



# Mislestursstökkbreyting í SMAD3 hefur fylgni við ættlægan ósæðargúlp í brjóstholi á Íslandi

Áslaug Dís Bergsdóttir

Ritgerð til B.S. gráðu  
Háskóli Íslands  
Læknadeild  
Heilbrigðisvísindasvið



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Ritgerð þessi er til B.S. gráðu í læknisfræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi rétthafa.

© Áslaug Dís Bergsdóttir 2016

# Mislestursstökkbreyting í SMAD3 hefur fylgni við ættlægan ósæðargúlp í brjóstholi á Íslandi

Áslaug Dís Bergsdóttir<sup>1</sup>, Sólveig Grétarsdóttir<sup>2</sup>, Hilma Hólm<sup>2,3</sup>, Arnar Geirsson<sup>3</sup>, Stefán Matthíasson<sup>4</sup>, Kári Stefánsson<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Læknadeild Háskóla Íslands, <sup>2</sup>Íslensk erfðagreining, <sup>3</sup>Landspítali háskólasjúkrahús, <sup>4</sup>SEM lækningar.

**Inngangur:** Ósæðargúlpur í brjóstholi getur haft lífshættulegar afleiðingar á borð við bráða ósæðarfylsjun. Ósæðargúlpar fylgja oft bandvefssjúkdómum eins og Marfans og Loeyes-Dietz heilkennum. Talið er að í um 20% tilfella sé ósæðargúlpur í brjóstholi ættlægur, og erfist þá oftast ókynbundið ríkjandi (*autosomal dominant*). Ýmis gen hafa verið tengd við sjúkdóminn í genarannsóknnum víðsvegar um heim. Markmið þessarar rannsóknar var að finna erfðabreytileika sem tengjast ósæðargúlpi í brjóstholi á Íslandi.

**Efniviður og aðferðir:** Íslensk erfðagreining hefur raðgreint allt erfðamengi (*whole genome sequencing*) 15.220 Íslendinga og arfgerðargreint um 150.000 Íslendinga með DNA-flögum (*chip-typed*). Auk þeirra samanstóð rannsóknarþýðið af fyrstu og annarrar gráðu ættingjum arfgerðargreindra, samtals um 300.000 manns. Á tímabilinu 1980-2014 fengu 415 einstaklingar útskriftargreininguna ósæðargúlpur í brjóstholi á LSH. Við bárum arfgerðarupplýsingar þeirra saman við 288.902 einstaklinga án sjúkdómsins. Fylgni var könnuð með tvíkosta aðhvarfsgreiningu og voru marktektarmörk ákveðin með tilliti til alvarleika erfðabreytileikanna. Sanger raðgreining var framkvæmd til að staðfesta arfbera, og skyldleiki arfbera rekinn með upplýsingum úr Íslendingabók. Svipgerðarupplýsingum um arfbera og viðmið úr sömu fjölskyldu var safnað úr Sögukerfi LSH og úr gagnagrunnum sem Arnar Geirsson, Inga Hlíf Melvinsdóttir og Tómas Guðbjartsson höfðu safnað fyrir rannsókn sína á ósæðarfylsjun af gerð A á Íslandi. Þá hefur þátttakendum verið boðið í skoðun og hjartaómun.

**Niðurstöður:** Ein stökkbreyting var með marktæka fylgni við ósæðargúlp í brjóstholi, með gagnlíkindahlutfallið (*odds ratio*, OR) 95,88 og *P*-gildið  $1,6 \times 10^{-9}$  (marktektarmörk voru  $P = 5,1 \times 10^{-8}$ ). Stökkbreytingin er mislestursstökkbreyting í *SMAD3* geninu, p.Tyr226Ser, sem veldur því að amínósýran serín kemur í stað týrósíns í stöðu 226 í *SMAD3* próteininu (NP\_005893.1). Stökkbreytingum í *SMAD3* hefur áður verið lýst í tengslum við ósæðargúlp í brjóstholi, bæði sem hluta af Loeyes-Dietz heilkenni, en einnig sem stökum sjúkdómi. Okkur er ekki kunnugt um að þessi tiltekna stökkbreyting hafi áður verið tengd ósæðargúlpi. *SMAD3* stökkbreytingin var staðfest í 11 arfberum sem reyndust allir koma úr sömu fjölskyldunni. Í þessari fjölskyldu eru 7 einstaklingar sem greindust með ósæðargúlp í brjóstholi á aldrinum 27-64 ára, og eru 4 þeirra staðfestir arfberar en hinir 3 hafa ekki verið arfgerðargreindir. Takmarkaðar upplýsingar um svipgerð arfbera benda ekki til þess að stökkbreytingin valdi bandvefssjúkdómi.

**Ályktanir:** Mislestursstökkbreytingin p.Tyr226Ser í *SMAD3* hefur sterka fylgni við ættlægan ósæðargúlp í brjóstholi á Íslandi. Stökkbreytingum í *SMAD3* hefur áður verið lýst í tengslum við ósæðargúlp í brjóstholi og týrósín í stöðu 226 er vel varðveitt þróunarfræðilega séð. Því teljum við líklegt að þessi stökkbreyting sé að valda ósæðargúlpi í þessari fjölskyldu. Nánari skoðun er þörf til að meta hvort þessi stökkbreyting valdi útbreiddari bandvefssjúkdómi.

## **Þakkir**

Ég vil þakka Hilmu Hólm, leiðbeinanda mínum, fyrir ómetanlega leiðsögn og aðstoð við verkefnið. Ég vil þakka henni og Sólveigu Grétarsdóttur, meðleiðbeinanda mínum, sérstaklega fyrir að vera alltaf reiðubúnað að svara öllum mínum spurningum af innsæi og þolinmæði, og fyrir að hafa veitt mér stuðning þegar á þurfti að halda. Arnari Geirssyni, meðleiðbeinanda mínum, vil ég þakka fyrir að veita mér aðgang að gagnagrunnum hans og fyrir að hafa leiðbeint mér við úrvinnslu þeirra og frekari söfnun svipgerðarupplýsinga. Stefáni Matthíassyni vil ég þakka fyrir samstarfið og fyrir að veita okkur aðgang að hans gögnum. Hilmu, Sólveigu og Arnari vil ég að lokum öllum þakka fyrir yfirlestur ritgerðarinnar og ráðgjöf, og fyrir þeirra framlag til verkefnisins.

# Efnisyfirlit

Myndaskrá .....	1
Töfluskrá .....	1
Listi yfir skammstafanir .....	2
1 Inngangur .....	3
1.1 Ósæðin: eðlileg virkni og þvermál .....	3
1.2 Ósæðargúlpur og ósæðarflysjun í brjóstholi .....	4
1.2.1 Meinmyndun .....	5
1.2.2 Erfðafræði ósæðargúlps .....	5
1.3 Bandvefssjúkdómar tengdir ósæðargúlpi í brjóstholi .....	6
1.3.1 Marfan heilkenni .....	6
1.3.2 Ehlers-Danlos heilkenni, gerð 4 .....	6
1.3.3 Loeys-Dietz heilkenni .....	7
1.4 Erfðafræðirannsóknir .....	8
1.4.1 Þróun erfðafræðirannsókna .....	8
1.4.2 Íslensk erfðagreining .....	8
2 Markmið .....	10
3 Efni og aðferðir .....	11
3.1 Rannsóknarpýði .....	11
3.2 Arfgerðagreining og áætlaðar arfgerðir .....	11
3.3 Fylgniprófanir .....	11
3.4 Söfnun svipgerðarupplýsinga .....	12
4 Niðurstöður .....	13
4.1 Erfðabreytileikar tengdir ósæðargúlpi í brjóstholi á Íslandi .....	13
4.2 Svipgerðir sjúkdómsins .....	13
4.2.1 Arfberar sem hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH .....	14
4.2.2 Arfberar sem ekki hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH .....	14
4.2.3 Viðmið .....	15
5 Umræða .....	16
5.1 SMAD3 .....	16
5.1.1 Áhrif á boðferil TGF- $\beta$ .....	17
5.2 Svipgerðir .....	18
5.3 Styrkleikar og takmarkanir .....	19

5.4	Ályktanir.....	19
5.5	Næstu skref.....	19
	Heimildaskrá.....	21

## Myndaskrá

Mynd 1. Teygjanleg ósæð	3
Mynd 2. Ættartré	13
Mynd 3. Val á þátttakendum fyrir áætlun svipgerðar	14
Mynd 4. <i>SMAD3</i> genið og nokkrar áður þekktar stökkbreytingar tengdar ósæðargúlpi í brjóstholi	17
Mynd 5. Týrósin og serín	17
Mynd 6. Boðferlar TGF- $\beta$	18

## Töfluskrá

Tafla 1. Gen sem tengd hafa verið ósæðargúlpi og ósæðarflysjun í brjóstholi og hlutverk þeirra	7
Tafla 2. Þróunarfræðileg varðveisla týrósíns í stöðu 226 í <i>SMAD3</i> próteininu	16

## Listi yfir skammstafanir

BAV: Tvíblöðkuloka (*bicuspid aortic valve*)

DNA: Deoxýríbósakjarnsýra (*deoxyribonucleic acid*)

EDS: Ehlers-Danlos heilkenni (*Ehlers-Danlos syndrome*)

EDS4: Ehlers-Danlos heilkenni af gerð 4

GWAS: Víðtæk erfðamengisrannsókn (*genome-wide association study*)

ÍE: Íslensk erfðagreining

LDS: Loeys-Dietz heilkenni (*Loeys-Dietz syndrome*)

LDS3: Loeys-Dietz heilkenni af gerð 3

LSH: Landspítali háskólasjúkrahús

MFS: Marfan heilkenni (*Marfan syndrome*)

MMP: Matrix metallopróteinasar (*Matrix metalloproteinase*)

NGS: Næstu kynslóðar aðferð við raðgreiningu erfðaefnis (*Next-generation DNA sequencing*)

PCR: Pólýmerasa-keðjuhvarf (*Polymerase chain reaction*)

SNPs: Einbasabreytileikar (*Single nucleotide polymorphisms*)

TGFBR1: TGF- $\beta$  viðtaki 1

TGFBR2: TGF- $\beta$  viðtaki 2

TIMP: Matrix metallopróteinasa hindri (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*)

VSN: Vísindasiðanefnd

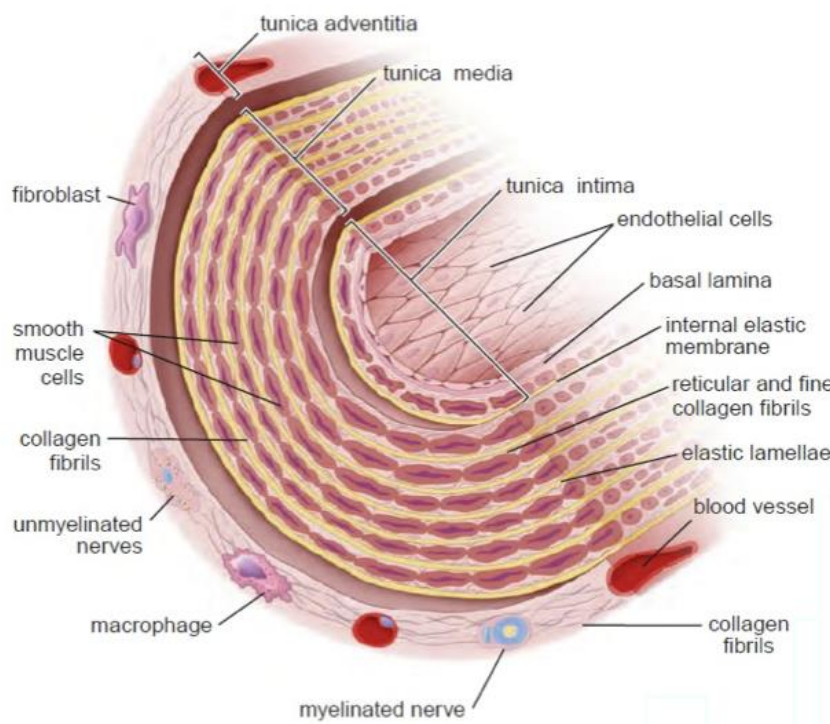
WGS: Heilraðgreining (*whole genome sequencing*)



# 1 Inngangur

## 1.1 Ósæðin: eðlileg virkni og þvermál

Ósæðin er stór teygjanleg (*elastic*) slagæð með æðavegg sem er samsettur úr þremur lögum; innsta lag (*tunica intima*), miðlag (*tunica media*) og ysta lag (*tunica adventitia*). Ósæðin gegnir því hlutverki að taka við blóði frá vinstri slegli og heldur blóðflæðinu stöðugu út í vefi líkamans. Í samdráttarfasa (*systole*) hjartans pumpar það blóði út í ósæðina og við það myndast þrýstingur á æðavegginn og hann þenst út. Við það að þenjast út getur ósæðin geymt meira rúmmál blóðs. Hversu mikið ósæðin getur þanist út ræðst af kollagen þráðum í mið- og ysta lagi ósæðarveggjarins. Í hvíldarfasa (*diastole*) hjartans minnkar þrýstingurinn á ósæðarvegginn, hann skreppur saman að nýju vegna elastískra þráða og þrýstir þá rúmmáli blóðs áfram út í æðakerfið. Þannig helst blóðþrýstingur og blóðflæði til vefja líkamans stöðugt. Elastín þræðir og sléttvöðvafrumur í miðlagi ósæðarveggjarins gera ósæðinni mögulegt að dragast aftur saman<sup>4</sup>.



**Mynd 1: Teygjanleg slagæð.**

Þessi mynd sýnir samsetningu teygjanlegs æðaveggs. Miðlag æðarinnar er skipulega lagskipt af sléttum vöðvafrumum, kollagenþráðum og teygjanlegum bjálkum. Mynd aðlöguð frá Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*<sup>4</sup>.

Innra þvermáli rishluta ósæðar (*ascending aorta*) í heilbrigðum fullorðnum einstaklingum hefur verið lýst sem  $31.1 \pm 3.9\text{mm}$  að meðaltali hjá konum og  $33.6 \pm 4.1\text{mm}$  að meðaltali hjá körlum. Þvermálið hefur sterkt línulegt samband við aldur, kyn, þvermál fallhluta ósæðar (*descending aorta*) og þvermál lungnaslagæðar (*pulmonary artery*). Hjá einstaklingum eldri en 60 ára var meðalþvermálið  $40\text{mm}$  hjá konum og  $42.6\text{mm}$  hjá körlum<sup>6</sup>. Ein aðferð til að áætla eðlilegt þvermál ósæðar er að reikna það út frá heildarflatarmáli yfirborðs einstaklinga og er eðlilegt þvermál ósæðarrótar við Valsalva sinusa áætlað  $2.1\text{cm}^2$  yfirborðs<sup>7</sup>. Engar skýrar reglur hafa verið settar um hvort taka eigi ósæðarvegginn með í mati á þvermáli ósæðar eða hvaða myndgreiningaraðferð eigi helst að nota<sup>8</sup>.

## 1.2 Ósæðargúlpur og ósæðarflysjun í brjóstholi

Ósæðargúlpur (*aortic aneurysm*) er staðbundin víkkun á ósæðinni. Þessi sjúkdómur getur haft alvarlegar afleiðingar, en talið er að 1-2% andláta á Vesturlöndum séu afleiðing ósæðargúlpa<sup>9</sup>. Gúlpurinn getur verið hvar sem er eftir endilangri ósæðinni, bæði í brjóstholi og kviðarholi. Algengara er að gúlpurinn verði í kviðarholi og hefur nýgengitíðni í Vestur-Evrópu og Norður-Ameríku verið lýst á bilinu 25,87-32,08 tilfelli á 100.000 persónuár<sup>10</sup>, en nýgengitíðni ósæðargúlps í brjóstholi hefur verið lýst á bilinu 5,9-16,9 tilfelli á 100.000 persónuár<sup>11-13</sup>.

Í þessari ritgerð verður sjónum beint að ósæðargúlpi í brjóstholi.

Ósæðargúlpur í brjóstholi getur valdið bæði brjóstverk og bakverk. Í flestum tilfellum er ósæðargúlpur þó einkennalaus og talið er að í allt að 95% tilfella sé ósæðargúlpur einkennalaus fram að lífshættulegri ósæðarflysjun (*aortic dissection*)<sup>8</sup>. Við ósæðarflysjun verður rof á innsta lagi æðarinnar (*tunica intima*) og blóð flæðir undan þrýstingi inn í miðlag æðar (*tunica media*)<sup>14</sup>. Ósæðarflysjun veldur yfirleitt miklum brjóstverk sem getur leitt aftur í bak og niður í kvið<sup>15</sup>. Önnur einkenni og teikn eru yfirlið, nýtt hjartaóhljóð, hjartaöng og blóðþurrðareinkenni frá öðrum líffærum<sup>15 16</sup>.

Ósæðarflysjun í brjóstholi er almennt skipað í tvo flokka. Stanford flokkunin skiptir ósæðarflysjun eftir staðsetningu, þar sem ósæðarflysjun af gerð A er í rishluta ósæðar og ósæðarboga, en ósæðarflysjun af gerð B er í fallhluta ósæðar, handan við neðanviðbeinsslagæð (*subclavian artery*)<sup>17</sup>. Bráð ósæðarflysjun er lífshættulegt ástand og hefur dánartíðni verið lýst á bilinu 10-58%<sup>11 15 16</sup>. Vegna nálægðar sinnar við hjartað getur ósæðarflysjun af gerð A valdið skyndidauða vegna blæðingar í gollurshúsið og hjartaþröng (*cardiac tamponade*)<sup>17</sup>. Einnig getur hún orsakað blóðþurrðarástand í hjarta og öðrum líffærum, og lostástand vegna lágþrýstings í slagbili (<90 mmHg)<sup>16</sup>. Ósæðarflysjun af gerð B er hættuminni en getur orsakað blóðþurrðarástand í innri líffærum og ganglum<sup>15 18</sup>.

Helstu áhættuþættir ósæðarflysjunar eru þeir sömu og fyrir ósæðargúlp; háþrýstingur, aldur, tvíblöðkuloka (*bicuspid aortic valve*, BAV) og bandvefssjúkdómar á borð við Marfans heilkenni (MFS), Ehlers-Danlos heilkenni (EDS) og Loey-Dietz heilkenni (LDS)<sup>19-21</sup>. Æðakölkun er mikilvægur áhættuþáttur fyrir ósæðarflysjun af gerð B, en virðist hafa litlu hlutverki að gegna í ósæðarflysjun af gerð A<sup>19</sup>. Ýmsar ástæður geta legið að baki því að orsakir ósæðargúlps og ósæðarflysjunar í brjóstholi og kviðarholi séu ólíkar, meðal annars sú að ósæð fyrir ofan þind og neðan hefur ekki sama fósturfræðilega uppruna. Ósæð í brjóstholi er upprunnin frá taugakambi (*neural crest*) en ósæð í kviðarholi er upprunnin frá miðlagi fósturþroska (*mesoderm*). Þessir tveir hlutar bregðast við ýmsum efnaboðum á mismunandi vegu<sup>22</sup>.

Myndgreining er nauðsynleg til að greina ósæðargúlp og ósæðarflysjun. Hægt er að nota tölvusneiðmyndatöku, hjartaómun og segulómun, og í flestum tilvikum eru fleiri en ein myndgreining notuð<sup>16 23</sup>. Tölvusneiðmynd virðist vera algengasta myndgreiningaraðferðin en segulómun talin geta verið sú nákvæmasta<sup>16 24</sup>. Einnig er hjartalínurit tekið til að greina blóðþurrð í hjartavöðvanum og í sumum tilfellum er kransæðapræðing framkvæmd, ýmist til að útiloka kransæðastíflu sem orsök einkenna eða sem afleiðingu ósæðarflysjunar<sup>16 24</sup>.

Ef þvermál rishluta ósæðar er  $\geq 55$  mm eða þvermál fallhluta ósæðar er  $\geq 65$  mm mæla klínískar leiðbeiningar með fyrirbyggjandi skurðaðgerð til að draga úr líkum á flysjun og öðrum fylgikvillum<sup>23</sup>. Ef einstaklingar eru með þekktu bandvefssjúkdóma, BAV eða fjölskyldusögu um ósæðargúlp í brjóstholi, þá er mælt með skurðaðgerð við minna þvermál ósæðar, eða um 45-50 mm í þvermál<sup>23</sup>. Mikilvægt er þó að hafa í huga að mögulega er spágildi þvermáls ósæðarinnar fyrir ósæðarflysjun lítið. Í rannsókn á 343 einstaklingum með ósæðarflysjun af gerð A, án bandvefssjúkdóma, BAV eða fjölskyldusögu, höfðu 60% tilfellanna átt sér stað án þess að nokkur vikkun væri á ósæðinni fyrir flysjun og einungis 3% einstaklinganna höfðu uppfyllt skilmerki fyrir skurðaðgerð í forvarnarskyni<sup>25</sup>.

Erfitt er að áætla nákvæma tíðni ósæðargúlpa, en rannsókn á ósæðarflysjun af gerð A á Íslandi á árunum 1992-2014 sýndi fram á mikla aukningu á aðgerðum vegna ósæðarflysjunar af gerð A á þessu tímabili<sup>16</sup>. Sama munstur má sjá í tíðni aðgerða við ósæðarflysjun í Svíþjóð<sup>11</sup>. Þrátt fyrir þessa aukningu í aðgerðum við ósæðarflysjun, er ekki hægt að staðfesta að tíðni ósæðargúlps sé að aukast. Mögulegt er að greining sé orðin betri og einnig að fleiri sjúklingar fari í aðgerð.

Ósæðargúlpur er lífshættulegur sjúkdómur sem er oftast einkennalaus og því erfitt að greina án beinnar skimunar. Mikilvægt er að heilbrigðisstarfsfólk hafi í huga að meðalaldur einstaklinga með ósæðarflysjun er um sextugt, og eru þessir einstaklingar líklegir til að hafa sögu um reykingar og háþrýsting, og um tveir þriðju þeirra eru karlmenn<sup>15 16</sup>. Einnig er mikilvægt að hafa í huga að einstaklingar með bandvefssjúkdóma eða fjölskyldusögu um ósæðargúlp eða ósæðarflysjun eru líklegri til að fá ósæðargúlp.

### 1.2.1 Meinmyndun

Mögulegar ástæður ósæðargúlps eru meðal annarra ójafnvægi í myndun og eyðingu utanfrumuefnis (*extracellular matrix*) sem og breytingar í starfsemi og dauði sléttra vöðvafrumna í miðlagi ósæðarveggjarins<sup>26-28</sup>. Samanburður á vef úr vikkudum og eðlilegum ósæðum sýndi hærra magn utanfrumupróteina sem brjóta niður kollagen og elastín í vikkudu ósæðarvefjunum<sup>27</sup>. Þessi utanfrumuprótein kallast matrix metallopróteinasar (MMP) og var mesta hækkunin á MMP-9. Einnig var hækkun á metallopróteinasa hindrum (*tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP), en þrátt fyrir það var hlutfallið milli kollagen- og elastínasanna og hindra þeirra, þ.e.a.s. MMP/TIMP, hækkað<sup>29</sup>. Safnrannsókn (*meta-analysis*) Rabkin et al.<sup>28</sup> sýndi að hlutfall MMP-9/TIMP1 í einstaklingum með ósæðargúlp í brjóstholi var 3.7 sinnum hærra en í samanburðarhópi og að hlutfall MMP-9/TIMP2 var 26.5 sinnum hærra. Þessi röskun í jafnvægi milli niðurbrotsensíma og hindra þeirra leiðir til frekara niðurbrots utanfrumuefnis. Við þessar breytingar verður ósæðarveggurinn stífari og veggspenna (*wall tension*) eykst, sem eykur líkurnar á ósæðarflysjun<sup>8</sup>.

### 1.2.2 Erfðafræði ósæðargúlps

Talið er að um 20% tilfella ósæðargúlpa og ósæðarflysjunar í brjóstholi séu ættlæg. Sjúkdómurinn virðist oftast erfast með ríkjandi A-litnings hætti (*autosomal dominant*) en getur einnig erfst á víkjandi (*autosomal recessive*) eða kynbundinn (*x-linked*) hátt<sup>30</sup>. Genarannsóknir hafa því verið framkvæmdar til að komast nær orsökum ósæðargúlps, bæði í stökum (*sporadic*) tilfellum og í tilfellum sem virðast vera ættlæg. Nokkur gen sem hafa verið tengd við ósæðargúlp í brjóstholi tengjast einnig

bandvefssjúkdómum; *FBN-1* genið tengist Marfan heilkenni, *COL3A1* tengist Ehlers-Danlos heilkenni, og *TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFB2* og *SMAD3* tengjast Loeys-Dietz heilkenni. Ýmis gen sem hafa verið tengd ósæðargúlpi, tengjast samdrætti sléttra vöðvafrumna (*ACTA2*, *MYH11*, *MYLK*, *PRKG1*), en enn fleiri gen sem hafa fundist tengjast próteininu TGF- $\beta$  á einhvern máta (*TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *SKI*) (tafla 1). Hefur það leitt til frekari rannsókna á hlutverki TGF- $\beta$  í meinmyndun ósæðargúlps, en TGF- $\beta$  gegnir hlutverki í ýmsum mikilvægum ferlum á borð við frumusérhæfingu, stjórnun frumuhings og stýrðan frumudauða (*apoptosis*).

## 1.3 Bandvefssjúkdómar tengdir ósæðargúlpi í brjóstholi

### 1.3.1 Marfan heilkenni

Marfan heilkenni (MFS) er fjölkerfa bandvefssjúkdómur með einkenni einna helst frá stoðkerfi, hjarta- og æðakerfi og augum<sup>31</sup>. Helstu einkenni eru langir útlimir og fingur, hryggskekkja, aflögun brjóstkassa (fuglsbrjóst eða holubrjóst), hár og þröngur gómur, yfirhreyfanleiki í liðum, augasteinslos, nærsýni, ósæðargúlpur og hjartaóhljóð<sup>31 32</sup>. Lífslíkur einstaklinga með MFS eru lægri en heilbrigðra einstaklinga, og eru helstu dánarorsakir þeirra tengdar hjarta- og æðakerfinu<sup>33</sup>. Á síðari áratugum hafa lífslíkur einstaklinga með MFS þó farið batnandi, meðal annars vegna framfara í meðferð hjarta- og æðatengdra einkenna sjúkdómsins<sup>34</sup>.

Algengi MFS á Íslandi hefur verið lýst sem 6,5 tilfelli á 100.000 íbúa, en þetta er yfirleitt fjölskyldulægur sjúkdómur sem erfist með ríkjandi A-litningshætti (*autosomal dominant*)<sup>32</sup>. MFS er yfirleitt talinn orsakast vegna stökkbreytinga í *FBN-1* geninu, en það tjáir fyrir próteininu fibrillín 1 sem er byggingarprótein bandvefs<sup>35</sup>. Stökkbreytingarnar í *FBN-1* geninu valda þó ekki veikleika í byggingarhluta próteinsins, heldur koma þær í veg fyrir að fibrillín geti bundið TGF- $\beta$ . Þannig verður truflun á stýringu TGF- $\beta$  í bandvefnum<sup>36</sup>.

### 1.3.2 Ehlers-Danlos heilkenni, gerð 4

Til eru nokkrar gerðir af Ehlers-Danlos heilkenni, en í gerð 4 (EDS4) eru innri líffæri á borð við þarma, leg og slagæðar, viðkvæm og geta rofnað auðveldlega<sup>37</sup>. Þetta getur verið lífshættulegt ástand og er helsta dánarorsök einstaklinga með EDS4 flýsjun eða rof á slagæðum, oftast í brjóst- eða kviðarholi, en einnig í miðtaugakerfi, og því er þessi gerð EDS stundum kölluð blóðrásargerð EDS (*vascular type*)<sup>21</sup>. Helstu útlitseinkenni EDS4 eru þunn og glær húð sem merst auðveldlega og sérkennandi andlitsfall sem kemur til vegna lítillar fitusöfnunar undir húð (mjótt nef, þunnar varir, strekkt húð, útstæð augu)<sup>37</sup>.

EDS4 orsakast af stökkbreyttu *COL3A1* geni sem kóðar fyrir prókollageni af gerð 3, og erfist með A-litnings ríkjandi hætti<sup>21</sup>. Til að staðfesta greiningu EDS4 þarf að sýna fram á stökkbreytingu í *COL3A1* geninu eða að bygging kollagens af gerð 3 sé afbrigðileg<sup>37</sup>.

EDS4 er sjaldgæfur sjúkdómur og til ársins 2011 var einungis vitað um 10 einstaklinga sem höfðu verið greindir með EDS4 á Íslandi<sup>38</sup>.

**Tafla 1: Gen sem hafa verið tengd við ósæðargúlp og ósæðarflysjun, og hlutverk þeirra.**

Gen	Prótein og hlutverk	Heimild
<i>ACTA2</i>	Alpha-actin. Gegnir hlutverki í samdrætti sléttra vöðvafrumna.	Yoo et al., 2010 <sup>39</sup>
<i>MYH11</i>	Punga keðja myosins ( <i>myosin heavy chain</i> ). Gegnir hlutverki í samdrætti sléttra vöðvafrumna.	Zhu et al., 2006 <sup>40</sup>
<i>MYLK</i>	Létta keðja myosins ( <i>myosin light chain</i> ). Gegnir hlutverki í samdrætti sléttra vöðvafrumna.	Wang et al., 2010
<i>PRKG1</i>	cGMP-háður prótein kínasi (PKG-1). Gegnir hlutverki í slökun sléttra vöðvafrumna.	Guo et al. , 2013 <sup>41</sup>
<i>TGFB2</i>	TGF- $\beta$ 2. Gegnir hlutverki í frumusérhæfingu, stjórnun frumuhings og stýrðum frumudauða.	Lindsay et al., 2012 <sup>42</sup>
<i>TGFB3</i>	TGF- $\beta$ 3. Gegnir hlutverki í frumusérhæfingu, stjórnun frumuhings og stýrðum frumudauða.	Bertoli-Avella et al., 2015 <sup>43</sup>
<i>TGFBR1</i>	TGF- $\beta$ viðtaki 1. Kemur af stað innanfrumuboðum TGF- $\beta$ .	Tran-Fadulu et al., 2009 <sup>44</sup>
<i>TGFBR2</i>	TGF- $\beta$ viðtaki 2. Kemur af stað innanfrumuboðum TGF- $\beta$ .	Tran-Fadulu et al., 2009 <sup>44</sup>
<i>SMAD3</i>	Hluti af boðferli ( <i>pathway</i> ) TGF- $\beta$ .	van de Laar et al., 2011 <sup>45</sup>
<i>SKI</i>	SKI prótein. Hindrar boðferil TGF- $\beta$ með því að hindra SMAD.	Doyle et al., 2012 <sup>46</sup>
<i>FBN-1</i>	Fíbrillín 1. Byggingarprótein í bandvef.	Milewicz et al., 1996 <sup>35</sup>
<i>FLNA</i>	Filamen A. Ýmis innanfrumuhlutverk, t.d. skorðun frumu við utanfrumuefni.	de Wit et al., 2009 <sup>47</sup>
<i>COL3A1</i>	Pro-kollagen af gerð 3. Er klofið niður í kollagen af gerð 3.	Pepin et al., 2000 <sup>21</sup>

### 1.3.3 Loeys-Dietz heilkenni

Loeys-Dietz heilkenni (LDS) er bandvefssjúkdómur með einkenni frá hjarta- og æðakerfi, miðtaugakerfi og stoðkerfi<sup>20</sup>. LDS er skipt í nokkrar gerðir eftir tegundum stökkbreytinga og einkenna, en þekkt gen tengd sjúkdómnum eru öll tengd TGF- $\beta$  boðferlinu á einhvern hátt og hafa allar gerðir LDS ósæðargúlp í brjóstholi sem einkenni<sup>48</sup>. Genin eru *TGFBR1*, *TGFR2*<sup>20</sup>, *SMAD3*<sup>45</sup> og *TGFB2*<sup>42</sup>. Ósæðarflysjun og ósæðarrof virðast gerast hjá yngri einstaklingum með LDS og við minna þvermál ósæðar, samanborið við einstaklinga með MFS<sup>49</sup>. Vegna þessa er mikilvægt að greinarmunur sé gerður á LDS og MFS.

Ekki er vitað til þess að LDS hafi greinst á Íslandi.

## 1.4 Erfðafræðirannsóknir

### 1.4.1 Þróun erfðafræðirannsókna

Allt frá því að sýnt var fram á að erfðaeftni lífvera væri deoxyríbósakjarnsýra (*deoxyribonucleic acid*, DNA) hafa vísindamenn leitast við því að greina DNA mannsins og annarra lífvera og var stórum áfanga náð árið 1953, þegar þrívíddarbyggingu DNA var fyrst lýst<sup>50</sup>. Ýmsar aðferðir voru þróaðar til þess að rannsaka erfðaeftni lífvera, svo sem skerðibútagreining, klónun, pólýmerasa-keðjuhvarfi (*polymerase chain reaction*, PCR) og DNA raðgreining. DNA raðgreining er samheiti yfir aðferðir sem notaðar eru til þess að greina basaröð erfðaeftnisins. Sú aðferð sem hefur mest verið notuð er Sanger raðgreining sem kom fram á sjónarsviðið árið 1977, en hún var tímafrek og kostnaðarsöm<sup>51 52</sup>. Upp úr 1990 var byrjað að þróa sjálfvirkar aðferðir við raðgreiningu erfðaeftnis, sem þörfuðust minni handavinnu og var yfirleitt notuð einhver útgáfa af Sanger raðgreiningu<sup>52</sup>. Í upphafi 21. aldarinnar komu fram nýjar aðferðir við raðgreiningu sem byggðu á annarri tækni en Sanger aðferðin og voru mun skjótvirkar og ódýrari, og kallast þessar aðferðir næstu kynslóðar aðferðir við raðgreiningu erfðaeftnis (*next-generation DNA sequencing*, NGS)<sup>53</sup>. Þessar aðferðir eru nákvæmar, með villutíðni allt niður í 0,001%, sem fer lækkandi eftir meiri dýpt, þ.e. hversu oft hver basi er lesinn<sup>53</sup>.

Árið 2004 tókst í fyrsta skipti að raðgreina allt erfðamengi manns með heilraðgreiningu (*whole genome sequencing*, WGS)<sup>54</sup>, en það tók um fjölda ára og var mjög kostnaðarsamt. Síðan þá hefur erfðamengi þúsundir einstaklinga verið heilraðgreint með tilkomu NGS. Önnur aðferð við greiningu erfðaeftnis er að raðgreina einungis útraðir gena (*whole-exome sequencing*, WES)<sup>55</sup>. Þessi aðferð er fljótlegri og ódýrari en heilraðgreining en talið er að stærstan hluta allra þekktra sjúkdómsvaldandi erfðabreytileika sé að finna í útröðum<sup>55</sup>. Einnig getur þessi aðferð nýst í klínísku umhverfi þar sem markmiðið er þá að finna gen með þekkt tengsl við tiltekinn sjúkdóm<sup>55</sup>.

Örflögutækni (*chip genotyping*) er önnur tækni sem mikið hefur verið notuð undanfarin ár, en hún er ódýrari en heilraðgreining. Með þeirri aðferð er hægt að greina á bilinu 300.000 - 1.000.000 þekktra erfðabreytileika fyrir hvern einstakling á mjög hraðvirkan hátt. Með því að sameina upplýsingar úr heilraðgreiningu, örflögugreiningu og með aðstoð gagnabanka á borð við HapMap, sem geyma upplýsingar um algenga einsbasabreytileika (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) og upplýsingar um tengslaójafnvægi (*linkage disequilibrium*)<sup>56</sup>, má síðan áætla arfgerðir fjölda einstaklinga sem hægt er að nota í víðtækri erfðamengisrannsókn (*whole-genome association study*, GWAS)<sup>57 58</sup>. Með þessum nýju og skjótu aðferðum má finna sjaldgæfa erfðabreytileika sem tengjast hinum ýmsu sjúkdómum.

Þrátt fyrir allar þessar framfarir og skjótu og öruggu aðferðir við arfgerðargreiningu hefur ekki tekist að útskýra áhrif erfðabreytileika á svipgerð að fullu og enn er margt á huldu varðandi samband arfgerðar og svipgerðar<sup>59</sup>.

### 1.4.2 Íslensk erfðagreining

Íslensk erfðagreining (ÍE) er leiðandi á sviði erfðafræðirannsókna í heiminum, en ÍE nýtur góðs af því hve ítarlegar upplýsingar er að finna um skyldleika Íslendinga í Íslendingabók, og upplýsingar er varða heilsufar og sjúkdóma Íslendinga hjá Landlæknisembættinu og heilbrigðisstofnunum landsins<sup>60</sup>.

Frá því ÍE var stofnað hafa um 160.000 Íslendingar gefið leyfi og lífsýni til rannsókna á arfgerð sinni og svipgerð og hefur ÍE fundið um 41 milljón erfðabreytileika, bæði algenga og sjaldgæfa<sup>57</sup>. Með rannsóknum sínum hefur ÍE fundið erfðabreytileika sem tengjast ýmsum sjúkdómum, svo sem brjóstakrabbameini, blöðruhálskirtilskrabbameini, hjartaáfalli og gáttatifi<sup>61</sup>.

ÍE, ásamt Friðriki Skúlasyni, hafa sameiginlega byggt upp Íslendingabók<sup>62</sup>, rafrænan gagnagrunn sem geymir ættfræðiupplýsingar um það bil 830.000 Íslendinga, sem er um helmingur þeirra Íslendinga sem búið hafa á Íslandi frá landnámi. Um það bil 370.000 Íslendingar fæddir á 20. öld eru skráðir í gagnagrunninn og eru tengingar við báða foreldra í 95.5% tilvika. Íslendingabók er eini ættfræðigrunnurinn í heiminum sem nær til heillar þjóðar.

## 2 Markmið

Markmið rannsóknarinnar var tvíþætt;

- a) Finna erfðabreytileika sem tengjast ósæðargúlpi í brjóstholi í íslensku þjóðinni.
- b) Lýsa svipgerð sjúkdómsins hjá einstaklingum sem bera þá erfðabreytileika sem finnast.



### 3 Efni og aðferðir

Þessi rannsókn var framkvæmd í samvinnu við Íslenska erfðagreiningu (ÍE), Landspítala háskólasjúkrahús (LSH), Stefán Matthíasson, æðaskurðlækni, og Arnar Geirsson, hjarta- og lungnaskurðlækni. Rannsóknin byggði að hluta til á fyrirbyggjandi gögnum frá ÍE og Arnari Geirssyni, hjarta- og lungnaskurðlækni. Þátttakendur í rannsókninni höfðu veitt upplýst samþykki fyrir erfðarannsóknnum á vegum ÍE og fellur rannsóknin undir leyfi Vísindasiðanefndar VSN: 12/132/V4 (áður VSN:99/065/V4 og VSN: 98/047). Rannsókn Arnars Geirssonar á árangri hjartaaðgerða á Íslandi fellur undir leyfin VSNb2010010009/03.7 og 2010010018LSL.

Öll gögn sem voru send til ÍE voru dulkóðuð með IPS dulkóðunarkerfi sem hlotið hefur samþykki Persónuverndar og gerir öll gögn ópersónugreinanleg þeim sem vinna með upplýsingarnar hjá ÍE. Þjónustumiðstöð rannsóknaverkefna sá um dulkóðun upplýsinganna. Öll erfðafræðileg gögn eru varðveitt hjá ÍE og eru óaðgengileg öðrum en þeim sem vinna að rannsókninni og eingöngu undir dulkóðuðum kennitölum.

Mitt hlutverk í þessari rannsókn var söfnun svipgerðarupplýsinga úr sjúkragögnum þátttakenda, sem aðgengileg voru í Sögukerfi LSH ásamt túlkun gagna eftir að fylgnigreining var gerð.

#### 3.1 Rannsóknarþýði

Rannsóknarþýði samanstóð af 415 einstaklingum sem höfðu fengið útskriftargreininguna ósæðargúlpur í brjóstholi á LSH, á tímabilinu 1980-2014, og 288.902 einstaklingar án sjúkdómsins.

#### 3.2 Arfgerðargreining og áætlaðar arfgerðir

Þegar þessi rannsókn var gerð hafði ÍE raðgreint allt erfðamengi (*whole genome sequencing*) 15.220 Íslendinga<sup>57</sup>. Dýpt raðgreiningar (þ.e. hversu oft hver basi er lesinn) var að minnsta kosti 10-föld og meðaldýptin 20-föld. Alls hefur um 41 milljón erfðabreytileika fundist með þessari aðferð. Auk þess hefur ÍE arfgerðargreint tæplega 152.000 Íslendinga með örflögutækni frá Illumina<sup>57</sup>. Ættfræðiupplýsingar úr Íslendingabók og niðurstöður úr raðgreiningu eru síðan notaðar til þess að áætla (*impute*) arfgerðir einstaklinga sem hafa verið arfgerðargreindir með örflögutækni, auk fyrstu og annarrar gráðu ættingja þeirra, í heildina allt að 300.000 Íslendingar<sup>57</sup>.

#### 3.3 Fylgniprófanir

Tvíkosta aðhvarfsgreining (*logistic regression*) var framkvæmd til að kanna fylgni milli erfðabreytileika og ósæðargúlps í brjóstholi. Til viðmiðunar voru nýttar arfgerðarupplýsingar 288.902 einstaklinga án sjúkdómsins. Leiðrétt var fyrir kyni, aldri, líftíma (*lifespan*) og búsetu eftir sýslu. Holm-Bonferroni aðferð var framkvæmd til að leiðrétta fyrir fjölda fylgniprófa og draga úr líkum á falskt jákvæðum niðurstöðum (*false positive*)<sup>63</sup>.

Prófað var fyrir 32.463.443 breytileikum og voru marktektarmörk ákveðin með tilliti til alvarleika erfðabreytileikanna<sup>64</sup>. Fyrir stökkbreytingar sem spáð var að að leiddu til taps á virkni próteins (*loss-of-function variants*) voru marktektarmörk  $P = 2,6 \times 10^{-7}$ , fyrir stökkbreytingar sem valda mislestri var  $P = 5,1 \times 10^{-8}$  og fyrir annars konar erfðabreytileika var  $P = 7,9 \times 10^{-10}$ .

Stuðst var við tölfræðihugbúnaðinn R (útgáfu 3.1.2) við tölfræðiúrvinnslu<sup>65</sup>.

### 3.4 Söfnun svipgerðarupplýsinga

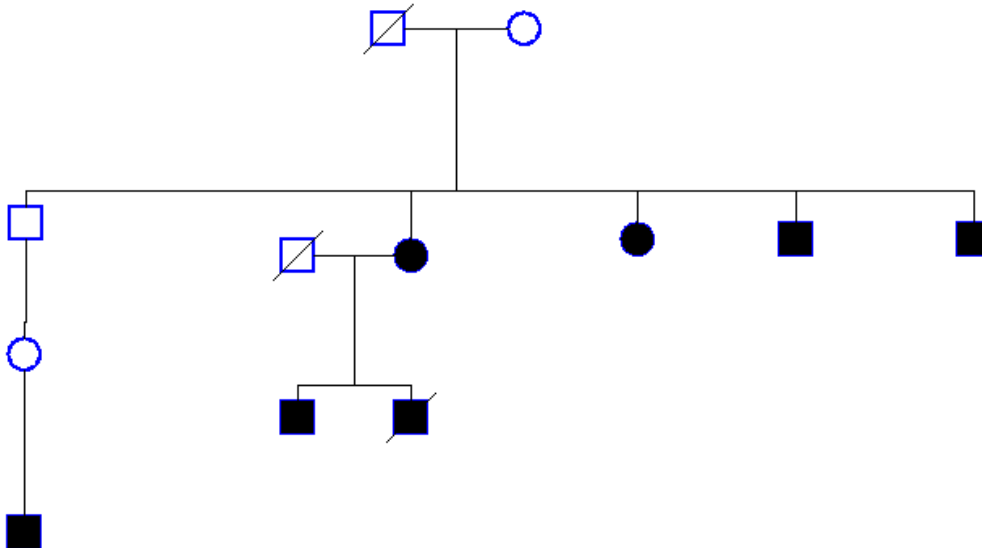
Rafrænar sjúkraskrár hjá LSH voru skoðaðar með tilliti til breyta sem eru annars vegar tengdar ósæðargúlpi í brjóstholi, og hins vegar bandvefssjúkdómum. Gögn um tvo einstaklinga var að finna í gagnagrunnum sem Arnar Geirsson, Inga Hlíf Melvinsdóttir og Tómas Guðbjartsson höfðu útbúið fyrir rannsókn sína á ósæðarflysjun af gerð A<sup>16</sup>. Öðrum gögnum var safnað úr sögukerfi Landspítala háskólasjúkrahúss.

Eftirfarandi breytum var safnað: Kyn, aldur, hvort einstaklingur hafi áður verið greindur með ósæðargúlpi í brjóstholi, staðsetning víkkunar, þvermál víkkunar, ósæðarflysjun og stærð hennar, hvort aðgerð hafi verið framkvæmd vegna ósæðarflysjunar, tvíblöðkuloka, bandvefssjúkdómar, háþrýstingur, útæðasjúkdómar, sykursýki, hækkað kólesteról, saga um heilablóðfall, skammvinna heilablóðþurrð (*transient ischemic attack, TIA*) eða langvinnan nýrnasjúkdóm, lokastigs nýrnabilun, langvinn lungnateppa, kransæðasjúkdómur, reykingsaga, hæð í sentimetrum, þyngd í kílógrömmum, lífun innan 30 daga frá aðgerð, lífun á tíma gagnasöfnunar, hvort myndgreining hafi verið framkvæmd á ósæð í brjóstholi, mesta þvermál ósæðar í brjóstholi samkvæmt myndgreiningu, staðsetning mesta þvermáls, hjartabilun, lokusjúkdómar og aðgerðir vegna þeirra, meðfæddir hjartagallar og aðgerðir vegna þeirra, myndgreining af slagæðum, krabbamein, klofinn gómur, krepptir fingur (*finger contractures*), klumbufætur, skekktir fætur (*skewfoot*), hryggskekkja, óstöðugleiki í háls hrygg, yfirhreyfanleiki í liðum, holubrjóst, fuglsbrjóst, slitgigt, kviðslit og sjóntengdar breytur (sjónhimnulós, augnvöðvakvillar, nærsýni og augasteinslos). Einnig var upplýsingum safnað um aðra sjúkdóma og aðgerðir, og lyf við síðustu skráningu.

## 4 Niðurstöður

### 4.1 Erfðabreytileikar tengdir ósæðargúlpi í brjóstholi á Íslandi

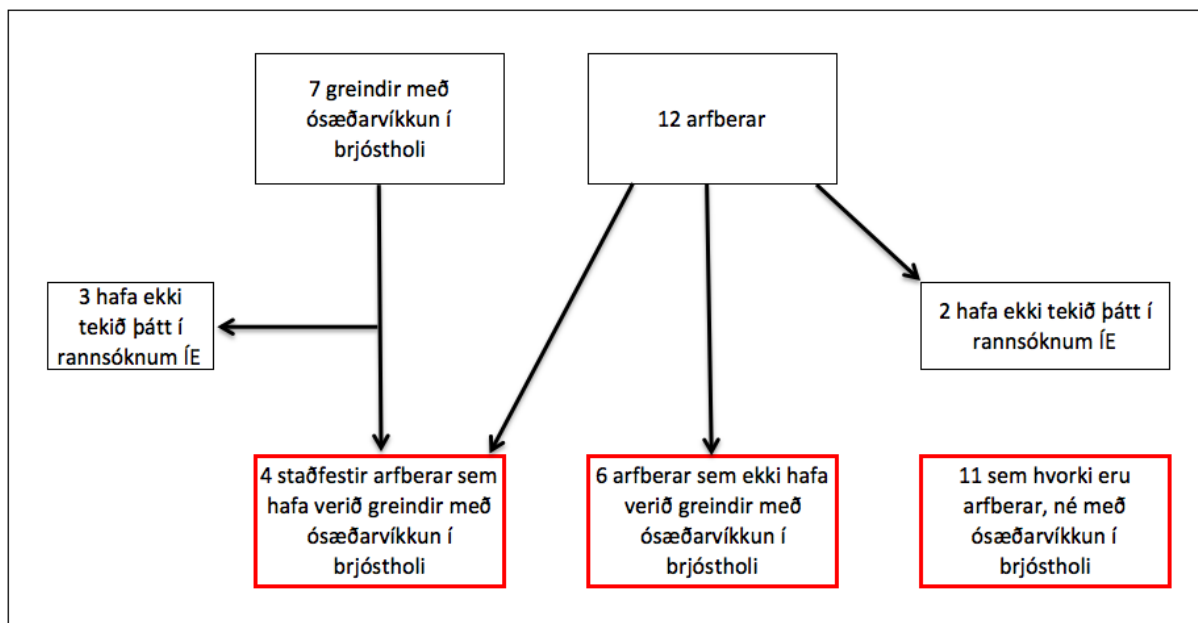
Ein stökkbreyting, í *SMAD3* geninu, var með marktæka fylgni við ósæðargúlpi í brjóstholi, með gagnlíkindahlutfallið (*odds ratio*, OR) 95,88 og *P*-gildið  $1,6 \times 10^{-9}$  (marktæktarmörk fyrir mislestursstökkbreytingar voru  $P = 5,1 \times 10^{-8}$ ). Stökkbreytingin í *SMAD3* geninu, p.Tyr226Ser, er mislestursstökkbreyting sem veldur því að amínósýran serín kemur í stað týrósin í stöðu 226 í *SMAD3* próteininu (NP\_005893.1). Tólf einstaklingar voru áætlaðir arfberar og var *SMAD3* stökkbreytingin staðfest með Sanger raðgreiningu í 11 arfberum, en ekki var til nóg DNA til þess að arfgerðargreina einn einstakling. Við röktum skyldleika arfberanna og reyndust þeir allir koma úr sömu fjölskyldunni. Í þessari fjölskyldu eru sjö einstaklingar sem hafa greinst með ósæðargúlpi í brjóstholi á aldrinum 27-64 ára. Fjórir þeirra eru staðfestir arfberar en hinir þrír hafa ekki verið arfgerðargreindir (þar af er einn látinn). Sjá má skyldleika þessara sjö einstaklinga á mynd 2.



**Mynd 2: Ættartré.** Þetta ættartré sýnir skyldleika þeirra sjö einstaklinga í fjölskyldunni sem greindir hafa verið með ósæðargúlpi í brjóstholi. Þeir eru táknnaðir með fylltum reitum. Hringir eru tákn fyrir konur, kassar eru tákn fyrir karla. Strik þvert yfir reitina merkir að einstaklingurinn sé látinn. Fjórir af þessum sjö einstaklingum eru staðfestir arfberar fyrir *SMAD3* stökkbreytingunni sem fannst.

### 4.2 Svipgerðir sjúkdómsins

Sjúkraskrár 21 einstaklings úr fjölskyldunni voru skoðaðar (mynd 3), þar af voru 10 þeirra arfberar fyrir stökkbreytingunni. Sjö einstaklingar úr fjölskyldunni hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH, og voru þeir á aldrinum 27-64 ára við greiningu. Af þessum sjö einstaklingum hafa fjórir verið arfgerðargreindir og reyndust þeir allir bera stökkbreytinguna. Arfgerð hinna þriggja hefur ekki verið áætluð.



**Mynd 3: Val á þátttakendum fyrir áætlun svipgerðar.** Sjúkrskrár einstaklinganna í rauðu reitunum voru skoðaðar til að reyna að áætla svipgerð sjúkdómsins hjá þeim sem bera erfðabreytileikann. Alls tíu arfberar fyrir stökkbreytingunni og ellefu viðmið sem staðfest er að séu ekki arfberar. Allir einstaklingarnir koma úr sömu fjölskyldu.

#### 4.2.1 Arfberar sem hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH

Staðfestir arfberar fyrir stökkbreytingunni sem hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH voru fjórir talsins. Var meðalaldur þeirra við greiningu 55 ár. Engar upplýsingar var að finna í sjúkraskrá LSH um einn þeirra, utan þess að hann hafði farið í aðgerð við ósæðargúlpi og væri með ótilgreinda hjartabilun. Hinir þrír fóru einnig í aðgerð á LSH og var þvermál ósæðar þeirra við aðgerð 50-54 mm. Einn þeirra greindist ekki fyrr en við bráða ósæðarflysjun af gerð A.

Tveir höfðu fyrri sögu um reykingar og tveir höfðu ósæðarlokubakflæði. Allir þrír voru í ofþyngd, með BMI á bilinu 28,4-30,0. Einungis einn hefur verið greindur með háþrýsting og einn var með sögu um kransæðasjúkdóm, án inngrips. Einn hafði ótilgreinda hjartabilunargreiningu og einn var með ristilkrabbamein.

Enginn var með sögu um sykursýki, heilablóðfall, skammvinna heilablóðþurrð, króníska nýrnabilun, langvinna lungnateppu, meðfæddan hjartagalla eða bandvefssjúkdóma.

#### 4.2.2 Arfberar sem ekki hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH

Arfberar fyrir stökkbreytingunni sem ekki hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH voru átta talsins og skoðuðum við sjúkraskrár sex þeirra. Meðalaldur þeirra er 45,5 ár. Engar upplýsingar var að finna í sjúkraskrá um einn af þessum sex.

Tveir hafa verið greindir með sykursýki af gerð 2. Tveir eru fyrrverandi reykingamenn og einn er núverandi reykingamaður. Einn er með of hátt kólesteról. Einn er með sögu um kransæðasjúkdóm, án inngrips. Einn er með míturlokubakflæði. Einn er með sögu um háþrýsting. Einn er með hjartabilun.

Tveir hafa farið í myndgreiningu af ósæð í brjóstholi og var hvorugur með ósæðargúlp á þeim tíma, en annar var 29 ára og hinn var 51 árs þegar myndgreiningin var framkvæmd.

Tveir eru með slitgigt og er annar þeirra með yfirhreyfanleika í liðum. Einn er með holubrjóst. Þetta geta verið einkenni bandvefssjúkdóma.

Enginn er með sögu um heilablóðfall, skammvinna heilablóðþurrð eða langvinna lungnateppu.

### **4.2.3 Viðmið**

Til viðmiðunar voru 11 einstaklingar sem koma úr sömu fjölskyldu, en eru án stökkbreytingarinnar, og var meðalaldur þeirra 58,5 ár. Nánast engar upplýsingar var að finna um þessa einstaklinga í sjúkraskrá LSH.

## 5 Umræða

### 5.1 SMAD3

Við höfum fundið stökkbreytingu í *SMAD3* sem er með fylgni við ósæðargúlp í brjóstholi. Alls eru 12 arfberar fyrir stökkbreytingunni og koma þeir allir úr sömu fjölskyldunni. Í þessari fjölskyldu hafa sjö einstaklingar verið greindir með ósæðargúlp í brjóstholi. Stökkbreytingum í *SMAD3* hefur áður verið lýst í tengslum við ósæðargúlp í brjóstholi<sup>1 45</sup>, en okkur er ekki kunnugt um að stökkbreytingin sem fannst í þessari rannsókn, p.Tyr226Ser, hafi áður verið tengd ósæðargúlpi.

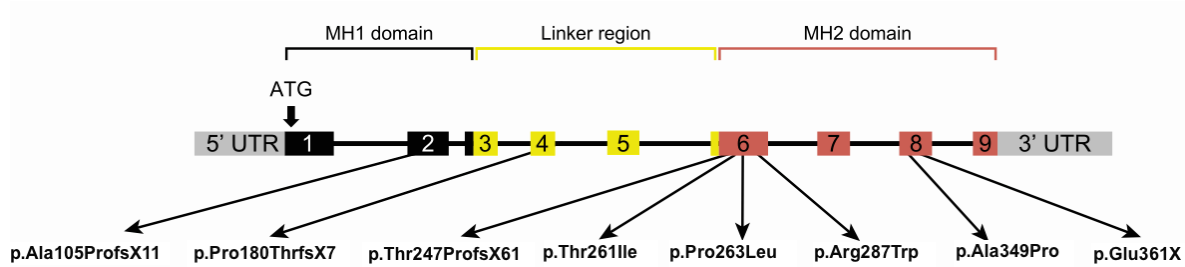
*SMAD3* genið kóðar fyrir SMAD3 próteininu sem er innanfrumuprótein sem tekur þátt í boðferli TGF-β og stýrir tjáningu ýmissa annarra gena. SMAD3 er 425 amínósýrur að lengd og er myndað af 3 starfrænum svæðum (*functional domains*); MH1, tengisvæði (*linker region*) og MH2 (Mynd 4)<sup>2</sup>. MH2 er á kolefnisenda próteinsins og er sá hluti próteinsins sem á í samskiptum við önnur prótein og stuðlar þar með að flutningi SMAD3 inn í kjarna frumu og gegnir hlutverki í að stýra umritun. MH1 er á niturenda próteinsins og tekur þátt í bindingu próteins við erfðaeftni<sup>66</sup>. Tengisvæðið gegnir einnig hlutverki í að hefja umritun<sup>67</sup>.

Stökkbreytingin sem fannst er í stöðu 226 og er í útröð (*exon*) 6, á mörkum tengisvæðis og MH2<sup>68 69</sup>. Ýmislegt bendir til þess að þessi stökkbreyting hafi áhrif á virkni SMAD3 próteinsins. Í fyrsta lagi þá er stökkbreytingin metin mjög líkleg til þess að hafa áhrif á virkni próteinsins af forriti sem spáir fyrir um áhrif stökkbreytinga á prótein (PolyPhen-2<sup>3</sup>) og í öðru lagi þá er týrósín í stöðu 226 þróunarfræðilega vel varðveitt, og er þar af leiðandi líklega mikilvæg fyrir virkni próteinsins (tafla 2).

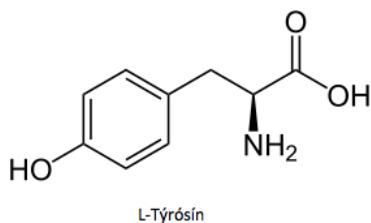
Latneskt heiti (enskt heiti)	Íslenskt heiti, ef við á	Amínósýruröð												
Homo sapiens (Human)	Maður	D	L	Q	P	V	T	Y	C	E	P	A	F	W
Danio rerio (Zebrafish)	Sebradanni	D	L	Q	P	V	T	Y	C	E	S	A	F	W
Xenopus tropicalis (Western clawed frog)		D	L	Q	P	V	T	Y	S	E	P	A	F	W
Meleagris gallopavo (Common turkey)	Kalkúnn	D	L	Q	P	V	T	Y	C	E	P	A	F	W
Saccoglossus kowalevskii (Acorn worm)		D	V	Q	P	V	P	Y	C	E	P	P	F	W
Takifugu rubripes (Japanese pufferfish)	Kúlufiskur	D	L	E	P	V	T	Y	C	E	S	A	F	W
Branchiostoma floridae (Florida lancelet)	Tálmunnur	D	L	Q	P	V	T	Y	T	E	P	T	F	W
Apis mellifera (Honeybee)	Býfluga	D	A	Q	P	V	M	Y	C	E	P	A	F	W
Drosophila ananassae (Fruit fly)	Ávaxtafluga	D	A	A	P	V	M	Y	H	E	P	A	F	W

**Tafla 2: Þróunarfræðileg varðveisla týrósíns í stöðu 226 í SMAD3 próteininu.** Taflan sýnir amínósýruna týrósín (Y) í stöðu 226 (rauður bakgrunnur) og aðliggjandi amínósýrur í mismunandi dýrategundum. Tafla unnin út frá upplýsingum frá PolyPhen-2<sup>3</sup>.

Amínósýrurnar týrósín og serín eru báðar skautaðar með alkóhól hliðarhóp, en týrósín er einnig með fenólvirkni (mynd 5). Báðar amínósýrurnar eru fosfórýleraðar af kínösum, en mikilvægt er að kínasar gera greinarmun á týrósíni og seríni og það eru ekki sömu kínasarnir sem fosfórýlera báðar þessar amínósýrur<sup>70</sup>. Því má álykta að ef týrósín er fosfórýlerað í SMAD3 próteininu af tilteknum kínasa, að þá muni fosfórýleringinn ekki eiga sér stað ef serín er komin í stöðu 226.



**Mynd 4: SMAD3 genið og nokkrar áður þekktar stökkbreytingar tengdar ósæðargúlpi í brjóstholi.** Til viðbótar eru aðrar þekktar stökkbreytingar p.Ala112Val í útröð 2, p.Asn218fs í útröð 5 og p.Glu239Lys og p.Arg279Lys í útröð 6<sup>1</sup>. Mislestursstökkbreytingin sem fannst í þessari rannsókn er í stöðu 226, á mörkum tengisvæðis og MH2. Mynd aðlöguð frá van de Laar et al., 2012<sup>2</sup>.



**Mynd 5: Týrósin og serín.** Myndin sýnir L-ísóform aminosýranna tveggja.

### 5.1.1 Áhrif á boðferil TGF-β

Þekkt er að ýmsir sjúkdómar á borð við krabbamein og líffæratrefjun (*fibrosis*) geti orsakast vegna galla í boðum TGF-β<sup>71 72</sup>. Líffæratrefjun einkennist af sjúklegri (*pathologic*) bandvefsmýndun í líffærum og er orsökina talin vera TGF-β offramleiðsla<sup>72</sup>. Í ljósi þess hvert hlutverk SMAD3 er mætti ætla að ef virkni þess sé skert munu áhrifin koma fram í skertum áhrifum TGF-β og leiði þar með til minni bandvefsmýndunar. Með öðrum orðum; mikið magn TGF-β leiðir til sjúklegrar bandvefsmýndunar (líffæratrefjun), en lítið magn TGF-β leiðir til minni bandvefsmýndunar og þar af leiðandi veikari bandvef (ósæðargúlpur). Rannsóknir á magni TGF-β í ósæðarbútum hafa leitt í ljós að magn TGF-β í vikkudum ósæðarbútum er hækkað samanborið við heilbrigða ósæðarbúta<sup>42</sup>, og hefur þetta verið útskýrt sem afturvirk viðbragð (*feedback*) við skertum TGF-β boðum. Við nánari skoðun stenst sú útskýring þó ekki, þar sem kollagen og vaxtarþáttur bandvefs (*connective tissue growth factor*, CTGF) eru merki um aukna TGF-β virkni, og mælast báðir þættir hækkaðir í vikkudum ósæðarbútum<sup>20</sup>. Þannig að, ólíkt því sem hefði mátt halda, þá er TGF-β virkni aukin í vikkudum ósæðum, samanborið við heilbrigðar ósæðar.

Ein leið til að útskýra þetta er að TGF-β hefur mismunandi boðferla til að koma áhrifum sínum fram og er talið að þessir mismunandi boðferlar hafi mismunandi áhrif á frumur<sup>73</sup>. Annars vegar er klassíski boðferillinn, sem SMAD3 er hluti af, og hins vegar eru aðrir boðferlar þar sem SMAD3 gegnir ekki hlutverki. Þekkt er að TGF-β hvetji til aukinnar tjáningu á kollageni og elastíni<sup>74 75</sup>, á sama tíma og það dregur úr niðurbroti utanfrumuefnis með aukinni tjáningu á TIMP<sup>76</sup>, og styrki þar með bandvef. Rannsóknir benda hins vegar til þess að þeir boðferlar, þar sem SMAD3 tekur engan þátt, ýti undir eyðingu utanfrumuefnis með aukinni tjáningu á MMP (Mynd 6)<sup>77</sup>.

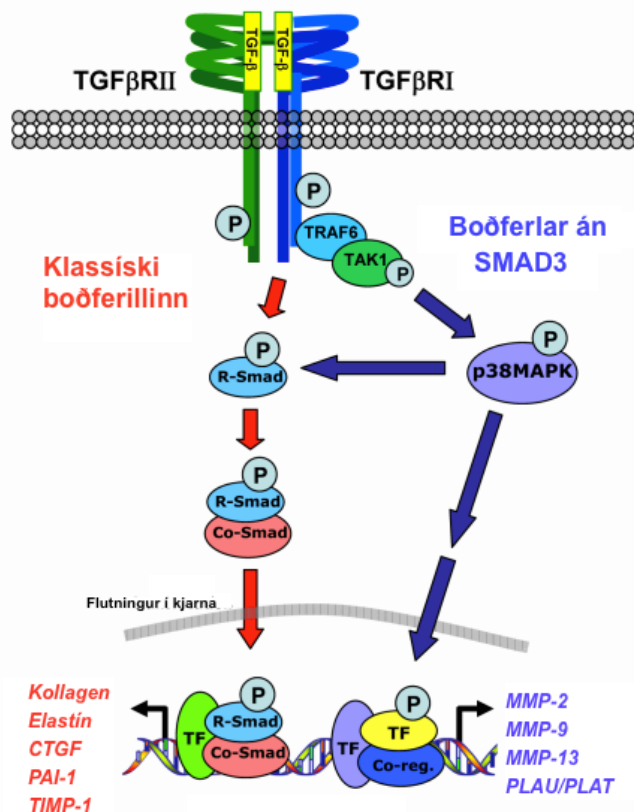
Með þetta í huga, auk stökkbreytinga í *SMAD3* og þeirrar staðreyndar að TGF- $\beta$  boð séu aukin í ósæðargúlpi, má leiða líkum að því að þessi auknu TGF- $\beta$  boð fari þá þær boðleiðir sem þarfnist ekki *SMAD3* próteinsins og að boðin leiði þar með til veikingar bandvefs.

## 5.2 Svipgerðir

Takmarkaðar upplýsingar fengust fyrir flesta þátttakendur við skoðun á sjúkraskrá á LSH. Ástæðan er ef til vill að hluta til sú að um tiltölulega unga einstaklinga var að ræða, með meðalaldur 52,6 ár, en einnig vegna þess að flestir einstaklinganna höfðu búsetu utan höfuðborgarsvæðisins.

Áhugavert er þó að bera saman meðalaldur hópanna með tilliti til þess hvort þeir hafi leitað sér þjónustu á LSH. Þeir arfberar sem hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi voru við greiningu 55 ára að meðalaldri, en þeir arfberar sem ekki hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi eru að meðaltali 9-10 árum yngri, eða 45,5 ára að meðalaldri. Meðalaldur viðmiðunarhóps var svo 58,5 ár, 13 árum hærri en meðalaldur arfbera án ósæðargúlps, en þrátt fyrir það eru nánast engar upplýsingar að finna um þessa einstaklinga í sjúkraskrá LSH. Það merkir að við höfum ekki upplýsingar til að bera hópana saman með tilliti til svipgerðar, en þetta merkir einnig að arfberar hafi frekar leitað þjónustu LSH.

Einstaklingar fá almennt ekki útskriftargreininguna ósæðargúlpur í brjóstholi á LSH nema þeir hafi farið í aðgerð eða fengið bráð einkenni ósæðargúlps. Það er mögulegt að þeir einstaklingar, bæði arfberar og ekki arfberar, sem höfðu ekki verið greindir með ósæðargúlpi á LSH, séu samt með sjúkdóminn og eru ýmist ógreindir eða hafa verið greindir á annarri heilbrigðisstofnun. Þó má nánast slá því föstu að enginn þeirra hafi farið í aðgerð vegna ósæðargúlps á Íslandi eða greinst með ósæðarflysjun. Þá var meðalaldur arfbera með þekktan ósæðargúlpi hærri við greiningu en núverandi meðalaldur þeirra arfbera sem ekki hafa verið greindir með ósæðargúlpi á LSH. Ómögulegt er að vita hvort arfberar án greiningar ósæðargúlps á LSH muni með tímanum þróa með sér ósæðargúlpi sem þarfnist aðgerðar eða muni valda bráðum einkennum.



**Mynd 6: Boðferlar TGF- $\beta$ .** Við virkjun myndar *SMAD3* samstæðu (*R-Smad* og *Co-Smad*) með öðrum *SMAD* próteínum og ferðast saman inn í kjarna frumu þar sem samstæðan binst stýrisvæði (*promoter*) gena og hefur áhrif á tjáningu þeirra. *SMAD3* tekur þátt í klassíska boðferli TGF- $\beta$ , sem leiðir til tjáningu kollagens og elastíns meðal annars. Aðrir boðferlar, án *SMAD3*, leiða til tjáningu á próteínum sem brjóta niður bandvef, líkt og *MMP*. Mynd aðlöguð frá Jones, 2010<sup>5</sup>.



Svipgerðir annarra þekktra stökkbreytinga í *SMAD3* sem tengdar eru ósæðargúlpi í brjóstholi samræmast svipgerð Loeys-Dietz heilkenni af gerð 3 (LDS3)<sup>2 45</sup>. LDS er bandvefssjúkdómur með einkenni frá æðakerfi, miðtaugakerfi og stoðkerfi sem er með fjórar undirtegundir, en LDS3 er án einkenna frá miðtaugakerfi. Helstu einkenni LDS3 eru ósæðargúlpar sem koma helst fyrir í brjóstholi (en geta einnig komið fyrir í öðrum slagæðum), hlykkjóttar slagæðar (*arterial tortuosity*) og snemmkomin slitgigt. Vegna þessa einkenna hefur LDS3 stundum nefndur slagæðagúlpa-slitgigtar heilkenni (*aneurysms-osteoarthritis syndrome, AOS*)<sup>45 78</sup>. Önnur einkenni geta meðal annars verið vítt bil milli augna, óeðlilegur gómur og/eða úfur, míturlokubakflæði, flaffótur, kviðslit og húðslit<sup>45</sup>.

Við sáum engin skýr merki þess að arfberarnir í þessari rannsókn séu með svipgerð sem samrýmist LDS3, þó svo þrír arfberar hafa einkenni bandvefssjúkdóma (slitgigt, yfirhreyfanleiki í liðum og holubrjóst). Mikilvægt er þó að hafa í huga að við erum einungis að skoða sjúkráhúsgögn frá LSH. Flestir þessara einstaklinga hafa búsetu utan höfuðborgarsvæðisins og ekki er víst að einkenni bandvefssjúkdóma væru skráð í þeim tilvikum sem þessir einstaklingar hafa leitað til LSH.

### 5.3 Styrkleikar og takmarkanir

Helstu styrkleikar rannsóknarinnar liggja í því gífurlega magni upplýsinga sem Íslensk erfðagreining hefur yfir að búa varðandi erfðaeefni og arfgerðir stórs hluta Íslendinga. Á Íslandi er einnig vel haldið utan allar skráningar, bæði tengdar heilsu, heilbrigði og sjúkdómum, og einnig ættfræðiupplýsingar.

Helstu takmarkanir rannsóknarinnar snúa að áætlun svipgerðar þeirra sem bera erfðabreytileikann sem fannst. Flestir þessara einstaklinga búa utan höfuðborgarsvæðisins og hafa ekki sótt sér þjónustu á LSH og því var litlar upplýsingar að finna í sjúkraskrá.

Einnig er vert að nefna að rannsóknarþýðið nær einungis til þeirra sem greindir hafa verið með ósæðargúlpi í brjóstholi á LSH á tímabilinu, svo rannsóknarþýðið er heldur takmarkað við hóp einstaklinga sem hafa alvarlegri sjúkdóm en þeir sem hafa verið greindir með ósæðargúlpi í brjóstholi á öðrum heilbrigðisstofnunum. Þrátt fyrir að þetta sé að vissu leyti takmarkandi þáttur í rannsókninni þá er þó styrkur í því að þetta leiðir einungis til falskt neikvæðra niðurstaðna en ekki falskt jákvæðra.

### 5.4 Ályktanir

Í þessari rannsókn fannst stökkbreyting í *SMAD3* geninu, p.Tyr226Ser, sem veldur ósæðargúlpi í brjóstholi. Við vitum ekki til þess að þessari stökkbreytingu hafi áður verið lýst í tengslum við sjúkdóminn. Nánari skoðunar er þörf til að meta svipgerð sjúkdómsins hjá þeim sem bera erfðabreytileikann.

### 5.5 Næstu skref

Í bígerð er framhaldsrannsókn sem miðar að því að ákvarða nánar svipgerð sjúkdómsins hjá arfberum stökkbreytingarinnar. Arfberar og viðmið verða boðuð í viðtal, líkamsskoðun og hjartaómun til að meta þvermál ósæðar. Ef lítil þátttaka næst, þá er mögulega hægt að fá rannsóknarleyfi til samstarfs við þær heilsugæslur og heilbrigðisstofnanir sem þessir einstaklingar tilheyra, svo unnt verði að skoða frekari sjúkraskrá.

Ef vilji er til að kanna áhrif nákvæmlega þessarar stökkbreytingar nánar, og staðfesta þar með að þetta sé stökkbreytingin sem er að valda ósæðargúlp, mætti útbúa músamódel þar sem þessi stökkbreyting er færð inn í erfðaeefni músanna með CRISPR-Cas9 tækni. CRISPR-Cas9 tæknin leyfir mönnum að hafa áhrif á erfðamengið og breyta genum á nákvæman hátt<sup>79</sup>. Þessi tækni er nákvæmari en útsláttar (*knock-out*) mýs, vegna þess að með þessari tækni má setja inn nákvæmlega þá stökkbreytingu sem við viljum kanna hver áhrifin eru af, en ekki er allt genið gert óvirkt líkt og í útsláttarmúsum.

## Heimildaskrá

1. Regalado ES, Guo DC, Villamizar C, et al. Exome sequencing identifies SMAD3 mutations as a cause of familial thoracic aortic aneurysm and dissection with intracranial and other arterial aneurysms. *Circ Res* 2011;**109**(6):680-6.
2. van de Laar IM, van der Linde D, Oei EH, et al. Phenotypic spectrum of the SMAD3-related aneurysms-osteoarthritis syndrome. *J Med Genet* 2012;**49**(1):47-57.
3. PolyPhen-2. Prediction of functional effects of human snSNPs. Má nálgast á <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml> [
4. Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6 ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
5. Jones JA, Ikonomidis JS. The pathogenesis of aortopathy in Marfan syndrome and related diseases. *Curr Cardiol Rep* 2010;**12**(2):99-107.
6. Mao SS, Ahmadi N, Shah B, et al. Normal thoracic aorta diameter on cardiac computed tomography in healthy asymptomatic adults: impact of age and gender. *Acad Radiol* 2008;**15**(7):827-34.
7. Roman MJ, Devereux RB, Kramer-Fox R, et al. Two-dimensional echocardiographic aortic root dimensions in normal children and adults. *Am J Cardiol* 1989;**64**(8):507-12.
8. Elefteriades JA, Farkas EA. Thoracic aortic aneurysm clinically pertinent controversies and uncertainties. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**(9):841-57.
9. Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* 2011;**473**(7347):308-16.
10. Sampson UK, Norman PE, Fowkes FG, et al. Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. *Glob Heart* 2014;**9**(1):159-70.
11. Olsson C, Thelin S, Stahle E, et al. Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. *Circulation* 2006;**114**(24):2611-8.
12. Clouse WD, Hallett JW, Jr., Schaff HV, et al. Improved prognosis of thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *JAMA* 1998;**280**(22):1926-9.
13. Bickerstaff LK, Pairolero PC, Hollier LH, et al. Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *Surgery* 1982;**92**(6):1103-8.
14. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9 ed: Elsevier Saunders, 2013.
15. Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA* 2000;**283**(7):897-903.
16. Geirsson A, Melvinsdóttir IH, Arnórsson Þ, et al. Outcomes of acute type A aortic dissection repairs in Iceland. *Læknabladid* 2016;**102**(2):71-76.
17. Daily PO, Trueblood HW, Stinson EB, et al. Management of Acute Aortic Dissections. *Ann Thorac Surg* 1970;**10**(3):237-47.
18. Henke PK, Williams DM, Upchurch GR, Jr., et al. Acute limb ischemia associated with type B aortic dissection: clinical relevance and therapy. *Surgery* 2006;**140**(4):532-9; discussion 39-40.
19. Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: A necropsy study of 161 cases. *The American Journal of Cardiology* 1984;**53**(6):849-55.
20. Loeyls BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 2005;**37**(3):275-81.
21. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, et al. Clinical and Genetic Features of Ehlers-Danlos Syndrome Type IV, the Vascular Type. *N Engl J Med* 2000;**342**(10):673-80.
22. Ruddy JM, Jones JA, Spinale FG, et al. Regional heterogeneity within the aorta: relevance to aneurysm disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**136**(5):1123-30.
23. Ramanath VS, Oh JK, Sundt TM, 3rd, et al. Acute aortic syndromes and thoracic aortic aneurysm. *Mayo Clin Proc* 2009;**84**(5):465-81.
24. Erbel R, Alfonso F, Boileau C, et al. Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 2001;**22**(18):1642-81.
25. Rylski B, Branchetti E, Bavaria JE, et al. Modeling of predissection aortic size in acute type A dissection: More than 90% fail to meet the guidelines for elective ascending replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;**148**(3):944-8 e1.
26. Halloran BG, Davis VA, McManus BM, et al. Localization of Aortic Disease Is Associated with Intrinsic Differences in Aortic Structure. *J Surg Res* 1995;**59**:17-22.

27. Patel MI, Melrose J, Ghosh P, et al. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms *J Vasc Surg* 1996;**24**:82-92.
28. Rabkin SW. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. *Vasa* 2014;**43**(6):433-42.
29. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997;**122**(2):264-71; discussion 71-2.
30. Coady MA, Davies RR, Roberts M, et al. Familial Patterns of Thoracic Aortic Aneurysms. *Arch Surg* 1999;**134**(4):361-67.
31. De Paepe A, Devereux R, Dietz H, et al. Revised Diagnostic Criteria for the Marfan Syndrome. *Am J Med Genet* 1996;**62**(4):417-26.
32. Einarsson EÖ, Danielsen R, Sigurdsson H, et al. Marfans heilkenni á Íslandi. *Læknablaðið* 1996;**82**(8):557-62.
33. Silverman DI, Burton KJ, Gray J, et al. Life Expectancy in the Marfan Syndrome. *The American Journal of Cardiology* 1995;**75**:157-60.
34. Pyeritz RE, Loeys B. The 8th international research symposium on the Marfan syndrome and related conditions. *Am J Med Genet A* 2012;**158A**(1):42-9.
35. Milewicz DM, Michael K, Fisher N, et al. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 1996;**94**(11):2708-11.
36. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* 2003;**278**(4):2750-7.
37. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al. Ehlers-Danlos Syndromes: Revised Nosology, Villefranche, 1997. *Am J Med Genet* 1998;**77**:31-37.
38. Guðmundsdóttir SÁ, Möller PH, Arngrímsson R. Ehlers-Danlos-heilkenni af gerð IV. Sjúkratilfelli og sjúkdómseinkenni. *Læknablaðið* 2012;**98**:355-59.
39. Yoo EH, Choi SH, Jang SY, et al. Clinical, Pathological, and Genetic Analysis of a Korean Family with Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Carrying a Novel Asp26Tyr Mutation. *Ann Clin Lab Sci* 2010;**40**(3):278-84.
40. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, et al. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 2006;**38**(3):343-9.
41. Guo DC, Regalado E, Casteel DE, et al. Recurrent gain-of-function mutation in PRKG1 causes thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections. *Am J Hum Genet* 2013;**93**(2):398-404.
42. Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, et al. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet* 2012;**44**(8):922-7.
43. Bertoli-Avella AM, Gillis E, Morisaki H, et al. Mutations in a TGF-beta ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J Am Coll Cardiol* 2015;**65**(13):1324-36.
44. Tran-Fadulu V, Pannu H, Kim DH, et al. Analysis of multigenerational families with thoracic aortic aneurysms and dissections due to TGFB1 or TGFB2 mutations. *J Med Genet* 2009;**46**(9):607-13.
45. van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, et al. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet* 2011;**43**(2):121-6.
46. Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, et al. Mutations in the TGF-beta repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat Genet* 2012;**44**(11):1249-54.
47. de Wit MC, Kros JM, Halley DJ, et al. Filamin A mutation, a common cause for periventricular heterotopia, aneurysms and cardiac defects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;**80**(4):426-8.
48. MacCarrick G, Black JH, 3rd, Bowdin S, et al. Loeys-Dietz syndrome: a primer for diagnosis and management. *Genet Med* 2014;**16**(8):576-87.
49. Williams JA, Loeys BL, Nwakanma LU, et al. Early surgical experience with Loeys-Dietz: a new syndrome of aggressive thoracic aortic aneurysm disease. *Ann Thorac Surg* 2007;**83**(2):S757-63; discussion S85-90.
50. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;**171**:737-38.
51. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;**74**(12):5463-67.
52. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986;**321**:674-79.
53. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;**26**(10):1135-45.

54. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;**431**:931-45.
55. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**(45):19096-101.
56. International HapMap C. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;**437**(7063):1299-320.
57. Gudbjartsson DF, Helgason H, Gudjonsson SA, et al. Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population. *Nat Genet* 2015;**47**(5):435-44.
58. Kilpinen H, Barrett JC. How next-generation sequencing is transforming complex disease genetics. *Trends Genet* 2013;**29**(1):23-30.
59. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;**461**(7265):747-53.
60. Lög um landlækni og lýðheilsu nr. 41/2007.
61. Íslensk erfðagreining [Available from: <http://www.decode.is>.
62. Skúlason F, erfðagreining Í. Íslendingabók [Available from: <http://islandingabok.is>.
63. Holm S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979;**6**(2):65-70.
64. Sveinbjornsson G, Albrechtsen A, Zink F, et al. Weighting sequence variants based on their annotation increases power of whole-genome association studies. *Nat Genet* 2016;**48**(3):314-7.
65. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Má nálgast á <http://www.R-project.org/>.
66. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal* 2000;**19**(8):1745-54.
67. Wang G, Long J, Matsuura I, et al. The Smad3 linker region contains a transcriptional activation domain. *Biochem J* 2005;**386**(1):29-34.
68. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: D204-D212. Síðast sótt 16. apríl 2016. Má nálgast á <http://www.uniprot.org>.
69. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Síðast sótt 16. apríl 2016. Má nálgast á <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.
70. Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J* 1995;**9**:1255-66.
71. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- $\beta$  signaling in cancer - a double edged sword. *Trends Cell Biol* 2001;**11**(11):44-51.
72. Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor beta in Tissue Fibrosis. *N Engl J Med* 1994;**331**(19):1286-92.
73. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005;**118**(Pt 16):3573-84.
74. Rozen-Zvi B, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF-beta/Smad3 activates mammalian target of rapamycin complex-1 to promote collagen production by increasing HIF-1 $\alpha$  expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;**305**(4):F485-94.
75. Kuang PP, Zhang XH, Rich CB, et al. Activation of elastin transcription by transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**292**(4):L944-52.
76. Leivonen SK, Lazaridis K, Decock J, et al. TGF-beta-elicited induction of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 expression in fibroblasts involves complex interplay between Smad3, p38 $\alpha$ , and ERK1/2. *PLoS One* 2013;**8**(2):e57474.
77. Jones JA, Spinale FG, Ikonomidis JS. Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. *J Vasc Res* 2009;**46**(2):119-37.
78. van der Linde D, van de Laar IM, Bertoli-Avella AM, et al. Aggressive cardiovascular phenotype of aneurysms-osteoarthritis syndrome caused by pathogenic SMAD3 variants. *J Am Coll Cardiol* 2012;**60**(5):397-403.
79. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;**157**(6):1262-78.