oncol*, 33 (5): 46. doi: 10.1007/s12032-016-0761-9.
154. Garcia-Palmero, I. & Villalobo, A. (2013). Deletion of the calmodulin-binding domain of Grb7 impairs cell attachment to the extracellular matrix and migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 436 (2): 271-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.092.
155. Han, D. C. & Guan, J. L. (1999). Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*, 274 (34): 24425-30.
156. Savolainen, M., Mustanoja, S., Pekkola, J., Tyni, T., Uusitalo, A. M., Ruotsalainen, S., Poutiainen, E., Hernesniemi, J., Kivipelto, L. & Tatlisumak, T. (2018). Moyamoya angiopathy: long-term follow-up study in a Finnish population. *J Neurol*. doi: 10.1007/s00415-018-9154-7.
157. Clark, M. J., Chen, R., Lam, H. Y., Karczewski, K. J., Chen, R., Euskirchen, G., Butte, A. J. & Snyder, M. (2011). Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. *Nat Biotechnol*, 29 (10): 908-14. doi: 10.1038/nbt.1975.
158. Nanba, R., Kuroda, S., Tada, M., Ishikawa, T., Houkin, K. & Iwasaki, Y. (2006). Clinical features of familial moyamoya disease. *Childs Nerv Syst*, 22 (3): 258-62. doi: 10.1007/s00381-005-1230-5.
159. Corradin, O. & Scacheri, P. C. (2014). Enhancer variants: evaluating functions in common disease. *Genome medicine*, 6 (10): 85-85. doi: 10.1186/s13073-014-0085-3.
160. Vaz-Drago, R., Custodio, N. & Carmo-Fonseca, M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*, 136 (9): 1093-1111. doi: 10.1007/s00439-017-1809-4.
161. Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*, 12 (10): 683-91. doi: 10.1038/nrg3051.
162. Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J. F., Hebuerne, X., et al. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*, 43 (3): 242-5. doi: 10.1038/ng.762.
163. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., et al. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536: 285. doi: 10.1038/nature19057
<https://www.nature.com/articles/nature19057#supplementary-information>.
164. Ruegg, C. & Mariotti, A. (2003). Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 60 (6): 1135-57. doi: 10.1007/s00018-003-2297-3.
165. Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. C., Lorgis, L., Cottin, Y. & Vergely, C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 140 (3): 239-57. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.07.004.
166. Noda, A., Suzuki, Y., Takayasu, M., Watanabe, K., Takagi, T., Hara, M. & Yoshida, J. (2000). Elevation of nitric oxide metabolites in the cerebrospinal fluid of patients with moyamoya disease. *Acta Neurochir (Wien)*, 142 (11): 1275-9; discussion 1279-80.

Appendiks

Appendiks 1 – Case report form (CRF)

MOYAMOYA – skjema for pasientinformasjon

Dato: _____

DEL 1 – fylles ut med prosjektmedarbeider

Pasientnummer: _____

1.1 Generelt

Kjønn

Mann ☐ / Kvinne ☐

Etnisitet

Skandinavisk ☐

Europeisk (Annen) ☐

Amerikansk ☐

Afrikansk ☐

Asiatisk ☐

Latinamerikansk ☐

Annen ☐ Beskriv: _____

Familieforhold

Har andre i biologisk familie sykdommen? ja ☐ / nei ☐

Hvem: _____

Familietre



Har du barn? – ja ☐ / nei ☐

Hvor mange barn: _____

Alder ved første barn: _____

Svangerskapskomplikasjoner – ja ☐ / nei ☐

Hvis ja, beskriv: _____

Fødselskomplikasjoner – ja ☐ / nei ☐

Hvis ja, beskriv: _____

Antall søsken: _____

ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: _____

I hvilken alder:

Behandling: _____

I hvilken alder: _____

Symptomer: _____

Behandling:

I hvilken alder:

Symptomer: _____

Behandling: _____

I hvilken alder: _____

Symptomer:

Behandling:

--

Sivilstatus

Gift ☐ / samboer ☐ / enslig ☐ / skilt ☐ / enke/enkemann ☐

ja / nei

Stillingsprosentprosent (0-100%): _____

ja ☐ / nei ☐

En enhet fysisk aktivitet: 30 min rask gåing / løping / ski / svømming / sykling:

Hvor mange enheter fysisk aktivitet per uke – 0 ☐ / 1-3 ☐ / 4-7 ☐ / 8-12 ☐ / >12 ☐

En enhet alkohol: En flaske/et glass med: 33 cl pils på 4,5 vol % / 12,5 cl vin på 12 vol % / 4 cl brennevin på 40 vol %

Hvor mange enheter i uken – Aldri ☐ / <3 ☐ / 3-9 ☐ / 10-14 ☐ / 14-21 ☐ / >21 ☐

ja / nei

Hvor mange sigaretter per dag: _____

Hvor mange år: _____

ja / nei

Nikotinholdig: ja ☐ / nei ☐

Hvor mange sigaretter per dag: _____

Snus

ja ☐ / nei ☐

Hvor mange bokser i uken: _____

1.3 Symptomer

Sykdomsdebut

Nåværende alder

Alder ved symptomstart

 / usikker ☐

Alder ved diagnose

Første symptom

Hjerneslag

☐

Annet

☐ Beskriv: _____

Hjerneslag

ja ☐ / nei ☐ / dato for første hjerneslag: _____

Symptomer ved første hjerneslag

Svakhet (i arm eller ben)

☐

Nummenhet / nedsatt følelse

☐

Synsforstyrrelser

☐

Ufrivillige bevegelser

☐

Utydelig tale

☐

Svimmelhet

☐

Ustøhet

☐

Andre

☐ Beskriv: _____

Gjentatte hjerneslag

ja / nei ☐ / hvor mange: _____

Hjerneslag nummer

2.

3.

4.

5.

6.

7.

Dato for hjerneslag

Symptomer ved gjentatte hjerneslag:

Svakhet (i arm eller ben)

☐☐☐☐☐☐

Nummenhet / nedsatt følelse

☐☐☐☐☐☐

Synsforstyrrelser

☐☐☐☐☐☐

Ufrivillige bevegelser

☐☐☐☐☐☐

Utydelig tale

☐☐☐☐☐☐

Svimmelhet

☐☐☐☐☐☐

Ustøhet

☐☐☐☐☐☐

Andre

☐☐☐☐☐☐

Beskriv: _____

Kroniske symptomer

Hodepine

ja ☐ / nei ☐

Ensidig

☐

Forutgående symptomer

☐

Beskriv: _____

Varighet: _____

Andre symptomer i forbindelse med hodepine: _____

Medisin mot hodepine: _____

Epilepsi	<input type="checkbox"/>
Generell utmattelse	<input type="checkbox"/>
Konsentrasjonsvansker	<input type="checkbox"/>
Språkvansker	<input type="checkbox"/>
Redusert hukommelse	<input type="checkbox"/>
Svimmelhet	<input type="checkbox"/>
Synsproblemer/synsforstyrrelser	<input type="checkbox"/>
Andre	<input type="checkbox"/>

Beskriv andre symptomer:

Andre sykdommer

Har du andre sykdommer – ja ☐ / nei ☐

Tar du p-piller? – ja ☐ / nei ☐

Andre medikamenter – ja ☐ / nei ☐

DEL 2 – fylles ut med lege

Generell sykdomshistorie

Blodtrykk: _____ / vet ikke ☐

Var graviditeten med pasienten normal? ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Var pasienten født ved termin? ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Eventuelt, utfyllende informasjon: _____

Har pasienten hatt spontanabort – ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: _____

Psykiske lidelser

Depresjon ja ☐ / nei ☐

Bipolar lidelse ja ☐ / nei ☐

Schizofreni ja ☐ / nei ☐

Angst ja ☐ / nei ☐

Har pasienten/har pasienten hatt?

Høyt blodtrykk ja ☐ / nei ☐

Hjerteinfarkt ja ☐ / nei ☐

Sukkersyke ja ☐ / nei ☐

Høyt kolesterol ja ☐ / nei ☐

Annen hjertesykdom ja ☐ / nei ☐ Beskriv: _____

Andre sykdommer ja ☐ / nei ☐ Beskriv: _____

Diagnose og bildediagnostikk

Cerebral angiografi: ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

MR / MRA: ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

Perfusjons MR: ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

Perfusjons undersøkelse +/- diamox: ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

CT / CTA: ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

Ultralyd / Special transcranial Doppler ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

Beskriv: _____

Histologiske rapporter ja ☐ / nei ☐ / hvor mange: ____ / dato: _____

Beskriv: _____

Symptom ved start – Hjerneinfarkt ☐ / Hjerneblødning ☐ / Annet ☐ Beskriv: _____

Dato for diagnose: _____

«Suzuki-stage» (I-VI, se vedlegg) ved diagnose: _____

Stenose

Distal ICA ☐ / proximal MCA ☐ / ACA ☐

Bilateral ☐ / Unilateral ☐

Stenose i bakre kretsløp – ja ☐ / nei ☐

– Grad ☐

Lokalisasjon: _____

Grad av innsnevring (<50=1, 50-90=2, >90=3)

Høyre – ICA ☐ / ACA ☐ / MCA ☐

Venstre – ICA ☐ / ACA ☐ / MCA ☐

Blødning – ja ☐ / nei ☐

Lokalisasjon – høgre ☐ / venstre ☐

– ventrikkelsystem ☐ / dypt parenkym ☐

Alternativ blodtilførsel / Kollateraler:

Posterior sirkulerende kompensasjon ☐

Dyp ☐ / overfladisk ☐ / pcom ☐

Transdurale kollateraler ☐

Aneurisme tilstede – ja ☐ / nei ☐

Sakkulært aneurisme ☐ / Fusiformt aneurisme ☐ / Mikroaneurisme ☐

Iskemiske lesjoner – ja ☐ / nei ☐

Beliggenhet – høyre ☐ / venstre ☐ /

Watershed ja ☐ / nei ☐

Andre cerebrovaskulære anomalier – ja ☐ / nei ☐

Beskriv: _____

Er disse sykdommene utelukket?

Downs syndrom ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Sigdecelleanemi ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Autoimmun sykdom ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Hjernehinnebetennelse ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Hjernerkeft ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Annen kjent hjerte/kar-sykdom ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Neurofibromatose type 1 ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Medfødt hjertesykdom ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Fibromuskulær dysplasi ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Aktivert protein C-resistens ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Hodeskade ja ☐ / nei ☐ / vet ikke ☐

Nivå i blodet av:

Homocystein: _____

Hemoglobin: _____

Anticardiolipin: _____

C-reaktivt protein: _____

Transforming growth factor beta (TGF- β): _____

Behandling

Medisinsk – ja ☐ / nei ☐

Antiplatelet (blodplatehemmende) – ja ☐ / nei ☐

Beskriv: _____

Antikoagulasjon – ja ☐ / nei ☐

Beskriv: _____

Kirurgisk – ja ☐ / nei ☐ / dato: _____

Direkte bypass (hudarterien sys direkte inn på en hjernearterie) – ja ☐ / nei ☐

Høyre side ☐ – Venstre side ☐ – Begge sider ☐

Indirekte bypass (arterien legges på hjerneoverflate) – ja ☐ / nei ☐
Høgre side ☐ – Venstre side ☐ – Begge sider ☐

Modifisert Rankinskala (0-6, se vedlegg)

Preoperativt	<input type="checkbox"/>
Postoperativt	<input type="checkbox"/>
Ved oppfølging	<input type="checkbox"/>

Vedlegg

Modifisert Rankingskala

- 0 – Ingen symptomer.
- 1 – Ingen signifikant funksjonshemning. Personen er i stand til å utføre alle vanlige aktiviteter trass i symptomene.
- 2 – Lett funksjonshemning. Personen er i stand til å ivareta egen livsførsel uten assistanse, men er ikke i stand til utføre alle aktiviteter som før sykdomsdebut.
- 3 – Moderat funksjonshemning. Personen behøver noe hjelp, men kan gå uten assistanse.
- 4 – Moderat alvorlig funksjonshemning. Personen er ute av stand til å ivareta kroppslige behov uten assistanse, og ute av stand til å gå uten assistanse.
- 5 – Alvorlig funksjonshemning. Krever konstant pleie, sengebundet, inkontinent.
- 6 – Død.

Suzuki stages

- stage I – "narrowing of the carotid fork"
 - narrowed ICA bifurcation
- stage II – "initiation of the moyamoya"
 - dilated ACA, MCA and narrowed ICA bifurcation with moyamoya change
- stage III – "intensification of the moyamoya"
 - further increase in moyamoya change of the ICA bifurcation and narrowed ACA and MCA
- stage IV – "minimization of the moyamoya"
 - moyamoya change reducing with occlusive changes in ICA and tenuous ACA and MCA
- stage V – "reduction of the moyamoya"
 - further decrease in moyamoya change with occlusion of ICA, ACA and MCA
- stage VI – "disappearance of the moyamoya"
 - ICA essentially disappeared with supply of brain from ECA

Appendiks 2 – Kandidatgenliste frå litteratur

Kaukasiske kandidatgen

RNF213
GUCY1A3
ACTA2
PDGFRB
TGFB1
ZXDC
OBSCN
CBL

Asiatiske kandidatgen

MTHFR
PLOD1
TSC22D2
HDAC9
JAZF1
TIEG
FADS1/FADS2
SBF2
LRP1
NF1
RPTOR
CARD14
RNF213
TIMP2
CTAGE1
SPTLC3
HORMAD2
TCN2

Appendiks 3 – Kandidatgen frå angiogeneseliste frå Qiagen

<i>A2M</i>	<i>FGF7</i>	<i>PGF</i>	<i>EDG6</i>
<i>ADORA2B</i>	<i>FGFR1</i>	<i>PGGT1B</i>	<i>EDF1</i>
<i>AGT</i>	<i>FGFR3</i>	<i>SERPINB5</i>	<i>NRP2</i>
<i>AGTR2</i>	<i>FGFR4</i>	<i>PLAU</i>	<i>NRP1</i>
<i>ANG</i>	<i>FIGF</i>	<i>PLAUR</i>	<i>ANGPTL1</i>
<i>ANGPT1</i>	<i>FLT1</i>	<i>MAPK7</i>	<i>SCYE1</i>
<i>ANGPT2</i>	<i>FLT4</i>	<i>PTAFR</i>	<i>EDG5</i>
<i>BMX</i>	<i>FN1</i>	<i>PTGS1</i>	<i>LIPG</i>
<i>BRAF</i>	<i>FNTA</i>	<i>PTGS2</i>	<i>ADAMTS1</i>
<i>CAV1</i>	<i>FNTB</i>	<i>PTN</i>	<i>ARHGEF17</i>
<i>CAV2</i>	<i>GATA2</i>	<i>SELE</i>	<i>TNFSF15</i>
<i>CD36</i>	<i>GPR30</i>	<i>SELP</i>	<i>EDIL3</i>
<i>CD151</i>	<i>HGF</i>	<i>SPARC</i>	<i>ESM1ADAMTS8</i>
<i>CDH5</i>	<i>HIF1A</i>	<i>SPP1</i>	<i>ANGPTL2</i>
<i>CHGA</i>	<i>TNC</i>	<i>TEK</i>	<i>RASD2</i>
<i>COL8A1</i>	<i>ID1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>GPR124</i>
<i>COL8A2</i>	<i>ID3</i>	<i>TGFB2</i>	<i>ANGPTL3</i>
<i>CTGF</i>	<i>IL8</i>	<i>TGFB3</i>	<i>REM1</i>
<i>CTSB</i>	<i>ITGAV</i>	<i>THBS1</i>	<i>ANGPTL4</i>
<i>ECGF1</i>	<i>ITGB3</i>	<i>THBS2</i>	<i>ANGPT4</i>
<i>EDG1</i>	<i>KDR</i>	<i>THBS3</i>	<i>EDG8</i>
<i>EDG3</i>	<i>MCAM</i>	<i>THBS4</i>	<i>ZNF444</i>
<i>EDN1</i>	<i>DNAJB9</i>	<i>TIE1</i>	<i>CD248</i>
<i>EFNB2</i>	<i>MDK</i>	<i>TIMP1</i>	<i>PLXDC1</i>
<i>EGF</i>	<i>MMP2</i>	<i>TIMP2</i>	<i>ZNF71</i>
<i>EGFR</i>	<i>MMP3</i>	<i>TIMP3</i>	<i>JAM2</i>
<i>EGR1</i>	<i>MMP9</i>	<i>TIMP4</i>	<i>TNS3</i>
<i>ENG</i>	<i>NOS3</i>	<i>TNFAIP1</i>	<i>ANGPTL6</i>
<i>EPAS1</i>	<i>NRAS</i>	<i>TNNI3</i>	<i>ANTXR1</i>
<i>EPHB4</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>TNNT2</i>	<i>PROK1</i>
<i>EPO</i>	<i>SERPINB2</i>	<i>VCAM1</i>	<i>PLXDC2</i>
<i>ERBB2</i>	<i>PDGFB</i>	<i>VEGFA</i>	<i>ESAM</i>
<i>ETS1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>VEGFB</i>	<i>SCARF2</i>
<i>FGF1</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>VEGFC</i>	<i>DCBLD2</i>
<i>FGF2</i>	<i>PECAM1</i>	<i>SPARCL1</i>	<i>ANGPTL5</i>
<i>FGF4</i>	<i>SERPINF1</i>	<i>SCARF1</i>	<i>OR5AT1</i>
<i>FGF6</i>	<i>PF4</i>	<i>PPAP2B</i>	



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway