

Academiejaar 2011 - 2012

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE
OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Eva DE VILDER

Promotor: Prof. Dr. A. De Paepe
Co-promotor: Dr. O. Vanakker

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER IN DE GENEESKUNDE

Academiejaar 2011 - 2012

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE
OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Eva DE VILDER

Promotor: Prof. Dr. A. De Paepe
Co-promotor: Dr. O. Vanakker

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER IN DE GENEESKUNDE

VOORWOORD

“Gezien de grote variabiliteit die er bestaat in het fenotype van PXE, ook tussen patiënten met dezelfde ABCC6 mutaties, wordt aangenomen dat er andere genen betrokken zijn in het reguleren van de ernst van het fenotype, zgn. regulerende of modifier genen. De identificatie van dergelijke genen en het aantonen dat er een klinisch relevant verband bestaat met de ernst van één van de symptomen of het natuurlijke verloop van de ziekte, zou een belangrijke bijdrage leveren tot de dagdagelijkse klinische opvang van deze patiënten.”

Na het lezen van deze paragraaf in de informatiebrochure van de thesisonderwerpen in de 3^{de} bachelor, was ik volledig overtuigd om dit masterproefonderwerp het mijne te maken. Het oog is een belangrijk zintuig, een instrument om de omgeving waar te nemen en de wereld te ontdekken en het heeft mij altijd sterk geïnteresseerd, waarschijnlijk mede omdat ikzelf ook eigenaar ben van een brilmontuur en contactlenzen. Ik vond het dan ook enorm erg dat een PXE-patiënt niet weet hoe snel zijn oogcomplicaties zullen verergeren, of hij al dan niet blind zal worden en hoe snel dit dan zal gaan. Ik kon dan ook niet wachten om hierin verandering te brengen en groot was mijn geluk toen ik aan dit project kon beginnen om antwoorden te vinden op de onvermijdelijke vraag van patiënten: “En dokter, hoe gaat dit nu verder gaan? Ik ga toch niet blind worden?”, want als arts moeten zeggen dat we dat eigenlijk niet weten, kan ik niet aanvaarden.

Antwoorden vinden, is iets wat mij al mijn hele leven boeit. Al in de middelbare school was dit mijn drijfveer. Waren het nu ingewikkelde differentiaalvergelijkingen bij wiskunde of een van Cicero's redevoeringen bij Latijn, telkens werd mijn geest geprikkeld om het correcte antwoord te vinden en liet ik mij niet afschepen vooraleer ik hierin was geslaagd. Daarbij heb ik geluk gehad. In het middelbaar onderwijs hebben extreem gemotiveerde wetenschapsleraars mij hun kennis overgebracht en het zijn zij die me hebben geleerd om kritisch na te denken, om stil te staan bij het hoe en het waarom, en om zeker geen genoegen te nemen met een halve waarheid.

Zo ook geldt dit voor mijn (co-) promotor dr. O. Vanakker. Hij gaf mij de mogelijkheid om mijn eerste stappen te zetten in het wetenschappelijk onderzoek en liet mij hierbij veel vrijheid om alles zelf te ontdekken. Vanaf het eerste gesprek kon ik altijd bij hem terecht en geen enkele vraag was hem te veel. Dr. Vanakker deed me stilstaan bij de stappen die ik nam en de woorden die ik neerpende en deed mij zo steeds kritisch nadenken over mijn handelen.

Bedankt om mij de kans te geven dit onderzoek te doen en om mij in te wijden in de wondere wereld van het wetenschappelijk onderzoek en de genetica. Bedankt voor uw kennis, enthousiasme, oprechte interesse en uw kritisch inzicht. Ik vond het een privilege u als begeleider te hebben gehad.

De praktische uitwerking van deze masterproef was er een vol ups en downs en veel dank ben ik dan ook verschuldigd aan de medewerkers van het CMGG, met in het bijzonder Lynn Demuynck, bij wie ik altijd terecht kon voor praktische vragen en problemen. Zij leidde mij door het doolhof van PCRs, sequenering en SeqScape. Een welgemeende merci daarvoor!

Ook Petra Van Acker wil ik bedanken die mij hielp toen SeqScape crashte en ik zo dicht tegen de eindstreep mijn gegevens niet meer terugvond. Bedankt om mij te behoeden van een zenuwinzinking.

Verder wil ik mijn familie bedanken die mij liet uitrazen wanneer weer eens een reactie mislukte of de tekstverwerker van mijn laptop vastliep.

Een woord van dank, of misschien beter een boek van dank, ben ik verschuldigd aan Igor, die mijn masterproef kritisch beoordeelde en dit vanaf de eerste letter tot het laatste punt. Bedankt, zelfs al ben je geen echte arts maar slechts een “dr.” in de ingenieurswetenschappen ;-).

Tenslotte wil ik graag mijn vrienden bedanken voor alle mentale steun. Bedankt voor jullie luisterbereidheid en voor de plezante momenten tijdens de les (jullie weten waarover ik het heb!).

Al degenen die mij geholpen hebben en die ik hier onvermijdelijk ben vergeten te vermelden, mijn excuses en bedankt voor jullie hulp!

En nu wordt het tijd dat u, beste lezer, begint aan de ontdekking van mijn masterproef. Ik hoop dat u er net zoveel plezier aan beleeft als ik heb gehad de voorbije 2 jaar. U zal merken dat genetica een gebied is dat nog lang niet volledig ontgonnen is en dat er voor goudzoekers nog heel wat te vinden is.

Veel leesplezier!

INHOUDSTAFEL

VOORWOORD	I
INHOUDSTAFEL	III
AFBEELDINGEN	VI
TABELLEN	VII
AFKORTINGEN	VIII
ABSTRACT	1
1 INLEIDING	2
1.1 HISTORIEK	3
1.2 EPIDEMIOLOGIE	4
1.3 SYMPTOMEN	4
1.3.1 ELASTINE EN ELASTINEVEZELS	4
1.3.2 HUID	6
1.3.2.1 Kliniek	6
Histologie en pathogenese	7
1.3.2.2	7
1.3.3 OGEN	8
1.3.3.1 Kliniek	8
1.3.3.2 Histologie en pathogenese	11
1.3.4 CARDIOVASCULAIR STELSEL	12
1.3.4.1 Kliniek	12
1.3.4.2 Histologie en pathogenese	12
1.3.5 ORGAANCALCIFICATIES	13
1.4 PXE EN ZWANGERSCHAP	13
1.5 CORRELATIE MET HEMOGLOBINOPATHIEËN	13
1.6 DIAGNOSE	14
1.7 BEHANDELING EN PREVENTIE	14
1.7.1 PREVENTIE	15
1.7.2 BEHANDELING	16

1.8	GENETISCHE ACHTERGROND VAN PXE	17
1.8.1	HET ATP-BINDING CASSETTE, SUBCLASS C, MEMBER 6 GEN (<i>ABCC6</i> ; OMIM*603234)	18
1.8.2	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A (<i>VEGFA</i> ; OMIM+192240)	20
1.8.3	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS	21
2	METHODOLOGIE	23
2.1	PATIËNTENPOPULATIE	23
2.2	DNA	24
2.3	SELECTIE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs)	24
2.4	REFERENTIESEQUENTIE EN ONTWIKKELING VAN PRIMERS	25
2.5	TECHNIEKEN	27
2.5.1	CONCENTRATIEMETING	27
2.5.1.1	Doel	27
2.5.1.2	Principe	27
2.5.1.3	Materialen	28
2.5.2	POLYMERASE CHAIN REACTION (POLYMERASE KETTING REACTIE OF PCR)	28
2.5.2.1	Doel	28
2.5.2.2	Principe	29
2.5.2.3	Samenstelling PCR-mengsel	29
2.5.2.4	PCR-programma	30
2.5.2.5	Optimalisatie	31
2.5.3	SEQUENCERING	31
2.5.3.1	Doel	31
2.5.3.2	Principe	32
2.5.3.3	Materialen	32
2.6	SEQUENTIE-ANALYSE	33
2.7	STATISTISCHE ANALYSE	33
3	RESULTATEN	35
3.1	PATIËNTEN	35
	FREQUENTIE VAN DE BESTUDEERDE	35
3.2	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS	35
3.2.1	VARIANTEN GELEGEN IN DE PROMOTORREGIO	36
3.2.1.1	p.(A-1564C) (rs699947)	36
3.2.1.2	p.(C-467T) (rs833061)	37
3.2.1.3	p.(T-424C) (rs833062), p.(C-179A) (rs59260042) en p.(C-172T) (rs79469752)	37

3.2.1.4	p.(C-167T) (geen rs-nummer)	37
3.2.1.5	p.(A-159G) (rs13207351)	38
3.2.1.6	p.(A-148G) (rs28357093)	38
3.2.1.7	p.(A-123G) (rs1570360)	39
3.2.1.8	c.-254_-255delAG	39
3.2.2	VARIANTEN GELEGEN IN DE INTRONENREGIO	40
3.2.2.1	p.(T2726C) (rs1413711)	40
3.2.2.2	p.(C6669T) (rs735286)	41
3.2.2.3	p.(C7143A) (rs2146323)	41
3.2.2.4	p.(C11158T) (rs3025020)	42
3.2.2.5	p.(T11211C) (rs3025021)	42
3.2.2.6	p.(C11561T) (rs3025024)	43
3.2.3	VARIANTEN GELEGEN IN DE CODERENDE REGIO	43
3.2.3.1	p.(C1031T) (rs25648)	43
3.2.4	VARIANTEN GELEGEN IN DE 5'-UTR-REGIO	44
3.2.4.1	p.(C398G) (rs2010963)	44
3.2.5	VARIANTEN GELEGEN IN DE 3'-UTR-REGIO	44
3.2.5.1	p.(C14584T) (rs3025039)	44
3.2.5.2	p.(C15099T) (rs3025040)	45

4 DISCUSSIE **46**

CONCLUSIE **52**

5 REFERENTIELIJST **53**

BIJLAGE 1 PROTOCOLS

BIJLAGE 2 OVERZICHT RESULTATEN VAN DE STATISTISCHE TESTEN

BIJLAGE 3 SCREENSHOTS SEQSCAPE

BIJLAGE 4 TOELATING VOOR HET GEBRUIK VAN FIGUREN UIT WETENSCHAPPELIJKE ARTIKELS

AFBEELDINGEN

AFBEELDING 1. ELASTINOGENESE	5
AFBEELDING 2. CONFLUERENDE PLAQUES VAN PAPELS IN DE NEK VAN EEN PXE PATIËNT	6
AFBEELDING 3. KARAKTERISTIEKEN VAN DE OOGFUNDUS VAN 2 PXE PATIËNTEN	9
AFBEELDING 5. KAART VOOR UITVOEREN VAN DE AMSLERTEST..	15
AFBEELDING 6. SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE ABCC6 TRANSPORTER	19
AFBEELDING 7. STRUCTURELE OPBOUW VAN HET <i>VEGFA</i> GEN.....	21
AFBEELDING 8. EXPONENTIEEL VERLOOP VAN EEN PCR-REACTIE	29
AFBEELDING 9. PRINCIPE VAN SANGERSEQUENERING	32
AFBEELDING 10. OVERZICHT VAN DE ONDERZOCHE SNPs IN HET <i>VEGFA</i> GEN.....	36
AFBEELDING 11. ELEKTROFEROGRAM VAN C.-254_-255DELTA G.....	40

TABELLEN

TABEL 1. DIFFERENTIAAL DIAGNOSE VAN AANDOENINGEN DIE MACROSCOPISCHE HUIDLETSELS VERTONEN ZOALS BIJ PXE...7	
TABEL 2. DIFFERENTIAAL DIAGNOSE VAN AS.....9	9
TABEL 3. OVERZICHT VAN MINDER FREQUENTE OOGMANIFESTATIES BIJ PXE..... 10	10
TABEL 4. MENDELIAANSE OVERERVING VAN EEN RECESSIEF FENOTYPE 18	18
TABEL 5. DEMOGRAFISCHE KARAKTERISTIEKEN VAN DE STUDIECOHORTE 23	23
TABEL 6. OVERZICHT VAN DE BESTUDEERDE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS..... 24	24
TABEL 7. OVERZICHT VAN DE GEBRUIKTE PRIMERSEQUENTIES..... 26	26
TABEL 8. OVERZICHT VAN DE GEBRUIKTE PCR-CONDITIES 30	30
TABEL 9. GEBRUIK VAN DE 2X2-TABEL BIJ DE FISCHERS EXACTTEST 33	33
TABEL 10. INDELING VAN DE PATIËNTEN VOLGENS DE ERNST VAN HET OCULAIRE FENOTYPE 35	35
TABEL 11. OVERZICHT P-WAARDEN RS699947..... 36	36
TABEL 12. OVERZICHT P-WAARDEN RS833061..... 37	37
TABEL 13. OVERZICHT P-WAARDEN RS833062, RS59260042, RS79469752 37	37
TABEL 14. OVERZICHT P-WAARDEN P.(C-167T)..... 38	38
TABEL 15. OVERZICHT P-WAARDEN RS13207351 38	38
TABEL 16. OVERZICHT P-WAARDEN RS28357093..... 39	39
TABEL 17. OVERZICHT P-WAARDEN RS1570360..... 39	39
TABEL 18. OVERZICHT P-WAARDEN RS1413711..... 41	41
TABEL 19. OVERZICHT P-WAARDEN RS735286..... 41	41
TABEL 20. OVERZICHT P-WAARDEN RS2146323..... 42	42
TABEL 21. OVERZICHT P-WAARDEN RS3025020..... 42	42
TABEL 22. OVERZICHT P-WAARDEN RS3025021..... 42	42
TABEL 23. OVERZICHT P-WAARDEN RS3025024..... 43	43
TABEL 24. OVERZICHT P-WAARDEN RS25648..... 43	43
TABEL 25. OVERZICHT P-WAARDEN RS2010963..... 44	44
TABEL 26. OVERZICHT P-WAARDEN RS3025039..... 44	44
TABEL 27. OVERZICHT P-WAARDEN RS3025040..... 45	45

AFKORTINGEN

A.	Arteria
ABCC6	ATP-binding Cassette, Subclass C, member 6 gen
AMD	Age-related Macula Degeneration; leeftijdsgebonden maculadegeneratie
AP	Antarctic Phosphatase
AS	Angioid Streak; angioïde streep
AT-gehalte	Gehalte aan adenine en thymine
ATP	Adenosinetriofosfaat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CaCO ₃	Calciumcarbonaat
CaHPO ₄	Calciumwaterstoffosfaat
CHU Angers	Centre Hospitalier Universitaire d'Angers
CMGG	Centrum voor Medische Genetica Gent
CNV	Choroidale Neovascularisatie
ddNTP	Dideoxynucleotidetriofosfaat
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	Deoxyribonucleotidetriofosfaat
DR	Diabetische Retinopathie
ECM	Extracellulaire Matrix
EDTA	Ethyleendiaminetetraazijnzuur
ERG	Electroretinogram
GC-gehalte	Gehalte aan guanine en cytosine
GC-rijk	Rijk aan guanine en cytosine
GSU	Genetic Service Unit
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
kb	Kilobasenparen (1000 basenparen)
kD	Kilodalton; de dalton is de atomaire massa-eenheid
LOX	Lysyl Oxidase
MgCl ₂	Magnesiumdichloride
mRNA	Messenger Ribonucleïnezuur
NFE2	Nuclear factor erythroid 2, p45 subunit
NSAID	Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug; Niet-Steroïdale Anti-inflammatoire medicatie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerase kettingreactie
PDGF	Platelet-derived Growth Factor

PXE	Pseudoxanthoma Elasticum
RPE	Retinaal Pigmentepitheel
RR	Ready Reaction Mix
Rs	Reference SNP
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	Single-stranded Deoxyribonucleic acid, enkelstrengig desoxyribonucleïnezuur
TD-principe	Touchdown-principe
UTR	Untranslated region
VE-statin/egf17	Vascular Endothelial Statin/Epidermal Growth Factor-like 7
VEGF(A)	Vascular Endothelial Growth Factor (A)
VEGFR-1 en 2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 en 2

ABSTRACT

Doel: Pseudoxanthoma Elasticum (PXE; OMIM#264800) is een zeldzame, autosomaal recessieve ziekte van de extracellulaire matrix (ECM). PXE wordt veroorzaakt door verkalking en fragmentatie van de elastinevezels in de ECM, resulterend in symptomen welke voornamelijk de huid, de ogen en het cardiovasculair stelsel treffen. Tot op heden bestaat er geen curatieve behandeling voor PXE.

PXE wordt gekenmerkt door een grote fenotypische variabiliteit en de causale PXE mutaties – gelegen in het *ABCC6* gen - kunnen deze variabiliteit niet verklaren. Om deze reden wordt aangenomen dat o.a. modifier genen een rol spelen in de ontwikkeling van symptomen. Een van de genen die hierbij betrokken wordt geacht, is het *VEGFA* gen, coderend voor Vasculaire Endotheliale Groeifactor en reeds eerder beschreven bij proliferatieve retinopathieën zoals ook bij PXE. De doelstelling van deze masterproef was om genotype-fenotypecorrelaties te identificeren en/of te confirmeren tussen varianten in het *VEGFA* gen en de oculaire symptomen bij PXE patiënten, waarbij werd toegespitst op de vraag of één of meerdere van deze varianten gebruikt kunnen worden in de counseling van PXE patiënten en in hun medische opvolging.

Methoden: Zesenzestig patiënten met een klinische, histologische en moleculaire diagnose van PXE werden gescreend op de aanwezigheid van 19 SNPs in het *VEGFA* gen, aan de hand van directe sequencing van de coderende regio, intronen en promotorregio. De patiënten werden ingedeeld in een groep met ernstige of milde retinopathie o.b.v. visus (enerzijds indeling o.b.v. literatuur: unilaterale visus < 10/10 is ernstige retinopathie en anderzijds indeling o.b.v. functionele impact: ernstig bij een visus < 5/10 unilateraal) alsook o.b.v. visus en anti-VEGF behandelingen (ernstige retinopathie indien meerdere anti-VEGF behandelingen noodzakelijk).

Resultaten: Er werd voor 4 SNPs een significant verband gevonden met de ernstige PXE-retinopathie wanneer rekening wordt gehouden met de anti-VEGF therapiestatus, 3 ervan, i.e. -1564C (rs699947; $p_{\text{tweezijdig}} = 0,014$), -467T (rs833061; $p_{\text{twee}} = 0,014$) en -159G (rs13207351; $p_{\text{tweez}} = 0,0079$), bevinden zich in de promotorregio en 2726C (rs1413711; $p_{\text{tweez}} = 0,0085$.) bevindt zich in intron 1-2. Promotorvariant -148G werd significant meer aangetroffen in de totale cohorte wanneer werd ingedeeld louter gebaseerd op visus². In de Belgische subcohorte volgen de resultaten dezelfde trend en werd nog 1 extra SNP significant bevonden, i.e. rs25648 gelegen in exon 1. In de Franse subcohorte werden geen significante resultaten weerhouden.

Conclusie: Deze studie bevestigt de rol van *VEGFA* als modifier gen voor de oogsymptomen bij PXE. Van vier SNPs kon worden aangetoond dat zij gecorreleerd zijn met een ernstigere PXE-retinopathie. Als belangrijke klinische implicatie noteren we dat een ernstige retinopathie hier kan gedefinieerd worden als enerzijds een visusdaling met belangrijke impact op het dagelijks functioneren doch anderzijds ook als een belangrijke nood aan anti-VEGF therapie met behoud van visus. Dit zou betekenen dat dragers van één of meerdere van deze SNPs nog strikter oftalmologisch dienen gevolgd te worden dan reeds het geval is voor PXE patiënten, en dat nog meer de nood aan zelfcontrole dient benadrukt te worden. De uiteindelijke impact van dergelijke aanbevelingen zal via prospectief onderzoek geëvalueerd moeten worden.

1 INLEIDING

Pseudoxanthoma Elasticum (PXE; OMIM#264800) is een zeldzame, autosomaal recessieve ziekte van de extracellulaire matrix (ECM) (1). De aandoening wordt veroorzaakt door verkalking en fragmentatie van de elastinevezels in de ECM, resulterend in symptomen welke voornamelijk de huid, de ogen en het cardiovasculair stelsel treffen (2).

Tot op heden bestaat er geen curatieve therapie voor PXE, doch is symptomatische behandeling van de verschillende complicaties mogelijk. Derhalve is een vroegtijdige diagnose noodzakelijk om een goede opvolging mogelijk te maken en om complicaties te voorkomen of vroegtijdig te detecteren en hun impact zo minimaal mogelijk te houden (3). Oogcomplicaties, waaronder neovascularisatie en retinale bloedingen, worden door middel van zelfonderzoek en regelmatige oftalmologische controles opgespoord en de evolutie ervan kan sterk worden geremd met anti-angiogenetische medicatie (cf. infra) (4). Voor de cardiovasculaire complicaties worden preventieve maatregelen aangehouden met het onder controle houden van cardiovasculaire risicofactoren en behandeling via heelkundige of interventioneel-radiologische ingrepen (5, 6). Wat de huidsymptomen betreft, zijn er slechts weinig therapeutische opties. Plastische heelkunde kan in sommige gevallen worden aangewend bij storende huidletsels, hoewel de evidentie voor dergelijke ingrepen beperkt is (7-9).

Een belangrijke mijlpaal in het ontrafelen van de pathogenese van PXE was de ontdekking van de relatie tussen PXE en mutaties in het *ABCC6* gen (ATP-binding Cassette, Subclass C, member 6; OMIM*603234) (10, 11). Op heden zijn reeds meer dan 300 mutaties gekend in dit gen en bij 66-97% van de PXE patiënten kan een *ABCC6* mutatie worden aangetroffen op beide allelen (3, 12-14). De precieze functie van het *ABCC6* gen is nog niet volledig opgehelderd, doch het is gekend dat het een transporteiwit is dat unidirectioneel transport verzorgt van intracellulair naar extracellulair (15). De *ABCC6* transporter komt voornamelijk tot expressie in de lever en de nieren en dus niet ter hoogte van de orgaanstelsels die het meest door PXE worden getroffen (16). Er zijn meerdere hypothesen omtrent het verband tussen de mutaties en het ontstaan van het ziektebeeld maar tot op heden is geen eenduidige verklaring gevonden (3).

PXE kent een zeer grote klinische variabiliteit en hoewel *ABCC6* mutaties een duidelijk verband vertonen met het ontstaan van PXE, lijken zij geen correlatie te vertonen met de ernst of progressie van het ziektebeeld (1). Dit is bijzonder frustrerend, zowel voor patiënt als arts, aangezien niet kan voorspeld worden of en wanneer welke symptomen zullen ontstaan en hoe ernstig deze symptomen zullen zijn. Er wordt aangenomen dat andere elementen, waaronder omgevingsfactoren, voeding en

modifier genen (zgn. modifiers), ook een belangrijke rol spelen in de evolutie van de PXE symptomen (2).

Deze masterproef deed onderzoek naar de rol van het *VEGFA* gen (Vascular Endothelial Growth Factor A gen; OMIM+192240) bij de oogsymptomen van PXE. De rationale hiervoor ligt in het feit dat varianten in dit gen in het verleden reeds werden vastgesteld bij oogaandoeningen met gelijkaardige manifestaties, i.e. diabetische retinopathie (DR) en leeftijdsgebonden maculadegeneratie (AMD) (17, 18). Zarbock et al. deden reeds onderzoek naar het effect van genetische defecten in het *VEGFA* gen en concludeerden dat deze mogelijks een rol zouden kunnen spelen in het ontstaan van oculaire manifestaties bij PXE (18). Sindsdien zijn er geen onafhankelijke studies geweest om deze hypothese te bevestigen of – vanuit klinisch oogpunt – het praktische nut om *VEGFA* SNPs in PXE te bepalen te evalueren.

De doelstelling van deze masterproef was enerzijds om na te gaan of de rol van het *VEGFA* gen als modifier voor de oogsymptomen bij PXE kon worden bevestigd in een onafhankelijke cohorte. Anderzijds werd geëvalueerd of - indien er aanwijzingen waren voor een modifierend effect - de moleculaire analyse van het *VEGFA* gen kan geïmplementeerd worden in de klinische praktijk en wat de mogelijke implicaties hiervan zouden zijn.

1.1 Historiek

De dermatologische symptomen van PXE werden voor het eerst beschreven in 1881 door de Franse dermatoloog **Rigal** (19). Het was echter Ferdinand-Jean **Darier**, eveneens Frans dermatoloog, die het ziektebeeld in 1896 zijn huidige naam gaf. Hij probeerde de klinische bevindingen te differentiëren van de reeds gekende Xanthomata (20). De typische oculaire symptomen, de angioïde strepen, werden voor het eerst beschreven in 1889 en 1891 door respectievelijk de Engelse oftalmoloog **Dojne** en de Duitse oogarts **Plange** (4). Het was de Amerikaanse oogarts Hermann **Knap**, die de term ‘angioïd streak’ introduceerde in 1892 (21). In 1929 werd het eponiem ‘Gröenblad-Strandberg syndroom’ geïntroduceerd door 2 Zweedse artsen, respectievelijk oftalmoloog Ester **Gröenblad** en dermatoloog James **Strandberg**. Zij waren ook de eersten die de link tussen de oog- en huidsymptomen legden (22). Aan het einde van de jaren dertig en in de jaren veertig werd ook onderzoek gedaan naar cardiovasculaire symptomen bij PXE (23). **Carlborg** publiceerde in 1944 een onderzoek naar de aanwezigheid van cardiovasculaire elastische calcificatie bij PXE (24). Men kon aantonen dat de veranderingen die optraden in de vaatwand berustten op hetzelfde principe van elastinenetwerkdysfunctie als de cutane en oculaire symptomen. **Böck** en **Touraine** waren de eersten die deze associatie publiceerden (23).

1.2 Epidemiologie

De prevalentie van PXE wordt geschat tussen 1/25.000 en 1/100.000 (4), hoewel dit aantal hoger kan liggen gezien het variabele klinische karakter van het ziektebeeld; bovendien wordt PXE – gezien de zeldzaamheid niet steeds goed gekend als entiteit – niet altijd als dusdanig herkend (25). Dit is dan ook de reden waarom er vaak een belangrijke tijdsperiode is tussen de leeftijd bij het begin van de symptomen en de leeftijd bij diagnose (4). Vrouwen worden dubbel zo vaak getroffen door PXE dan mannen en de manifestaties zouden ook ernstiger zijn (24, 26). Een verklaring hiervoor is tot op heden niet gekend.

Met de huidige prevalentieschattingen kan via het Hardy-Weinbergequilibrium worden berekend dat 1,25% van de populatie heterozygoot is, wat overeenkomt met 1 op 80 individuen in de algemene bevolking (2, 4). In Zuid-Afrika komt een bepaalde mutatie in het causale gen veel meer voor, i.e. p.(R1339C), wat het gevolg kan zijn van een founder effect (cf. infra) (27).

1.3 Symptomen

PXE wordt gekenmerkt door fragmentatie en calcificatie van de elastinevezels in de ECM. Dit resulteert in aantasting van de huid, de ogen en het cardiovasculaire stelsel (28). Verder kunnen ook calcificaties optreden in de abdominale organen, borsten en testikels (29). Deze manifestaties kennen zowel inter- als intrafamiliaal een uiterst variabel karakter (13). Hoewel het verminderen van de visus, de huidletsels en de versnelde atherosclerose en andere complicaties een belangrijke morbiditeit met zich meebrengen, is de levensverwachting van PXE patiënten in de meeste gevallen normaal (25).

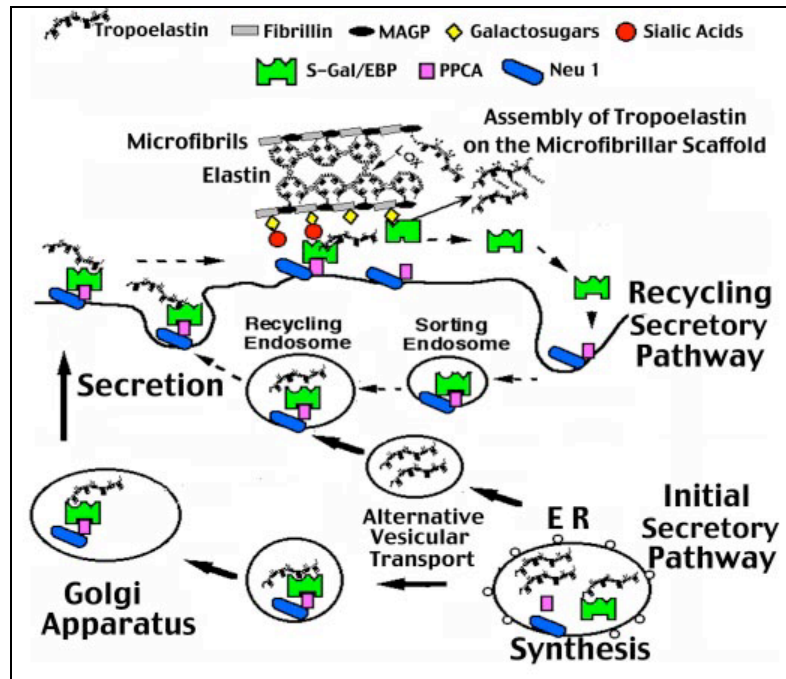
1.3.1 Elastine en elastinevezels

Mature elastinevezels bestaan voornamelijk uit **elastine en fibrillines**. De synthese van elastinevezels is een uiterst complex proces dat voornamelijk plaatsvindt tijdens de vroege, perinatale ontwikkeling. Op volwassen leeftijd is de turnover laag (25, 30).

Fibrilline wordt intracellulair aangemaakt via een precursor, profibrilline, die na secretie door de fibroblast in de ECM verder wordt verwerkt via N- en C-terminale modificaties. Vervolgens worden pericellulair de eigenlijke microfibrillen gevormd, waarbij een nauwe interactie van de fibrillines met heparine, heparansulfaat en fibronectine kritisch is. Microfibrillen bevatten naast fibrilline nog 2 microfibril geassocieerde proteïnen en organiseren zich in bundels (25, 30).

Het elastine, dat voornamelijk uit glycine, proline en hydrofobe aminozuren bestaat (31), wordt ook intracellulair gesynthetiseerd via een precursor, het tropo-elastine, dat als dusdanig wordt gesecreteerd naar extracellulair en aggregeert aan het celoppervlak. Vervolgens wordt het tropo-elastine getransfereerd op het microfibrilskelet en wordt het tropo-elastine omgezet tot de mature,

gecrosslinkte vorm. Lysyl oxidase (LOX) en gelijkaardige “LOX-like” enzymen, treden in dit proces op als mediator (30). **Crosslinking** van de individuele elastinepolypeptiden gebeurt aan de hand van zogenaamde crosslinks zoals de desmosines, afgeleid van lysine (31). Zo ontstaat het mature elastinepolymeer. Tot slot van de elastinevezelsynthese treedt crosslinking op tussen de beide structuren (30). Afbeelding 1 toont een overzicht van de elastinogenese.



Afbeelding 1. Elastinogenese. De elastinogenese start in het endoplasmatisch reticulum, waar de precursorcellen tropo-elastine en profibrilline worden aangemaakt. Deze stoffen worden vervolgens naar het celmembraan gebracht waar secretie optreedt. Aan de extracellulaire zijde van het celmembraan gebeurt de volgende stap van de elastinogenese, m.n. het plaatsen van het elastine op het microfibrilskelet. De andere afgebeelde moleculen spelen ook een rol in het complexe productieproces waarop niet verder zal worden ingegaan (32).

In de mature elastinevezel bevinden de elastinemoleculen zich in het centrum en nemen ze meer dan 90% van het volume van de vezel in. Microfibrillen bevinden zich voornamelijk aan de buitenkant van de elastinevezel en kunnen daar interageren met cellulaire integrines (30).

Er zijn 3 gekende fibrillines die afzonderlijk tot expressie komen in plaats en tijd. Fibrilline-2 komt voornamelijk voor in de vroege ontwikkeling, terwijl fibrilline-1 de belangrijkste vorm is in matuur weefsel (30).

Hoe de regulatie van de elastinogenese exact verloopt, is nog onvoldoende opgehelderd. Lelièvre et al. stelden een model voor de regulatie van de LOX-gemedieerde crosslinking van de elastinemonomeren in de vaatwand voor. Dit model werd ontwikkeld via muismodellen en in vitro-experimenten en het houdt in dat het *VE-statin/egfl7* gen (Vascular Endothelial Statin/Epidermal Growth Factor-like 7;

OMIM*608582) optreedt als negatieve inhibitor van de elastinogenese via directe interactie met het katalytisch domein van de LOX-enzymen (33). Of deze link ook in vivo kan worden gelegd, dient nog verder te worden onderzocht.

1.3.2 Huid

1.3.2.1 Kliniek

De huidletsels van PXE zijn meestal de **eerste merkbare symptomen** (2, 25). Gewoonlijk presenteren de letsels zich onder de vorm van ivoorgelige, zachte papulae welke asymptomatisch zijn (2, 25). Ze komen voor in een reticulair patroon en treffen de **flexurale regio's** van het lichaam (34), met name de nek (laterale zijde; afbeelding 2), oksels, ellebogen, lies, periumbilicale regio en knie (35), dit zowel solitair als in groep (2, 25). Uitzonderlijk zijn de huidletsels gelokaliseerd ter hoogte van het aangezicht (25). Het voorkomen van grotere samenvloeiende gebieden, gebieden met purpura en volledige huidnecrose werd reeds beschreven, maar dit is zeldzaam (36).

De huid krijgt in vele gevallen een gerimpeld aspect en overtollige huidplooiën kunnen zich ontwikkelen (25, 37). Bij zwangerschap kunnen deze plooiën prominenter worden (35, 38).



Afbeelding 2. Confluerende plaques van papels in de nek van een PXE patiënt. Overgenomen uit: (13)

Een gelijkaardig geelachtig reticulair patroon kan ook worden aangetroffen op mucosale membranen verspreid over het hele lichaam, in het bijzonder ter hoogte van de lippen en het rectum (2, 39).

PXE-achtige huidletsels kunnen ook worden opgemerkt bij andere ziektebeelden. Een differentiaal diagnose wordt weergegeven in tabel 1.

Differentiaal diagnose van macroscopische huidletsels gelijkaardig aan PXE-huidletsels:
Beta-thalassemie
Buschke-Ollendorfsyndroom (dermatofibrosis lenticularis)
Elastosis solaris
Elastosis perforans serpiginosa
Langdurige behandeling met penicillamine

Tabel 1. Differentiaal diagnose van aandoeningen die macroscopische huidletsels vertonen zoals bij PXE (4).

Vroeger werden huidletsels verkeerdelijk aanzien als een vorm van cutis laxa (35). De gemiddelde leeftijd bij diagnosestelling van de huidletsels is 22 jaar, met een gemiddelde tijdsperiode van 9 jaar vanaf het begin van de symptomen (2, 35).

Men mag er echter niet van uitgaan dat de afwezigheid van huid- of mucosale letsels gelijk staat aan de afwezigheid van PXE (25). Voor de verklaring hiervoor wordt verwezen naar de variabiliteit van het ziektebeeld.

1.3.2.2 Histologie en pathogenese

De huid bij PXE patiënten vertoont histologisch voornamelijk aantasting van het elastine in de **mid-dermis** (3). Het elastine calcificeert, zwelt op, vormt granules en fragmenteert, wat het ook zijn typische beeld geeft op Von Kossakleuring (calciumfosfaataankleuring) en Orceine- en Verhoeffkleuringen (elastinekleuring) (2, 28). De evolutie van deze fragmentatie is sterk gerelateerd aan de ziekteprogressie (24).

Het eerste teken welke elektronenmicroscopisch kan onderscheiden worden, is **calcificatie** van de op dat moment nog normale elastinevezels (25). In de elastinematrix kunnen door deze mineralisatie verschillende calciumverbindingen worden aangetroffen, m.n. calciumcarbonaat (CaCO_3) en calciumwaterstoffosfaat (CaHPO_4) (25). Naarmate de mineralisatie toeneemt ter hoogte van de elastinevezels, neemt de densiteit hiervan toe op elektronenmicroscopie; later ontstaan gaten in de vezels en tenslotte treedt **fragmentatie** op (25). Naast de calciumdeposities worden nog andere mineralen, zoals ijzer, fosfaat en carbonaat aangetroffen in de vezels. Er wordt ook een toename van proteoglycanen en glucosamine gezien en ten slotte zijn matrixproteïnen, die allen een hoge affiniteit vertonen voor calcium zoals osteonectine, fibronectine, vitronectine en fibrilline-2, geassocieerd met de aangetaste elastinevezels in PXE (40, 41).

Patiënten die geen macroscopische huidletsels vertonen, kunnen wél histologische kenmerken vertonen (25). Wanneer een PXE patiënt een litteken overhoudt na een verwonding, kan dit weefsel microscopisch PXE-achtige veranderingen vertonen, ook al is deze patiënt tot op dat moment niet gekend met dermatologische PXE-manifestaties (25).

1.3.3 Ogen

1.3.3.1 Kliniek

Oogproblemen zijn een belangrijke oorzaak van morbiditeit bij het merendeel van de PXE patiënten. De meest voorkomende opeenvolging van letsels en symptomen is: peau d'orange, angioïde strepen, subretinale neovascularisatie met als gevolg bloedingen, maculadegeneratie en peripapillaire atrofie (25, 34).

Met **peau d'orange** wordt een pigmentverandering van het netvlies bedoeld. Deze pigmentverandering kan gepaard gaan met een neerslag van gelig materiaal en geeft een gevlekt aspect aan het retinaal pigmentepitheel (RPE), welke het meeste uitgesproken is temporaal van de fovea (2, 34). Peau d'orange is de meest geobserveerde abnormaliteit in fundus bij jonge PXE patiënten (25) en dit gaat de angioïde strepen vooraf met een gemiddelde van 1 tot 8 jaar (2). De functie van de retina noch het metabolisme van de fotoreceptorcellen worden geschaad door de aanwezigheid van peau d'orange, waaruit kan worden geconcludeerd dat deze retinale pigmentverandering ter hoogte van de retina een asymptomatische lesie is (28, 42).

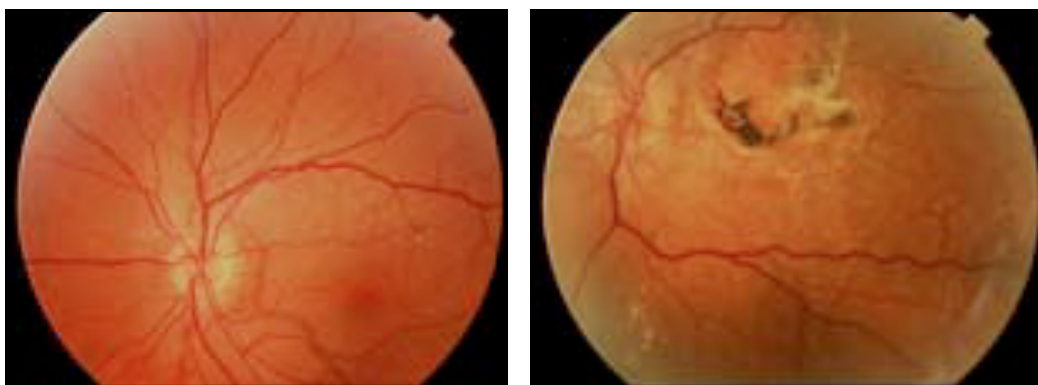
Angioïde strepen (angioïd streaks; AS) zijn de meest voorkomende oogafwijkingen bij PXE (afbeelding 3); nagenoeg elke patiënt wordt er vroeg of laat mee geconfronteerd (13). Het zijn onregelmatige roodbruine tot grijze lijnen die op het eerste zicht zeer goed lijken op choroidale of retinale bloedvaten en bilateraal voorkomen (2, 25). Ze nemen hun oorsprong ter hoogte van de discus opticus en kunnen deze concentrisch omringen; ze verspreiden zich verder radiaal en centrifugaal (2, 25). Ze treden meestal op in de tweede of derde levensdecade (13). Twintig jaar na diagnose van PXE zullen zo goed als alle patiënten AS ontwikkeld hebben (24). Pierro et al. vonden de aanwezigheid van PXE in 86% van de gevallen bij 58 patiënten met AS (43). Andere onderzoekers kwamen tot gelijkaardige resultaten (44). In vele gevallen kan de aanwezigheid van AS voor een hele tijd het enige teken van PXE zijn. Op termijn kunnen de AS schijnbaar vervagen of verdwijnen omwille van een uitgebreide, veralgemeende degeneratie en atrofie van het RPE en choriocapillaris (2).

AS komen niet enkel voor bij PXE. De differentiaal diagnose wordt weergegeven in tabel 2

Differentiaal diagnose van AS	
<i>Ziektebeelden met een sterke associatie met AS:</i>	
Pseudoxanthoma elasticum	
Hemoglobinopathieën (sikkelcelanemie, thalassemie en sferocytose)	
<i>Andere ziektebeelden met een twijfelachtige frequentie van AS:</i>	
Ziekte van Paget	Chronische congenitale hyperfosfatemie
Acromegalie	Sturge-Webersyndroom
Syndroom van Marfan	Neurofibromatose
Ehlers-Danlossyndroom	Diabetes
A-beta-lipoproteïnemie	Diffuse lipomatose
Verworven hemolytische anemie	Epilepsie
Cutaneuze calcinose	Seniele elastose
Hypertensieve coronaropathie	...

Tabel 2. Differentiaal diagnose van AS. Gebaseerd op: (4).

De aanwezigheid van AS betekent een infauste prognose m.b.t. de visus. In 70 tot 86% van de gevallen ontstaat vanaf de derde tot vierde levensdecade subretinale of **choroidale neovascularisatie** (CNV) (45, 46), waardoor bloedingen kunnen ontstaan (afbeelding 3). Hierdoor ontwikkelt zich disciforme maculadegeneratie wat op termijn leidt tot discoid littekenweefsel en hierdoor een aanzienlijk verlies in de centrale gezichtsscherpte (25). Volledige blindheid is echter zeldzaam (25). Dit is vergelijkbaar met het visusverlies dat optreedt bij AMD (6, 47). Vanakker et al. vonden dat het ontstaan van centrale blindheid (centrale visus < 1/10) voornamelijk uni-oculair optreedt, maar dat het andere oog in deze gevallen op korte termijn ook sterk aangetast zal worden, wat een significante visuele beperking met zich meebrengt (13).



Afbeelding 3. Karakteristieken van de oogfundus van 2 PXE patiënten. A: fundus met ongecompliceerde AS en bewaarde visus. B: fundus met AS, subretinale neovascularisatie en maculadegeneratie. Overgenomen uit: (13).

De pathogenese van AS is nog niet volledig opgeklaard maar er wordt gedacht dat mechanische stress op het membraan van Bruch een rol zou spelen (2). Er wordt aangenomen dat AS gedurende de evolutie van de ziekte toenemen in lengte en breedte, maar de snelheid hiervan werd nog niet bestudeerd (4).

Peripapillaire atrofie kan verschillende uitingsvormen hebben. Het kan zo uitgebreid worden rond de discus opticus en maculaire streek dat AS niet meer of zeer moeilijk zichtbaar worden, wat de oculaire PXE-screening sterk bemoeilijkt (25, 48).

Naast bovenvermelde symptomen zijn er ook een aantal minder frequente oogmanifestaties waarvan het verband met PXE berust op minder evidentie (43, 49). Deze zijn samengevat in tabel 3.

Overzicht van minder frequente oogmanifestaties bij PXE
Drusen (extracellulaire focale lipidehoudende deposities, gelegen tussen het RPE en het membraan van Bruch) (50, 51)
Myopie (43, 49)
Chorioretinale arterioveneuze communicatie (43, 49)

Tabel 3. Overzicht van minder frequente oogmanifestaties bij PXE (43, 49).

Bij PXE patiënten treden rupturen van de choroidea veel gemakkelijker op dan in de normale populatie; ook kunnen milde hoofdtraumata een ruptuur of zelfs loslating van het membraan van Bruch veroorzaken. Dit laatste wordt vaak gevolgd door subretinale bloedingen welke gemakkelijk foutief worden geïnterpreteerd als CNV (4, 52). Om het ruptureren van het choroid en het membraan van Bruch te voorkomen, wordt aan PXE patiënten aangeraden om een bril te gebruiken ter bescherming van het oog en om activiteiten en sporten met verhoogd risico op traumata te vermijden (2, 52).

Van alle bovenvermelde oogmanifestaties is er geen enkele die pathognomonisch is voor PXE. De enige lesies die dat wel zijn, werden door Gass *comet-like tails* genoemd (53). Het zijn punched-out letsels die in het midden tot de periferie van het RPE voorkomen met een licht gedepigmenteerde staart en die georiënteerd zijn vanuit de lesie naar de posterieure pool van het oog; uitbreiding naar de sclera is mogelijk (2). Eigenlijk is dit letsel niets anders dan chorioretinale atrofie en verkalking, met een hypergepigmenteerde halo in de mid-periferie en een gelokaliseerde atrofie ter hoogte van het RPE met de typische *comet-like* uitlopers zoals hierboven reeds beschreven (2, 13, 34).

Vele onderzoekers kwamen reeds tot dezelfde conclusie dat secundair degeneratieve en hemorrhagische veranderingen kunnen optreden ter hoogte van de maculaire streek (2), wat frequent leidt tot ernstige

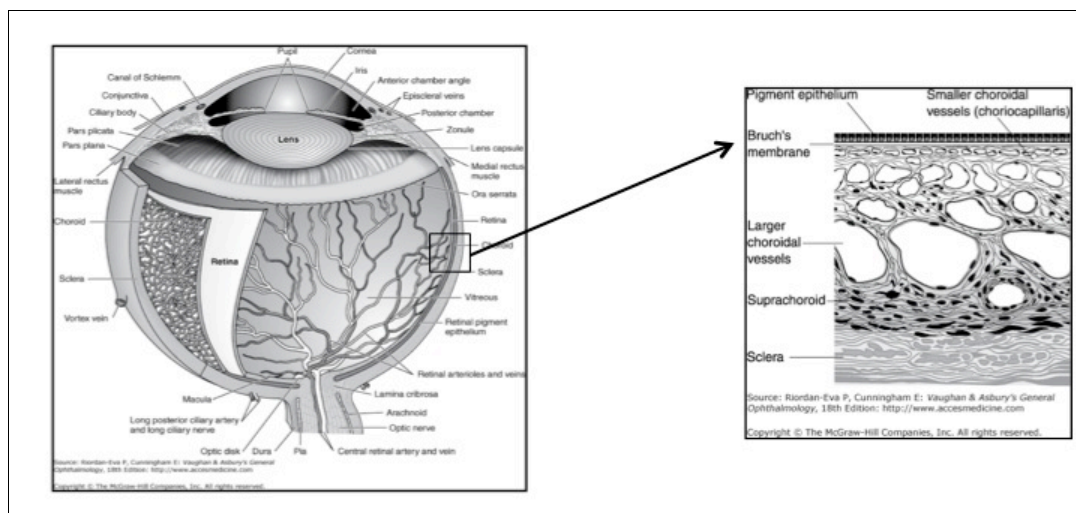
afname van de visus (48). Tegen de leeftijd van 50 jaar is de visus van vele PXE patiënten bilateraal afgenomen tot niet meer dan 1/10 (2).

Audo et al. onderzochten 4 patiënten met PXE via electroretinogram (ERG) en stelden de aanwezigheid vast van staafjes-kegeltjesdystrofie, kegeltjes-staafjesdystrofie en ernstige fotoreceptordystrofie ter hoogte van de macula (54). Gass en Agarwal stelden eerder al dat deze maculaire dystrofie optreedt bij 10 tot 15% van de PXE patiënten (2).

Voor de diagnose van oogsymptomen bij PXE zijn er verschillende hulpmiddelen, waaronder fluoresceïne angiografie, indocyanine groen angiografie en fundus autofluorescentie (4, 13, 34).

1.3.3.2 Histologie en pathogenese

Het **membraan van Bruch** is rijk aan elastine en collageen en bevindt zich tussen het RPE en de choriocapillaris (afbeelding 4) (25). Het is betrokken bij het bidirectioneel transport van nutriënten en metabolieten tussen de twee voorgenoemde lagen (25).



Afbeelding 4. Anatomie van het oog. Links: anatomie van het oog (doorsnede); rechts: detail van het membraan van Bruch en aangrenzende lagen. Overgenomen uit: (55).

Histologisch bestaat het uit 3 tot 5 lagen: de basale lamina ter hoogte van het RPE; een binnenste collageenzone; een middelste elastische zone; een buitenste collageenzone en tenslotte het basale membraan van de endotheelcellen van de choriocapillaris. De elastische zone vormt geen afgesloten laag maar eerder een netwerk dat verweven ligt en uitlopers heeft in beide collageenzones (25, 56).

De histologische veranderingen ter hoogte van het membraan van Bruch zijn gelijkaardig aan deze ter hoogte van de huid (57). De elastinevezels van het membraan van Bruch ontwikkelt **calcificaties** en vertoont verdikkingen, wat de stevigheid ervan sterk doet afnemen (2). De mechanismen hiervoor zijn zeer complex en tot op heden onvolledig begrepen. Deze pathologische veranderingen zijn de belangrijkste factoren in het ontstaan van AS, i.e. breuken, in het membraan van Bruch (57). In vroege

stadia leidt dit niet tot veranderingen in de omliggende retina en choriocapillaris (57). In latere stadia toonden Dreyer et al. onderbrekingen aan van de elastische zone van het membraan van Bruch, alsook een afname van de pigmentgranulae in het RPE (57). Dit kan bij verdere evolutie leiden tot een defect over de volledige dikte van het membraan van Bruch, samen met atrofie van het bovenliggende RPE en fotoreceptoren, en rupturen in de onderliggende choriocapillaris (2, 25). Doorheen dit defect kan ingroei van fibrovasculair weefsel ontstaan, wat op zijn beurt aanleiding kan geven tot CNV gevolgd door het ontstaan van een disciform litteken met subretinale fibrose en atrofie (2). Dit litteken wordt in het eindstadium het meest gezien ter hoogte van de posterieure pool van de retina, i.e. tussen de grote temporale bloedvatarcades (2).

1.3.4 Cardiovasculair stelsel

1.3.4.1 Kliniek

Cardiovasculaire complicaties van PXE treden voornamelijk op **vanaf de 4^{de} tot 5^{de} levensdecade** (13). Het gaat om veralgemeende calcificaties van de bloedvaten, die daardoor verstijven en kunnen occluderen (25). De meest frequente complicatie van PXE is **versnelde atherosclerose** welke een frequentie heeft van 68% bij patiënten vanaf de 5^{de} levensdecade. Coronaire aandoeningen komen in deze leeftijdscategorie beduidend minder voor (28%). Vanaf de zesde levensdecade krijgt claudicatio intermittens, met een frequentie van 44%, ook een belangrijk aandeel in de cardiovasculaire complicaties van PXE (13).

Bij PXE is er naast versnelde atherosclerose een verhoogd risico op **plotse dood** met als meest frequente oorzaak een acuut myocardinfarct ten gevolge van ernstige coronaire atherosclerose. Andere mogelijke oorzaken voor plotse dood zijn de complicaties van veralgemeende atherosclerose, met onder andere afname van de perifere pulsaties, hypertensie, angina pectoris en claudicatio intermittens (58).

Gastro-intestinale bloedingen zijn, na de subretinale bloedingen, de meest voorkomende bloedingen bij PXE patiënten (25). Ze veroorzaken melena en hematemesis bij ongeveer 15% van de PXE-populatie (2, 25). Opnieuw zijn deze een consequentie van calcificaties van elastische vezels in de vaten net onder de gastrische mucosa (25).

Bloedingen op andere plaatsen in het lichaam, zoals de neus, de longen en de blaas zijn minder frequent; menometrorragieën daarentegen lijken frequenter geassocieerd met PXE (25).

1.3.4.2 Histologie en pathogenese

Op het niveau van de middelgrote arteriën worden calcificaties aangetroffen ter hoogte van de tunica **media en interna** (58, 59). Er werd echter geen verschil gevonden met de histologie van atherosclerose in de algemene populatie (60). Musculaire arteriën, zoals de grote perifere arteriën of de

coronairen, vertonen calcificaties, vertrekkende uit de interne en externe elastische laminae met later verdere uitbreiding naar de tunica media en intima. Het endocard vertoont verdikking van de fibroelastische intima en calcificatie van de elastische vezels (60). Dit laatste leidt echter slechts zelden tot complicaties (25).

1.3.5 Orgaancalcificaties

Op echo kunnen **multipele calcificaties** gevonden worden in verscheidene organen, waaronder de borsten, nieren, testikels, lever, milt en pancreas (14). In de nieren kan dit de oorzaak zijn van renale hypertensie, hoewel de meest frequente oorzaak van renale hypertensie de atherosclerose van de A. Renalis is (2, 25). De andere calcificaties lijken geen klinische symptomen te veroorzaken. Deze calcificaties zijn ook niet specifiek voor PXE en verder onderzoek is nodig om uit te zoeken of deze in de toekomst als diagnostisch criterium zouden kunnen worden gebruikt (14).

1.4 *PXE en Zwangerschap*

De obstetrische prognose wordt sterk bepaald door de cardiovasculaire toestand van de patiënte (38). Aangezien de meeste cardiovasculaire complicaties van PXE echter pas vanaf de vijfde levensdecade duidelijk zichtbaar worden, kan men besluiten dat de obstetrische risico's vrij beperkt zijn bij PXE (13). De **meeste zwangerschappen** zijn dan ook **ongecompliceerd** (59). Wat de toestand van de moeder betreft, wordt er geen algemene achteruitgang gezien van de klinische symptomen van de moeder. Wel kan er een uitbreiding gezien worden van de abdominale huidletsels (38).

1.5 *Correlatie met hemoglobinopathieën*

Bij hemoglobinopathieën, in het bijzonder β -thalassemie, sikkelcelanemie en sikkelthalassemie, worden gelijkaardige oftalmologische, cardiovasculaire en dermatologische manifestaties opgemerkt als bij PXE (61, 62). Meer in het bijzonder gaat het om **AS, huidletsels en arteriële calcificaties** (61). Men gaat ervan uit dat de PXE-achtige lesies bij de hemoglobinopathieën **verworven** zijn en dus niet overgeërfd zoals dat bij PXE wél het geval is (61).

Recent werd via een muismodel aangetoond dat er bij β -thalassemie een progressieve leverspecifieke downregulatie optreedt van de ABCC6 expressie en van de ABCC6 transporter ter hoogte van de lever en dit vanaf de zesde levensmaand van de muizen. Deze downregulatie wordt veroorzaakt door veranderingen in de regulatie van de transcriptie waarin voornamelijk de zgn. "**nuclear factor erythroid 2, p45 subunit**" (NFE2, gecodeerd door het *NFE2* gen ; OMIM *601490) een rol zou spelen (63). Ter hoogte van de nieren werd er geen verschil gevonden met de normale muizen (63). NFE2 is een transcriptiefactor die voornamelijk betrokken is bij de regulatie van globinetranscriptie en is essentieel voor een normale trombocytenproductie (64).

Het is belangrijk om bij patiënten met een hemoglobinopathie actief op zoek te gaan naar PXE-achtige lesies om ze in een vroeg stadium te kunnen behandelen. Anderzijds moet er bij patiënten waarbij PXE-achtige lesies worden aangetroffen (en die niet gediagnosticeerd kunnen worden met PXE), altijd worden nagegaan of deze niet lijden aan een onderliggende hemoglobinopathie (61).

1.6 Diagnose

In 1994 kwam er een classificatiesysteem met diagnostische criteria voor PXE. Lebwohl et al. definieerden majeure en mineure criteria en op basis daarvan konden patiënten geclassificeerd worden als “zeker” PXE en “onzeker” PXE (65). Zij achtten de classificatie van patiënten zonder karakteristieke huidafwijkingen controversieel en namen aan dat zij of heterozygote dragers waren van één mutant allel, een milde vorm van autosomaal dominante PXE vertoonden of later in hun leven huidmanifestaties zouden ontwikkelen (14).

Vanakker et al. stelden in 2008 een nieuwe flowchart voor in kader van de nieuwe inzichten in PXE waarin de rol van huidbiopsie en moleculaire analyse bij het diagnostisch proces werden gedefinieerd. De inclusiecriteria voor deze nieuwe flowchart zijn strikt en gebaseerd op het werk van Lebwohl et al. (13). Vanakker et al. baseerden zich op het feit dat de meeste patiënten zich in de kliniek melden met oog- dan wel huidproblemen en dat deze laatste dan nog de aanmeldingsklacht is van het overgrote deel van de patiënten. Oogproblemen worden inderdaad pas veel later symptomatisch, wanneer reeds CNV is opgetreden (2, 13).

Op basis van deze bevindingen kan men stellen dat een fundoscopie en huidbiopsie onontbeerlijk zijn voor de diagnosestelling (13). Met het ontdekken van de *ABCC6* mutaties is de moleculaire analyse een mogelijk alternatief voor de huidbiopsie (13).

In 2010 publiceerden Plomp et al. een voorstel voor een **update van het classificatiesysteem** (14). De rationale hiervoor was dat in de consensus uit 1994 de criteria niet concreet werden uitgewerkt; dat volgens Lebwohl et al. de zekerheidsdiagnose enkel kan worden gesteld wanneer de 3 majeure criteria aanwezig zijn terwijl dit volgens de auteurs niet noodzakelijk is; en dat er met de nieuwe moleculaire testing op *ABCC6* mutaties sowieso een update moet gebeuren (14). In hun nieuw model wordt een oplossing geboden voor de bovengenoemde problemen (14).

1.7 Behandeling en preventie

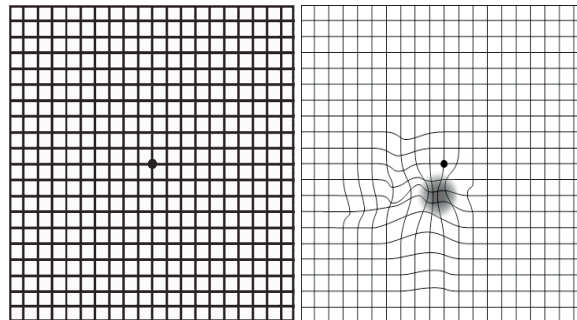
Tot op heden is er geen curatieve behandeling voor PXE. Het hoofddoel van de behandeling is het **voorkomen van complicaties of vroegtijdige behandeling bij het optreden ervan** (6). De opvolging van PXE patiënten gebeurt door een multidisciplinair team, met onder andere een dermatoloog, oftalmoloog, huisarts, cardioloog, vasculaire chirurg, plastisch chirurg en geneticus (65). Verder kan een zelfhulpgroep hulp bieden aan zowel patiënten als hun families, dit vooral op gebied

van educatie en het verbreken van het isolement (65). Aangezien er echter geen standaardisatie is in de behandeling, werd geopteerd om hieronder het behandelplan over te nemen zoals gebruikt wordt in de PXE-kliniek van het CMG Gent (6).

1.7.1 Preventie

In de preventie van **oogproblemen**, met name de choroidale (=subretinale) bloedingen, is het, zoals reeds hoger vermeld, wenselijk om een bril ter bescherming van de ogen te dragen en om sporten en activiteiten te vermijden die enerzijds traumata zouden kunnen uitlokken of anderzijds een verhoogde druk zouden kunnen veroorzaken. Zo worden balsporten en gewichtheffen afgeraden (2, 6, 25, 61, 66).

Wanneer patiënten AS hebben ontwikkeld, is het aangeraden om frequent op controle te gaan bij een oftalmoloog, met een frequentie die afhankelijk is van de ernst van de oculaire aantasting (gewoonlijk eenmaal per jaar) (4). Verder kan op regelmatige basis een Amslertest afgenomen worden; men kan de patiënt ook leren om dit zelf te doen. Bij de Amslertest wordt gevraagd aan de patiënt om naar een “raster” te kijken (afbeelding 5). Bij de aanwezigheid van distorsie of metamorfopsie moet de patiënt onmiddellijk worden doorgestuurd voor verder onderzoek en eventuele behandeling (6).



Afbeelding 5. Kaart voor uitvoeren van de Amslertest. Links zoals gezien door een normale proefpersoon; rechts zoals gezien door een persoon met distorsie van het beeld. Overgenomen uit: (67).

De preventie van **cardiovasculaire complicaties** is dezelfde als voor de algemene populatie en gericht op het verlagen of optimaliseren van het cardiovasculair risico. Er wordt rekening gehouden met de klassieke risicofactoren, zoals hypertensie, hypercholesterolemie, diabetes, roken en obesitas. Aspirine en andere NSAIDs moeten worden vermeden wegens het verhoogde risico op mucosale bloedingen, voornamelijk gastro-intestinaal, die door het ziektebeeld zelf ook al een verhoogde prevalentie kennen (66). Dit kan leiden tot een therapeutisch dilemma, aangezien deze medicaties als standaard worden toegediend bij cardiovasculaire patiënten in de secundaire preventie (dus wanneer zij al een cardiovasculair event hebben doorgemaakt) (6). In verband met het **dieet** zijn tot op heden weinig gegevens bekend, maar Larusso et al. vonden recent een mogelijke invloed van een verhoogde magnesiuminname op de ectopische mineralisatie ter hoogte van perifere weefsels van een PXE

muismodel (68). Bij een toediening van een dosis magnesium die 5x hoger is dan normaal, bleef de mineralisatie zelfs volledig achterwege (68). De mechanismen die verantwoordelijk zijn voor deze vermindering van mineralisatie zijn nog niet volledig gekend. Men kan wel afleiden dat het verhogen van de magnesiuminname geen nadelige effecten had op het calciumgehalte in het bot (68). Verder onderzoek op humane cohortes is nodig om na te gaan of magnesiumtoediening effectief een hulp kan bieden in de toekomst (68).

1.7.2 Behandeling

Wanneer CNV optreedt, ontstaat er dikwijls een centraal disciform litteken (2). Patiënten klagen in vroege stadia voornamelijk van een afname van de centrale visus en soms ook van distorsie van het beeld en van metamorfopsie, meer dan van het centraal scotoma wat in een later stadium gepaard kan gaan met de pathologie (4). Hoewel dit ernstige functionele problemen kan veroorzaken, is totale blindheid ten gevolge van PXE eerder zeldzaam (2). Het stadium van de neovascularisatie is het moment waarop een behandeling aangewezen is (2, 4). Profylactische therapie werd uitgetest maar is niet aangeraden aangezien hierdoor zelfs CNV kan worden geïnduceerd (4). Het doel is het stoppen van de neovascularisatie en haar complicaties, zoals bloedingen (2). Hiervoor zijn reeds verschillende technieken uitgeprobeerd, met wisselend succes (2). Laser fotocoagulatie gaf de mogelijkheid om de progressie van neovascularisatie tegen te gaan, maar er was een hoge graad van herval en het optreden van centrale scotomen (2). Verder werd aangetoond dat er enkel gunstige effecten optreden bij het gebruik van de laser in de extrafoveale regio (4). Ook een heelkundige procedure, zoals subfoveale CNV-excisie, bleek onvoldoende succesvol (2). Maculatranslocatie, een andere heelkundige interventie, geeft een vrij gunstig resultaat, maar de techniek ervan is zeer ingewikkeld en houdt grote risico's in op complicaties (4).

Fotodynamische therapie had meer potentieel, maar het succes van deze therapie kon niet eenduidig worden vastgesteld (2, 4).

Met de komst van de anti-angiogenetische medicatie was er een grote vooruitgang wat betreft de behandeling van **oogsymptomen** bij PXE, met name de neovascularisatie (2). De evidentie werd gehaald uit de behandeling van de natte vorm van AMD – welke belangrijke gelijkenissen vertoont met de PXE-retinopathie – waar anti-VEGF in het vitreum werd geïnjecteerd en bleek dat dit effectief was (2). Er werd een behoud van de residuele visus beschreven en zelfs een gedeeltelijk herstel ervan bij een aantal patiënten, vooral wanneer de behandeling vroegtijdig werd toegepast (2, 4). Als anti-VEGF medicatie werd bevacizumab, ranibizumab en pegabtanib gebruikt. Studies werden reeds uitgevoerd bij CNV ten gevolge van AS zoals bij PXE het geval is, zij het met kleine patiëntencohortes, maar ook deze zijn veelbelovend (2, 4). Het resultaat zou beter zijn naarmate de aantasting van het oog milder is zodat het belangrijk is om de aandoening in een vroeg stadium te behandelen (2). Aangezien vele PXE patiënten een verhoogd cardiovasculair risico vertonen, moet ook

hiermee rekening worden gehouden bij het implementeren van een nieuw medicijn. In de reeds uitgevoerde studies werden echter nog geen dergelijke neveneffecten vermeld; men moet er echter rekening mee houden dat in de studies gebruik werd gemaakt van patiënten met blanco cardiovasculaire voorgeschiedenis (geen infarct of bloeding) en met een bloeddruk die onder controle was (2).

Wat de **cardiovasculaire complicaties** betreft, werd er geen broosheid van de vaten vastgesteld bij PXE. De complicaties kunnen dan ook op klassieke wijze worden behandeld, hetzij heelkundig, hetzij interventioneel-radiologisch (6).

Viljoen et al. beschreven de heelkundige behandeling van **huidafwijkingen** bij PXE. Peroperatief werden geen moeilijkheden gemeld; wel was in de meeste gevallen de wondheling trager dan normaal, trad er soms vorming op van keloïden en kwam ook extrusie van calcium via de wondranden in enkele gevallen voor (7). Het ging hier echter om een kleine cohorte van patiënten (7). Ook andere auteurs schreven over plastische heelkunde bij PXE, met toepassing van verschillende heelkundige technieken, maar telkens waren de patiëntencohortes heel klein of ging het om een case report (8, 9).

1.8 Genetische achtergrond van PXE

PXE is een genetische en dus overerfbare ziekte. Pope et al. beschreven in het verleden dat er 4 vormen waren van PXE, met name 2 autosomaal dominante en 2 autosomaal recessieve types (49, 69). Volgens de huidige evidentie is de meest voorkomende en vermoedelijk enige overervingsvorm echter **autosomaal recessief**. Autosomaal dominante overerving is zeer uitzonderlijk en wordt zelfs volledig in vraag gesteld (70, 71). Een mogelijke verklaring waarom PXE in het verleden als autosomaal dominant werd beschreven, is dat in sommige gevallen pseudo-dominante overerving werd gevonden bij families waarin PXE in opeenvolgende generaties voorkomt (4). Een andere verklaring zou kunnen zijn dat klinische bevindingen bij PXE, zoals cardiovasculaire fenomenen, vrij frequent voorkomen bij de “normale” oudere populatie en dat deze personen dus foutief de diagnose van PXE hebben kregen, wanneer het onderzoek niet grondig genoeg werd uitgevoerd (4).

Tenslotte werd ook reeds gesuggereerd dat **heterozygote dragers** van een PXE-mutatie milde PXE-achtige manifestaties kunnen vertonen (72). Martin et al. beschreven de mogelijkheid op ernstige oftalmologische symptomen bij heterozygote dragers van een PXE-mutatie (73). Hornstrup et al. deden onderzoek naar het verband tussen cardiovasculaire symptomen en heterozygoot dragerschap voor een welbepaalde PXE-mutatie. Zij konden geen significante associatie vinden (74). Plomp et al. gingen op zoek naar PXE-manifestaties bij heterozygote dragers van een andere PXE-mutatie en konden geen symptomen aantonen bij deze dragers (75). Naast deze studies gebeurde en gebeurt waarschijnlijk nog steeds nog meer onderzoek rond dit onderwerp, maar eenduidigheid is er nog niet.

Bij recessieve overerving hebben ouders welke beide drager zijn 25% kans om een kind te krijgen met de desbetreffende aandoening (tabel 4). Met dragerschap wordt bedoeld dat de ouders slechts op één allel van het betreffende gen een mutatie vertonen, hetgeen meestal niet gepaard gaat met klinische manifestaties (cf. supra). Beide ouders moeten wel drager zijn van een mutatie, want anders zal het kind nooit 2 gemuteerde allelen kunnen overerven (2). Bij consanguïteit in families, wat bijvoorbeeld kan optreden wanneer een bepaalde populatie zeer geïsoleerd leeft, is er een grotere kans dat 2 heterozygote dragers met elkaar in contact komen. In zulke gevallen is het risico op PXE verhoogd ten opzichte van de normale populatie (76). Het is overigens niet noodzakelijk dat bij een PXE patiënt de 2 allelen dezelfde fout dragen in het causale gen voor PXE. Dit noemt men compound heterozygositeit (71).

Mendeliaanse overerving van een recessief fenotype		
	G	g
G	GG	Gg
g	Gg	gg

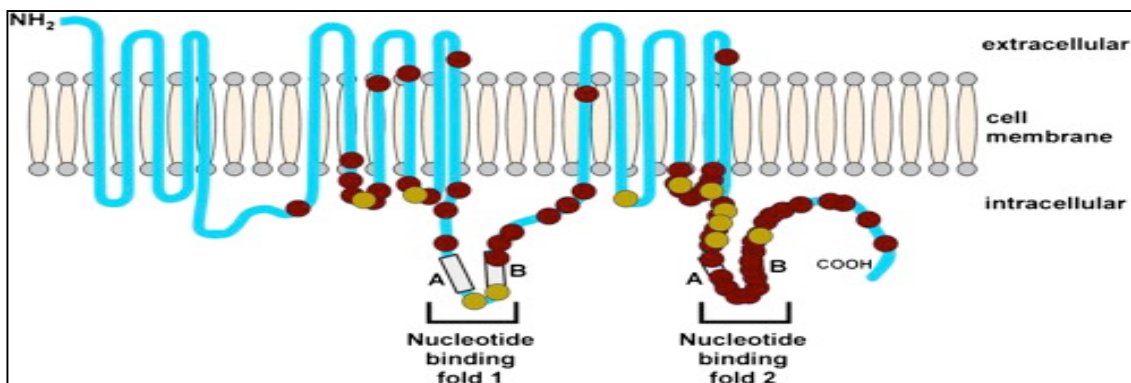
Tabel 4. Mendeliaanse overerving van een recessief fenotype. G= wild type of normaal allel; g: mutant allel.

De patiënt vertoont het ziektebeeld wanneer hij homozygoot is voor het mutante allel, wat bij recessieve overerving overeenkomt met een kans van 1 op 4. De kans op heterozygoot dragerschap bij recessieve overerving is 2 op 3. In zo'n geval vertoont een persoon 1 normaal allel en 1 mutant allel.

1.8.1 Het ATP-binding Cassette, Subclass C, member 6 gen (*ABCC6*; OMIM*603234)

Wanneer de pathofysiologie van PXE wordt onderzocht, worden telkens dezelfde histologische afwijkingen gevonden in de getroffen weefsels, i.e. fragmentatie en calcificatie van elastinevezels (2, 25). De zoektocht naar de verantwoordelijke mutaties voor PXE, leidde onderzoekers dan ook eerst naar genen die betrokken waren bij het maken van het elastinenetwerk (4, 76). Zo werden elastine op chromosoom 7, elastine geassocieerde microfibrillen op chromosomen 5 en 15 en lisyloxidase op chromosoom 15, alsook leden van de microfibrillenfamilie op chromosomen 2, 5 en 15 onderzocht. Er werden echter geen afwijkingen gevonden (4, 76). In 1997 kwamen er 2 publicaties die aan de hand van een koppelingsonderzoek konden aantonen dat PXE gelinkt was met een regio op chromosoom 16, i.e. 16p13.1 (10, 11). In de volgende jaren volgde verder mutatieonderzoek en kon PXE met zekerheid worden gelinkt aan het *ABCC6* gen (16, 76-78).

Het *ABCC6* gen, dat zich op de korte arm van chromosoom 16, i.e. 16p13.1, bevindt, is ongeveer 73.000 baseparen groot en omvat 31 exonen (79). Het codeert voor een transportereiwit welke een lid is van subklasse C van de ATP-binding cassette of ABC transporters (76, 77). Het wordt overgeschreven in mRNA van ongeveer 5 kb groot en vertaald naar een proteïne van 165 kD en 1503 aminozuren. De *ABCC6* transporter komt voornamelijk in de lever en de nieren tot expressie (16) en kent slechts een heel lage expressie in de weefsels die het meest worden aangetast bij PXE, i.e. huid, oog en cardiovasculair stelsel (2). De transporter werkt voornamelijk unidirectioneel van intracellulair naar extracellulair doch de fysiologische functie van *ABCC6* noch zijn substraat of substraten zijn tot op heden volledig gekend (2, 15, 80, 81).



Afbeelding 6. Schematische voorstelling van de *ABCC6* transporter. De rode en groene cirkels stellen mutaties voor die PXE veroorzaken. Overgenomen uit: (2).

Er zijn reeds **meer dan 300 mutaties gekend** in het *ABCC6* gen die kunnen voorkomen in zo goed als elk exon, hoewel er een overwicht van mutaties is aan het 3' C-terminaal uiteinde (afbeelding 6) (3, 12, 13). In 66-97% van de patiënten met PXE wordt een *ABCC6* mutatie gevonden op beide allelen (13, 14). De meeste mutaties zijn missense en nonsense mutaties en deleties (79). In tenminste 30% van alle mutaties ontstaat een frameshift, waardoor een stopcodon wordt geïntroduceerd. Dit leidt tot een verkort eiwit en als gevolg hiervan functieverlies (79). Er zijn 2 mutaties die frequent voorkomen. De eerste is p.(R1141X) met een prevalentie van ongeveer 30% van alle PXE-mutaties en de tweede is een deletie (del23-29; p.(A999-S1430del)), die werd gevonden op minstens één van beide allelen in een aanzienlijk percentage van de PXE-populatie (tot 20% in de VS en 12% van de Europese populatie) (3, 4). Het feit dat deze 2 mutaties zo frequent voorkomen, is waarschijnlijk te wijten aan een founder effect (79). Het founder effect betreft een situatie waarin een kleine groep individuen van een populatie geografisch geïsoleerd raakt van hun oorsprongpopulatie. Wright et al. postuleerden in 1942 reeds op basis van theoretisch werk dat een dergelijke geografische isolatie ervoor zou kunnen zorgen dat deze populatie een aanzienlijke genetische differentiatie zou ondergaan van de voorouders waarbij genetische variabiliteit alsook toevallige veranderingen in allelfrequenties ten gevolge van genetische drift kunnen optreden (82).

Op welke manier de *ABCC6* mutaties een rol spelen in het ontwikkelen van PXE-manifestaties is nog niet opgeklaard. Er is wel een hypothese vooropgesteld die zegt dat een verminderd aantal functionele *ABCC6* transporter, voornamelijk in de lever, resulteert in een deficiëntie van circulerende factoren, die in fysiologische condities nodig zijn om elastinefragmentatie en – calcificatie te voorkomen (3). Een andere mogelijkheid is dat een tekort van *ABCC6* substraten ter hoogte van de getroffen weefsels het biosynthetisch expressieprofiel en de cel-cel/cel-matrixinteracties verstoren en zo de proliferatieve capaciteit van de cellen van deze weefsels veranderen (3).

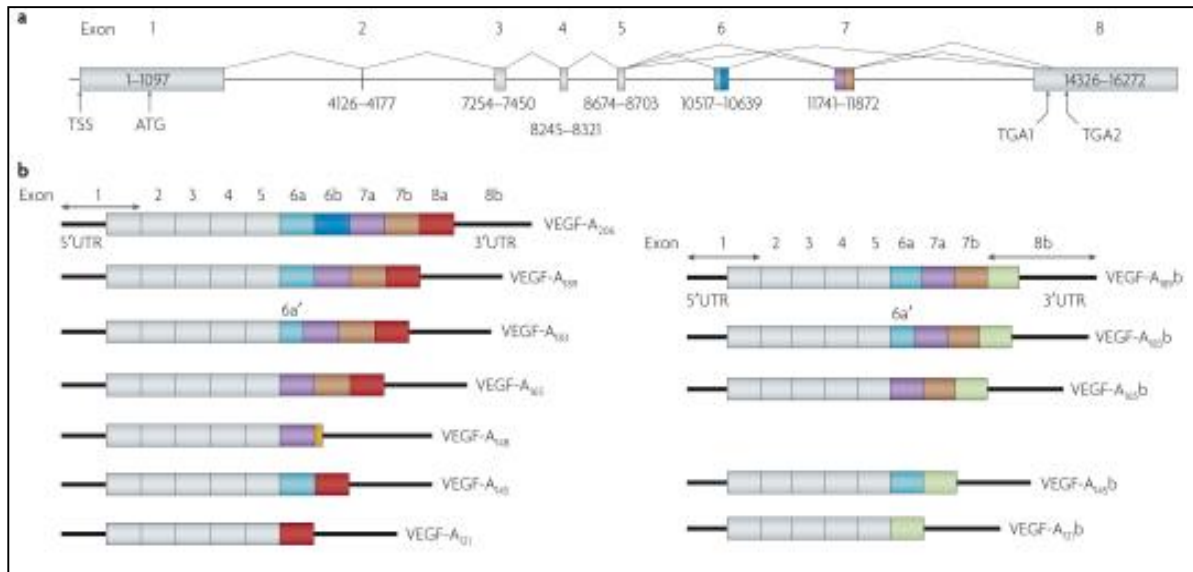
Ook al zijn reeds heel wat mutaties van het *ABCC6* gen gekend, in geen enkel geval kon er een genotype-fenotype relatie worden gevonden (2, 4). Dit laatste suggereert dat omgevingsfactoren, zoals voeding, levensstijl en mutaties in andere modifier genen een belangrijke rol kunnen spelen in het ontstaan van het fenotype (2).

1.8.2 Vascular Endothelial Growth Factor A (*VEGFA*; OMIM+192240)

Het *VEGFA* gen, dat gelegen is op de korte arm van chromosoom 6 (6p12), bestaat uit 6,272 baseparen en omvat 8 exonen (afbeelding 7) (83). Het gen maakt deel uit van de PDGF/VEGF groeifactorfamilie en codeert voor een homodimeer eiwit, verbonden door een disulfidebinding, dat angiogenese medieert, i.e. de nieuwvorming van bloedvaten (5, 18). Verder verhoogt het eiwit de microvasculaire permeabiliteit, kan het arteriën doen dilateren, is het een mediator van chemotaxis van monocytten, zorgt het voor groei van endotheliale cellen en inhibeert het apoptose (5, 18). *VEGFA* kent door splicing een onderverdeling in verschillende isovormen (5, 18, 83, 84). *VEGFA 165* is de fysiologisch dominante isovorm, waarbij exon 6 (a en b) ontbreekt. Deze isovorm bindt op alle VEGF receptoren, zoals VEGFR-1 en VEGFR-2. *VEGFA 165* kent door splicing een a-vorm die sterk pro-angiogenetisch is en een b-vorm die anti-angiogenetisch is (17). Een andere isovorm, *VEGFA 121*, bestaat uit exonen 1-5 en exon 8a. Samen komen ze in hoge mate tot expressie in spieren, hersenen, chondrocyten en het oog (83, 84).

Aangezien de PXE-mutaties in het *ABCC6* gen geen uitsluitel konden geven omtrent de voorspelling van het fenotype van een aangetast individu, ontstond het idee dat ook andere factoren hierin een belangrijke rol zouden kunnen spelen waaronder **modifier genen** (18). De rationale om het *VEGFA* gen als potentiële modifier voor PXE-retinopathie te onderzoeken, resulteerde uit de inzichten die men reeds had verworven bij andere ziektebeelden en werd reeds in 1 voorgaand onderzoek bestudeerd (18). *VEGFA* speelt inderdaad een rol in de natte vorm van AMD en in DR (17, 18). Beide kennen een symptomatologie die gelijkaardig is aan die van de oogsymptomen die kunnen optreden bij PXE (18).

De afwijkingen in het *VEGFA* gen zijn geen mutaties zoals bij het *ABCC6* gen wel het geval is. Het zijn polymorfismen, meer bepaald Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (18).



Afbeelding 7. Structurele opbouw van het *VEGFA* gen. A geeft een overzicht van de volledige structuur. Er zijn alternatieve splicesites (5' of 3') aanwezig in exon 6, 7 en 8 waardoor verschillende isovormen ontstaan. B geeft de verschillende isovormen, bekomen door alternatieve splicing. TSS: start transcriptie; ATG: start translatie; TGA1 en 2: alternatieve stopcodons. 6a' is 18 baseparen korter dan het gewone exon 6 omwille van een geconserveerde alternatieve splicesite. Overgenomen uit: (83).

1.8.3 Single Nucleotide Polymorphisms

Een SNP is een verandering van slechts 1 basepaar (85). Er zijn 2 verschillende soorten, namelijk de transitie of substitutie tussen purines en pyrimidines onderling, en de transversie of substitutie van een purine door een pyrimidine en vice versa. Verder is er ook een functionele onderverdeling van SNPs. Men spreekt van een synonymous SNP wanneer in het aangetaste codon het aminozuur niet verandert, en van een non-synonymous SNP wanneer dit wel het geval is. Ongeveer 2/3 van de SNPs bevinden zich in niet-coderende regio's, i.e. niet in exonen. Ze vormen de basis van 90% van de genetische variatie van de mens. Dit is dan ook de reden waarom SNPs enorm vaak worden bestudeerd in het kader van multifactoriële aandoeningen, zo ook in PXE (85). Mogelijk is er een interferentie door deze SNPs bij processen als transcriptie, translatie, splicing en dergelijke meer (85).

In de literatuur en in genetische databanken, zoals Ensembl (cf. infra), wordt gebruik gemaakt van een internationaal identificatiesysteem om SNPs op een eenduidige manier te kunnen classificeren, i.e. het refSNP cluster identificatienummersysteem (rs).

Het *VEGFA* gen is, zoals reeds hoger vermeld, gelegen op chromosoom 6. Aangezien het humane genoom is opgebouwd uit 2 sets van 23 chromosomen, i.e. een maternale en een paternale set, is het

VEGFA gen in normale omstandigheden **in tweevoud aanwezig**. Het maternale en paternale *VEGFA* gen zijn homoloog, wat wil zeggen dat deze genen gelijkaardig zijn, maar niet noodzakelijk identiek. Men spreekt van 2 **allelen**, i.e. 2 verschillende vormen van hetzelfde gen. De allelen kunnen van elkaar verschillen door SNPs die in het gen aanwezig zijn. Zo kan het zijn dat op 1 van de allelen ter hoogte van een bepaalde locus de alternatieve nucleotide aanwezig is en op het andere allel de referentienucleotide. Het individu wordt dan heterozygoot genoemd voor die bepaalde SNP. Wanneer dezelfde nucleotide aanwezig is op beide allelen, wordt het individu homozygoot genoemd. Iemand kan dus homozygoot zijn voor de referentienucleotide maar ook voor de alternatieve nucleotide.

Deze masterproef beoogt het identificeren en/of confirmeren van een genotype-fenotypecorrelatie tussen varianten (SNPs en mutaties) in het *VEGFA* gen en de oculaire symptomen bij PXE patiënten. Hierbij zal voornamelijk worden toegespitst op de vraag of één of meerdere van dergelijke varianten gebruikt kunnen worden in de dagdagelijkse klinische praktijk in de counseling van PXE patiënten en in hun opvolging.

2 METHODOLOGIE

2.1 Patiëntenpopulatie

Demografische karakteristieken van de studiegroep	Geslacht		Totaal
	F	M	
Belgische patiënten			
Totaal aantal	30	10	40
Gemiddelde leeftijd(geboortjaar)(in jaar)	42,1	51,7	44,5
Franse patiënten			
Totaal aantal	17	9	26
Gemiddelde leeftijd(geboortjaar)(in jaar)	54,6	56,7	55,3

Tabel 5. Demografische karakteristieken van de studiegroep. De gemiddelde leeftijd wordt berekend op basis van het geboortjaar. F: aantal vrouwen. M: aantal mannen.

De patiëntenpopulatie van deze studie bestaat uit een cohort van 66 patiënten met 40 PXE patiënten uit het patiëntenbestand van de PXE kliniek van het CMG Gent en 26 Franse patiënten van de PXE kliniek van het CHU Angers (Frankrijk). De patiënten hebben allemaal een klinische, histologische en moleculaire diagnose van PXE gekregen. Informed consent werd bij alle patiënten bekomen. Deze studie werd goedgekeurd door het Ethisch Comité van het UZGent en het CHU Angers. Tabel 5 vat de demografische karakteristieken van de cohort samen.

De huidige studie concentreert zich op de oogsymptomen van PXE. Hierbij werd voornamelijk toegespitst op de vraag of één of meerdere varianten in het *VEGFA* gen gebruikt kunnen worden in de dagdagelijkse klinische praktijk zowel in de counseling van PXE patiënten als in hun medische opvolging. De patiënten werden onderverdeeld in 2 groepen, namelijk patiënten met een milde en patiënten met een ernstige PXE-retinopathie. Hierbij werd enerzijds rekening gehouden met de visus en anderzijds met de nood aan anti-angiogenetische behandeling(en). In het kader van de vergelijking met een eerder gepubliceerde studie rond de rol van het *VEGFA* gen bij de oogsymptomen van PXE werden de patiënten **in een eerste onderverdeling ingedeeld volgens visus** (visus1). Patiënten worden in deze indeling als ernstig beschouwd wanneer ze unilateraal een visus van < 10/10 hebben. Deze indeling werd alleen bij de Belgische patiënten gebruikt, door een gebrek aan adequate informatie hieromtrent bij de Franse subgroep.

Aangezien deze studie zich concentreert op de gevolgen van een ernstige PXE-retinopathie in het dagelijkse leven, werd **in een tweede onderverdeling volgens visus 5/10** als afkappunt gekozen omdat dit de minimale visus is voor het behoud van het rijbewijs (visus2). Bij een lagere visus is de mobiliteit en onvermijdelijk de zelfstandigheid van de patiënt belemmerd, hetgeen door vele patiënten wordt ervaren als de eerste belangrijke functionele impact van het oculaire PXE fenotype op hun leven. Tot de patiënten met een milde retinopathie werden in deze opdeling deze gerekend met een

visus van 5/10 of meer bilateraal. Een correctie voor de leeftijd werd doorgevoerd, waarbij een significante visusvermindering ($\leq 7/10$) op jonge leeftijd (≤ 45 jaar) als ernstig werd beschouwd.

In de derde onderverdeling, waarbij rekening werd gehouden met de **nood aan anti-angiogenetische behandelingen**, hebben patiënten met een ernstige retinopathie uni- of bilateraal een visus van minder dan 5/10 en/of ondergingen verschillende anti-angiogenetische behandelingen.

2.2 DNA

Het DNA werd bekomen via een EDTA bloedstaal bij de patiënten. Hieruit werd het DNA geëxtraheerd door het DNA-extractieteam van het CMGG. Voor het uitvoeren van de PCR-reacties werd gebruik gemaakt van een DNA-concentratie van 50ng/ μ L. Hiertoe moest het stock-DNA worden verdund aan de hand van onderstaande formule. Deze hoeveelheid DNA werd dan aangelengd met gedemineraliseerd water tot de benodigde hoeveelheid.

$$\text{Hoeveelheid stock - DNA } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Benodigde hoeveelheid } (\mu\text{L}) \times \text{Gewenste concentratie } (\text{ng} / \mu\text{L})}{\text{concentratie stock - DNA } (\text{ng} / \mu\text{L})}$$

2.3 Selectie Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Overzicht van de bestudeerde SNPs		
Promotor	SNP-locatie	Flankerende sequentie
rs699947	A-1564C	tgccaagatct
rs833061	C-467T	gagggcgttg
rs833062	T-424C	tccaatagatc
rs59260042	C-179A	gcggcctcggg
rs79469752	C-172T	gcgggcagggc
/	C-167T	ccaggctcac
rs13207351	A-159G	cactgagcgtc
rs28357093	A-148C	cgcagagcccg
rs1570360	A-123G	gtggaaaggct
Intronen		
rs1413711	T2726C	tgtgc_tccctg
rs735286	C6669T	ttgag_cctcct
rs2146323	C7143A	aaggacttgcc
rs3025020	C11158T	tattcc_ggccc
rs3025021	T11211C	tcctc_tgggtc
rs3025024	C11561T	tgctg_cctett
Exonen		
rs25648	C1031T	gcctc_cgaaac
5'-UTR		
rs2010963	C398G	gaaagcgacag
3'-UTR		
Rs3025039	C14584T	cagcaggtcc
Rs3025040	C15099T	gacacgggctc

Tabel 6. Overzicht van de bestudeerde Single Nucleotide Polymorphisms. Flankerende sequentie: aan elke kant van de SNP werden in deze tabel enerzijds de 5 voorgaande en anderzijds de 5 volgende nucleotiden toegevoegd. Dit maakt het eenvoudiger om de SNP op te zoeken in de sequentie. SNP-locatie: er werd uitgegaan van de transcriptiestartplaats als nucleotide 1; in deze notatie is de letter die de locatie voorafgaat de referentienucleotide en de andere de alternatieve nucleotide.

Eerst werd nagegaan of er SNPs konden worden teruggevonden in de coderende regio; hiervoor werd de SNP-database van **Ensembl** geraadpleegd (<http://www.ensembl.org/index.html>). Later werden ook SNPs afkomstig uit intronen-, promotor-, 5'-UTR en 3'-UTR-regio's betrokken in het project. De selectie van deze laatste gebeurde op basis van artikels, handelend over oogsymptomen bij PXE en over AMD (17, 18). Tabel 6 geeft een overzicht van de onderzochte SNPs. De nomenclatuur, gebruikt om varianten aan te duiden, volgt de meest recente richtlijnen van de Human Genome Variation Society.

2.4 Referentiesequentie en ontwikkeling van primers

Voor een aantal van de onderzochte SNPs diende een primerpaar te worden ontworpen voor PCR (cf. 2.5.2). Hiervoor werd de referentiesequentie van *VEGFA* geraadpleegd in de databank Ensembl (ENSG00000112715). Uit de verschillende mogelijke transcripten, i.e. sequenties, werd transcript ENST00000372055 weerhouden gezien dit het beste overeen met *VEGFA*165, welke de voornaamste *VEGFA*-isovorm is die in het oog tot expressie komt. Dit werd ook geverifieerd aan de hand van een artikel in Nature Cancer Review dat handelt over het *VEGFA* gen (afbeelding 7) (83). Er werd geopteerd om het volledige *VEGFA* gen te screenen naar SNPs en mutaties. De primerparen voor intronen-, promotor-, 5'-UTR- en 3'-UTR regio's werden voornamelijk overgenomen uit artikels van Zarbock et al. en Churchill et al. (17, 18). Voor een genfragment in intron 6-7 en 2 genfragmenten in de 3'-UTR regio konden geen primerparen gevonden worden in de literatuur en voor een genfragment in de promotorregio (promotor 2) kon geen mooi PCR-resultaat worden bekomen met de overgenomen primerparen. Voor deze fragmenten werden nieuwe primerparen ontworpen. Ook voor de analyse van de coderende regio's werden nieuwe primerparen gegenereerd. Na de analyse van een deel van de patiëntenstalen werd gekozen om voor Promotor 1 een extra primerpaar te ontwikkelen, aangezien telkens een deel van de sequentie ontbrak en hierdoor geen volledige analyse mogelijk was. Wanneer een primerpaar wordt ontwikkeld, wordt rekening gehouden met een aantal voorwaarden waaraan moet worden voldaan (86):

- De lengte van de primers is gewoonlijk tussen 15 en 30 baseparen; ze mogen niet te kort noch te lang zijn om respectievelijk gebrek aan specificiteit en moeilijke hechting aan het DNA te vermijden.
- Het primerpaar moet een zo hoog mogelijke specificiteit vertonen voor de doelwitsequentie, waarmee wordt bedoeld dat ze niet op een andere plaats in het genoom mogen binden.
- Het gehalte aan GC is idealiter tussen 40 en 60%, dus vergelijkbaar met het AT-gehalte.
- Er mogen geen complementaire delen aanwezig zijn in een primer, omdat hierdoor primerdimeren of -oligomeren kunnen ontstaan.
- De smelttemperatuur moet voor beide primers van een primerpaar gelijkaardig zijn en ligt bij voorkeur tussen 50°C en 60°C.

De ontwikkeling van de primerparen gebeurde vooral aan de hand van de software Primer3, die via het internet werd geraadpleegd (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Deze software laat toe om de meest geschikte primerparen te ontwikkelen nadat de doelwitsequentie en enkele parameters zoals gewenste lengte en hybridisatietemperatuur werden ingevoerd.

De primerparen die via Primer3 werden gegenereerd, werden vervolgens gecontroleerd in de databases Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De eerste database wordt voornamelijk gebruikt om na te gaan of er in de primerparen SNPs aanwezig zijn, iets wat beter wordt vermeden, aangezien dit de PCR en daaropvolgende sequencerig kan compromitteren. BLAST wordt voornamelijk gebruikt om de specificiteit van de primerparen voor de doelwitsequentie na te gaan. Deze database linkt de ingevoerde primerparen aan alle mogelijke bindingsplaatsen in het humane genoom en drukt de specificiteit van de binding uit met een percentage. Het doel is om primerparen te ontwikkelen die specifiek zijn voor 1 bepaalde regio in het menselijk genoom. In tabel 7 worden de sequenties van de gebruikte primerparen samengevat.

De primerparen werden eerst uitgeprobeerd op controle-DNA. Wanneer PCR en sequencerig goede resultaten gaven, werd overgegaan op patiënten-DNA.

Overzicht van de gebruikte primersequenties		
	FORWARD PRIMER (5' → 3')	REVERSE PRIMER (5 → 3')
Exon 1a	CTTTTGGGGGTGACCGCCGG	TCCATGAGCCCGCTTCCGA
Exon 1b	GGGGAGGAGGAAGAAGAGAA	CCCTGCACCTAAGACGACAG
Exon 2	GTGGGAGGGAAGTGAGGAG	TCCTCCCCACAGTTCTGAAG
Exon 3	CTCCAAAGAGTGGCATTACAGA	CCTGGGACCACCTGTTC
Exon 4	CCCAGGGTTGTCCCATC	ACATAGCGGGAAGCTGGA
Exon 5	CAGTGTGCTCCATAATAAATGC	TGACCCAGGGAGGCTAT
Exon 6	TGGCTTTGCTTTGGTCG	GGCAGGGTTACAGGGAAT
Exon 7	GGGTGTTGCATGGTGAIT	TCTCTTCTCTCTCTCTCTCCC
Exon 8a	TGCTCTTATGGTGCCGA	GGTTTCTGGATTAAGGACTGTTC
Exon 8b	GTTTCGGGAACCAGATCTCTCA	TGAAGACACCAATAACATTAGCAC
Promotor 1	GGTGAGTGAGTGTGTGCG	CCGCTACCAGCCGACTTT
Promotor 1n	GCGTCTTCGAGAGTGAGGAC	CCAAGGTTACAGCCTGAAA
Promotor 2	TAACCTAGCACCTCCACCAAAC	TTCTCCAACCTCTCCACATCTT
5'-UTR	CGACGGCTTGGGGAGATTGCTCT	CAGGTCACTACTTTGCCCTGTG
Intron 1	CGCAAGTTCCTCAGACCC	ACCCATTCCCATGACACC
Intron 2	GGTGTGCGCAGACAGTGCTCCAG	CACCCAAGACAGCAGAAAGTTTCATGGTTTC
Intron 3	ATGCCACACCTTCTC	CCTACGTCTCCCCACAAC
Intron 4	ACGTTAGATTTTGAAGGA	GGATGGCTTGAAGATGTAC
Intron 5	GGGCTGTGAATGACTGGA	GTGGGCTAAAGTAGGGTGTG
Intron 6	GACACAGCATTGCCCTTAT	CAACACCCCTAACATGTCC
3'-UTR	AGTTTTGGGAACGACAA	AAGCAGGTGAGAGTAAGCGAAG

Tabel 7. Overzicht van de gebruikte primersequenties. Primerparen exon 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a en 8b werden gebruikt om de coderende regio's van het *VEGFA* gen te screenen. 8b werd ook gebruikt om rs3025039 te screenen, promotor 1 voor rs833062, rs59260042, rs79469752, rs / (C-167T), rs13207351, rs28357093 en rs1570360, promotor 1n voor rs833061, promotor 2 voor rs699947, 5'-UTR voor rs2010963, intron 1 voor rs1413711, intron 2 voor rs25648, intron 3 voor rs735286, intron 4 voor rs2146323, intron 5 voor rs3025020 en rs3025021, intron 6 voor rs3025024 en 3'-UTR voor rs3025040.

2.5 Technieken

Tijdens het project werden verschillende technieken gebruikt in het laboratorium. Hieronder volgt de beschrijving van de technieken voor concentratiemeting, PCR en sequencer (86-90). De protocols zijn te vinden in bijlage 1.

2.5.1 Concentratiemeting

2.5.1.1 Doel

Het kennen van de concentratie van DNA is noodzakelijk voor het uitvoeren van vele genetische testen, zoals bijvoorbeeld voor het uitvoeren van PCR met een bepaalde, gewenste concentratie van het DNA. Zo kan men weten hoeveel keer het DNA moet worden verdund vooraleer het kan worden gebruikt (88).

2.5.1.2 Principe

DNA-concentratiemeting gebeurt met een **spectrofotometer**. In het CMGG laboratorium wordt een Trinean dropquant (of Dropsense96[®]) gebruikt. De concentratiebepaling van een stof in een spectrofotometer gebeurt volgens de wet van Lambert-Beer. Deze wet zegt dat “de afname van intensiteit van monochromatische straling die invalt op een absorberend milieu, recht evenredig is met de intensiteit van de opvallende straling en de hoeveelheid materiaal in de lichtweg”.

$$A = \epsilon_{\lambda} b C$$

Met:

A: absorbantie of extinctie (dimensieloos)

ϵ_{λ} : molaire extinctie coëfficiënt (constante voor een bepaalde stof, afhankelijk van temperatuur, oplosmiddel en golflengte) in L / (mol.cm)

b: optische lengte (cuvetbreedte) in cm,

C: concentratie van de absorberende stof in mol / L.

Hieruit kan worden afgeleid dat de absorbantie van een stof bij een bepaalde golflengte recht evenredig is met de concentratie van deze stof. De absorbantie (A) kan worden gemeten en indien de molaire extinctiecoëfficiënt ook gekend is, kan de concentratie van de stof worden gemeten aan de hand van de wet van Lambert-Beer.

De absorptie wordt gemeten door volgende formule:

$$A = -\log (I_{\text{staal}} / I_{\text{blanco}})$$

Met:

A: absorptie

I_{staal} : gemeten intensiteit van het doorgelaten licht bij de meting van het staal

I_{blanco} : gemeten intensiteit van het doorgelaten licht bij de meting van een blanco staal

Bij klassieke spectrofotometers wordt de oplossing in een cuvet geplaatst en wordt daardoor een lichtstraal gestuurd. Na doorgang door het cuvet wordt het resterende licht gemeten. De Trinean dropquant gebruikt hetzelfde principe maar maakt geen gebruik van cuvetten. Hij voert een tweevoudige meting uit met twee verschillende optische lengtes, meer bepaald 0.2 en 1 mm (= b in de formule). Zo kunnen zowel zeer hoge als zeer lage concentraties worden gemeten.

De dropsense96[®] kan bij verschillende golflengtes meten, waaronder 230nm, 260nm en 280nm. De software waarvan Trinean gebruik maakt, berekent dan automatisch de verhoudingen en zo bekomt men onmiddellijk de ratio A_{260}/A_{280} en A_{260}/A_{230} . Deze ratio's worden gebruikt om de zuiverheid te meten van een staal, wat van belang is bij het uitvoeren van minder robuuste genetische testen. De zuiverheid van het staal kan worden gebruikt als een maat voor het slagen van de meting (87, 88).

2.5.1.3 Materialen

- Toestel Trinean (dropsense96[®]) met software dropquant.
- D(ual)-plaat. Deze bevat 2 optische kamers zodat een tweevoudige meting kan worden uitgevoerd (cf. 2.5.1.2)
- 3 μ L DNA
- 6 μ L van het DNA-oplosmiddel (88)

2.5.2 Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketting Reactie of PCR)

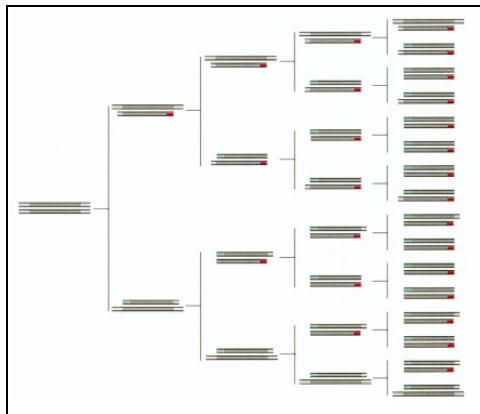
2.5.2.1 Doel

Het doel van de PCR is om, uitgaande van een minimale hoeveelheid DNA, een specifiek DNA-fragment te amplificeren. Deze reactie gebeurt om latere sequenceren en analyse van het bekomen reactieproduct mogelijk te maken (86, 89).

2.5.2.2 Principe

De PCR bestaat uit **3 stappen** die zich in een aantal cycli – gewoonlijk een twintig- tot dertigtal – herhalen. De eerste stap is de **denaturatie**. In deze stap worden bij een hoge temperatuur (94°C; cf. TD-schema) de waterstofbruggen tussen de complementaire basen gebroken en gaan de DNA-strengen uiteen. De gevormde enkelstrengige DNA-moleculen dienen als template (“matrijs”) voor de aanmaak van twee nieuwe strengen. De tweede stap is de “annealing” of **hybridisatie** van de primers. De primers binden op het gedatureerde DNA en vormen het begin van de verdere elongatie. Hybridisatie van primers gebeurt bij een temperatuur die primerspecifiek is (afhankelijk van hun lengte en samenstelling). De optimale temperatuur is gewoonlijk tussen 40°C en 60°C. De derde en laatste stap is de **elongatie**. Vanuit de primers zorgt het Taq-polymerase voor de aanmaak van complementaire DNA-strengen door middel van nucleotiden (dNTPs). Dit gebeurt bij een temperatuur van 72°C. De aanhechting van nucleotiden gebeurt in de 3'-richting.

Het gevormde DNA kan in een volgende cyclus als template worden gebruikt, waardoor er een exponentiële toename is van het DNA (afbeelding 8) (86, 89).



Afbeelding 8. Exponentieel verloop van een PCR-reactie. Overgenomen uit (86).

Wanneer de PCR is uitgevoerd, moet worden nagegaan of de reactie is geslaagd. Dit wordt gedaan door middel van de **elektroforesetechniek**. De stalen worden hiertoe automatisch verwerkt met de Caliper Labchip GX.

2.5.2.3 Samenstelling PCR-mengsel

Het standaardmengsel bestond in totaal uit 25µL en omvat de volgende elementen :

- 13,9µL H₂O (SIGMA[®])
- 5µL buffer (5x) (Kapa biosystems[®])
- 3µL 1mM dNTPs (Invitrogen[®])
- 1µL 25mM MgCl₂ (Kapa biosystems[®])
- 0,5µL 30µM forward primer (Invitrogen[®], IDT[®])

- 0,5µL 30µM reverse primer (Invitrogen[®], IDT[®])
- 0,1µL 5U/µL Taq polymerase (Kapa biosystems[®])
- 1µL DNA
- DMSO werd toegevoegd wanneer het primaire PCR-resultaat onzuiver was. Dit was voornamelijk het geval bij GC-rijke genfragmenten. Indien DMSO werd toegevoegd, werd de hoeveelheid toegevoegd water verminderd met het toegevoegde DMSO.

Bij moeilijk te optimaliseren GC-rijke sequenties waar DMSO ontoereikend was, werd gemaakt van het Kapa Robust Hot Start-polymerase waarvoor speciale conditie golden:

- 13,1µL Water (SIGMA[®])
- 5µL GC Buffer (Kapa biosystems[®])
- 5µL 1 µM dNTP (Invitrogen[®])
- 0,4µL 30µM forward primer (Invitrogen[®], IDT[®])
- 0,4µL 30µM reverse primer (Invitrogen[®], IDT[®])
- 0,1µL 5U/µL Robust Hotstart DNA polymerase (Kapa biosystems[®])

In tabel 8 is een overzicht te vinden van de gebruikte PCR-condities voor de verschillende genfragmenten.

2.5.2.4 PCR-programma

Overzicht van de PCR-condities		
	PCR-MENGSEL	PCR-INSTELLINGEN (TDT1-T2)
Exon 1a	Kapa Robust Hot Start met GC buffer-condities	TD66-54
Exon 1b	ST + DMSO (0,5µL/reactie)	TD62-50
Exon 2	ST+ 10% DMSO	TD62-50
Exon 3	ST	TD62-50
Exon 4	ST+ 5% DMSO	TD62-50
Exon 5	ST	TD62-50
Exon 6	ST	TD62-50
Exon 7	ST	TD62-50
Exon 8a	ST	TD62-50
Exon 8b	ST	TD62-50
Promotor 1	ST + 5% DMSO	TD62-50
Promotor 1n	ST + 5% DMSO	TD62-50
Promotor 2	ST	TD62-50
5'-UTR	ST + 5% DMSO	TD62-50
Intron 1	ST + 5% DMSO	TD62-50
Intron 2	ST + 5% DMSO	TD62-50
Intron 3	ST	TD62-50
Intron 4	ST	TD62-50
Intron 5	ST + 5% DMSO	TD62-50
Intron 6	ST	TD62-50
3'-UTR	ST	TD62-50

Tabel 8. Overzicht van de gebruikte PCR-condities. ST = standaard PCR-mengsel zonder DMSO, zoals beschreven in de tekst. TD= touchdown, methode voor lopen PCR. 5% DMSO: er wordt 5% van het totaal reactievolume DMSO toegevoegd, i.e. 1,25µL bij een reactievolume van 25µL. Zie tabel 7 voor de verklaring van de primerbenamingen.

Voor het lopen van de PCR werd gebruik gemaakt van het **Touchdown-principe** (TD-principe; standaardnotatie TDT1-T2). Eerst is er een inleidende stap van 4' aan 94°C. Dit wordt gevolgd door twaalf cycli van 20'' aan 94°C, 15'' aan T1 (T1 neemt telkens af met 1°C per cyclus) en 1' aan 72°C. Daarna zijn er 28 cycli van 40'' aan 94°C, 40'' aan T2, 30'' aan 72°C en 10' aan 72°C met T2=T1-12. Tenslotte volgt nog 1' aan 15°C. Dit laatste dient om het product af te koelen. In tabel 8 worden de T1- en T2-temperaturen van de gebruikte primerparen samengevat.

2.5.2.5 Optimalisatie

Bij het optimaliseren van de reacties werd telkens uit gegaan van het standaard PCR-mengsel zoals hierboven reeds beschreven. In sommige gevallen gaf dit echter een onzuiver of zelfs helemaal geen resultaat. Er volgde dan een optimalisatieproces met uittesten van de reacties bij verschillende condities.

Mogelijke oorzaken van een niet optimale PCR (86):

- Primers binden op een andere dan de gewenste plaats (gebrek aan specificiteit).

Mogelijke aanpassingen:

- Verhogen van de aanhechtingstemperatuur van de primers.
- Verkorten van de aanhechtingstijd.
- Aanpassen van reactiemengsel door toevoeging van DMSO (voornamelijk bij GC-rijke sequenties, vermindering van de hoeveelheid primers en/of het gebruik van een andere reactiebuffer.

- Niet verkrijgen van een amplificatieproduct (gebrek aan sensitiviteit) (86).

Mogelijke aanpassingen:

- Verlagen van de aanhechtingstemperatuur van de primers.
- Verlengen van de aanhechtingstijd.
- Verlengen van de elongatietijd (voornamelijk bij langere fragmenten).
- Aanpassen van reactiemengsel.

De testfase met controle-DNA verliep niet steeds even vlot en vaak moesten verschillende fragmenten herdaan worden. Wanneer een bepaald primerpaar na verschillende pogingen geen aanvaardbare resultaten gaf, werd beslist om een nieuw primerpaar te ontwikkelen en de hele testprocedure van voor af aan te herbeginnen (86).

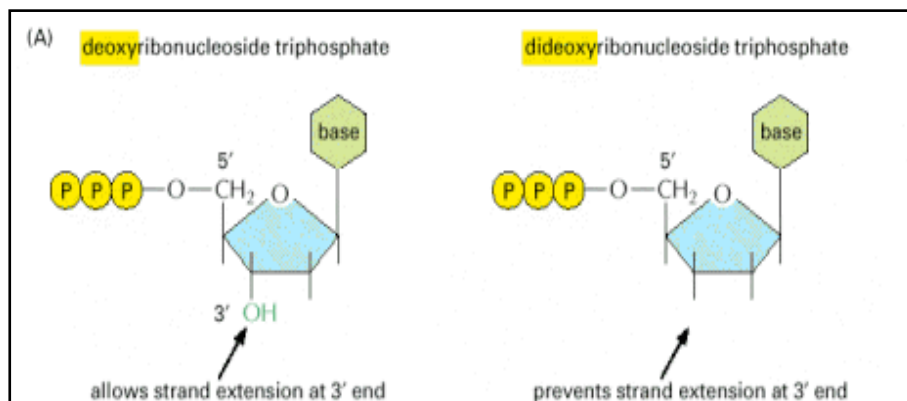
2.5.3 Sequencing

2.5.3.1 Doel

Sequencing heeft als doel het bepalen van de opeenvolging van de nucleotiden in de doelwitsequentie. Op die manier wordt analyse van het genfragment mogelijk gemaakt (90).

2.5.3.2 Principe

De sequencerig gebeurt volgens het **Sangerprincipe** (91). In deze methode wordt gebruikt gemaakt van **2',3'-dideoxynucleotiden (ddNTPs)** die fungeren als zogenaamde “ketenbeëindigende inhibitoren” (afbeelding 9). Deze worden ingebouwd in het ssDNA dat uit voorbereidende stappen werd bekomen. De sequenceringsreactie gebeurt tijdens een aantal cycli van hogere en lagere temperatuur, respectievelijk voor denaturatie en hechten van de primers en synthese. Elke primer (i.e. een klein stukje ssDNA) bindt met het gedenuatureerde PCR-product. In het mengsel bevinden zich ook de 4 dNTPs en in ondermaat ook 4 ddNTPs, gemerkt met fluorochromen. Deze laatste worden de BigDye Terminators genoemd. Vanaf de primer worden de nucleotiden één voor één gekoppeld, en telkens wanneer een BigDye Terminator bindt, stopt de verdere amplificatie. Hierdoor krijg je als resultaat allemaal stukjes DNA die alle mogelijke lengtes aannemen en die geëindigd zijn op een ddNTP. De sequenties worden daarna uitgelezen door de sequencer aan de hand van hun elektrische lading. Ze migreren op basis van hun lengte, met de kortste eerst. Wanneer ze voorbij het detectievenster passeren, worden de fluorochromen geëxciteerd door de laser. De detectie gebeurt met de ABI 3130XL en de ABI3730XL.



Afbeelding 9. Principe van Sangersequencerig. dNTPs laten de binding toe van een volgende nucleotide aan het 3'-OH. Bij de ddNTPs is deze hydroxylgroep afwezig en kan geen binding meer optreden. De sequentie wordt beëindigd. Deze ddNTPs worden willekeurig ingebouwd in de opgezuiverde PCR-producten en zo ontstaan sequenties van verschillende lengtes. Deze worden gebruikt om de originele sequentie te reconstrueren.

Overgenomen uit: (90).

2.5.3.3 Materialen

- PCR-product (cf. protocol PCR-reactie, bijlage 1)
- Antarctic Phosphatase (5000U/mL, New England Biolabs[®])
- Exonuclease (20000U/mL, New England Biolabs[®])
- BigDye Terminator v3.x Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems[®]): RR (=Ready Reaction Mix) en Sequentiebuffer 5x (ABI-buffer)

- Primers 1 μ M (Invitrogen[®], IDT[®])
- DMSO (Invitrogen[®])
- CleanSeq beads (Agencourt[®])
- HPLC water (Fischer Scientific[®])

2.6 Sequentie-analyse

De referentiesequentie van het *VEGFA* gen werd opgezocht in de database Ensembl. De gevonden sequenties werden één voor één vergeleken met de referentie. Er werd op zoek gegaan naar SNPs (cf. 2.3) en mutaties.

De programma's die werden gebruikt voor de analyse zijn **SeqScape** (Applied Biosystems, 2,5) en **Finch** (<http://finch.ugent.be:8080/Finch/Core/loginForm>). In bijlage 3 kunnen screenshots worden geraadpleegd van een analysesessie. Deze fase nam heel wat tijd in beslag aangezien voor elke patiënt alle SNP-plaatsen moesten worden nagekeken en de resultaten niet altijd even duidelijk waren. In gevallen waar de twijfel te groot bleef, werd beslist om het verwerkingsproces te herstarten vanaf de PCR-reactie.

2.7 Statistische Analyse

Na de analyse in Seqscape en Finch, werden de allelen opgeteld per categorie (mild en ernstig) en werd hierop een **Fischers Exacttest** uitgevoerd om de statistische significantie van het verschil in allelen op te zoeken. De Fischers Exacttest is een statistische test die gebruikt wordt bij categorische variabelen, dit zijn variabelen die karakteristieken van de populatie beschrijven die niet in getalwaarden zijn uitgedrukt en overeenkomen met een bepaalde categorie, zoals het geslacht of het al dan niet aanwezig zijn van een bepaald kenmerk (92). De 2 variabelen die werden gebruikt, zijn het al of niet aanwezig zijn van de alternatieve vorm van de SNP en de 2 categorieën Ernstig en Mild (zie 2.1). Zo werd een 2x2-tabel bekomen (tabel 9).

2x2-tabel bij de Fischers Exacttest	Ernstig	Mild	Totalen
Referentie-allel	a	b	a+b
Alternatief allel	c	d	c+d
Totalen	a+c	b+d	n

Tabel 9. Gebruik van de 2X2-tabel bij de Fischers Exacttest. a = het aantal referentie-allelen in de “Ernstige” populatie; b = het aantal referentie-allelen in de “Milde” populatie; c = het aantal alternatieve allelen in de “Ernstige” populatie; d = het aantal alternatieve allelen in de “Milde” populatie.

Uit tabel 9 kan aan de hand van wiskundige formules de significantie of p-waarde worden berekend. De grens voor significantie werd vastgelegd op 0,05. De uitvoering van de test gebeurde met behulp van een website voor statistische analyse van het Vassar College NY in de Verenigde Staten (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

Significantie wordt op 2 manieren uitgedrukt, namelijk op basis van enerzijds eenzijdig toetsen en anderzijds **tweezijdig toetsen**. Eenzijdig toetsen wil zeggen dat geweten is wat het effect zou moeten zijn van de aanwezigheid van het alternatieve allel. Er zou dus reeds bekend moeten zijn of het alternatieve allel meer dan wel minder aanwezig is in de ernstig aangetaste populatie. De gebruikte artikels geven hieromtrent wel een hint, maar gezien het geringe aantal studies, is het aangewezen om tweezijdig te toetsen, dit wil zeggen dat het effect nog niet geweten is (92).

3 RESULTATEN

De doelstelling van deze masterproef is de identificatie en/of confirmatie van genotype-fenotype correlaties tussen varianten (SNPs en mutaties) in het *VEGFA* gen en de oculaire symptomen bij PXE patiënten. Hierbij werd voornamelijk toegespitst op de vraag of één of meerdere van dergelijke varianten gebruikt kunnen worden in de dagdagelijkse klinische praktijk in de counseling van PXE patiënten en in hun opvolging.

3.1 Patiënten

In deze studie werd een cohorte van 66 patiënten geëvalueerd, afkomstig uit respectievelijk de PXE-kliniek van Gent en van Angers (Frankrijk). Deze cohorte werd onderverdeeld in patiënten met respectievelijk een milde of ernstige retinopathie volgens de criteria beschreven in de methodologie. In tabel 10 wordt de samenstelling van de verschillende groepen weergegeven.

	Totale cohorte						Totale cohorte
	Aantal	Visus1		Anti-VEGF			
		Ernstig	Mild	Ernstig	Mild		
Indeling van de patiënten volgens de ernst van het oculaire fenotype	F	12	35	20	27	47	
	M	10	9	13	6	19	
	Totaal	22	44	33	33	66	

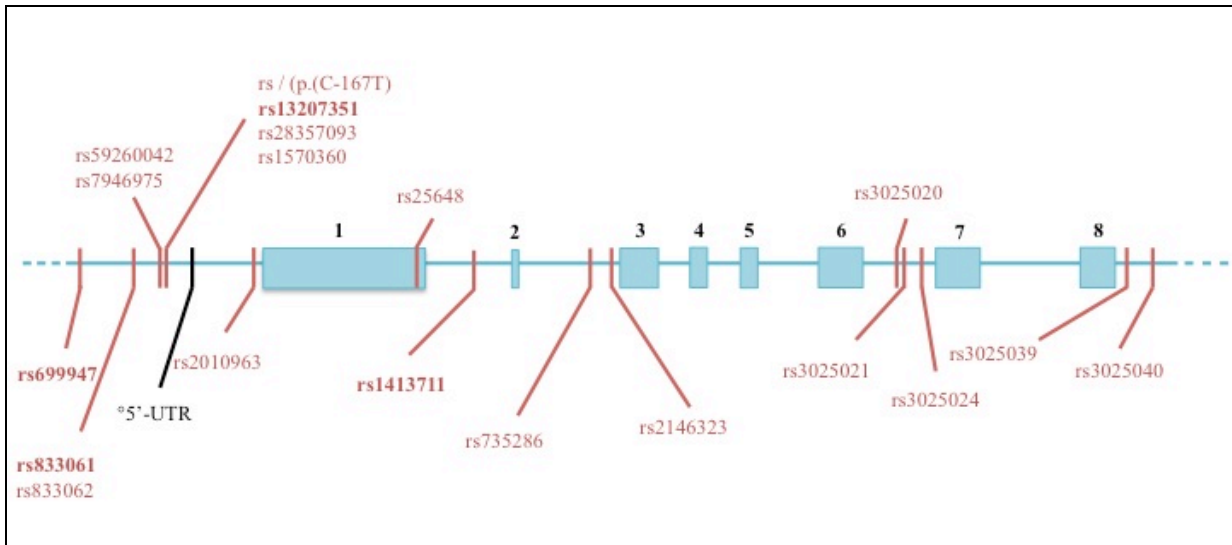
Aantal	Belgische patiënten							Franse patiënten				
	Visus1		Visus2		Anti-VEGF		Totaal	Visus1		Anti-VEGF		Totaal
	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild		Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	
F	5	25	13	17	11	19	30	7	10	7	10	17
M	5	5	7	3	6	4	10	5	4	6	3	9
Totaal	10	30	20	20	17	23	40	12	14	13	13	26

Tabel 10. Indeling van de patiënten volgens de ernst van het oculaire fenotype. Visus1: ernstige groep = visus <10/10. Visus2: ernstige groep = visus <5/10. Anti-VEGF: ernstige groep visus <5/10 en/of ≥ 1 Anti-VEGF injectie(s).

Bij enkele patiënten was het, ondanks doorgedreven optimalisatie, niet mogelijk om adequate sequenties te bekomen om op alle geselecteerde loci SNPs te kunnen onderzoeken; deze werden uit de studiecohort gelaten voor deze welbepaalde SNP(s). Dit zal telkens worden vermeld bij de desbetreffende SNP.

3.2 Frequentie van de bestudeerde Single Nucleotide Polymorphisms

In de volgende paragrafen worden de onderzochte SNPs afzonderlijk besproken. Afbeelding 10 geeft een overzicht van de lokalisatie van de onderzochte SNPs in het *VEGFA* gen. Telkens wordt het aantal homozygoten en heterozygoten vermeld alsook de bekomen p-waarden, i.e. de statistische significantie. Hier wordt echter slechts een beknopte samenvatting gegeven van de berekeningen. Voor een volledig overzicht wordt verwezen naar tabel 2.



Afbeelding 10. Overzicht van de onderzochte SNPs in het *VEGFA* gen. Gebaseerd op: (83). De SNPs die een tweezijdig significant resultaat geven bij ernstige PXE-retinopathie volgens de anti-VEGF indeling zijn vetjes gedrukt.

3.2.1 Varianten gelegen in de promotorregio

3.2.1.1 p.(A-1564C) (rs699947)

In de volledige cohorte zijn 20 patiënten homozygoot voor het A-allel (wild type), 17 voor het C-allel en 29 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,14 voor tweezijdige toets).

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling rekening houdend met de anti-VEGF therapie wordt een significant resultaat gevonden met p-waarde 0,014 voor tweezijdige toets.

In de Belgische groep wordt een tweezijdig significant resultaat gevonden bij de indeling volgens anti-VEGF therapie, met p-waarde 0,0056 voor tweezijdige toets. In de Franse cohorte worden geen significante resultaten bekomen.

De resultaten van de statistische tests zijn terug te vinden in tabel 11.

Overzicht p-waarden rs699947			
rs699947	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,14	0,014
Belgisch	0,11	0,069	0,0056
Frans	/	0,24	0,56

Tabel 11. Overzicht p-waarden rs699947.

3.2.1.2 p.(C-467T) (rs833061)

In de volledige cohorte zijn 19 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 16 voor het T-allel en 31 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde tweezijdige toetsing 0,20).

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling rekening houdend met de anti-VEGF therapie wordt een tweezijdig significant resultaat gevonden met p-waarde 0,014.

In de subcohortes wordt enkel een significant resultaat gevonden in de Belgische groep, wanneer ingedeeld wordt op basis van anti-VEGF therapie. De p-waarde voor tweezijdige toets is 0,0056.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 12.

Overzicht p-waarden rs833061			
rs833061	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,20	0,014
Belgisch	0,11	0,12	0,0056
Frans	/	0,24	0,56

Tabel 12. Overzicht p-waarden rs833061.

3.2.1.3 p.(T-424C) (rs833062), p.(C-179A) (rs59260042) en p.(C-172T) (rs79469752)

Deze 3 SNPs worden samen besproken aangezien de bekomen resultaten identiek zijn.

In de totale cohorte zijn alle patiënten homozygoot voor het referentie-allel. Bij gebrek aan variatie wordt aldus geen significant resultaat bekomen met tweezijdig getoetste p-waarden gelijk aan 1.

Een overzicht van de resultaten van de meest relevante statistische tests is terug te vinden in tabel 13.

Overzicht p-waarden rs833062/rs59260042/rs79469752			
	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	1,0	1,0
Belgisch	1,0	1,0	1,0
Frans	/	1,0	1,0

Tabel 13. Overzicht p-waarden rs833062, rs59260042, rs79469752.

3.2.1.4 p.(C-167T) (geen rs-nummer)

In de volledige cohorte zijn 63 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type) en 2 patiënten compound heterozygoot. Van één patiënt was het niet mogelijk de gegevens te gebruiken, cf. 3.2.1.8.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus $<5/10$ worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden. De p-waarde voor tweezijdige toets is 0,56.

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling rekening houdend met de anti-VEGF therapie wordt ook geen significant resultaat gevonden, met p-waarde 1 voor tweezijdige toets.

In de subcohortes worden geen significante resultaten gevonden

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 14.

Overzicht p-waarden p.(C-167T)			
p.(C-167T)	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,56	1,0
Belgisch	1,0	1,0	1,0
Frans	/	0,50	1,0

Tabel 14. Overzicht p-waarden p.(C-167T)

3.2.1.5 p.(A-159G) (rs13207351)

In de volledige cohorte zijn 18 patiënten homozygoot voor het A-allel (wild type), 16 voor het G-allel en 31 patiënten compound heterozygoot. Van één patiënt was het niet mogelijk de gegevens te gebruiken, cf. 3.2.1.8.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus $<5/10$ worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen tweezijdig significant resultaat gevonden (p-waarde 0,094).

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt een sterk significant resultaat gevonden voor tweezijdige toets met p-waarde 0,0079.

In de Belgische cohorte wordt een sterk significant resultaat gevonden, i.e. $p < 0,01$ bij de indeling volgens anti-VEGF, met p-waarde 0,0056 voor tweezijdige toets.

Een overzicht van de resultaten van de meest relevante statistische tests is te vinden in tabel 15.

Overzicht p-waarden rs13207351			
rs13207351	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,094	0,0079
Belgisch	0,11	0,12	0,0056
Frans	/	0,15	0,37

Tabel 15. Overzicht p-waarden rs13207351.

3.2.1.6 p.(A-148G) (rs28357093)

In de volledige cohorte zijn 62 patiënten homozygoot voor het A-allel (wild type) en 3 patiënten compound heterozygoot. Van één patiënt was het niet mogelijk de gegevens te gebruiken, cf. 3.2.1.8.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt een tweezijdig significant resultaat gevonden met p-waarde 0,032.

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt geen resultaat gevonden (p-waarde 0,081 voor tweezijdige toets).

In de subcohortes wordt enkel een significant resultaat gevonden in de Belgische groep wanneer wordt ingedeeld volgens visus2 met p-waarde 0,014 voor tweezijdige toets.

Een overzicht van de resultaten van de meest relevante statistische tests is te vinden in tabel 16.

Overzicht p-waarden rs28357093			
rs28357093	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,032	0,081
Belgisch	0,24	0,014	0,073
Frans	/	1,0	1,0

Tabel 16. Overzicht p-waarden rs28357093.

3.2.1.7 p.(A-123G) (rs1570360)

In de volledige cohorte zijn 10 patiënten homozygoot voor het A-allel (wild type), 31 voor het G-allel en 24 patiënten compound heterozygoot. Van één patiënt was het niet mogelijk de gegevens te gebruiken, cf. 3.2.1.8.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,32 voor tweezijdige toets)

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt geen tweezijdig significant resultaat gevonden (p-waarde 0,062).

In subcohortes worden geen significante resultaten gevonden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests worden weergegeven in tabel 17.

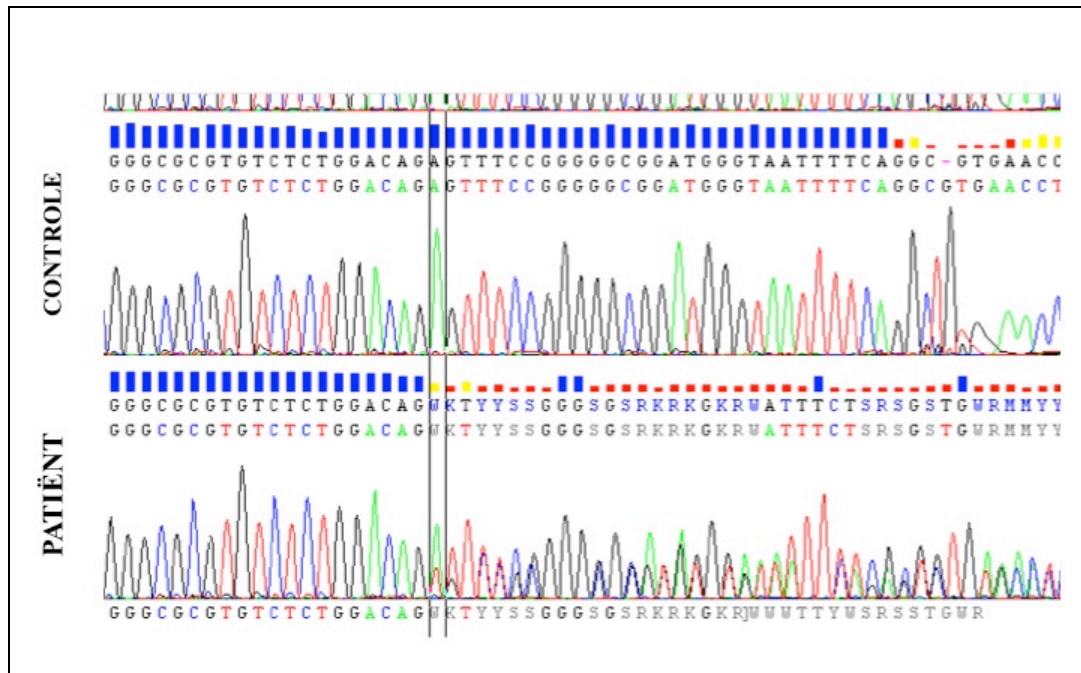
Overzicht p-waarden rs1570360			
rs1570360	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,32	0,062
Belgisch	1,0	0,40	0,21
Frans	/	0,39	0,16

Tabel 17. Overzicht p-waarden rs1570360.

3.2.1.8 c.-254_-255delAG

Bij een van de Franse patiënten werd een deletie gevonden met rs57743727 (afbeelding 11). Deze variant was nog niet gekend bij deze patiënt en werd bij geen van de andere patiënten in de huidige studie teruggevonden. De deletie bevindt zich maar op 1 van beide allelen, waardoor de sequentie

eigenlijk dubbel loopt van positie -254 (afbeelding 11). Hierdoor was het onmogelijk om deze sequentie nog verder te interpreteren bij de verdere analyse van de promotor-SNPs downstream van de deletie.



Afbeelding 11. Elektroferogram van c.-254_-255delAG. Op de plaats van de balk is bij de patiënt een A- en een T-top zichtbaar. In eerste instantie wordt dan ook gedacht aan de aanwezigheid van een SNP. Als de sequentie echter verder wordt geanalyseerd in de 3'-richting, kan opgemerkt worden dat de sequentie dubbel blijft lopen en dat de afwijkende sequentie bij de patiënt dezelfde is als de sequentie van de controlepatiënt, maar dat deze sequentie zich op elk moment 2 nucleotiden meer in de 3'-UTR-richting bevindt.

3.2.2 Varianten gelegen in de intronenregio

3.2.2.1 p.(T2726C) (rs1413711)

In de volledige cohorte zijn 20 patiënten homozygoot voor het T-allel (wild type), 16 voor het C-allel en 30 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden met p-waarde 0,14 voor tweezijdige toets.

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt een tweezijdig significant resultaat gevonden p-waarde 0,0085.

In de Franse subcohort worden geen significante resultaten gevonden. In de Belgische subcohort wordt bij de indeling volgens anti-VEGF een sterk significant resultaat gevonden met p-waarde 0,0028 voor tweezijdige toets.

De resultaten van de meest relevante berekeningen zijn te vinden in tabel 18.

Overzicht p-waarden rs1413711			
rs1413711	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P tweezijdig			
Totaal	/	0,14	0,0085
Belgisch	0,11	0,07	0,0028
Frans	/	0,24	0,56

Tabel 18. Overzicht p-waarden rs1413711.

3.2.2.2 p.(C6669T) (rs735286)

In de volledige cohorte zijn 30 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 8 voor het T-allel en 28 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,43 voor tweezijdige toets).

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt ook geen tweezijdig significant resultaat gevonden, met p-waarde 0,095.

In de subgroepen worden geen significante resultaten weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 19.

Overzicht p-waarden rs735286			
rs735286	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P tweezijdig			
Totaal	/	0,43	0,095
Belgisch	0,49	0,79	0,17
Frans	/	0,19	0,32

Tabel 19. Overzicht p-waarden rs735286.

3.2.2.3 p.(C7143A) (rs2146323)

In de volledige cohorte zijn 41 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 8 voor het A-allel en 17 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden met p-waarde 0,47 voor tweezijdige toets.

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt ook geen tweezijdig significant resultaat gevonden (0,68).

In de subcohortes worden geen significante resultaten weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 20.

Overzicht p-waarden rs2146323			
rs2146323	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,47	0,068
Belgisch	0,61	0,25	0,071
Frans	/	0,11	0,74

Tabel 20. Overzicht p-waarden rs2146323.

3.2.2.4 p.(C11158T) (rs3025020)

In de volledige cohorte zijn 27 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 7 voor het T-allel en 32 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (visus2), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,44 voor tweezijdige toets).

Wanneer de berekeningen worden gemaakt bij de indeling volgens anti-VEGF wordt ook geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,85 voor tweezijdige toets).

Er wordt in de subcohortes geen significantie weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 21.

Overzicht p-waarden rs3025020			
rs3025020	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,44	0,85
Belgisch	0,48	0,17	0,48
Frans	/	0,77	0,77

Tabel 21. Overzicht p-waarden rs3025020.

3.2.2.5 p.(T11211C) (rs3025021)

In de volledige cohorte zijn 6 patiënten homozygoot voor het T-allel (wild type), 31 voor het C-allel en 29 patiënten compound heterozygoot.

Er worden geen significante resultaten weerhouden, noch voor de visus2 groep, noch voor de anti-VEGFA-indeling. De p-waarden voor tweezijdige toets zijn respectievelijk 0,84 en 0,85.

In de subcohortes worden geen significante resultaten weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 22.

Overzicht p-waarden rs3025021			
rs3025021	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,84	0,85
Belgisch	0,81	1,0	0,81
Frans	/	1,0	1,0

Tabel 22. Overzicht p-waarden rs3025021.

3.2.2.6 p.(C11561T) (rs3025024)

In de totale cohorte zijn alle patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type). Bij gebrek aan variatie wordt geen significant resultaat gevonden, met p-waarde 1,0 voor tweezijdige toets.

De tweezijdige p-waarden van de statistische tests zijn terug te vinden in tabel 23.

Overzicht p-waarden rs3025024			
rs3025024	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	1,0	1,0
Belgisch	1,0	1,0	1,0
Frans	/	1,0	1,0

Tabel 23. Overzicht p-waarden rs3025024.

3.2.3 Varianten gelegen in de coderende regio

Screening van de coderende regio leverde slechts 1 bruikbare SNP op voor het onderzoek.

3.2.3.1 p.(C1031T) (rs25648)

Deze SNP geeft een verandering van codon 179 in de proteïnestructuur van het *VEGFA* gen. Dit codon TCC codeert in normale situatie voor een serine. Het mutante codon TCT codeert echter ook voor een serine en zo is de eiwitstructuur niet veranderd (silent variation).

In de volledige cohorte zijn 45 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 4 voor het T-allel en 16 patiënten compound heterozygoot. Van 1 patiënt kon geen bruikbare sequentie voor analyse worden bekomen, ondanks doorgedreven optimalisatie.

Er worden in de totale cohorte geen significante resultaten weerhouden met tweezijdige p-waarde 0,47 voor de visus2-indeling en 0,26 voor de anti-VEGF indeling.

In de subcohortes wordt enkel een significant resultaat gevonden bij de Belgische patiënten wanneer wordt ingedeeld volgens anti-VEGF. De p-waarde tweezijdige toets bedraagt 0,020.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 24.

Overzicht p-waarden rs25648			
rs25648	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,47	0,26
Belgisch	1,0	0,27	0,020
Frans	/	0,74	0,74

Tabel 24. Overzicht p-waarden rs25648.

3.2.4 Varianten gelegen in de 5'-UTR-regio

3.2.4.1 p.(C398G) (rs2010963)

Wegens een gebrek aan voldoende geslaagde stalen in de Franse groep konden voor deze SNP geen berekeningen worden gemaakt voor de volledige groep.

In de subcohortes wordt geen tweezijdige significante gevonden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 25.

Overzicht p-waarden rs2010963			
rs2010963	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	/	/
Belgisch	0,37	0,30	0,072
Frans	/	/	/

Tabel 25. Overzicht p-waarden rs2010963.

3.2.5 Varianten gelegen in de 3'-UTR-regio

3.2.5.1 p.(C14584T) (rs3025039)

In de volledige cohorte zijn 43 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 10 voor het T-allel en 13 patiënten compound heterozygoot.

Wanneer de berekeningen bij de indeling volgens visus <5/10 worden gemaakt (Visus2 groep), wordt geen significant resultaat gevonden (p-waarde 0,49 voor tweezijdige toets).

Bij de andere indeling, met name die volgens anti-VEGF, wordt ook geen tweezijdig significant resultaat gevonden, met p-waarde 0,20.

In de subcohortes worden geen significante resultaten weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 26.

Overzicht p-waarden rs3025039			
rs3025039	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
P _{tweezijdig}			
Totaal	/	0,49	0,20
Belgisch	0,78	1,0	0,78
Frans	/	0,19	0,17

Tabel 26. Overzicht p-waarden rs3025039.

3.2.5.2 p.(C15099T) (rs3025040)

In de volledige cohorte zijn 37 patiënten homozygoot voor het C-allel (wild type), 4 voor het T-allel en 25 patiënten compound heterozygoot.

Er wordt in de totale cohorte geen tweezijdige significantie gevonden. De p-waarden voor tweezijdige toets zijn 1,0 voor de Visus2 groep en 0,53 voor de anti-VEGFA indeling.

In de subcohortes worden geen significante resultaten weerhouden.

De resultaten van de meest relevante statistische tests zijn terug te vinden in tabel 27.

Overzicht p-waarden rs3025040			
rs3025040	VISUS1	VISUS2	ANTI-VEGF
Ptweezijdig			
Totaal	/	1,0	0,53
Belgisch	0,78	1,0	0,78
Frans	/	0,75	0,74

Tabel 27. Overzicht p-waarden rs3025040.

4 DISCUSSIE

Pseudoxanthoma Elasticum is een zeldzame, autosomaal recessieve bindweefselaandoening met symptomen ter hoogte van meerdere orgaanstelsels. **Oogsymptomen komen bij vrijwel elke PXE patiënt voor in het verloop** van de aandoening en voor vele patiënten zijn deze manifestaties de **meest ingrijpende m.b.t. hun levenskwaliteit** (99). Deze oculaire problemen ontstaan ten gevolge van neovascularisatie. Sommige patiënten hebben een eerder beperkte retinopathie met weinig actieve neovascularisatie, terwijl andere patiënten uitgesproken oculaire neovascularisatie ontwikkelen, met het ontstaan van bloedingen, degeneratie en uiteindelijk atrofie van de retina (cf. 1.3.3.) (18). Neovascularisatie wordt in de hand gewerkt door enerzijds de aanwezigheid van breuken in het membraan van Bruch, de zogenaamde angioïde strepen (18, 25), en anderzijds door de aanwezigheid van groeifactoren die het proces van neovascularisatie kunnen initiëren, waaronder VEGF (18).

De mutaties welke PXE veroorzaken bevinden zich in het ***ABCC6* gen**. Deze mutaties kunnen echter de **variabiliteit van het fenotype**, inclusief de oculaire symptomen, **niet verklaren**. Het is op heden voor artsen onmogelijk om PXE patiënten gerichte en meer geïndividualiseerde informatie te verstrekken omtrent de prognose van de oogmanifestaties. Deze onzekerheid is zowel voor de patiënt als voor de arts zeer frustrerend. Men kan enkel een standaard screeningsprotocol volgen en afwachten met ingrijpen tot symptomen ontstaan, wat het risico inhoudt dat op dat moment reeds schade is opgetreden. Wanneer het mogelijk zou zijn om die patiënten te identificeren welke binnen de PXE populatie tot een hoog-risicogroep behoren, zou een meer gepersonaliseerd schema voor follow-up en behandeling kunnen worden toegepast.

Er wordt aangenomen dat andere factoren, zoals de zgn. **modifier genen**, een rol spelen in het tot stand komen van de klinische variabiliteit in PXE. Echter, tot op heden zijn geen modifier genen met mogelijkheid tot klinische implementatie geïdentificeerd. Behalve enkele susceptibiliteitsgenen, zoals het *OPN* gen coderend voor osteopontine, werd tot nog toe enkel het ***VEGFA* gen** gesuggereerd als mogelijks betrokken bij de evolutie van de PXE-retinopathie (18, 93). SNPs in het *VEGFA* gen werden reeds in verband gebracht met verschillende ziektebeelden, waaronder borstkanker, Spondylitis Ankylosans, de Ziekte van Alzheimer en recurrente idiopathische spontane abortus (17). De rationale waarom het *VEGFA* gen een rol zou kunnen spelen in de PXE-retinopathie, is zijn gedocumenteerde invloed bij andere proliferatieve retinopathieën, zoals DR en de natte vorm van AMD. Beiden vertonen gelijkenissen met de PXE-retinopathie (17, 18); om dezelfde reden werd ook de anti-angiogenetische therapie gebruik makend van anti-VEGF antilichamen, geïntroduceerd in PXE. Immers, tot op heden werd de betrokkenheid van VEGF in de pathogenese van neovascularisatie bij

PXE nooit formeel bewezen. Gezien het succes van de anti-VEGF therapie wordt echter empirisch geconcludeerd dat VEGF een belangrijke propagator van neovascularisatie in PXE moet zijn.

Zarbock et al. publiceerden in 2009 een **studie naar de rol van het *VEGFA* gen bij PXE** (18). In eerste instantie werd gezocht naar een verband tussen een aantal *VEGFA* SNPs met het voorkomen PXE zelf (18). Het hebben van deze informatie is op zich interessant, maar voor de klinische praktijk heeft dit weinig meerwaarde gezien dit de bestaande diagnostische tests voor PXE niet kan vervangen. Een tweede luik van de studie bestond erin een correlatie te zoeken tussen diezelfde SNPs en de ernst van de PXE-retinopathie. Het criterium dat zij hanteerden om tot een ernstige groep te behoren was een visus van minder dan 10/10 en dit tenminste unilateraal. Een patiënt met een unilaterale visus van 9/10 is echter niet zodanig gehinderd in zijn dagelijkse leven dat hij afhankelijk wordt van anderen en de functionele impact is dus beperkt. Het voordeel van zulk een streng criterium is dat het aantal vals-negatieven, i.e. het aantal ernstig aangetaste patiënten dat niet als dusdanig wordt herkend, heel erg klein is. Het aantal vals positieven, i.e. het aantal patiënten dat onterecht als ernstig wordt beschouwd, wordt in deze indeling heel erg groot. De verdediging hiervoor kan zijn dat men beter 1 patiënt te veel behandelt dan 1 patiënt te weinig, wat natuurlijk ook zo is, maar in dit geval is de indeling veel te streng en klinisch minder relevant, aangezien een predictie maken of een individuele PXE patiënt tot een hoog-risicogroep behoort in de praktijk moeilijk wordt.

Het doel van deze masterproef was om het potentieel modifierend effect van varianten in het *VEGFA* gen, coderend voor de Vasculaire Endotheliale Groeifactor A, te onderzoeken in een groep van patiënten met een milde, respectievelijk ernstige retinopathie.

In de indeling van patiënten in deze twee groepen dient met verschillende factoren rekening te worden gehouden. Enerzijds werd een vergelijking gemaakt met de eerder gerapporteerde analyse van *VEGFA* varianten in PXE, en dienden dus dezelfde criteria aangewend te worden als in deze studie werden gebruikt. Om deze reden werd de “**visus1**” indeling gebruikt, waarbij alle patiënten met een PXE-retinopathie welke tenminste een unilateraal gedaalde visus (<10/10) hadden, als ernstig werden beschouwd. Er werd in deze indeling geen rekening gehouden met de nood aan anti-VEGF behandeling. Deze classificatie houdt in zijn definitie van “ernstige retinopathie” minder rekening met de functionele impact van de oogsymptomen; i.e. een patiënt van 65 jaar die door twee kleine unilaterale bloedingen een residuele visus van 7/10 heeft, wordt binnen de ernstige groep beschouwd. De klinische implementatie van resultaten bekomen op basis van deze indeling is moeilijk; immers, patiënten die in de loop van hun ziekte ooit een bloeding doen en hieraan een visusdaling overhouden, worden als ernstig beschouwd. In de praktijk komt dit overeen met nagenoeg alle PXE patiënten en kan geen verdere stratificatie worden gemaakt.

In een volgende analyse werd voor de definitie van mild en ernstig minder rekening gehouden met de cijfermatige visus, doch voornamelijk met de klinische impact van de PXE-retinopathie in het leven van PXE patiënten. De patiëntcohort werd ingedeeld in een ernstige en milde groep waarbij de cut-off om tot een ernstige groep te behoren werd vastgelegd op een uni- of bilaterale visus van minder dan 5/10 (**de visus2 indeling**). De rationale hiervoor is dat dit de wettelijke minimumvisus is om een auto te besturen in België. Het verlies van het rijbewijs wordt door de meeste PXE patiënten ervaren als een zeer ernstige impact op hun dagdagelijks functioneren en als het verlies van een deel van zijn vrijheid gezien hij vaker afhankelijk wordt van anderen om verplaatsingen te maken, boodschappen te doen, sociale activiteiten op verplaatsing te doen en dergelijke meer. Bij een visus van 5/10 worden ook activiteiten waarvoor een scherpe visus nodig is zoals boeken lezen, koken, handwerk en kaarten zeer moeilijk. Bij PXE werd in een recente studie aangetoond dat oculaire complicaties ernstiger doorwegen op de levenskwaliteit dan cardiovasculaire symptomen, die nochtans ook talrijke en vaak ernstige complicaties kunnen veroorzaken (93). Bij AMD werd gevonden dat bij een slechte visus de kans op depressie significant toeneemt (94).

In een derde indeling van de groepen werd ook rekening gehouden met de **anti-VEGF therapiestatus**. De rationale hiervoor is dat een patiënt een visus van 5/10 of meer kan hebben, maar hiervoor intravitreale injecties nodig kan hebben gehad met anti-VEGF antilichamen, de medicatie die wordt gebruikt om de neovascularisatie een halt toe te roepen. Zonder deze injecties zou de patiënt reeds verder geëvolueerd kunnen zijn met zeer slechte visus of zelfs blindheid als mogelijke consequenties. Bijgevolg wordt deze patiënt in de indeling volgens anti-VEGF therapie geclassificeerd in de groep met ernstige PXE-retinopathie. Wanneer wordt ingedeeld volgens visus, onafhankelijk van de anti-VEGF therapiestatus, wordt deze patiënt echter in de milde groep opgenomen.

In deze masterproef werden **19 SNPs onderzocht**, grotendeels gebaseerd op het werk van Churchill et al. en Zarbock et al. (17, 18). Er werd gevonden dat de allelen -159G (rs13207351), -467T (rs833061) en -1564C (rs699947) in de promotorregio en 2726C (rs1413711) in intron 1-2 significant meer voorkomen bij patiënten die lijden aan de ernstige vorm van PXE-oogmanifestaties wanneer de indeling wordt gemaakt ook rekening houdend met de anti-VEGF status.

Deze patiënten met een ernstige retinopathie blijken nagenoeg allen hetzij homozygoot, hetzij heterozygoot voor het alternatieve allel voor alle **vier van deze SNPs**. Dit resultaat stemt overeen met de eerdere beschrijving van twee regio's van linkage disequilibrium in het *VEGFA* gen (94).

Een aantal SNPs in deze studie gaven enkel eenzijdig significante resultaten of p-waarden net onder de grens van significantie. Dit is onder andere het geval voor -123G (rs1570360), 6669T (rs735286) en C7143 (rs2146323).

De C398 variant gaf bij de indeling volgens anti-VEGF een eenzijdig significant resultaat in de Belgische subcohort maar bij gebrek aan bruikbare data kon een eventuele toe- of afname van de eenzijdige en/of tweezijdige significantie bij een grotere cohort niet worden geëvalueerd. Voor deze SNP werd door Churchill et al. aangetoond dat het haplotype dat onder andere C398 bevat, geassocieerd is aan de natte vorm van AMD (17). Zarbock et al. zagen ook een verhoogde frequentie van C398 bij de PXE patiënten met ernstige oogsymptomen, maar dit leverde geen significante resultaten op (18). In hun onderzoek werd voor C398 een p-waarde gevonden van 0,126 terwijl het huidige project met eenzijdig significant resultaat van 0,049 en tweezijdig resultaat van 0,072 duidelijk veel meer aanleunt tegen een werkelijke significantie. Dit impliceert dat de C398 variant in de toekomst verder moet worden onderzocht op grotere patiëntencohortes vooraleer definitieve uitspraken kunnen worden gedaan omtrent de significantie ervan bij PXE-retinopathie. Immers, hoewel eerdere studies hebben aangetoond dat de grootte van onze studiegroep voldoende power heeft om significante associaties te vinden, is het niet uit te sluiten dat bij uitbreiding van de studiegroep sommige van bovenvermelde randgevallen alsnog significant zouden worden (17, 95, 96).

De promotorvariant -148G kon in de Belgische subcohort meer worden aangetroffen wanneer werd ingedeeld enkel rekening houdend met de visus. Hogerop werd reeds besproken dat indeling van ernstige en milde PXE-retinopathie enkel gebaseerd op de visus waarschijnlijk minder nauwkeurig is. Aangezien de significantie niet kan worden herhaald in de meer nauwkeurigere indeling rekening houdend met anti-VEGF behandeling, wordt deze variatie niet weerhouden om bij te dragen tot een genotype-fenotypecorrelatie tussen *VEGFA* variaties en oftalmologische complicaties. De andere onderzochte SNPs leverden in de totale cohort geen significant resultaat op.

Om vergelijking met de eerder gepubliceerde data van Zarbock et al. mogelijk te maken werden de data uit het huidige project geanalyseerd volgens de criteria voor milde en ernstige retinopathie zoals door hen werden gebruikt (indeling Visus1). Hierbij werd echter geen enkel significant resultaat gevonden. Er werd wel een trend opgemerkt richting significantie bij de SNPs die met de andere indeling (anti-VEGF indeling) wel significante resultaten opleverden.

Zarbock et al. vonden dat varianten -1564C, -467T, -159G, C1031 en 2726C op significante wijze meer voorkomen bij patiënten met ernstige PXE-retinopathie, met -467T en 2726C als onafhankelijke risicomerkers (18). De andere door hen onderzochte SNPs leverden geen significant resultaat op. Deze significante varianten komen overeen met de varianten die in deze studie als significant werden terug gevonden, doch enkel wanneer anti-VEGF therapie als bijkomend criterium werd genomen voor de indeling in milde of ernstige oogaantasting. Aangezien in het onderzoek van Zarbock et al. een veel grotere studiegroep werd gebruikt, met name van 163 patiënten, speelt in de huidige studie de

beperkte grootte van de studiecohorte mogelijks een rol in het niet vinden van statistische significantie. Anderzijds kan het terugvinden van de significante SNPs in de anti-VEGF groep illustreren dat deze vorm van indeling een betrouwbaardere weergave is van de klinische realiteit.

Er werd ook gezocht naar literatuur omtrent **VEGF-polymorfismen bij DR**. Proliferatieve retinopathie wordt hier beschouwd als zijnde de ernstige vorm van DR. Uit onderzoek is gebleken dat ook hier bepaalde SNPs significant betrokken zijn bij het ernstige fenotype. Enkele ervan, zoals 11158T, A-1564, A-159 en A-123, werden ook in deze masterproef en door Churchill en Zarbock bestudeerd. Het lijkt echter zo te zijn dat bij proliferatieve DR voornamelijk de referentie-allelen significant betrokken zijn (95, 96). Dit is het tegenovergestelde van wat bij PXE en leeftijdsgebonden MD wordt gezien.

De vraag stelt zich op welke manier ***VEGFA* polymorfismen** een **rol** kunnen spelen in het ontstaan van **neovascularisatie**. Een toename van de hoeveelheid en/of het effect van het *VEGFA* genproduct zou aanleiding kunnen geven tot een ernstigere vorm van retinopathie (18). Dit kan worden afgeleid uit de bevinding dat *VEGFA* pro-angiogenetische eigenschappen bezit en toename ervan de nieuwvaatvorming kan accelereren. Voor de meeste van de onderzochte SNPs zijn geen data beschikbaar omtrent hun functionele effect op VEGF expressie. Uitzondering hierop is bvb. het -1564C allel, waarvan werd aangetoond dat het leidt tot hogere serumconcentraties van VEGF. Er zijn op heden echter geen gegevens bekend omtrent toename of afname van de *VEGFA*-concentratie in het serum of het oogvocht van patiënten met PXE (18). Bovendien dient in de interpretatie van VEGF activiteit rekening te worden gehouden met de observatie dat VEGF op basis van splicing verschillende isovormen kent. In het oog komen voornamelijk isotype 165a met pro-angiogenetische eigenschappen en isotype 165b met anti-angiogenetische eigenschappen voor (97). Een goede balans tussen beide is van belang voor het behoud van de vasculaire homeostase in het oog. Bij DR werd reeds een relatieve toename van het VEGFA165a in het glasvocht vastgesteld (97). Bij AMD werd een toename gezien van het totale VEGFA165 in het glasvocht (98).

Een tweede werkingsmechanisme van deze *VEGFA* SNPs berust op de observatie dat het *VEGFA* gen bindingsplaatsen voor transcriptiefactoren bevat die de regulatie van de transcriptie van het *VEGFA* gen en/of de splicing ervan kunnen beïnvloeden. De exacte plaatsen voor deze bindingsplaatsen zijn vaak (nog) niet gekend, maar promotor-, 5'-UTR- en intronenregio's zijn plausibele kandidaten, wat ook de keuze van SNPs verklaart (17). Single Nucleotide Polymorphisms kunnen het productieproces in de war sturen door een verandering van de sequentie te veroorzaken die de binding van de welbepaalde transcriptiefactor verhindert (17).

De resultaten van de huidige studie kunnen de resultaten, welke eerder gerapporteerd werden door Zarbock et al., i.e. de significante *VEGFA* SNPs -1564C, -467T, -159G en 2726C bij ernstige PXE-

retinopathie, bevestigen, zij het niet in de stringente classificatie die zij gebruikten doch in een classificatie die zich meer richt op de functionele impact van visusverlies enerzijds en de nood aan anti-VEGF medicatie anderzijds. De door het huidige project gebruikte classificatie lijkt vanuit een klinisch standpunt meer toepasbaar; de resultaten die hieruit voortvloeien betekenen dat patiënten welke drager zijn van één of meerdere van deze SNPs binnen de PXE populatie kunnen beschouwd worden als een hoog-risicopopulatie om een ernstige retinopathie te ontwikkelen. Dit hoeft echter niet te betekenen dat zij obligaats gaan evolueren naar centrale blindheid, doch dat er een hogere nood kan zijn aan anti-VEGF behandelingen in vergelijking met de milde retinopathie-groep. Dit laatste is vanzelfsprekend een belangrijke boodschap bij counseling van de patiënten.

Op basis van deze resultaten kan **deze set van 4 *VEGFA* SNPs in de praktijk worden bepaald** bij patiënten met PXE. Voor patiënten die één of meerdere van deze SNPs dragen lijkt het aanbevolen om de oftalmologische **screening nog rigoureuzer** te maken en - ipv. de jaarlijkse controle - een zesmaandelijkse controle voor te stellen. Bovendien dienen deze patiënten bij herhaling extra gemotiveerd te worden om regelmatige **zelfcontroles** te verrichten via de Amslertest; vaak wordt immers gezien dat zelfcontrole slechts zeer sporadisch wordt verricht en na verloop van tijd volledig verdwijnt. Daarnaast kan het *VEGFA* genotype van patiënten ook een invloed hebben op de **behandeling**. Hoewel de resultaten geen invloed zullen hebben op het starten van de behandeling – hiervoor kan enkel worden verwacht dat letsels welke behandeling vergen vroegtijdiger zullen gedetecteerd worden – kan in de evaluatie tijdens behandeling rekening worden gehouden met het *VEGFA* genotype. Wanneer na een reeks anti-VEGF antilichaam injecties nog residueel subretinaal vocht wordt gezien en men normaliter een afwachtende houding zou aannemen, zou men bij deze hoog-risico patiënten sneller kunnen overgaan tot een bijkomende reeks injecties. Het uiteindelijke benefit van deze aanbevelingen dient via prospectief onderzoek verder te worden onderzocht.

Deze studie heeft uiteraard ook **enkele beperkingen**. Vooreerst is de **patiëntenpopulatie vrij beperkt**, wat de power van de studie kleiner maakt. Er moet echter rekening mee worden gehouden dat PXE een zeldzame aandoening is en dat het hierdoor sowieso moeilijker is om een grote patiëntenpopulatie te bestuderen. Bij andere oogziekten kon echter met gelijkaardige studiecohortes statistische significantie worden aangetoond (17, 96). Ten tweede is er een mogelijke **bias van leeftijd**. Bij het indelen van de groepen werd voornamelijk rekening gehouden met visus en anti-VEGF therapie. Aangezien oogsymptomen ernstiger worden met de leeftijd, is het mogelijk dat heel jonge patiënten op dit moment nog geen symptomen of zelfs tekenen in fundus vertonen en dus nog geen behandeling hebben ondergaan, terwijl deze patiënten later in hun leven wel een ernstig fenotype kunnen ontwikkelen. Er is waarschijnlijk een onderschatting van de ernstige groep en dus mogelijk ook van de resultaten. Het aantal patiënten dat aan deze voorwaarden voldoet, is echter beperkt in deze studie en er gebeurde ook een correctie voor leeftijd (visus $\leq 7/10$ op een leeftijd van ≤ 45 jaar wordt

ook als ernstig beschouwd). Tenslotte is er een duidelijk verschil tussen de resultaten van de **Franse subcohort** en die van de Belgische. De belangrijkste reden hiervoor is het kleine aantal Franse patiënten.

CONCLUSIE

De doelstelling van deze masterproef was om genotype-fenotypecorrelaties te identificeren en/of te confirmeren tussen varianten (SNPs en mutaties) in het *VEGFA* gen en de oculaire symptomen bij PXE patiënten. Daarnaast was het de bedoeling om in te schatten of deze varianten zouden kunnen gebruikt worden in de klinische praktijk binnen de PXE kliniek. In de studiecohort van dit project werd voor 4 SNPs – i.e. 1564C, -467T, -159G en 2726C – een significant verband gevonden met een ernstige PXE-retinopathie, doch enkel wanneer rekening wordt gehouden met de anti-VEGF therapiestatus. Dit resultaat bevestigt de rol van deze 4 SNPs en hun modifierend effect, doch stelt vraagtekens bij de eerdere classificatiesystemen die werden gebruikt. Op basis van deze resultaten in de door dit onderzoek gebruikte classificatie volgens visus en nood aan anti-VEGF therapie kunnen een aantal belangrijke implicaties voor counseling, opvolging en behandeling van PXE patiënten worden gekoppeld. Hoewel verder prospectief onderzoek noodzakelijk zal zijn om het voordeel van deze aanbevelingen in te schatten, kan worden geconcludeerd dat de klinische implementatie van screening van alle PXE patiënten voor deze vier SNPs een nuttige aanvulling is op de moleculaire diagnostiek en impact kan hebben op de outcome van het oculaire fenotype.

Naast de set van vier significante SNPs werden een beperkt aantal varianten met significantiewaarden welke randnormaal waren genoteerd. Voor deze SNPs is verder onderzoek in onafhankelijke en grotere cohortes noodzakelijk om te evalueren of zij dienen te worden toegevoegd aan de basisset van 4 *VEGFA* SNPs.

5 REFERENTIELIJST

1. Bergen AA, Plomp AS, Gorgels TG, de Jong PT. Van gen naar ziekte; pseudoxanthoma elasticum en het ABCC6-gen. [From gene to disease; pseudoxanthoma elasticum and the ABCC6 gene]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2004;148(32):1586-9.
2. Finger RP, Charbel Issa P, Ladewig MS, Gotting C, Szliska C, Scholl HP, et al. Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Survey of ophthalmology*. 2009;54(2):272-85.
3. Li Q, Jiang Q, Pfindner E, Varadi A, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Experimental dermatology*. 2009;18(1):1-11.
4. Georgalas I, Tservakis I, Papaconstantinou D, Kardara M, Koutsandrea C, Ladas I. Pseudoxanthoma elasticum, ocular manifestations, complications and treatment. *Clinical & experimental optometry : journal of the Australian Optometrical Association*. 2011;94(2):169-80.
5. VEGF Vascular Endothelial Growth Factor(Homo Sapiens). 2012 [updated 9 april; cited 2012 2/03]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422>.
6. Vanakker OM. Novel Clinical and Etiopathogenetic Findings in Pseudoxanthoma Elasticum. *SCRIPTIE voorgedragen in het kader van het verkrijgen van de titel Doctor in de Geneeskunde*. Ghent: University of Ghent; 2009.
7. Viljoen DL, Bloch C, Beighton P. Plastic surgery in pseudoxanthoma elasticum: experience in nine patients. *Plastic and reconstructive surgery*. 1990;85(2):233-8.
8. Ng AB, O'Sullivan ST, Sharpe DT. Plastic surgery and pseudoxanthoma elasticum. *British journal of plastic surgery*. 1999;52(7):594-6.
9. Akali AU, Sharpe DT. Cervical midline Z-plasty revision surgery for pseudoxanthoma elasticum. *British journal of plastic surgery*. 2003;56(3):289-91.
10. van Soest S, Swart J, Tijmes N, Sandkuijl LA, Rommers J, Bergen AA. A locus for autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum, with penetrance of vascular symptoms in carriers, maps to chromosome 16p13.1. *Genome research*. 1997;7(8):830-4.
11. Struk B, Neldner KH, Rao VS, St Jean P, Lindpaintner K. Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Human molecular genetics*. 1997;6(11):1823-8.
12. Pfindner EG, Vanakker OM, Terry SF, Vourthis S, McAndrew PE, McClain MR, et al. Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype-phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum. *Journal of medical genetics*. 2007;44(10):621-8.
13. Vanakker OM, Leroy BP, Coucke P, Bercovitch LG, Uitto J, Viljoen D, et al. Novel clinico-molecular insights in pseudoxanthoma elasticum provide an efficient molecular screening method and a comprehensive diagnostic flowchart. *Human mutation*. 2008;29(1):205.
14. Plomp AS, Toonstra J, Bergen AA, van Dijk MR, de Jong PT. Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152A(4):1049-58.
15. Szabo Z, Varadi A, Li Q, Uitto J. ABCC6 does not transport adenosine - relevance to pathomechanism of pseudoxanthoma elasticum. *Molecular genetics and metabolism*. 2011;104(3):421; author reply 2.
16. Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quaglino D, et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nature genetics*. 2000;25(2):223-7.
17. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. 2006;15(19):2955-61.
18. Zarbock R, Hendig D, Szliska C, Kleesiek K, Gotting C. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms as prognostic markers for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. *Human molecular genetics*. 2009;18(17):3344-51.
19. D R. Observation pour servir à l'histoire de la chéloïde diffuse xanthélmique. *Annales de dermatologie et de syphiligraphie*. 1881;2(2):491-501.

20. J D. Pseudoxanthoma elasticum. Monatshefte für Praktische Dermatologie. 1896;23:609-17.
21. H K. On the formation of dark angioid streaks as an unusual metamorphosis of retinal hemorrhage. Archives of ophthalmology. 1892;21:289-92.
22. E G. Angioid Streaks - pseudoxanthoma elasticum; vorläufig Mitteilung. Acta ophthalmologica. 1929;7:329.
23. Wolff HH, Stokes JF, Schlesinger BE. Vascular abnormalities associated with pseudoxanthoma elasticum. Archives of disease in childhood. 1952;27(131):82-8.
24. Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. Clinics in dermatology. 1988;6(1):1-159.
25. Hu X, Plomp AS, van Soest S, Wijnholds J, de Jong PT, Bergen AA. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. Survey of ophthalmology. 2003;48(4):424-38.
26. Yoo JY, Blum RR, Singer GK, Stern DK, Emanuel PO, Fuchs W, et al. A randomized controlled trial of oral phosphate binders in the treatment of pseudoxanthoma elasticum. Journal of the American Academy of Dermatology. 2011;65(2):341-8.
27. Ramsay M, Greenberg T, Lombard Z, Labrum R, Lubbe S, Aron S, et al. Spectrum of genetic variation at the ABCC6 locus in South Africans: Pseudoxanthoma elasticum patients and healthy individuals. Journal of dermatological science. 2009;54(3):198-204.
28. Christen-Zach S, Huber M, Struk B, Lindpaintner K, Munier F, Panizzon RG, et al. Pseudoxanthoma elasticum: evaluation of diagnostic criteria based on molecular data. The British journal of dermatology. 2006;155(1):89-93.
29. Vanakker OM, Voet D, Petrovic M, van Robaey F, Leroy BP, Coucke P, et al. Visceral and testicular calcifications as part of the phenotype in pseudoxanthoma elasticum: ultrasound findings in Belgian patients and healthy carriers. The British journal of radiology. 2006;79(939):221-5.
30. Sherratt MJ. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. Age (Dordrecht, Netherlands). 2009;31(4):305-25.
31. Rosenbloom J. Elastin: relation of protein and gene structure to disease. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1984;51(6):605-23.
32. Hinek A, Pshezhetsky AV, von Itzstein M, Starcher B. Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. The Journal of biological chemistry. 2006;281(6):3698-710.
33. Lelievre E, Hinek A, Lupu F, Buquet C, Soncin F, Mattot V. VE-statin/egfl7 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. The EMBO journal. 2008;27(12):1658-70.
34. De Zaeytijd J, Vanakker OM, Coucke PJ, De Paepe A, De Laey JJ, Leroy BP. Added value of infrared, red-free and autofluorescence fundus imaging in pseudoxanthoma elasticum. The British journal of ophthalmology. 2010;94(4):479-86.
35. Jacobi H, Schreiber G. Pseudoxanthoma elasticum. Hautveränderungen als Wegweiser einer Systemerkrankung. [Pseudoxanthoma elasticum. Skin changes as a marker of systemic illness]. Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete. 1997;48(3):191-4.
36. Schneider T, Apel HP, Kuhlwein A, Mensing H, Schaeg G. Groenblad-Strandberg-Syndrom. [Groenblad-Strandberg syndrome]. Zeitschrift für Hautkrankheiten. 1984;59(19):1290-2, 7-300.
37. Abbas O, Ghosn S, Kurban M, Salman S. Multiple asymptomatic skin-coloured papules over the neck and antecubital areas. Pseudoxanthoma elasticum (PXE). Clinical and experimental dermatology. 2010;35(3):e50-1.
38. Tan WC, Rodeck CH. Placental calcification in pseudoxanthoma elasticum. Annals of the Academy of Medicine, Singapore. 2008;37(7):598-600.
39. Utani A, Tanioka M, Yamamoto Y, Taki R, Araki E, Tamura H, et al. Relationship between the distribution of pseudoxanthoma elasticum skin and mucous membrane lesions and cardiovascular involvement. The Journal of dermatology. 2010;37(2):130-6.
40. Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M. Elastic fiber during development and aging. Microscopy research and technique. 1997;38(4):428-35.
41. Baccarani-Contri M, Vincenzi D, Cicchetti F, Mori G, Pasquali-Ronchetti I. Immunochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. European journal of histochemistry : EJH. 1994;38(2):111-23.

42. Holz FG, Jubb C, Fitzke FW, Bird AC, Pope FM. Dark adaptation and scotopic perimetry over 'peau d'orange' in pseudoxanthoma elasticum. *The British journal of ophthalmology*. 1994;78(1):79-80.
43. Pierro L, Brancato R, Minicucci M, Pece A. Echographic diagnosis of Drusen of the optic nerve head in patients with angioid streaks. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 1994;208(5):239-42.
44. Connor PJ, Jr., Juergens JL, Perry HO, Hollenhorst RW, Edwards JE. Pseudoxanthoma elasticum and angioid streaks. A review of 106 cases. *The American journal of medicine*. 1961;30:537-43.
45. Schiano Lomoriello D, Parravano MC, Chiaravalloti A, Varano M. Choroidal neovascularization in angioid streaks and pseudoxanthoma elasticum: 1 year follow-up. *European journal of ophthalmology*. 2009;19(1):151-3.
46. Finger RP, Charbel Issa P, Hendig D, Scholl HP, Holz FG. Monthly ranibizumab for choroidal neovascularizations secondary to angioid streaks in pseudoxanthoma elasticum: a one-year prospective study. *American journal of ophthalmology*. 2011;152(4):695-703.
47. Khaw PT, Shah P, Elkington A. Age-related macular degeneration. *ABC of Eyes*. London: BMJ Publishing Group Ltd; 2004. p. 60-3.
48. Mansour AM, Ansari NH, Shields JA, Annesley WH, Jr., Cronin CM, Stock EL. Evolution of angioid streaks. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 1993;207(2):57-61.
49. Pope FM. Autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum. *Journal of medical genetics*. 1974;11(2):152-7.
50. Leger F, Fernagut PO, Canron MH, Leoni S, Vital C, Tison F, et al. Protein aggregation in the aging retina. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2011;70(1):63-8.
51. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *The British journal of ophthalmology*. 2011;95(12):1638-45.
52. Soutome N, Sugahara M, Okada AA, Hida T. Subretinal hemorrhages after blunt trauma in pseudoxanthoma elasticum. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2007;27(6):807-8.
53. J.D.M. G. *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases*. St Louis: Mosby CV; 1987. p. p. 102.
54. Audo I, Vanakker OM, Smith A, Leroy BP, Robson AG, Jenkins SA, et al. Pseudoxanthoma elasticum with generalized retinal dysfunction, a common finding? *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(9):4250-6.
55. Cunningham ETJ, Riordan-Eva P. *Anatomy and Embryology of the Eye*. Vaughan & Asbury's *General Ophthalmology*. 18th ed: The McGraw Hill Company; 2011.
56. Das A, Frank RN, Zhang NL, Turczyn TJ. Ultrastructural localization of extracellular matrix components in human retinal vessels and Bruch's membrane. *Archives of ophthalmology*. 1990;108(3):421-9.
57. Dreyer R, Green WR. The pathology of angioid streaks: a study of twenty-one cases. *Transactions - Pennsylvania Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*. 1978;31(2):158-67.
58. Combrinck M, Gilbert JD, Byard RW. Pseudoxanthoma elasticum and sudden death. *Journal of forensic sciences*. 2011;56(2):418-22.
59. Bercovitch L, Leroux T, Terry S, Weinstock MA. Pregnancy and obstetrical outcomes in pseudoxanthoma elasticum. *The British journal of dermatology*. 2004;151(5):1011-8.
60. Mendelsohn G, Bulkley BH, Hutchins GM. Cardiovascular manifestations of Pseudoxanthoma elasticum. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1978;102(6):298-302.
61. Aessopos A. Elastic tissue abnormalities resembling pseudoxanthoma elasticum in beta thalassemia and the sickling syndromes. *Blood*. 2002;99(1):30-5.
62. Hamlin N, Beck K, Bacchelli B, Cianciulli P, Pasquali-Ronchetti I, Le Saux O. Acquired Pseudoxanthoma elasticum-like syndrome in beta-thalassaemia patients. *British journal of haematology*. 2003;122(5):852-4.
63. Martin L, Douet V, VanWart CM, Heller MB, Le Saux O. A mouse model of beta-thalassemia shows a liver-specific down-regulation of *Abcc6* expression. *The American journal of pathology*. 2011;178(2):774-83.
64. Andrews NC. The NF-E2 transcription factor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(4):429-32.

65. Lebwohl M, Neldner K, Pope FM, De Paepe A, Christiano AM, Boyd CD, et al. Classification of pseudoxanthoma elasticum: report of a consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994;30(1):103-7.
66. Terry SF, Bercovitch L. Pseudoxanthoma Elasticum. 2001 [updated 2007 april 2; cited 2012 2 march]; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1113.
67. Figuren Amsler Test. [updated 2009; cited 2012 12/03]; Available from: www.illinoisretinainstitute.com.
68. LaRusso J, Li Q, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum, the paradigm of heritable ectopic mineralization disorders - can diet help? *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2011;9(8):586-93.
69. Pope FM. Two types of autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum. *Archives of dermatology*. 1974;110(2):209-12.
70. Bergen AA. Pseudoxanthoma elasticum: the end of the autosomal dominant segregation myth. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(4):704-5.
71. Ringpfeil F, McGuigan K, Fuchsel L, Kozic H, Larralde M, Lebwohl M, et al. Pseudoxanthoma elasticum is a recessive disease characterized by compound heterozygosity. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(4):782-6.
72. Bacchelli B, Quagliano D, Gheduzzi D, Taparelli F, Boraldi F, Trolli B, et al. Identification of heterozygote carriers in families with a recessive form of pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1999;12(12):1112-23.
73. Martin L, Maitre F, Bonicel P, Daudon P, Verny C, Bonneau D, et al. Heterozygosity for a single mutation in the ABCC6 gene may closely mimic PXE: consequences of this phenotype overlap for the definition of PXE. *Archives of dermatology*. 2008;144(3):301-6.
74. Hornstrup LS, Tybjaerg-Hansen A, Haase CL, Nordestgaard BG, Sillesen H, Grande P, et al. Heterozygosity for R1141X in ABCC6 and risk of ischemic vascular disease. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011;4(5):534-41.
75. Plomp AS, Bergen AA, Florijn RJ, Terry SF, Toonstra J, van Dijk MR, et al. Pseudoxanthoma elasticum: Wide phenotypic variation in homozygotes and no signs in heterozygotes for the c.3775delT mutation in ABCC6. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2009;11(12):852-8.
76. Uitto J, Pulkkinen L, Ringpfeil F. Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: a metabolic disorder at the environment-genome interface? *Trends in molecular medicine*. 2001;7(1):13-7.
77. Ringpfeil F, Lebwohl MG, Christiano AM, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):6001-6.
78. Le Saux O, Beck K, Sachsinger C, Silvestri C, Treiber C, Goring HH, et al. A spectrum of ABCC6 mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum. *American journal of human genetics*. 2001;69(4):749-64.
79. Bergen AA, Plomp AS, Hu X, de Jong PT, Gorgels TG. ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2007;453(5):685-91.
80. Fulop K, Jiang Q, Wetering KV, Pomozi V, Szabo PT, Aranyi T, et al. ABCC6 does not transport vitamin K3-glutathione conjugate from the liver: relevance to pathomechanisms of pseudoxanthoma elasticum. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;415(3):468-71.
81. Vanakker OM, Leroy BP, Schurgers LJ, Vermeer C, Coucke PJ, De Paepe A. Atypical presentation of pseudoxanthoma elasticum with abdominal cutis laxa: evidence for a spectrum of ectopic calcification disorders? *American journal of medical genetics Part A*. 2011;155A(11):2855-9.
82. Templeton AR. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics*. 1980;94(4):1011-38.
83. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):880-7.
84. Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *Journal of dental research*. 2007;86(10):937-50.

85. De Paepe A. Genetische variatie in het humaan genoom. *Cursus Klinische Genetica*. 2012. p. 7.
86. Van Der Cruyssen G. Polymerase chain Reaction (PCR) - Basisprotocol. *Accreditatie Kwaliteitshandboek CMGG*. 2009.
87. Demuyne L, Debacker V. Toestelprotocol - Trinean DropSense96®. *Accreditatie Kwaliteitshandboek*. 2010.
88. Demuyne L, Deleyn S. Bepalen van concentratie van DNA en RNA en de ratio van de absorpties bij 260 nm en bij 280 nm. *Accreditatie Kwaliteitshandboek CMGG*. 2010.
89. Van Laer L, Willaert A, Demuyne L. cDNA screening van het COL 1A2 gen gebruikmakend van DNA-sequentieanalyse. 2009-2010.
90. Van Der Cruyssen G, Vereecken I. Methodeprotocol: Cycle sequencing met big dye terminators "manueel". *Accreditatie Kwaliteitshandboek CMGG2011*.
91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
92. De Moor G, Van Maele G. *Inleiding tot de Biomedische Statistiek: Acco*; 2008. 337 p.
93. Hendig D, Arndt M, Szliska C, Kleesiek K, Gotting C. SPP1 promoter polymorphisms: identification of the first modifier gene for pseudoxanthoma elasticum. *Clinical chemistry*. 2007;53(5):829-36.
94. Haines JL, Schetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(1):329-35.
95. Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, Brenchley PE, et al. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(8):3611-6.
96. You JY, Chung H, Kim HC. Evaluation of Changes in Choroidal Neovascularization Secondary to Age-related Macular Degeneration after Anti-VEGF Therapy Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Current eye research*. 2012;37(5):438-45.
97. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*. 2005;48(11):2422-7.
98. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong PT. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *The British journal of ophthalmology*. 1997;81(2):154-62.
99. Finger RP, Fenwick E, Marella M, Charbel Issa P, Scholl HP, Holz FG, et al. The relative impact of vision impairment and cardiovascular disease on quality of life: the example of pseudoxanthoma elasticum. *Health and quality of life outcomes*. 2011;9:113.

BIJLAGE 1 PROTOCOLS

CONCENTRATIEMETING

- *Klaarmaken van de D-plaat*

Pipetteer 3µL van het DNA-oplosmiddel in de eerste 2 welletjes van de D-plaat. Pipetteer vervolgens per staal 3µL in de volgende welletjes van de D-plaat. De plaats van het laatste staal wordt gemarkeerd; zo weet de gebruiker welke plaatsen hij heeft gebruikt én weet de volgende gebruiker waar hij kan beginnen met het vullen van de welletjes.

- *Instellen van de Dropquantsoftware*

Eerst wordt ingelogd op de computer en de Dropquantsoftware. Vervolgens worden volgende stappen uitgevoerd:

- New measurement
- experiment name wordt automatisch aangemaakt
- description: te kiezen, naam van de meting. Bijvoorbeeld: DNA-stalen gen x
- sample:
 - Sample type: nucleic acids
 - Labeled: unlabeled
 - Sample material: dsDNA
 - Solvent: water-based
 - High viscosity aangevinkt laten
- dropplate type: DropPlate-D
- Pathlength: dual
- read barcode:no
- klik next: er wordt gevraagd om het programma op te slaan: naam geven

Na het uitvoeren van bovenstaande stappen verschijnt er een scherm met als naam Plate Layout. Hier kan op de plaat worden aangeduid welke welletjes worden gebruikt en kunnen deze een naam krijgen. Het eerste staal krijgt als naam blanco en als teken op de plaat **B**. Het volgende staal, dat ook blanco is, krijgt als naam ZERO en als teken op de plaat **S**. Hierna volgen de stalen waarvan de concentratie moet worden gemeten, zij krijgen de naam van het DNA-staal (hetzij patiëntennaam, hetzij DNA-nummer of andere code) en ook het teken **S**.

- *Plaatsen van de D-plaat*

De knop Start Test wordt aangeklikt. De microtiterplaat opent automatisch. Hierop wordt de DropPlate96/16-plaat (waarop maximum 6 D-platen kunnen worden bevestigd) geplaatst. Klik vervolgens op OK en de lade zal weer sluiten. Het toestel begint automatisch met de meting. Het verwerken van een volledige DropPlate96/16-plaat duurt 10 minuten. Bij het beëindigen van de meting opent de lade automatisch en kan de plaat verwijderd worden.

- *Resultaten*

Ondertussen is de plaat verwijderd uit het toestel. Er wordt opnieuw op OK gedrukt. De resultaten verschijnen op het scherm en kunnen nu geëxporteerd worden naar Excel, met als inhoud van het rapport de naam van het staal, de concentratie in ng/ μ L, A260/A280 en A260/A230. De laatste twee gegevens worden gebruikt om de zuiverheid van het staal te bekijken. Hierna worden het programma en de computer uitgelogd en het toestel afgezet.

PCR

- *Maken mastermix aan PCR-kant*

- Werkblad schoonmaken met ethanol om contaminatie met ethanol om contaminatie met eventueel achtergebleven materiaal te voorkomen.
- Materialen, zoals beschreven in 2.5.2.3, klaarleggen. Polymerase op ijs plaatsen (voorkomt vroegtijdige activatie)
- Vortexen (=mengen) van de te gebruiken stoffen.
- Aanmaak van de PCR-mix met samenstelling zoals beschreven in 2.5.2.4. Er wordt telkens meer PCR-mix gemaakt dan het aantal staaltjes; zo wordt een veiligheidsmarge ingebouwd.
- Het polymerase wordt als allerlaatste toegevoegd om een vroegtijdige start van de reactie te voorkomen.

- *Uitverdelen PCR-mix*

De bekomen mix wordt gemengd met de vortex en daarna uitverdeeld over het aantal benodigde welletjes. Per welletje wordt 24 μ L PCR-mix toegevoegd.

- *Toevoegen DNA aan DNA-kant pre-PCR-labo*

Er wordt aan de welletjes telkens 1 μ L DNA toegevoegd, zodat een totaal reactievolume van 25 μ L wordt bekomen. Aan één welletje wordt geen DNA toegevoegd. Dit zal dienen als controle voor contaminatie van het PCR-mengsel.

- *Plaatsen in thermal cyclor (PCR-machine) + instellen programma*

SEQUENERING

- *Finch*

De aanvraag voor een sequeneringsreactie wordt gedaan via de software Finch, die via het internet kan worden geraadpleegd (<http://finch.ugent.be:8080/Finch/Core/loginForm>). Er kan worden gekozen voor een just run (manuele sequenering) of een bidirectionele sequenering (automatische sequenering, cf. infra). Het uploaden van de staaltjes kan gebeuren op verschillende manieren, onder andere door het uploaden van een Excelbestand. Deze laatste methode werd het frequentst toegepast. Bij de manuele sequenering mogen de F en R primers in dezelfde request worden opgenomen, terwijl bij automatische sequenering F en R in twee afzonderlijke requests moeten worden geplaatst.

Sequencing requests worden in Finch automatisch op “holding” gezet tot wanneer de producten daadwerkelijk worden afgegeven aan de GSU – Genetic Sequencing Unit. Dan verandert de status naar “pending” en bij het verwerken van de requests verandert de status naar “active”. Tenslotte zal bij vervolledigen van de request de status veranderen in “complete” en dan kunnen de gesequeneerde stalen worden bekeken via Finch.

- *Manuele Sequenering*

- Opzuiveren PCR-product

Vooraleer de eigenlijke sequeneringsreactie kan plaatsvinden, is het belangrijk dat het PCR-product wordt opgezuiverd, wat wil zeggen dat de overtollige primers moeten worden verwijderd en de overgebleven oligonucleotiden moeten worden geïnactiveerd.

Hiervoor wordt gebruik gemaakt van respectievelijk Exonuclease I (Exo) en Antarctic Phosphatase (AP). Er wordt een reactiemengsel gemaakt met 0.05µL Exo, 0.2µL AP en 0.75µL water. Hieraan wordt 5µL PCR-reactieproduct toegevoegd.

Vervolgens wordt de bekomen oplossing in de thermal cyclor gezet en ondergaat daar het programma “Exosap”. Dit omvat de volgende stappen: incubatie bij 37°C (15 min) en vervolgens inactivatie van de enzymen door te verwarmen aan 80°C (20 min) en tenslotte 1 minuut afkoeling aan 4°C.

- Sequeneringsreactie

Na de opzuivering volgt de eigenlijke sequenering. Hiervoor wordt een Master Mix gemaakt die bestaat uit 0.5µL RR mix, 2µL buffer (5x), 4µL water en eventueel 0.5 µL DMSO. Wanneer geen DMSO moet worden toegevoegd, wordt het aantal µL opgeteld bij de hoeveelheid water. Belangrijk is dat het aantal staaltjes vanuit de eerste stap nu wordt verdubbeld aangezien er wordt uitgesplitst naar forward en reverse. Vervolgens wordt de Master Mix uitverdeeld (7µL per reactie) over de staaltjes en worden 2µL van elke primer en 1µL opgezuiverd PCR-product toegevoegd. Het reactiemengsel wordt

opnieuw in een thermal cycler geplaatst waarin nu het programma ABI55 wordt gelopen. Dit programma is de eigenlijke Cycle Sequencing Reaction en omvat 5 min 95°C, 25 cycli van 10s 95°C – 5s 55°C – 4min 60°C, en 10 min 15°C.

- Opzuiveren sequenceringsproduct

In deze stap wordt het sequenceringsproduct, bekomen uit de sequenceringsreactie (cf. stap 2), gezuiverd van de overmaat aan BigDye Terminators. Dit gebeurt aan de hand van magnetische beads. Eerst worden de CleanSeq beads goed gemengd tot een homogene oplossing, dit omdat de beads anders onderaan geconcentreerd zijn. Vervolgens wordt 10µL van de beads toegevoegd aan elke sequenceringsreactie; ook wordt telkens 45µL 85% ethanol toegevoegd. Dit mengsel wordt nu 7 maal gemengd met de multichannel pipet (waarbij steeds nieuwe tips worden gebruikt). Vervolgens worden de mengsels gedurende 3 minuten op de magneet geplaatst. Hierna wordt het supernatans verwijderd, terwijl de mengsels op de magneet blijven. Vervolgens wordt 100µL 85% ethanol toegevoegd en wordt dit 30 seconden op de magneet geïncubeerd, waarna het supernatans opnieuw wordt verwijderd. Daarna blijven de reacties gedurende minstens 10 minuten onaangeraakt staan op de labotafel. In deze stap is het niet noodzakelijk dat de plaat op de magneet blijft.

- Vorbereiden analyse

Wanneer de sequenceringsproducten moeten worden afgegeven aan de sequencer, zal vooraf 40µL water worden toegevoegd en de beads hierin worden opgelost. Deze oplossing blijft gedurende een paar minuten staan op de labotafel en vervolgens wordt opnieuw voor een homogene oplossing gezorgd door op en neer te pipetteren, waarbij steeds nieuwe tips worden gebruikt. Vervolgens wordt de plaat gedurende 30 seconden op de magneet gezet en daarna wordt 30 µL van de vloeistof zonder beads overgepipetteerd naar een ABI-plaat (=microtiterplaat voor sequencing). Dit wordt dan afgeleverd aan de GSU - Genetic Service Unit- die zorgt voor de verdere verwerking van de stalen.

- *Automatische Sequencing*

Bij de automatische sequencing wordt hetzelfde principe toegepast als bij de manuele sequencing, met dezelfde stappen. Hét grote verschil is dat alles automatisch verloopt. Het enige wat moet gebeuren, is het PCR-product en de primers afgeven aan de GSU. Ook hiervoor zijn specifieke regels. Er moet 10µL van elk staaltje van het PCR-product worden afgegeven. Dit kan worden gepipetteerd in een 96-well plaat of in stripjes met 8 welltjes, wanneer geen volledige plaat kan worden gevuld.

Wat de primers betreft, worden forward en reverse primers apart afgegeven. Van elke primer wordt 30µL + 3µL x aantal staaltjes afgegeven. Primers worden altijd afgegeven in stripjes met 8 welltjes. De plaats van de primers in deze welltjes wordt bepaald door het programma Exact Primer List. Primers en PCR-producten worden tegelijkertijd afgegeven aan de GSU die de verdere verwerking van de stalen voor haar rekening neemt.

BIJLAGE 2 OVERZICHT RESULTATEN VAN DE STATISTISCHE TESTEN

TOTALE COHORTE				
	Visus2		Anti-VEGFA therapie	
Promotor				
rs69947	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	43,18%	57,95%	40,00%	62,50%
C (in %)	56,82%	42,05%	60,00%	37,50%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0.07806583926046484		0,0080111749498031	
tweezijdig	0.13921407447445622		0,0140908101056744	
rs833061	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	43,18%	56,82%	40,00%	62,50%
T (in %)	56,82%	43,18%	60,00%	37,50%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,097843365718205		0,008011174949803	

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

tweezijdig	0,195469198294762		0,014090810105674	
rs833062	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
C (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs59260042	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
A (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs79469752	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
p.(C-167T)	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

C (in %)	100,00%	97,73%	98,28%	98,61%
T (in %)	0,00%	2,27%	1,72%	1,39%
Totaal allelen	42	88	58	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,4565295169946640		0,6648308418567960	
tweezijdig	0,5592128801431490		1,0000000000000000	
rs13207351	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	40,48%	56,82%	37,93%	62,50%
G (in %)	59,52%	43,18%	62,07%	37,50%
Totaal allelen	42	88	58	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,0597224649865034		0,0044102092204060	
tweezijdig	0,0935444412486524		0,0078924844824510	
rs28357093	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	92,86%	100,00%	94,83%	100,00%
G (in %)	7,14%	0,00%	5,17%	0,00%
Totaal allelen	42	88	58	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,0320885509838992		0,0812007874015751	
tweezijdig	0,0320885509838992		0,0812007874015751	
rs1570360	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	26,19%	36,36%	24,14%	40,28%
G (in %)	73,81%	63,64%	75,86%	59,72%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Totaal allelen	42	88	58	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,1703846840433360		0,0387506575156755	
tweezijdig	0,3197746735672370		0,0619191646351340	
Intronen				
rs1413711	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	43,18%	57,95%	40,00%	63,89%
C (in %)	56,82%	42,05%	60,00%	36,11%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,0780658392604648		0,0050728302210963	
tweezijdig	0,1392140744744560		0,0084989737073923	
rs735286	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	61,36%	69,32%	58,33%	73,61%
T (in %)	38,64%	20,45%	41,67%	26,39%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,2353872983109630		0,0476491686087277	
tweezijdig	0,4341239901688670		0,0946219770193705	
rs2146323	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	86,36%	69,32%	83,33%	68,06%
A (in %)	13,64%	20,45%	16,67%	31,94%
Totaal allelen	44	88	60	72

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Sinificantie				
eenzijdig	0,2702993650893190		0,0336005593988188	
tweezijdig	0,4713153245429050		0,0683150360979268	
rs3025020	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	70,45%	62,50%	66,67%	63,89%
T (in %)	29,55%	37,50%	33,33%	36,11%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,2399108388034560		0,4410669934010180	
tweezijdig	0,4400112278374360		0,8547014865141100	
rs3025021	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	29,55%	31,82%	30,00%	31,94%
C (in %)	70,45%	68,18%	70,00%	68,06%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	0,4769132220655250		0,4803564763089140	
tweezijdig	0,8439677241331620		0,8518596237239330	
rs2025024	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
Exonen				
rs25648	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	86,36%	80,23%	86,67%	78,57%
T (in %)	13,64%	19,77%	13,33%	21,43%
Totaal allelen	44	86	60	70
Sinificantie				
eenzijdig	0,2702993650893190		0,1648511398705100	
tweezijdig	0,4713153245429050		0,2567203471610920	
5'-UTR				
rs2010963	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)				
G (in %)				
Totaal allelen				
Sinificantie				
eenzijdig				
tweezijdig				
3'-UTR				
rs3025039	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	84,09%	77,27%	85,00%	75,00%
T (in %)	15,91%	22,73%	15,00%	25,00%
Totaal allelen	44	88	60	72
Sinificantie				

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

	eenzijdig	0,2490986975587880		0,1142473433091200	
	tweezijdig	0,4929559423810470		0,1953965026386000	
rs3025040		Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)		79,55%	78,41%	81,67%	76,39%
T (in %)		20,45%	21,59%	18,33%	23,61%
Totaal allelen		44	88	60	72
Sinificantie					
	eenzijdig	0,5357567057617670		0,3011198721121610	
	tweezijdig	1,0000000000000000		0,5250638571746090	
FRANS					
		Visus2		Anti-VEGFA therapie	
Promotor					
rs69947		Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)		58,33%	75,00%	61,54%	73,08%
C (in %)		41,67%	25,00%	38,46%	26,92%
Totaal allelen		24	28	26	26
Sinificantie					
	eenzijdig	0,1634231006674050		0,2775677611486980	
	tweezijdig	0,2446780785927110		0,5551355222973970	
rs833061		Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)		58,33%	75,00%	61,54%	73,08%
T (in %)		41,67%	25,00%	38,46%	26,92%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,163423100667405		0,277567761148698	
tweezijdig	0,244678078592711		0,555135522297397	
rs833062	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
C (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs59260042	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
A (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs79469752	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
p.(C-167T)	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	92,86%	95,83%	96,15%
T (in %)	0,00%	7,14%	4,17%	3,85%
Totaal allelen	22	28	24	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,3085714285714220		0,7346938775510260	
tweezijdig	0,4971428571428520		1,0000000000000000	
rs13207351	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	54,55%	75,00%	58,33%	73,08%
G (in %)	45,45%	25,00%	41,67%	26,92%
Totaal allelen	22	28	24	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,1123416016188300		0,2117864818963240	
tweezijdig	0,1473772027108390		0,3725122989936550	
rs28357093	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
G (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	22	28	24	26
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

rs1570360	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	31,82%	46,43%	29,17%	50,00%
G (in %)	68,18%	53,57%	70,83%	50,00%
Totaal allelen	22	28	24	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,2254132589916430		0,1122697217914580	
tweezijdig	0,3868843457124970		0,1587685071973360	
Intronen				
rs1413711	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	58,33%	75,00%	61,54%	73,08%
C (in %)	41,67%	25,00%	38,46%	26,92%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,1634231010000000		0,2775677611486980	
tweezijdig	0,2446780790000000		0,5551355222973970	
rs735286	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	66,67%	85,71%	69,23%	84,62%
T (in %)	33,33%	14,29%	30,77%	15,38%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,0976652810989811		0,1619187373963540	
tweezijdig	0,1855972424813070		0,3238374747927140	
rs2146323	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

C (in %)	87,50%	67,86%	80,77%	73,08%
A (in %)	12,50%	32,14%	19,23%	26,92%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,0879319613823264		0,3715815359102500	
tweezijdig	0,1126308116082630		0,7431630718204930	
rs3025020	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	62,50%	67,86%	61,54%	69,23%
T (in %)	37,50%	32,14%	38,46%	30,77%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,4544185012077070		0,3856062771621890	
tweezijdig	0,7738172113982210		0,7712125543243760	
rs3025021	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	25,00%	25,00%	26,92%	23,08%
C (in %)	75,00%	75,00%	73,08%	76,92%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,6240155453209710		0,5000000000000080	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs2025024	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000	
Exonen				
rs25648	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	79,17%	73,08%	73,08%	73,08%
T (in %)	20,83%	26,92%	26,92%	19,23%
Totaal allelen	24	26	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,4328272649376750		0,4328272649376750	
tweezijdig	0,7447436067631490		0,7447436067631470	
5'-UTR				
rs2010963	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)				
G (in %)				
Totaal allelen				
Sinificantie				
eenzijdig				
tweezijdig				
3'-UTR				
rs3025039	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	87,50%	71,43%	88,46%	69,23%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

T (in %)	12,50%	28,57%	11,54%	30,77%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,1412750156965350		0,0864718970220473	
tweezijdig	0,1902960095468190		0,1729437940440890	
rs3025040	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	79,17%	75,00%	80,77%	73,08%
T (in %)	20,83%	25,00%	19,23%	26,92%
Totaal allelen	24	28	26	26
Sinificantie				
eenzijdig	0,4918150869041750		0,3715815359102500	
tweezijdig	0,7542986589163890		0,7431630718204930	

BELGISCH						
	Visus2		Visus1		Anti-VEGFA therapie	
Promotor						
rs699947	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	25,00%	50,00%	32,50%	52,50%	23,53%	56,52%
C (in %)	75,00%	50,00%	67,50%	47,50%	76,47%	43,48%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,0436004598294314		0,056398587		0,0029168146028056	
tweezijdig	0,0692089294392649		0,112797174		0,0056449683599545	
rs833061	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	25,00%	48,33%	32,50%	52,50%	23,53%	56,52%
T (in %)	75,00%	51,67%	67,50%	47,50%	76,47%	43,48%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,056734490369510		0,0563985868389739		0,002916814602806	
tweezijdig	0,115776876652833		0,1127971736779470		0,005644968359955	
rs833062	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
C (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Sinificantie						
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs59260042	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
A (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs79469752	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
p.(C-167T)	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
rs13207351	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	25,00%	48,33%	32,50%	52,50%	23,53%	56,52%
G (in %)	75,00%	51,67%	67,50%	47,50%	76,47%	43,48%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,0567344903695099		0,0563985868389739		0,0029168146028056	
tweezijdig	0,1157768766528330		0,1127971736779470		0,0056449683599545	
rs28357093	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	85,00%	100,00%	92,50%	100,00%	91,18%	100,00%
G (in %)	15,00%	0,00%	7,50%	0,00%	8,82%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,0138753651411886		0,1202531645569580		0,0728334956183021	
tweezijdig	0,0138753651411886		0,2405063291139160		0,0728334956183021	
rs1570360	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
A (in %)	20,00%	31,67%	27,50%	30,00%	20,59%	34,78%
G (in %)	80,00%	68,33%	72,50%	70,00%	79,41%	65,22%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,2416788605990840		0,5000000000000100		0,1273854335215840	
tweezijdig	0,4005635865833330		1,0000000000000000		0,2143965427843990	
Intronen						

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

rs1413711	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	25,00%	50,00%	32,50%	52,50%	23,53%	58,70%
C (in %)	75,00%	50,00%	67,50%	47,50%	76,47%	41,30%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,0436004598294314		0,0563985868389739		0,0016104235617110	
tweezijdig	0,0692089294392649		0,1127971736779470		0,0028007529168983	
rs735286	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	55,00%	61,67%	55,00%	65,00%	50,00%	67,39%
T (in %)	45,00%	38,33%	45,00%	35,00%	50,00%	32,61%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,3931113799541480		0,2469455731754330		0,0904089838075646	
tweezijdig	0,7927216360242140		0,4938911463508670		0,1659880837934890	
rs2146323	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	85,00%	70,00%	77,50%	70,00%	85,29%	65,22%
A (in %)	15,00%	30,00%	22,50%	30,00%	14,71%	34,78%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,1519534875607940		0,3059952879313340		0,0372669384356645	
tweezijdig	0,2473866886336170		0,6119905758626690		0,0706766552693106	
rs3025020	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	80,00%	60,00%	45,00%	60,00%	70,59%	60,87%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

T (in %)	20,00%	40,00%	30,00%	40,00%	29,41%	39,13%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,0855579064072641		0,2411538191493540		0,2542794705518390	
tweezijdig	0,1747828866937800		0,4823076382987060		0,4780070351436130	
rs3025021	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
T (in %)	35,00%	35,00%	32,50%	37,50%	32,35%	36,96%
C (in %)	65,00%	65,00%	67,50%	62,50%	67,65%	63,04%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,6013525421205010		0,4074733422378480		0,4262833756164140	
tweezijdig	1,0000000000000000		0,8149466844756990		0,8131846475548140	
rs2025024	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
T (in %)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	44
Sinificantie						
eenzijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
tweezijdig	1,0000000000000000		1,0000000000000000		1,0000000000000000	
Exonen						
rs25648	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	95,00%	83,33%	95,00%	77,50%	97,06%	78,26%
T (in %)	5,00%	16,67%	5,00%	22,50%	2,94%	21,74%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,1766212744719610		0,4999999999999870		0,0145009906848749	
tweezijdig	0,2749540428277150		0,9999999999999740		0,0202851966484198	
5'-UTR						
rs2010963	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	55,00%	40,00%	50,00%	37,50%	55,88%	34,78%
G (in %)	45,00%	60,00%	50,00%	62,50%	44,12%	65,22%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,1810681063162590		0,1837361039598690		0,0491191898830003	
tweezijdig	0,3012837442961200		0,3674722079197380		0,0715351003954802	
3'-UTR						
rs3025039	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	80,00%	80,00%	77,50%	82,50%	82,35%	78,26%
T (in %)	20,00%	20,00%	22,50%	17,50%	17,65%	21,74%
Totaal allelen	20	60	40	40	34	46
Sinificantie						
eenzijdig	0,6372575078812330		0,3903056224237310		0,4362640525116210	
tweezijdig	1,0000000000000000		0,7806112448474550		0,7801482980780750	
rs3025040	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild	Ernstig	Mild
C (in %)	80,00%	80,00%	77,50%	82,50%	82,35%	81,82%
T (in %)	20,00%	20,00%	22,50%	17,50%	17,65%	22,73%

STUDIE VAN DE ROL VAN HET *VEGFA* GEN IN DE OOGSYMPTOMEN BIJ PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM

Totaal allelen	20	60	40	40	34	44
Sinificantie						
eenzijdig	0,6372600000000000		0,3903056224237310		0,4362640525116210	
tweezijdig	1,0000000000000000		0,7806112448474550		0,7801482980780750	

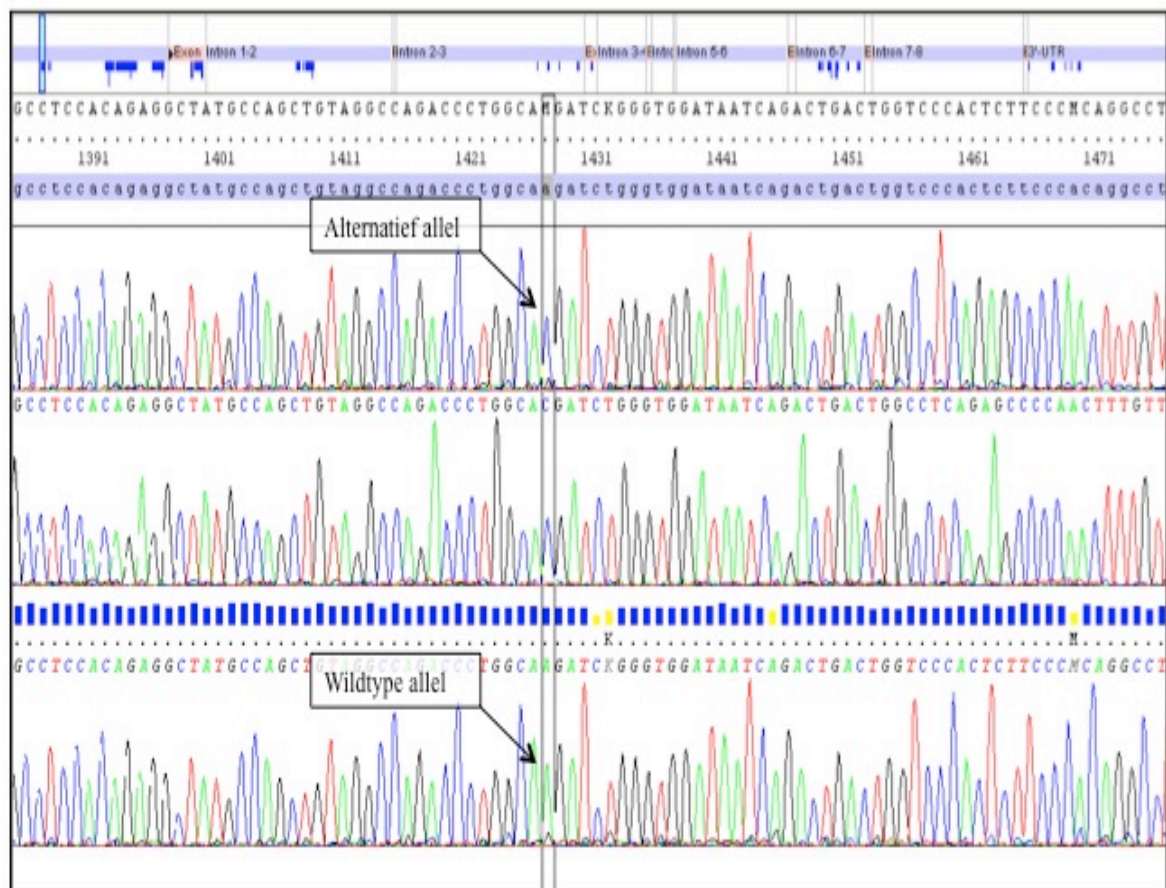
BIJLAGE 3 SCREENSHOTS SEQSCAPE

In onderstaande afbeeldingen zijn screenshots te zien van de analyse in SeqScape. Het gaat om een selectie van enkele goede sequenties en van enkele minder geslaagde, twijfelachtige sequenties. De balk duidt telkens de plaats van de onderzochte SNP aan. Er worden zowel homozygote wildtype allelen, homozygote alternatieve allelen en heterozygoten van verschillende SNPs weergegeven.

GOEDE SEQUENTIES

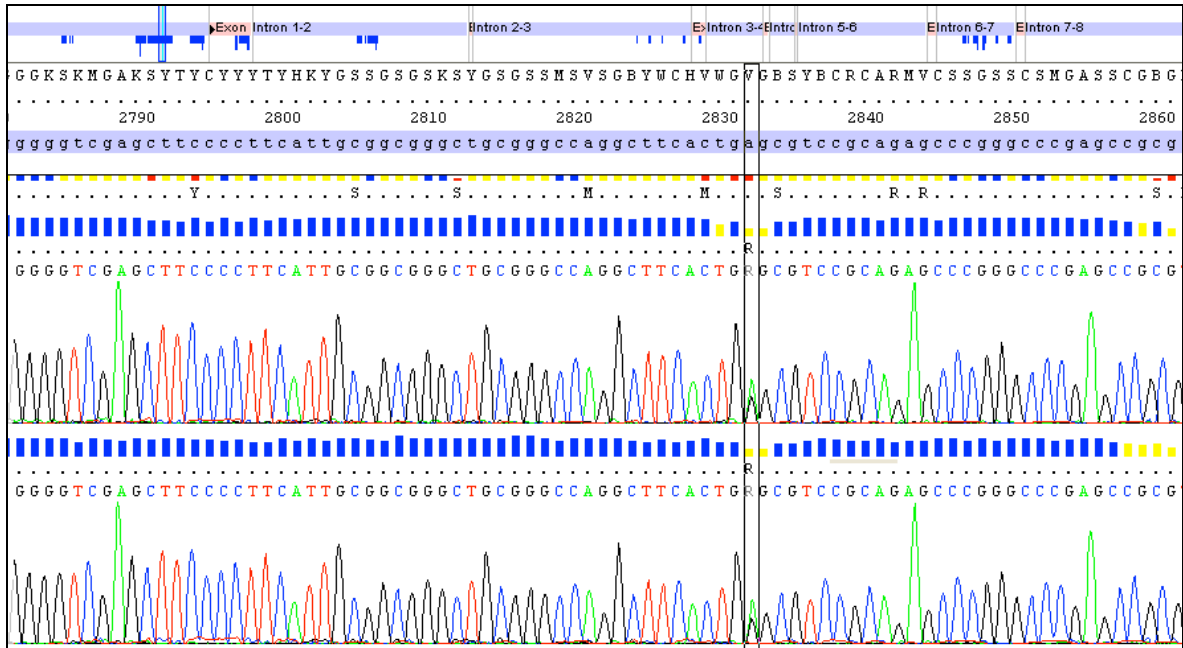
Rs699947

Homozygoten



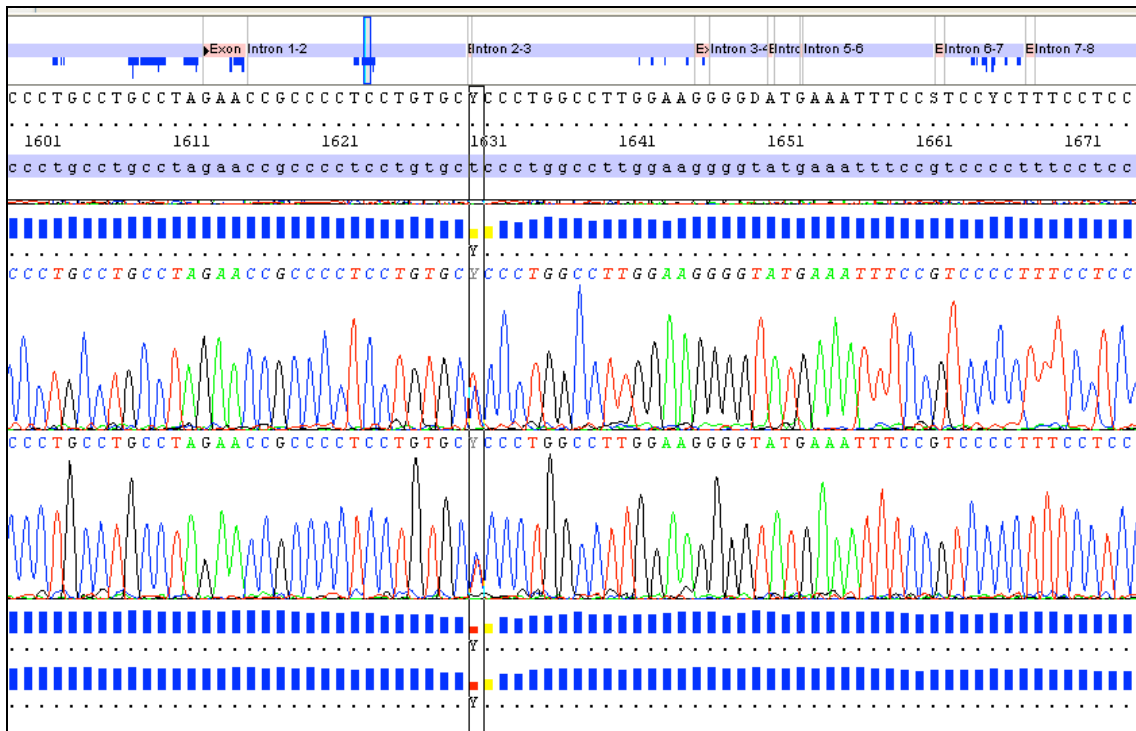
Rs13207351

Heterozygoot



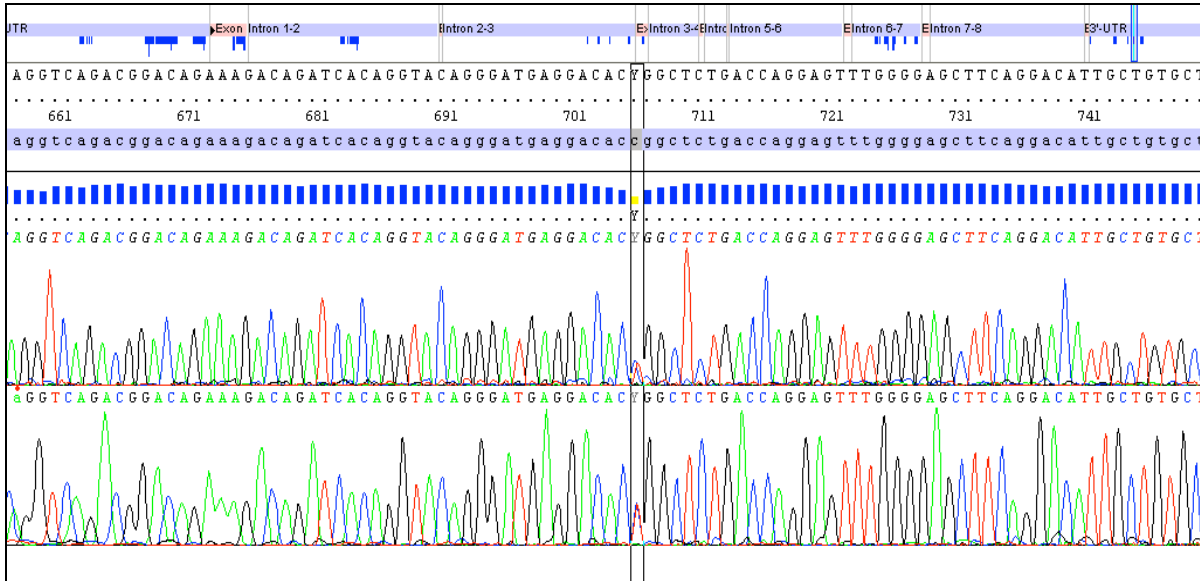
Rs1413711

Heterozygoot



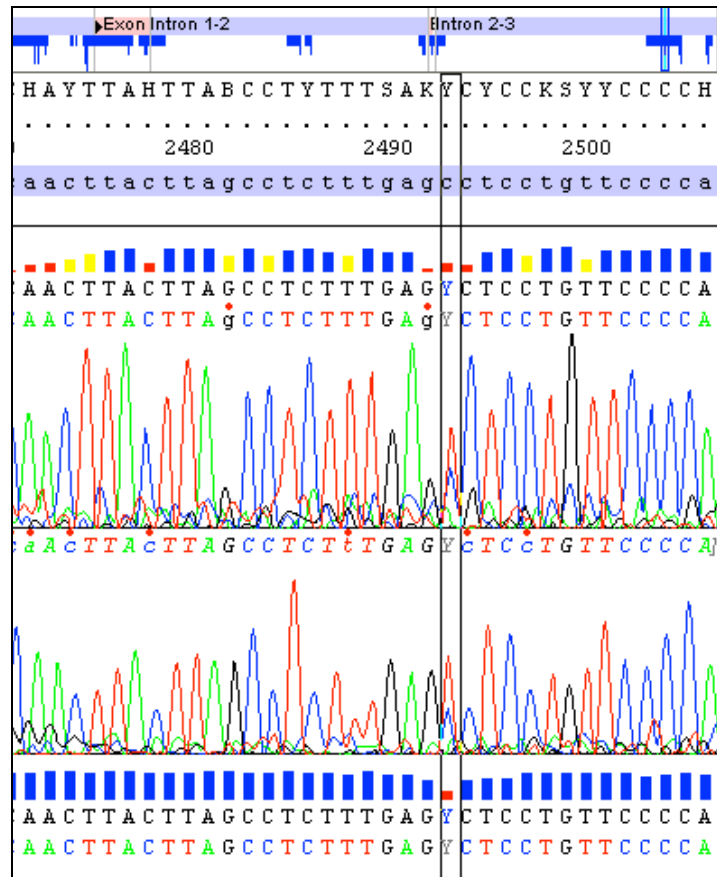
Rs3025040

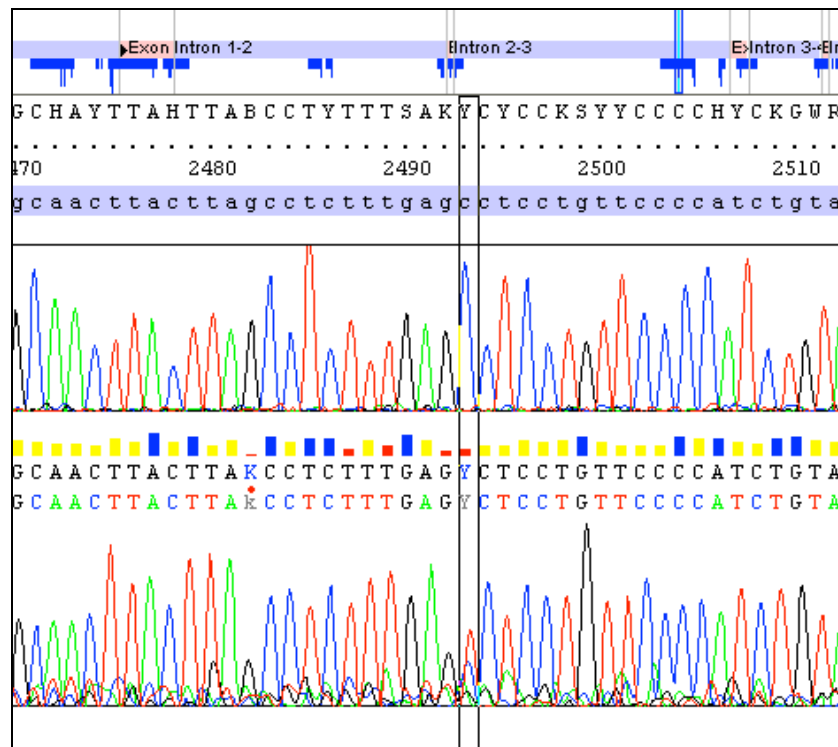
Heterozygoten



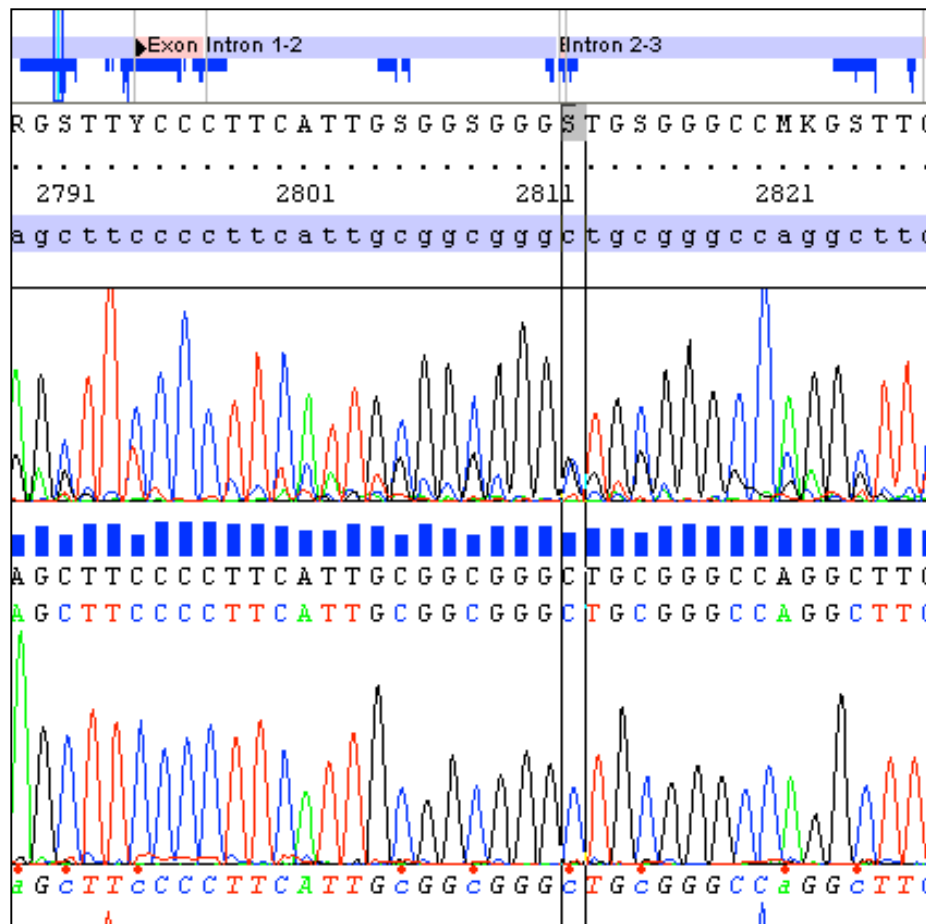
ONZUIVERE SEQUENTIES

rs735286





rs59260042



BIJLAGE 4 TOELATING VOOR HET GEBRUIK VAN FIGUREN UIT WETENSCHAPPELIJKE ARTIKELS

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 01, 2012

This is a License Agreement between Eva De Vilder ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number 2900090500453

License date May 01, 2012

Licensed content publisher Nature Publishing Group

Licensed content publication Nature Reviews Cancer

Licensed content title VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?

Licensed content author Steven J. Harper and David O. Bates

Licensed content date Oct 16, 2008

Volume number 8

Issue number 11

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Requestor type academic/educational

Format print and electronic

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations 1

High-res required no

Figures Figure 1

Author of this NPG article no

Your reference number

Title of your thesis / dissertation Studie van de rol van het *VEGF* gen in de oogsymptomen bij
Pseudoxanthoma Elasticum

Expected completion date May 2012

Estimated size (number of pages) 55

Total 0.00 EUR

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 01, 2012

This is a License Agreement between Eva De Vilder ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier Elsevier Limited
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Registered Company Number 1982084

Customer name Eva De Vilder

Customer address Wachtebekestraat 121
Zelzate, Oost-Vlaanderen 9060

License number 2900090804423

License date May 01, 2012

Licensed content publisher Elsevier

Licensed content publication Survey of Ophthalmology

Licensed content title Pseudoxanthoma Elasticum: Genetics, Clinical Manifestations and Therapeutic Approaches

Licensed content author Robert P. Finger, Peter Charbel Issa, Markus S. Ladewig, Christian Götting, Christina Szliska, Hendrik P.N. Scholl, Frank G. Holz

Licensed content date March–April 2009

Licensed content volume number 54

Licensed content issue number 2

Number of pages 14

Start Page 272

End Page 285

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Intended publisher of new work other

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations 1

Format both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article? No

Will you be translating? Yes

Number of languages 1

Languages Dutch

Order reference number

Title of your thesis/dissertation Studie van de rol van het *VEGF* gen in de oogsymptomen bij Pseudoxanthoma Elasticum

Expected completion date May 2012

Estimated size (number of pages) 55

Elsevier VAT number GB 494 6272 12

Permissions price 0.00 EUR

VAT/Local Sales Taks 0.0 USD / 0.0 GBP

Total 0.00 EUR

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 01, 2012

This is a License Agreement between Eva De Vilder ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number 2900100658854

License date May 01, 2012

Licensed content publisher John Wiley and Sons

Licensed content publication Human Mutation

Licensed content title Novel clinico-molecular insights in pseudoxanthoma elasticum provide an efficient molecular screening method and a comprehensive diagnostic flowchart

Licensed content author Olivier M. Vanakker, Bart P. Leroy, Paul Coucke, Lionel G. Bercovitch, Jouni Uitto, Dennis Viljoen, Sharon F. Terry, Petra Van Acker, Dirk Matthys, Bart Loeys, Anne De Paepe

Licensed content date Dec 21, 2007

Start page 205

End page 205

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic

Portion Figure/table

Number of figures/tables 1

Number of extracts

Original Wiley figure/table number(s) Figure 1

Will you be translating? Yes, without English rights

Number of languages 1

Languages Dutch

Order reference number

Total 0.00 USD



11200 Rockville Pike
Suite 302
Rockville, Maryland 20852

August 19, 2011

American Society for Biochemistry and Molecular Biology

To whom it may concern,

It is the policy of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology to allow reuse of any material published in its journals (the Journal of Biological Chemistry, Molecular & Cellular Proteomics and the Journal of Lipid Research) in a thesis or dissertation at no cost and with no explicit permission needed. Please see our copyright permissions page on the journal site for more information.

Best wishes,

Sarah Crespi

[American Society for Biochemistry and Molecular Biology](#)

11200 Rockville Pike, Rockville, MD

Suite 302

240-283-6616

[JBC](#) | [MCP](#) | [JLR](#)

