

Academiejaar 2013 - 2014

DE ROL VAN COLLAGEEN TYPE V EN VI IN ERFELIJKE BINDWEEFSELAANDOENINGEN

Eva MORTIER

Promotor: Dr. Sofie Symoens

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

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

“De auteur en de promotor geven de toelating dit afstudeerwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit afstudeerwerk.”

Datum

06.04.2014

(handtekening)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mortier', with a large, sweeping flourish underneath.

Naam (student)

MORTIER EVA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Syhoens', with a large, sweeping flourish underneath.

(promotor)

SYHOENS SOFIE

VOORWOORD

Mijn dank gaat uit naar de volgende personen:

Eerst en vooral, mijn promotor dr. Sofie Symoens. Dankzij haar adviezen en tips heb ik niet alleen van mijn masterproef een mooi en samenhangend geheel kunnen maken, maar heb ik ook meer inzicht verkregen in het onderwerp.

Mevrouw Luus Verreth en Joke Vanden Broecke, bij wie ik steeds terecht kon met vragen.

Mijn ouders, voor hun onvoorwaardelijke steun en eindeloos geduld.

Mijn broer, die mij in tijden van nood altijd kon opbeuren met een komische noot.

Tot slot, mijn vriendinnen, die veel begrip toonden voor mijn tunnelvisie tijdens het schrijven van deze masterproef.

Inhoud

ABSTRACT	1
INLEIDING	2
1. Bindweefsel	2
2. Collageen	2
Algemene structuur	2
De fibrillaire collagenen	3
Biosynthese	3
Collageen type I	3
Collageen type V	9
3. Ehlers-Danlos Syndroom	13
Classificatie	13
Klinisch beeld	14
Pathogenese	15
Diagnostiek	21
4. Onderzoeksvraag	22
MATERIAAL EN METHODEN	24
RESULTATEN	25
1. Bindingspartners	25
Microfibril vormende collagenen	25
Biosynthese	25
Collageen type VI	25
Interactie met collageen type V	28
2. Congenitale musculaire dystrofie	30
Classificatie	30
Klinisch beeld	30
Pathogenese	32
Diagnostiek	37
3. Overlap	38
Kliniek	38
Klinisch onderzoek en technische investigaties	39
Neuromusculair	39
EDS	39
UCMD	41

Huid	42
EDS	42
UCMD.....	43
DISCUSSIE.....	44
REFERENTIES	50
BIJLAGE	I

EDS is een heterogene groep van erfelijke bindweefselaandoeningen, gekenmerkt door hyperelasticiteit van de huid, hypermobiliteit van de gewrichten en kwetsbaarheid van huid, ligamenten, gewrichten, bloedvaten en inwendige organen. Deze groep kan volgens de Villefranche criteria onderverdeeld worden in verschillende types. Eén van deze types is klassieke EDS. De oorzaak van klassieke EDS kan bij meer dan 90% van de patiënten verklaard worden door afwijkend collageen type V. Echter, niet bij alle patiënten die lijden aan klassieke EDS kan een collageen V mutatie vastgesteld worden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat mutaties van andere ECM moleculen aan de basis liggen. Mits collageen type VI één van de bindingspartners van collageen type V is, zijn collageen type VI mutaties een mogelijke oorzaak. Aangezien beide collageen types deel kunnen uitmaken van eenzelfde proteïne netwerk zou hun interactie verantwoordelijk kunnen zijn voor overlap tussen collageen type V en collageen type VI aandoeningen. Er werd nagegaan in welke mate collageen VI deficiëntie, wat zich kan uiten in Ullrich Congenitale Musculaire Dystrofie, in bepaalde aspecten overlap vertoont met klassieke EDS. Aangezien tenascine-X deficiëntie zeer sterke overlap vertoont met klassieke EDS werd dit ook besproken.

De drie aandoeningen vertonen beperkte overlap in kliniek. Elektromyografie toont zowel spier- als zenuwaantasting bij klassieke en tenascine-X deficiënte EDS. Bij UCMD bevindt de afwijking zich op spierniveau.

Spierbiopsie toont bij klassieke EDS en tenascine-X deficiëntie myopathische veranderingen en bij UCMD eveneens dystrofie. Ook hier wijst dit op aantasting op spierniveau. Collageen type VI is aanwezig bij EDS, maar afwezig bij UCMD.

Serum creatinekinase is bij UCMD licht verhoogd, wat wijst op spierschade. Bij klassieke EDS en tenascine-X deficiëntie is deze relatief normaal.

De huid bij klassieke EDS wordt gekenmerkt door 'cauliflower'-achtige collageen fibrillen op elektronenmicroscopie. Bij UCMD wordt dit ook gezien, doch in mindere mate.

Echografie toont bij klassieke en tenascine-X deficiënte EDS vetinfiltratie en spieratrofie. Bij UCMD patiënten wordt op MRI dystrofie waargenomen.

Deze bevindingen doen vermoeden dat de ECM van spieren en perifere zenuwen een rol spelen in de pathofysiologie van klassieke EDS en tenascine-X deficiëntie. Mogelijks is er een gemeenschappelijke pathway tussen UCMD en klassieke EDS.

1. Bindweefsel

Er zijn vijf grote klassen van weefsel: bindweefsel, spierweefsel, epitheel, bloed en zenuwen. Bindweefsel is grotendeels opgebouwd uit extracellulaire matrix (ECM). De ECM draagt bij tot de organisatie van cellen en het coördineren van hun functies. Eén van de moleculen die helpt bij de opbouw van de ECM is collageen. Het staat in voor de mechanische sterkte en weerstand van het weefsel. Naast collageen bevat de ECM ook proteoglycanen. Dit zijn glycoproteïnen die covalent gebonden zijn aan glycosaminoglycanen¹. (4)

Andere glycoproteïnen zijn fibronectine, laminine, fibrinogeen, elastine, fibrilline, fibuline, tenascin, trombospondine en COMP (cartilage oligomeric matrix protein).

2. Collageen

Algemene structuur

Collagenen zijn glycoproteïnen die één of meerdere collageen (COL) domeinen² bezitten. Dit collageen domein is opgebouwd uit segmenten met een herhalende (Glycine-X-Y)_n sequentie, waarbij X en Y meestal proline en hydroxyproline zijn. In mindere mate kunnen dit lysine en hydroxylysine zijn, maar het kan eender welk aminozuur (AZ) zijn. De aanwezigheid van glycine met zijn korte zijketen is essentieel, mits het als enige past in het centrum van de triple helix. Substitutie van glycine zorgt voor een onderbreking van het triple helix motief³ (5). De collagenen bevatten tevens niet-collageen (NC) domeinen. Het aantal en de structuur van de COL en NC domeinen is afhankelijk van het type collageen. (5)

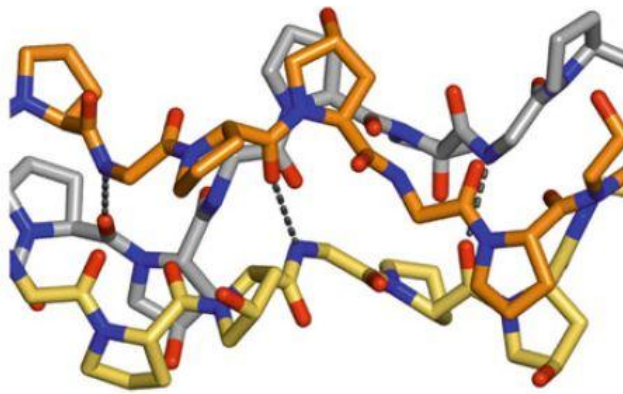
Er bestaan 28 verschillende types collageen die worden voorgesteld door Romeinse cijfers. Ze verschillen in structuur en plaats van voorkomen maar hebben als gemeenschappelijk kenmerk dat het 'trimere'⁴ proteïnen zijn. De α -ketens, de polypeptides waaruit ze zijn opgebouwd, kunnen identiek (homotrimeer) of verschillend (heterotrimeer) zijn. Elke α -keten vormt een linksdraaiende helix die geen waterstofbruggen binnenin de keten bevat. Drie zulke linksdraaiende α -ketens draaien rond elkaar tot een rechtshandige triple helix (figuur 1). Deze superhelix wordt gestabiliseerd door waterstofbruggen binnenin de ketens. (5)

¹ Lineaire polymeren van specifieke herhalende disacchariden. Voorbeelden: hyaluronzuur, chondroïtinesulfaat, heparansulfaat en keratansulfaat

² Regio van een proteïne met een welbepaalde tertiaire structuur (de 3D vorm van een polypeptideketen) en typerende activiteit

³ Een structurele unit (met een bepaalde 3D architectuur) in proteïnen; vaak geassocieerd met een bepaalde functie

⁴ Opgebouwd uit 3 monomeren



**Peptide dat hier wordt afgebeeld is
Gly-Pro-Hyp (glycine-proline-hydroxyproline)**

oranje, geel en grijs: polypeptideketens
blauw: N
rood: O

Figuur 1 Collageen triple helix structuur (overgenomen van Engel en Chiquet(6)). Elke polypeptideketen (α -keten) vormt een linksdraaiende polyproline-II-achtige structuur. Deze zijn op zich niet stabiel, maar 3 ketens draaien tot een rechtshandige superhelix die gestabiliseerd wordt door waterstofbruggen tussen de NH-groepen van de glycines en de CO-groepen van hydroxyproline in een naburige keten. Een belangrijke stabilisatie, voornamelijk van de polyproline-II-helix, komt door de N-C bindingen in de imino zuur residuen, die daarenboven de stabiliteit van de niet gevouwen ketens vermindert. De OH-groep van hydroxyproline heeft een stabiliserende functie. Alle zijketens (in dit voorbeeld de proline ringen) wijzen naar de buitenkant van de triple helix en kunnen op die manier interageren met naburige moleculen in collageen fibrillen en andere.

De collageen types kunnen onderverdeeld worden in verschillende klassen (tabel 3 in bijlage). De fibrillaire collageenen vormen de grootste klasse en komen het meest abundant voor in het lichaam. Collageen type I (bot en pezen), type II (kraakbeen), en type III zijn kwantitatief de meest voorkomende fibrillaire collageen types. Collageen type V en type XI komen minder frequent voor. Zij vormen samen met collageen type I en II heterotypische fibrillen, die de structuur en eigenschappen van de vezels reguleren. (4)

De fibrillaire collageenen

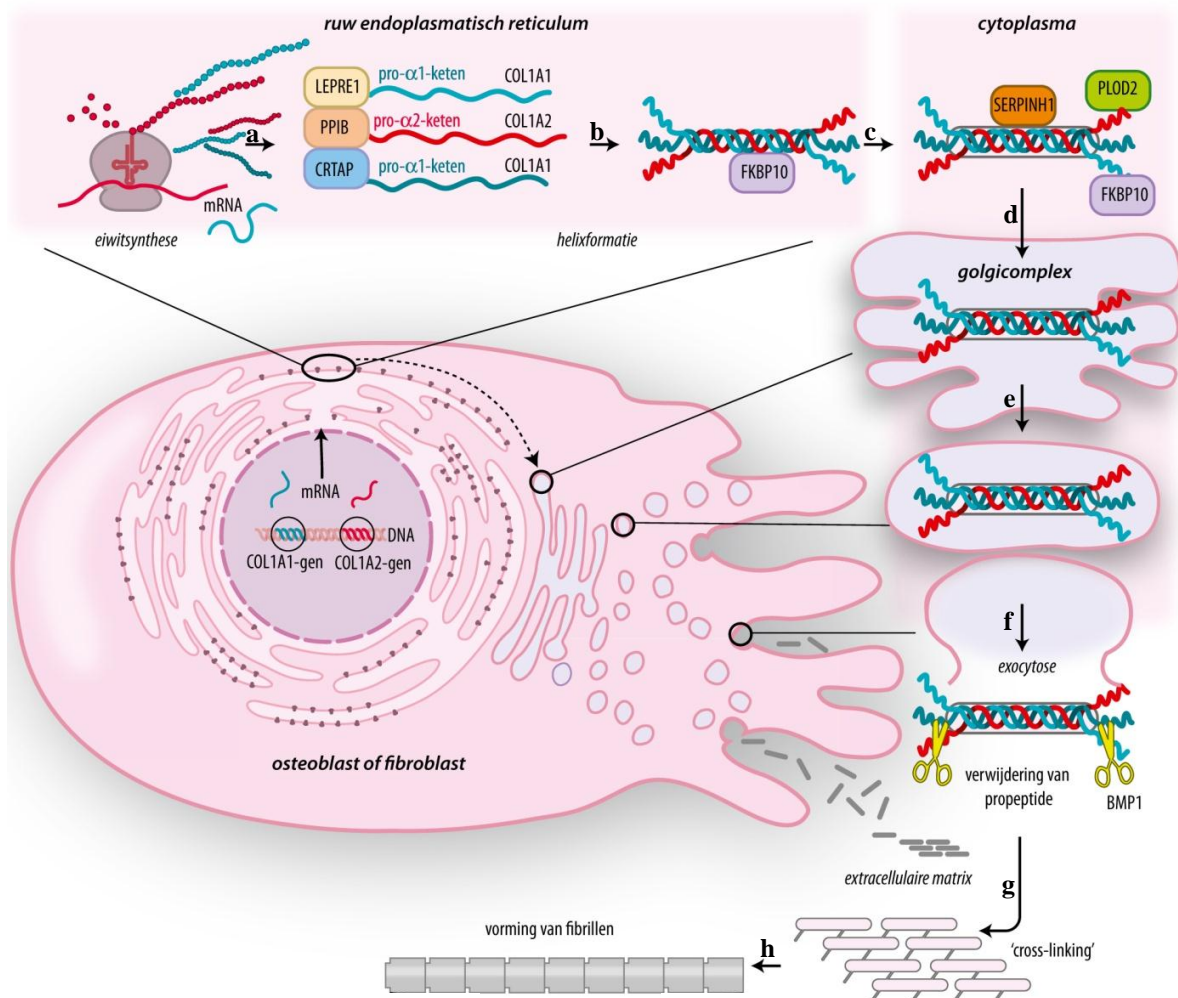
Biosynthese

De fibrillaire collageenen, voornamelijk geproduceerd door fibroblasten, worden gesynthetiseerd en gesecreteerd als procollagenen (5). Deze bestaan uit een niet-collageen carboxy(C)-terminaal propeptide en een amino(N)-terminaal propeptide dat zowel uit een collageen- als verschillende niet-collageen domeinen is opgebouwd. Het N-terminaal niet-collageen domein is opgebouwd uit een N-propeptide en een N-telopeptide. (4) Het propeptide verhindert premature samenstelling van de collageen moleculen tot fibrillen (5).

Collageen type I

Aangezien de biosynthese van collageen type I het meest bestudeerd is zal deze besproken worden.

Het *COL1A1* en *COL1A2* gen⁵ coderen voor de productie van de precursoren van de collageen type I α -ketens, de prepro- α ketens (figuur 2a). (7)



Figuur 2 Biosynthese van collageen type I (overgenomen van van Dijk et al. (8)). Het *COL1A1*-gen codeert voor de α 1-ketens en *COL1A2*-gen voor de α 2-ketens van collageen type I. (a) Translatie van het *COL1A1* en *COL1A2* mRNA en translocatie naar het rER vinden simultaan plaats. (b,c) In het rER vinden verscheidene post-translationele modificaties plaats en zullen twee pro- α 1 en één pro- α 2-keten zich opvouwen tot een triple helix structuur, de procollageen I molecule. Gedurende dit proces zullen 'chaperones' aan het procollageen type I binden. (d,e) Vervolgens wordt het procollageen via het Golgi-complex vervoerd naar de extracellulaire matrix. (f) Hier worden de N- en C-terminus gekleefd door respectievelijk het N-proteïnase ADAMTS-2 en het C-proteïnase BMP-1. Aldus ontstaat de mature collageen type I molecule. (g) Erna vindt collageen crosslinking plaats om fibrillen van collageen type I te vormen.

INTRACELLULAIR

Transcriptie

In de nucleus van de cel, waar het DNA zich bevindt, vindt de transcriptie plaats. Dit houdt in dat RNA gesynthetiseerd wordt op de DNA 'template'. Om matuur messenger RNA, mRNA,

⁵ Een gen is een DNA sequentie in het genoom dat vereist is voor het produceren van een functioneel product, zoals een polypeptide. Een gen bestaat uit coderende sequenties, exonen, afgewisseld met niet-coderende sequenties, intronen, en aangrenzende nucleotide sequenties die vereist zijn om het gen goed tot expressie te kunnen brengen

te verkrijgen worden de intron sequenties uit het primaire RNA transcript⁶ geknipt en de exon sequenties worden samengevoegd in dezelfde lineaire volgorde als de exonen. Dit proces heet ‘splicing’.

Translatie

Met translatie wordt bedoeld dat de RNA sequentie gedecodeerd wordt om de AZ sequentie van het te synthetiseren proteïne te bepalen. Hierbij wordt transfer RNA, tRNA, gebruikt als link tussen de base-sequentie van elk mRNA en de AZ sequentie van het proteïne gecodeerd door dat mRNA. (7)

Het mRNA wordt getransporteerd naar het cytoplasma waar het aan de ribosomen bindt (figuur 2c). Op de ribosomen in het ruw endoplasmatisch reticulum (rER) vindt vervolgens de translatie van het *COL1A1* en *COL1A2* mRNA tot prepro- α 1- en prepro- α 2-ketens plaats. (7) Deze prepro- α ketens hebben een signaalpeptide ter hoogte van de N-terminus. Deze AZ sequentie vergemakkelijkt het binden van ribosomen aan het rER en verzorgt het transport van de prepro- α keten in het lumen van de rER.

In het rER wordt het signaalpeptide gekliefd, waardoor de pro- α keten ontstaat (7). Twee pro- α 1-ketens worden samengevoegd met één pro- α 2-keten tot type I procollageen polypeptide ketens.

Alvorens de triple helix gevormd kan worden dienen er post-translationele veranderingen plaats te vinden, zoals hydroxylatie, glycosylatie en het opvouwen van de N- en C-propeptides.

Post-translationele modificaties

a) Hydroxylatie

De nu nog ongevouwen collageen ketens worden gehydroxyleerd⁷. Deze hydroxylatie draagt bij tot de crosslinking van de α -ketens (zie verder).

De hydroxylatie wordt gemedieerd door prolyl 4-hydroxylase (P4H), prolyl 3-hydroxylase (P3H) en lysyl hydroxylase (LH). Lysyl hydroxylase staat ook bekend als procollageen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase (PLOD2).

Deze hydroxylasen hebben Fe²⁺, vitamine C en moleculaire O₂ nodig om te functioneren. (9)

⁶ Initieel RNA product bij de transcriptie alvorens de intronen verwijderd worden door middel van splicing

⁷ Het toevoegen van een OH-groep aan een molecule

P4H vormt samen met het Protein Disulfide Isomerase (PDI) een enzymatisch actief complex (9). PDI is een oxidoreductase in het rER en een moleculaire ‘chaperone’⁸.

PDI is noodzakelijk om P4H oplosbaar te houden en het P4H-PDI complex binnenin het rER te houden tijdens inhibitie van de hydroxylatie. (9)

Het vormt tevens disulfidebindingen, zowel in als tussen de α -ketens (9).

Proline

Hydroxylatie van proline tot 4-hydroxyproline is de meest voorkomende posttranslationele modificatie. Dit vindt plaats in de Y-positie van de Gly-X-Y repeats en zorgt voor thermische stabilisatie van de collageen triple helix (9). Allicht is 3-hydroxyproline betrokken bij de kwaliteitscontrole van collageen en draagt het bij tot de binding van SLRP's (small leucine rich proteoglycans) en FACIT's (fibril associated molecules with large noncollagenous domains) (9).

Lysine

LH hydroxyleert enkele lysine residu's in de Y-positie (Gly-X-Lys tripeptide unit) van het collageen domein en sequenties in de N- en C-niet collageen telopeptide regio's. Deze hydroxylatie laat de glycosylatie van hydroxylysine toe (zie verder).

b) ‘O-linked’ glycosylatie⁹

Sommige hydroxylysine residu's worden geglycolyseerd door β -galactose en α -glucose. Dit proces wordt gekatalyseerd door de galactosyltransferasen GLT25D1 (glycosyl transferase 25 domain 1), GLT25D2 (glycosyl transferase 25 domain 2) en LH3.

LH3 is één van de reeds vermelde isovormen van het lysyl hydroxylase en fungeert naast galactosyltransferase ook als glucosyltransferase. (9)

Hydroxylysine en ‘O-linked’ glycosylatie van hydroxylysines binnenin procollageen moleculen zijn belangrijk voor de intra- en intermoleculaire crosslinks (9).

⁸ Een proteïne dat het correct opvouwen van andere proteïnen bevordert door de aggregatie van ongevouwen proteïnes te verhinderen

⁹ Een saccharide bindt aan een O-atoom van een AZ in een proteïne

c) Opvouwen van N- en C-propeptide

Alvorens de triple helix gevormd wordt, worden de C-propeptides opgevouwen. Hierbij spelen moleculaire ‘chaperones’ van het rER, zoals PDI en cyclophiline B (CypB), een rol (9).

Vorming triple helix

De triple helix komt tot stand als een soort van rits, startend vanaf de C-terminus en eindigend aan de N-terminus. Alle peptidebindingen dienen zich hiervoor in ‘trans’¹⁰ conformatie te bevinden.

Proline kan zich zowel in ‘trans’ als in ‘cis’ conformatie bevinden. Indien proline zich in ‘cis’ conformatie bevindt dient deze gewijzigd te worden naar ‘trans’ conformatie door middel van peptidyl prolyl cis-trans isomerasen (PPIase’s). Tot deze PPIase’s behoren cyclophylines, FK506 binding proteins (FKBP) en parvulines. (9)

a) *Cyclophyline*

Eén van de cyclophylines, CypB, vormt in het rER complexen met PDI, Hsp47 (heat shock protein 47), calreticuline/calnexine en LH1 (één van de LH isovormen). Het vormt tevens een complex met P3H1, één van de P3H isovormen, en CRTAP (cartilage associated protein). Het CypB/P3H1/CRTAP complex vervult naast een peptidyl–prolyl cis–trans isomerase functie, tevens een rol als algemene moleculaire chaperone en prolyl hydroxylase. (9)

b) *FKBP65*

FKBP65 is één van de ‘FK506 binding proteins’. Diens rol is optreden als ‘chaperone’ tijdens de biosynthese en de maturatie van procollageen. FKBP65 verhindert vroegtijdige associatie tussen procollageen moleculen en zorgt voor bijkomende thermische stabiliteit van collageen type I. (9)

Bij de vorming van de triple helix van procollageen is er een onstabiele ‘junction’ tussen gevouwen en ongevouwen ketens. Het P3H1/CRTAP/CypB complex is allicht een moleculaire chaperone totdat Hsp47 en/of FKBP65 de triple helix stabiliseert. (9)

c) *Hsp47*

Hsp47 is een moleculaire ‘chaperone’ specifiek voor collageen. Het maakt deel uit van de serine protease inhibitor familie (SERPIN) maar functioneert zelf niet als protease inhibitor (9). De functie van Hsp47 is het stabiliseren van de procollageen triple helix bij lichaamstemperatuur (10). Dit proces kan enkel doorgaan als er minstens 20 Hsp47

¹⁰ Stereoisomeren hebben dezelfde bindingen maar zijn anders georganiseerd in de ruimte. In het ‘cis’ isomeer bevinden de moleculen zich naast elkaar. In het ‘trans’ isomeer bevinden ze zich tegenover elkaar

moleculen aanwezig zijn (11).

Het eiwit herkent de collageen triple helix, bindt direct aan het gevouwen type I collageen en verplaatst zich van het rER naar het Golgi-apparaat met het procollageen. Eens in het Golgi-apparaat komt Hsp47 los van het procollageen en wordt het gerecycleerd in het rER via COPI (coat protein 1) vesikels¹¹. (9)

Hsp47 speelt tevens een belangrijke rol in de controle van het gevouwen procollageen. Indien collageen verkeerd opgevouwen is wordt de ‘unfolding protein response’ (UPR) geactiveerd om deze te elimineren.

Secretie

Na de synthese van het procollageen in het rER wordt het getransporteerd naar het trans-Golgi netwerk, via COPII (coat protein 2) vesikels¹² en vervolgens naar de extracellulaire matrix (9).

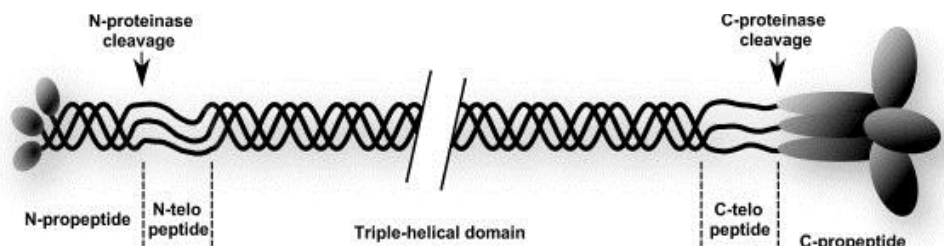
EXTRACELLULAIR

Maturatie

Tijdens de maturatie van collageen wordt het amino-terminaal propeptide gekliefd door het procollageen N-proteïnase (ADAMTS-2), behorend tot de ‘A Disintegrin And

Metalloproteinase with Thrombospondin motifs’ (ADAMTS) familie (figuur 3). (12)

Hierdoor ontstaat tropocollageen. Het carboxy-terminaal propeptide wordt gekliefd door procollageen C-proteïnase, ook wel Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1) genoemd (figuur 3).



Figuur 3 Model van de proteolytische verwerking van collageen type I (overgenomen van Boudko et al. (13)). Collageen type I wordt initieel gesynthetiseerd in diens premature vorm dat grote ‘globulaire’ domeinen bevat ter hoogte van de N- en C-terminus (N- en C-propeptiden). Deze propeptiden worden later gekliefd door N- en C-proteïnasen. De mature collageen moleculen vormen dan fibrillen. Het mature collageen bevat in dit stadium nog steeds de korte niet-triple helicale peptiden, de N- en C-telopectiden.

¹¹ ‘Coat protein’ dat vesikels omhult en helpt bij het transport van proteïnen van het cis-Golgi apparaat naar het rER, zogenaamd retrograad transport

¹² Analog aan COPI vesikels maar is betrokken bij anterograad transport van proteïnen, van het rER naar het Golgi-apparaat

Crosslinking

Vervolgens zal het gevormde collageen zich organiseren tot supramoleculaire structuren, zoals fibrillen. Fibrillen worden gevormd door crosslinking van het procollageen ter hoogte van de telopeptiden. Dit zorgt voor bijkomende weerstand tegen 'shear stress'. De monomeren worden hierbij gestapeld per 67 nm (=D-periode) (14). Hierbij ontstaat er een 'gap' tussen de uiteinden van naburige moleculen. De fibril collageen molecule is ongeveer 300 nm (4,4 D) lang en heeft een doorsnede van 1,5 nm (5).

Dit proces wordt geïnitieerd door oxidatieve deaminatie¹³ van lysine en hydroxylysine residu's en wordt gekatalyseerd door lysyl oxidase (LOX) enzymen die hydroxylysine en lysine residu's verbinden (15).

LOX is een koper-metalloenzyme dat gebruik maakt van vitamine B6 en tyrosyl-lysine quinone als cofactoren. LOX wordt geactiveerd via klieving van pro-LOX door BMP-1 (16).

Collageen type V

Collageen type V komt voor in alle niet-kraakbenige weefsels (14). Het maakt 2-5% uit van het totaal collageen in bot, pees en dermis en 10-20% van de cornea (17).

De biosynthese van collageen type V verloopt grotendeels analoog aan dat van collageen type I. Desalniettemin zijn er enkele verschillen die in de komende paragrafen toegelicht worden.

INTRACELLULAIR

Transcriptie en translatie

De genen die coderen voor de $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - en $\alpha 3$ -ketens van collageen type V zijn respectievelijk *COL5A1*, *COL5A2* en *COL5A3*. (5)

Type V collageen wordt gesynthetiseerd als homo- en heterotrimeer pro- α -collageen (tabel 3, in bijlage). Het meest voorkomende heterotrimeer is $[\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)]$, opgebouwd uit twee pro- $\alpha 1(V)$ -ketens en één pro- $\alpha 2(V)$ -keten. Type V collageen kan tevens voorkomen als homotrimeer van pro- $\alpha 1(V)$ -ketens, namelijk $[\alpha 1(V)]_3$.

Hybride heterotrimeren zijn mogelijk indien de pro- $\alpha 1$ en pro- $\alpha 2$ -ketens van collageen type XI de pro- $\alpha 1(V)$ - en pro- $\alpha 2(V)$ -ketens vervangen. (14)

¹³ Het verwijderen van een aminegroep van een molecule

De structuur van het pro- $\alpha 2(V)$ -domein toont sterke overeenkomsten met dat van de majeure fibrilvormende collageen types, zoals collageen type I (18).

De triple helix en C-propeptides van de pro- $\alpha 1(V)$ en pro- $\alpha 3(V)$ -ketens lijken op die van de andere fibrilvormende collageen types, maar ze verschillen in grootte en configuratie van de domein structuur van het ‘globulair’ proteïne ter hoogte van de amino-terminus (19).

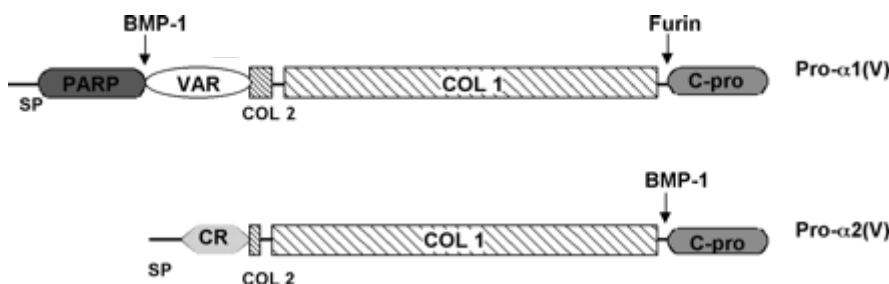
Analoog aan collageen type I bevat procollageen type V een niet-collageen C-terminaal propeptide en een N-terminaal propeptide (5).

De N-propeptides van collageen type V hebben een flexibel NC2-domein dat zich tussen het domein van de triple helix (COL1) en een ander kort rigide triple helix domein (COL2) bevindt (5). Het N-terminaal domein (NC3) van de pro- $\alpha 3(V)$ en pro- $\alpha 1(V)$ -ketens is opgebouwd uit een variabel (VAR) en een proline en arginine rijk (PARP) subdomein (20). Het pro- $\alpha 2(V)$ -N-propeptide bevat tevens een cysteïnerijk¹⁴ (CR) subdomein (20).

EXTRACELLULAIR

Maturatie

Net zoals bij collageen type I worden de N-terminale en C-terminale propeptides vóór de fibrillogenese door middel van peptidasen verwijderd (figuur 4) (4). Aangezien het [$\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)$] heterotrimeer het meest voorkomt wordt hier enkel de proteolytische verwerking van de pro- $\alpha 1(V)$ - en pro- $\alpha 2(V)$ -ketens besproken.



Figuur 4 Proteolytisch verwerken van de pro- $\alpha 1(V)$ en pro- $\alpha 2(V)$ collageen ketens (overgenomen van Unsöld et al. (21)). Plaatsen waar klieving plaatsvindt zijn aangeduid door een pijl. SP: signaalpeptide. COL1: voornaamste collageen domein van pro- $\alpha 1(V)$ en pro- $\alpha 2(V)$. COL2: klein collageen N-propeptide subdomein van pro- $\alpha 1(V)$ en pro- $\alpha 2(V)$. C-pro: C-propeptide. CR: cysteïne-rijk subdomein van het pro- $\alpha 2(V)$ -N-propeptide.

BMP-1 klieft de pro- $\alpha 1(V)$ -keten in het niet-collageen domein (NC3) van diens N-terminale ‘globulaire’ regio en de pro- $\alpha 2(V)$ -keten ter hoogte van de C-terminus tussen het groot collageen domein (COL1) en de C-propeptide (20). Hierbij wordt het flexibele COL2 en het

¹⁴ Cysteïne is essentieel voor het vormen van disulfidebindingen binnenin de ketens alvorens de pro- $\alpha(V)$ -ketens samengesteld worden en het opvouwen van de triple helix geïnitieerd wordt

VAR domein behouden. De activiteit van BMP-1 wordt hierbij opgereguleerd door het enhancer proteïne PCPE-1 (procollagen C-proteinase enhancer-1) (1).

Furine, het ‘subtisin-like prohormone convertase’, klieft de pro- $\alpha 1(V)$ -keten ter hoogte van de C-terminus, tussen het C-propeptide en het groot collageen domein (COL1) (20).

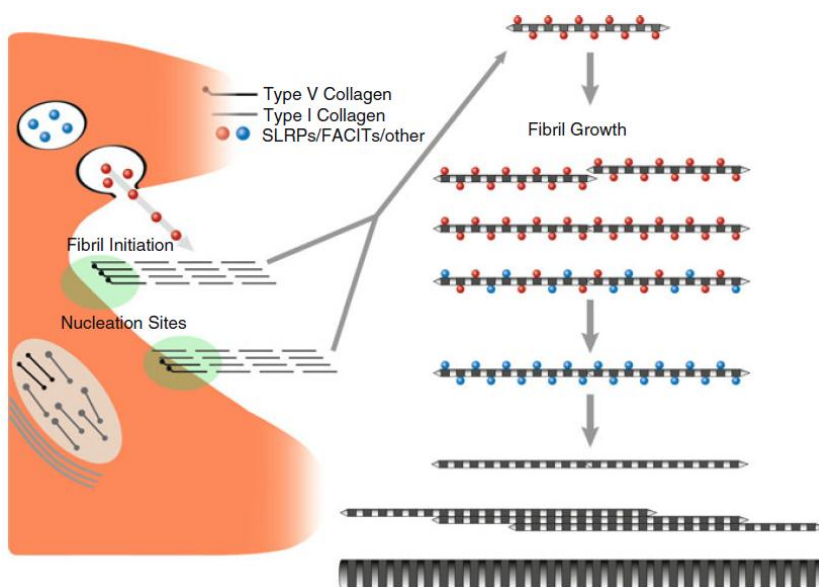
Het N-terminaal domein van pro- $\alpha 2(V)$ wordt niet gekliefd (5). In de heterotrimeren blijft een ‘globulair’ domein bestaan dat de groei van collageen moleculen sterisch kan inhiberen. (14)

De klieving van de N-terminale propeptiden gebeurt zeer traag, wat de functie van type V collageen beïnvloedt en zo ook de fibrillogenese (14). De N-terminale propeptiden kunnen beschouwd worden als de snelheidsbeperkende componenten in dit proces.

Supramoleculaire structuur

Het is onduidelijk op welk ogenblik in de ECM de fibrillogenese¹⁵ van start gaat.

Het samenstellen van het procollageen tot fibrillen vindt plaats in het Golgi compartiment maar deze samenstelling wordt actief geïnhibeerd door Hsp47 en andere rER ‘chaperones’ (9). De ontstane fibrillen hebben een diameter van 67nm (= D-periode) en zijn bandvormig (5).



Figuur 5 Model van het regelen van de samenstelling van fibrillen (overgenomen van Birk en Bruckner (5)). (1) Initiatie van fibrillogenese door ‘nucleatoren’, zoals collageen type V en XI, ter hoogte van het oppervlak van de fibroblast. Bij de ‘nucleatie’ zijn tevens organisatoren, zoals integrines en syndecanen, betrokken (groen gearceerde regio). (2) Samenstellen van onvolgroeide fibrillen met een korte diameter. (3) Incorporatie van de fibrillen in de extracellulaire matrix. De fibrillen worden gestabiliseerd door SLRP’s en FACIT’s.

¹⁵ Het vormen van fibrillen

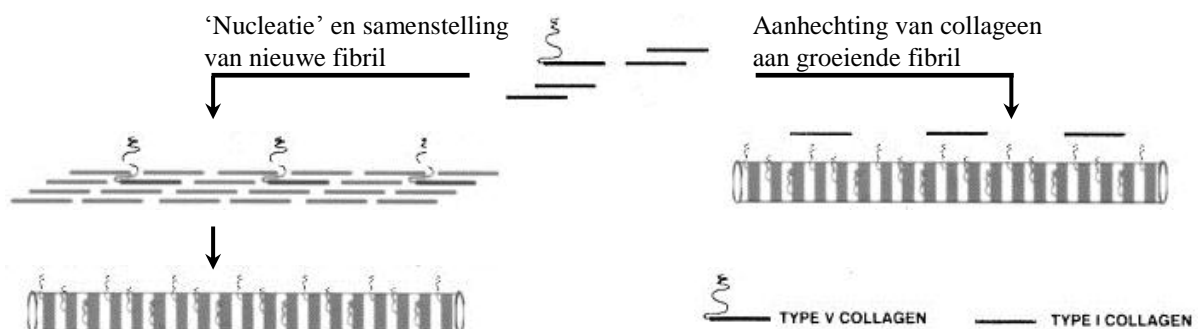
Het wordt algemeen aangenomen dat alle fibrillen heterotypisch samengesteld zijn uit minstens twee fibrilvormende collageen types, een majeur (collageen types I, II en III) en een mineur (collageen types V en XI) (9).

Collageen type V speelt een belangrijke rol als ‘nucleator’ in het regelen van de collageen fibrillogenese, meer bepaald in het vormen van de fibrilstructuur en in de orthogonale schikking van de lamellen (figuur 5). Het controleert tevens het aantal en de beginnende diameter van de fibrillen. (22)

Fibroblasten regelen de fibril diameter door de verhouding van collageen type V te wijzigen, totdat een bepaalde collageenconcentratie bereikt is. Sun et al. stelt dat collageen type V bepaalt hoeveel fibrillen samengesteld worden. Daar waar meer collageen type V teruggevonden wordt zullen meer ‘nucleatie sites’ aangetroffen worden en fibrillen met een kleine diameter. Dit is het geval in de cornea. (22)

Na de ‘nucleatie’ worden door middel van unilaterale elongatie onvolgroeide tussenvormen met een korte, smalle diameter gecreëerd (figuur 6). Deze tussenvormen zullen lineair en lateraal samensmelten en zo aanleiding geven tot lange mature fibrillen met grotere diameters. (2)

De fibrillen worden vervolgens geïncorporeerd in de ECM waar ze gestabiliseerd worden door SLRP's en FACIT collageenen (5). De SLRP's worden onderverdeeld in klasse I (decorine en biglycan) en klasse II (fibromoduline en lumican).

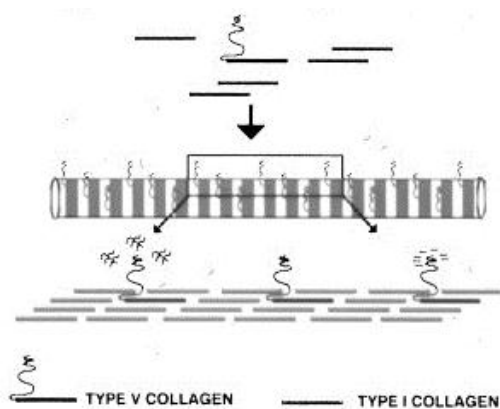


Figuur 6 Model heterotypische regeling van de samenstelling van de collageen fibril in de fibrillogenese (overgenomen van Birk et al. (3)). Wanneer de NH₂-uiteinden van collageen type V op het fibriloppervlak een kritieke densiteit bereiken gebeurt er geen verdere groei van de bestaande fibrillen maar worden er nieuwe korte fibrillen gevormd met smalle diameters. Dit zou de vroege fibriltussenvormen leveren die noodzakelijk zijn voor de volgende stap in de fibrilgroei.

Collageen type V is vereist voor de ‘nucleatie’ van fibrillen indien collageen type I in lage hoeveelheid aanwezig is (2, 22). Overschrijdt collageen type I echter de relatief hoge drempelconcentratie, dan kan het zelf instaan voor het samenstellen van fibrillen, doch

inefficiënt (23). Het is de verhouding van collageen type V ten opzichte van collageen type I die rechtstreeks het aantal en de diameter van de fibrillen regelt (22).

Bij het vormen van de heterotypische fibril wordt de triple helix van collageen type V ingebed in de heterotypische fibril van collageen type I en wordt zo de diameter geregeld (2, 3). Het N-terminaal domein van collageen type V kan echter niet ingebed worden (figuur 7). Hierbij fungeert de weerhouden NC2-regio als scharnier zodat het rigide COL2 domein doorheen het fibriloppervlak in de 'gap' regio kan geprojecteerd worden en het variabel domein aanwezig is in de 'gap' en op het fibriloppervlak (5). Hierbij is het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide het enige deel van de collageen V molecule dat aan het oppervlak van de heterotypische I/V collageen fibrillen uitsteekt (3). Het N-propeptide van collageen type V speelt een zeer belangrijke rol in het regelen van de collageen fibrillognese en de organisatie van de ECM.



De type I en V collageen moleculen zijn parallel gerangschikt en vormen een dwarsgestreepte fibril. Hierdoor ligt de triple helix van de collageen type V molecule begraven in de fibril en zijn de type I collageen moleculen aanwezig ter hoogte van het fibril oppervlak.

De N-terminus van collageen type V wordt doorheen de 'gap' regio geprojecteerd en komt op die manier bloot te liggen op het fibril oppervlak.

Naarmate de fibril samenstelling verdergaat neemt het aantal NH_2 -terminale domeinen toe aan het fibril oppervlak.

De NH_2 -terminale domeinen van collageen type V wijzigen de eigenschappen van het fibril oppervlak alleen of samen met andere macromoleculen.

Figuur 7 Model van de heterotypische fibril collageen I/V (overgenomen van Birk et al. (3)).

3. Ehlers-Danlos Syndroom

Mutaties van collageen type V veroorzaken het klassieke type van het Ehlers-Danlos Syndroom. Het Ehlers-Danlos Syndroom (EDS) is een heterogene groep van erfelijke bindweefselaandoeningen, gekenmerkt door hyperelasticiteit van de huid, hypermobiliteit van de gewrichten en kwetsbaarheid van huid, ligamenten, gewrichten, bloedvaten en inwendige organen (24). De groep kan ingedeeld worden naargelang deze kenmerken minder of meer voorkomen.

Classificatie

De Villefranche criteria verdelen het EDS onder in zes grote types, aan de hand van majeure en mineure criteria. De aanwezigheid van één of meerdere majeure criteria is noodzakelijk

voor een klinische diagnose, met bij voorkeur bevestiging door laboratoriumtesten. De mineure criteria dragen bij tot de diagnose van het subtype. De aanwezigheid van één of meer mineure criteria is onvoldoende voor het stellen van een diagnose in afwezigheid van een major criterium. Het doet daarentegen wel een EDS-like aandoening vermoeden. (25) De klassieke, hypermobiele en vasculaire types komen het meest voor. Enkel het klassieke type wordt hier besproken. De criteria van de andere types kunnen teruggevonden worden in bijlage (tabel 4).

Klinisch beeld

De huid van een patiënt met klassieke EDS wordt omschreven als dun, zacht, fluweelachtig en voelt deegachtig aan. De huid is hyperelastisch; hiermee wordt bedoeld dat de huid gemakkelijk uitrekbaar is en terugspringt na loslating. De huid vertoont tevens een verhoogde kwetsbaarheid, wat zich uit in het scheuren van de dermis na kleine traumata. Daarenboven is er een vertraagde wondheling en een uitrekking van littekens. Dit laatste resulteert in atrofische littekens met typisch uitzicht van ‘sigarettenpapier’ (figuur 8a). (24)

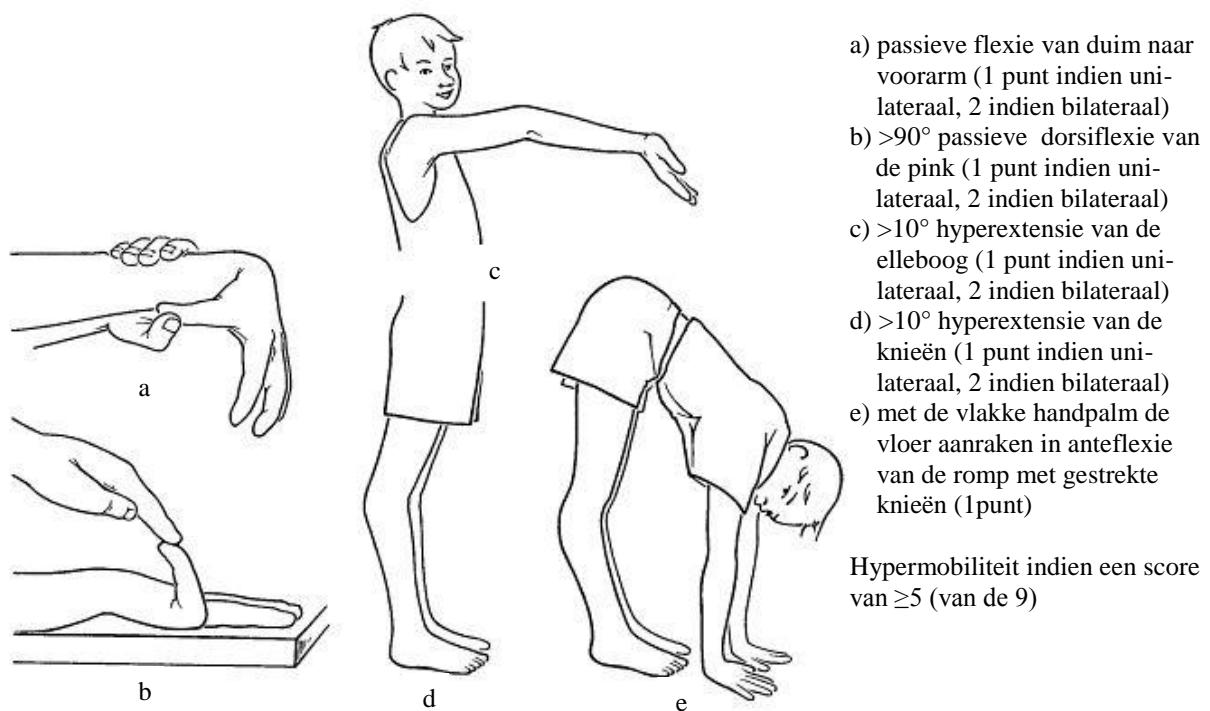


Figuur 8 Klinische symptomen (overgenomen van Symoens et al. (26)). (a) Typerende atrofische littekens op de knieën, (b) prominente hyperlaxiteit van de vingergewrichten (met zwanenhals vervorming).

Verhoogde kwetsbaarheid van perivascuair bindweefsel en bloedvaten geeft aanleiding tot hematomen (24).

Met hypermobiliteit wordt een grotere bewegingsamplitudo van de gewrichten, zowel actief als passief, bedoeld. Hypermobiliteit varieert met leeftijd, geslacht en etniciteit (24). Bij klassieke EDS worden zowel de grote als de kleine gewrichten aangetast. Indien uitgesproken kan dit leiden tot luxatie (24). Om de hypermobiliteit te evalueren wordt de Beighton score

gebruikt. Een patiënt moet een score van vijf of meer behalen om aan het criterium van hypermobiliteit te voldoen (figuur 9).



- a) passieve flexie van duim naar voorarm (1 punt indien unilateraal, 2 indien bilateraal)
- b) $>90^\circ$ passieve dorsiflexie van de pink (1 punt indien unilateraal, 2 indien bilateraal)
- c) $>10^\circ$ hyperextensie van de elleboog (1 punt indien unilateraal, 2 indien bilateraal)
- d) $>10^\circ$ hyperextensie van de knieën (1 punt indien unilateraal, 2 indien bilateraal)
- e) met de vlakke handpalm de vloer aanraken in anteflexie van de romp met gestrekte knieën (1punt)

Hypermobiliteit indien een score van ≥ 5 (van de 9)

Figuur 9 De Beighton score in kader van gewrichtshypermobiliteit (S. Staubli) (overgenomen van Steinmann et al. (24)).

Een alternatief voor het gebruik van de Beighton score is de Bulbena score (27). Naast het testen van negen gewrichten wordt hierbij ook gekeken naar de aanwezigheid van ecchymosen. Dit laatste laat de differentiatie toe met de hypermobiliteit die bij sommige myopathieën wordt aangetroffen, aangezien ecchymosen daar afwezig zijn (zie verder).

Pathogenese

Fibrillaire collagenen

Van de klassieke EDS patiënten die voldoen aan de 3 majeure Villefranche criteria (tabel 4, in bijlage) heeft meer dan 90% een collageen type V defect (26). Symoens et al. constateerde dat hierbij ongeveer 2/3 van de mutaties zich bevond in het *COL5A1* gen en ongeveer 1/3 in het *COL5A2* gen.

Ten gevolge van de technologische vooruitgang is er een toegenomen detectieratio van de mutaties en een betere kennis van de betrokken genen. *COL5A1* en *COL5A2* worden algemeen beschouwd als de majeure (of zelfs enige) genen die betrokken zijn bij klassieke EDS. Tot op heden is er nog geen mutatie van *COL5A3* aangetoond.

In theorie kan genetische heterogeniteit niet uitgesloten worden, maar mogelijk kan technische beperking van de methode van sequentieanalyse verantwoordelijk zijn voor het niet vinden van een mutatie. Het feit dat door aanpassing van de detectiemethode nieuwe mutaties geïdentificeerd konden worden bij patiënten waarbij vroeger geen collageen type V mutaties aangetoond kon worden staft dit (26).

De huidige technieken focussen zich voornamelijk op de exonen. Het is bijgevolg mogelijk dat de tot op heden ongedetecteerde mutaties zich bevinden in de promotor regio of dieper in de intronen. Het is mogelijk dat de ongedetecteerde *COL5A1* mutaties in die regio's enkel verantwoordelijk zijn voor die EDS patiënten met *COL5A1* haplo-insufficiëntie ('null'¹⁶ allel) waarbij geen mutatie kon vastgesteld worden, en dat causale mutaties zich elders bevinden.

Het klassieke type van EDS is autosomaal dominant (AD) overerfbaar. De heterozygote *COL5A1* mutaties komen verspreid voor doorheen het gen, terwijl de *COL5A2* mutaties, met uitzondering van 1 C-propeptide mutatie, gelokaliseerd zijn in het triple helix domein (26).

Het merendeel van de *COL5A1* mutaties zijn nonsense¹⁷, frameshift¹⁸ of splice site¹⁹ mutaties die verantwoordelijk zijn voor een niet-functioneel *COL5A1* allel ('null' allel). Deze mutaties geven aanleiding tot een prematuur stopcodon waardoor een onstabiel *COL5A1* mRNA mutant ontstaat dat snel afgebroken wordt ('nonsense-mediated mRNA decay'). Dit verhindert de productie van een verkort polypeptide die met de celfunctie kan interfereren. Dit heeft als gevolg dat de productie van de normale hoeveelheid van collageen type V amper de helft bedraagt. Men spreekt hier van haploinsufficiëntie. (26, 28-31)

Haploinsufficiëntie van collageen type V speelt een belangrijke rol in de pathogenese van klassieke EDS. Dit kan afgeleid worden uit het feit dat een substitutie van een aminozuur in de hydrofobe regio van het prepro- $\alpha 1(V)$ signaalpeptide²⁰ de secretie van het mutante collageen type V proteïne in de ECM verhindert door afname van de hydrofobiciteit. Dit doet vermoeden dat het intracellulair transport van het proteïne naar het endoplasmatisch reticulum (ER) gehinderd wordt (32).

¹⁶ Mutatie resulterend in de afwezigheid van een genproduct of van functie op fenotype niveau

¹⁷ Substitutie van een codon (=triplet) door stopcodon

¹⁸ Codon insertie/deletie dat geen veelvoud is van 3 en bijgevolg het leesraam verstoort

¹⁹ Een mutatie die de specifieke sequentie waar de splicing van een intron plaatsvindt wijzigt

²⁰ Opgebouwd uit 3 functionele domeinen met een karakteristieke centrale hydrofobe kern regio die noodzakelijk is voor de translocatie van het preproteïne naar het ER

Dit wordt onderstreept door het feit dat mutaties die aanleiding geven tot deletie van 1 of meer ‘highly conserved’ cysteine residu’s in het C-propeptide domein, verhinderen dat mutante pro- $\alpha 1(V)$ -ketens geïncorporeerd worden in collageen type V procollageen heterotrimeren. Dit resulteert in een reductie van collageen type V in de ECM. (30, 33)

Minder voorkomend zijn structurele mutaties die aanleiding geven tot de productie van een gemuteerde α -keten. Deze mutaties kunnen splice site of missense mutaties van de *COL5A1* genen zijn (32, 34, 35). Als gevolg daarvan wordt een abnormale polypeptideketen geïncorporeerd in de collageen V molecule. Dit zorgt voor een structureel abnormale collageen V molecule met daardoor een verstoring van de structuur van collageen type V (26). Dit reduceert eveneens de beschikbare hoeveelheid van normaal collageen type V.

Alle geïdentificeerde *COL5A2* mutaties zijn structurele mutaties, voornamelijk splice site mutaties, die aanleiding geven tot gemuteerde $\alpha 2(V)$ -ketens die geïncorporeerd worden in de type V collageen moleculen (26).

COL5A2 ‘null’ allel mutaties zijn nog niet geïdentificeerd, wat volgens Symoens et al. te wijten is aan het feit dat deze mutatie niet leidt tot een klinisch fenotype. Mogelijks is het overblijvende *COL5A2* proteïne voldoende om te functioneren en kan het ‘nonsense mediated RNA decay’ en het functioneel verlies van één allel bijgevolg geen fenotype veroorzaken.

Er wordt gesproken van een ‘dominant negatief effect’ als een gemuteerd polypeptide niet alleen zijn functie verliest, maar ook tussenkomt in de productie van het normale allel.

Voornamelijk missense mutaties in het triple helix domein van de the $\alpha 1(V)$ - of $\alpha 2(V)$ -ketens geven hiertoe aanleiding (36).

Aangezien collageen V een belangrijke rol speelt in de fibrillogenese wordt verwacht dat de verminderde beschikbaarheid van type V collageen de interacties met andere ECM bestanddelen negatief beïnvloedt (en zo de ECM organisatie in het algemeen).

Zo observeerde Zoppi et al. dat bij een *COL5A1* C-propeptide mutatie in de ECM de afwijkende proteïnen niet georganiseerd konden worden in fibrillen (37). De wijziging in collageen moleculen veranderde tevens het oplosbaar fibronectine gehalte in de ECM met als gevolg een gedesorganiseerd fibronectine-ECM (37).

Een mutatie in de pro- $\alpha 1(V)$ -ketens geeft aanleiding tot een gewijzigd N-propeptide dat met de normale verwerking van collageen interfereert. Hierbij is het fenotype niet te wijten aan

haploinsufficiëntie aangezien de pro- α 1(V)-ketens efficiënt in de ECM geïncorporeerd worden. De gesecreteerde gemuteerde type V collageen heterotrimeren kunnen tussenkomen in de normale interacties van collageen type V met andere ECM bestanddelen (35).

Zowel mutaties die leiden tot een 'null' allel als structurele mutaties geven aanleiding tot hetzelfde fenotype. Er is dus geen genotype-fenotype correlatie. Dit doet vermoeden dat er een gemeenschappelijke pathway is die leidt tot een afname in beschikbaarheid van normaal, niet gemuteerd collageen type V, ongeacht de aard van de mutatie (26). Zo geeft een 'null' mutatie een verminderde hoeveelheid collageen V, terwijl een structurele mutatie aanleiding geeft tot een verminderde secretie van collageen V waardoor de hoeveelheid collageen V in het totaal is afgenomen. Dit kan mogelijks verklaard worden door de plaats en rol van het collageen in de ECM. Collageen type V is daar in mindere mate aanwezig en speelt voornamelijk een rol in de collageen fibrillogenese (26). Dit wordt gestaafd door het feit dat in de cornea, waar collageen type V voldoende aanwezig is, een mutatie veelal geen problemen geeft, terwijl dit in de dermis dan de typische 'cauliflowers'²¹ geeft (26).

Verhoogde stress van het ER kan tevens een rol spelen.

ER stress²² kan getriggerd worden door ongevouwen of verkeerd gevouwen proteïnes die het gevolg kunnen zijn van de expressie van een mutant proteïne. Cellen van het bindweefsel, zoals fibroblasten, zijn hier zeer gevoelig voor. (38)

Om te verhinderen dat deze proteïnen zich niet opstapelen of gesecreteerd worden wordt het 'UPR' geactiveerd om de homeostase te herstellen. Dit zorgt ervoor dat de proteïne synthese gereduceerd wordt en het verschijnen van nieuw gesynthetiseerd proteïne in het ER lumen verhinderd wordt. (38)

Als het ER lang blootgesteld wordt aan stress kan dit pathologische gevolgen hebben, zoals apoptose. (38)

Hoe haploinsufficiëntie de fibrillogenese verstoort, werd aangetoond door Wenstrup et al. (2). De *COL5A1*^{+/-} muizen vertoonden 2 fibril subpopulaties. Eén bestond uit relatief normale fibrillen met een iets grotere diameter. De andere subpopulatie vertoonde zeer grote structureel afwijkende fibrillen met zeer onregelmatige vormen in doorsnede.

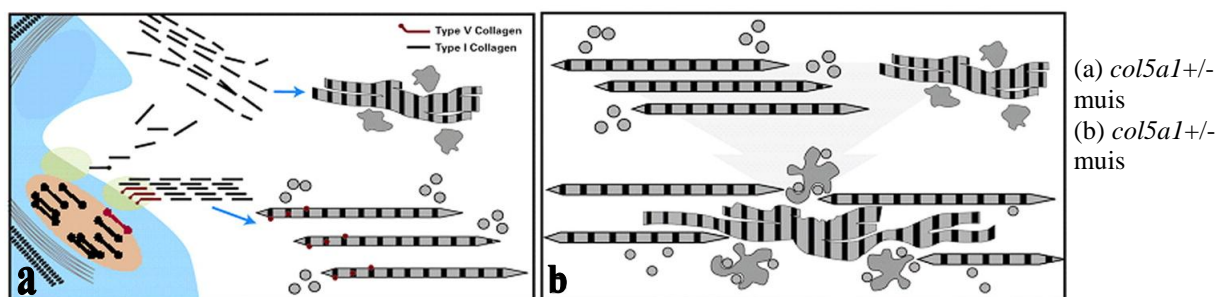
²¹ Bloemkoolachtige vorm

²² De toestand waarbij één van de functies van het ER verstoord wordt, wat zich uit in verstoring van het correct opvouwen van proteïnes en secretie door het ER waardoor de ongevouwen proteïnes zich opstapelen in het ER lumen

Dit wijst erop dat de, door haploinsufficiëntie gehalveerde, hoeveelheid collageen type V ‘snelheidsbeperkend’ geworden is (2).

‘Additive fusion’ gebeurtenissen tussen normale, door type V collageen geïnitieerde, en abnormale fibrillen waar type V collageen lijkt te ontbreken, zorgt voor toename van een afwijkende morfologie van de collageenvezels in de loop van de tijd (2).

Bijgevolg kan elke heterotypische collageen I/V fibril normale fibril tussenvormen omvatten die verstoord worden door interactie met structuren die lijken op de fibril tussenvormen (figuur 10).



Figuur 10 Reductie van type V collageen verstoort de ‘nucleatie’ van groei (a) en samenstellen (b) van collageen fibrillen in *col5a1*^{+/-} muizen (overgenomen van Wenstrup et al. (2)). (a) Collageen type V is beperkt, wat een gereduceerd aantal relatief normale tussenvormen geeft. Bijgevolg vormt overtollig type I collageen morfologisch abnormale aggregaten door middel van niet geregelde self-assembly. Hierdoor ontstaan groepen van zowel normale als abnormale tussenvormen. (b) Interactie van de normale fibril met structureel afwijkende fibril-achtige structuren verstoort de structuur van de matrix verder.

In de cornea, waar collageen type V 5 tot 10 maal het type I collageen in hoeveelheid overtreft, geeft *COL5A1* haploinsufficiëntie geen aanleiding tot abnormale fibrillen. Wenstrup et al. vermoedt dat, aangezien type V collageen in grotere mate aanwezig is, de ‘nucleatie’ normaal kan verlopen en dat de ‘nucleatie sites’ het overtollige type I collageen kunnen opvangen door de fibrillen in diameter te laten doen toenemen, zonder dat zij hierbij onregelmatig worden (2).

In de dermis, waar collageen type V in lagere hoeveelheid aanwezig is, is een toename van de diameter onvoldoende om dit op te vangen, wat erop wijst dat de maximale diameter van een onvolgroeide fibril tussenvorm beperkt is (2).

Defecten in proteïnen die betrokken zijn bij de samenstelling van de ECM kunnen ook in de pathogenese van klassieke EDS betrokken zijn. Zo is er bewijs dat *COL1A1* mutatie tot de ziekte kan leiden (39). Malfait et al. sloot echter uit dat mutaties in de *COL1A1*, *COL1A2*, en

*DCN*²³ genen een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het ontstaan van klassieke EDS, aangezien bij patiënten die negatief testten voor *COL5A1* en *COL5A2* geen causale mutatie in deze genen aangetoond kon worden (28). Hieruit kan besloten worden dat collageen type I mutatie bij klassieke EDS eerder een zeldzaam gebeuren is.

Mutaties in het *TNXB*²⁴ gen levert tevens een fenotype op dat sterke overlap toont met het klassieke type van EDS, maar ook hier is dit niet frequent (40).

Tenascines

Sinds de introductie van de Villefranche criteria is tenascin-X deficiënte EDS ontdekt. Tot op heden is het moeilijk gebleken om deze onder te brengen in één van de Villefranche categorieën en wordt het meestal als een apart type beschouwd. Door de sterke overlap die het vertoont met klassieke EDS wordt het in deze masterproef kort aangehaald.

Tenascines zijn grote en complexe extracellulaire glycoproteïnes met een unieke moleculaire vorm. Tenascin-X is hiervan de grootste en komt in grote hoeveelheden tot expressie in dermis, pees, ligamenten en bindweefsel van dwarsgestreepte spieren (24). Tenascin-X zou als een overbruggende molecule tussen de collageen vezels werken. Het kan indirect binden aan collageen fibrillen via decorine (41).

Schalwijk et al. onderzocht een patiënten populatie die voldeed aan de drie majeure criteria voor EDS en een gelijkaardige kliniek vertoonde aan die van klassieke EDS. Deze patiënten bleken een tenascin-X deficiëntie te hebben (40).

Volledige tenascin-X deficiëntie, ten gevolge van een homozygote *TNXB* mutatie, leidt tot een zeer gelijkaardig fenotype van klassieke EDS, maar atrofische littekens zijn afwezig (42). Vertraagde wondheling komt ook niet frequent voor (40). De overerving is autosomaal recessief (AR) (40).

Partiële tenascin-X deficiëntie, ten gevolge van een heterozygote *TNXB* mutatie, kan zich uiten in het benigne hypermobiliteitssyndroom (42).

Routine diagnostiek is niet beschikbaar. Serumanalyse is mogelijk via ELISA²⁵ (42).

²³ Het gen dat codeert voor decorine

²⁴ Het gen dat codeert voor tenascin-X

²⁵ Enzyme-linked immunosorbent assay, techniek die gebruik maakt van antilichamen en kleurverandering

Minamitani et al. toonde aan dat tenascin-X deficiëntie in fibroblasten de expressie van type VI collageen wijzigt. In *TNX*^{-/-} fibroblasten werd een downregulatie van $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - en $\alpha 3$ mRNA van collageen type VI vastgesteld. De organisatie van type VI collageen in de ECM van *TNX*^{-/-} fibroblasten was echter gelijkaardig aan deze van het 'wild-type'. Hieruit werd afgeleid dat tenascin-X de hoeveelheden van type VI collageen regelt maar diens organisatie in de ECM niet beïnvloedt. (43)

Tevens werd een afname van de hoeveelheid mRNA expressie van type I collageen geconstateerd, alsook van de SLRP's lumican en fibromoduline in *TNX*^{-/-} fibroblasten. De hoeveelheid mRNA expressie van het SLRP decorine daarentegen was toegenomen. Dit suggereert dat tenascin-X deficiëntie leidt tot een verstoring van de collageen fibrillen. (43)

De expressie van type V collageen bij tenascin-X deficiënte patiënten lijkt normaal (40).

Diagnostiek

De diagnose van het klassieke type wordt gesteld op basis van de kliniek, aan de hand van de majeure en mineure Villefranche criteria. De majeure criteria van het klassieke type omvatten hyperelastische huid, atrofische littekens en hypermobiliteit van zowel kleine als grote gewrichten. De mineure criteria zijn onder andere een zachte, fluweelachtige huid, spierhypotonie, verhoogd risico voor contusio's, een positieve familiale voorgeschiedenis, enz. ... Ook distortie en (sub)luxatie, te wijten aan hyperlaxe gewrichten, en pes planus zijn mineure criteria. (25)

Symoens et al. toonde aan dat, indien alle majeure criteria aanwezig zijn, de aanwezigheid van een mutatie van collageen type V met veel betrouwbaarheid kan voorspeld worden (26).

De diagnose wordt bevestigd door middel van moleculaire testen.

Indien de moleculaire testen niets opleveren kan tevens een huidbiopsie uitgevoerd worden. Via elektronenmicroscopie kunnen afwijkende collageen moleculen met een 'cauliflower' vorm hierop vastgesteld worden (44). In het geval van een moeilijke differentiaal diagnose kunnen dermale fibroblasten, gepreleveerd via huidbiopsie, in cultuur gekweekt worden en onderworpen worden aan elektroforese om subtypes van EDS uit te sluiten (36). Type V collageen wordt maar in kleine hoeveelheden door dermale fibroblasten geproduceerd en als gevolg daarvan zijn afwijkingen niet goed detecteerbaar via biochemische analyse (32).

Echter, andere types van EDS kunnen hiermee wel uitgesloten worden.

Tot voor kort werd gestart met een sequentieanalyse van *COL5A1*, aangezien dit gen meestal gemuteerd is. Indien dit niets opleverde werd vervolgens een sequentieanalyse van *COL5A2* verricht. Tegenwoordig worden de sequentieanalyses van *COL5A1* en *COL5A2* terzelfdertijd uitgevoerd. Op de fibroblasten in cultuur kan tevens een *COL5A1* ‘null’ allel test uitgevoerd worden. Deze test identificeert geen *COL5A1* mutaties, maar toont wel aan of het individu op gDNA niveau heterozygoot is voor exon markers van *COL5A1* (36). Indien één *COL5A1* allel afwezig is op cDNA niveau wordt dit beschouwd als een ‘null’ allel (36). Aangezien *COL5A1* en *COL5A2* grote genen zijn en bijkomend de mutaties hierin wijdverspreid en van heterogene aard zijn kan dit de moleculaire analyse bemoeilijken (32).

Een flowchart van de diagnostiek bij het vermoeden van klassieke EDS is terug te vinden in bijlage (schema 1).

4. Onderzoeksvraag

In de vorige passages werd het mineur fibrillaire collageen type V besproken, aan de hand van de biosynthese van het majeur fibrillaire collageen type I. Er werd tevens nagegaan hoe een mutatie in de genen die coderen voor collageen type V kan leiden tot het klassieke type van het Ehlers-Danlos syndroom. Echter, niet bij alle patiënten met klassieke EDS kliniek kan een mutatie in het *COL5* gen aangetoond worden.

Eén van de verklaringen hiervoor kan zijn dat de detectiemethoden niet in staat zijn om alle mutaties in deze genen te detecteren. Zo detecteerde Symoens et al. mutaties bij patiënten waarbij vroeger geen mutaties kon worden vastgesteld. De door hen gebruikte detectiemethode kon evenwel geen mutaties aantonen in de regulatoire regio's, noch diepe intron mutaties, noch grote genomwijzigingen of deleties van volledige genen. Mogelijks bevinden de tot nu toe ongedetecteerde mutaties zich daar.

Aangezien zeldzame gevallen gerapporteerd zijn waarbij klassieke EDS kon verklaard worden door afwijkend collageen type I is het mogelijk dat mutaties in genen die coderen voor andere ECM moleculen bij de pathogenese betrokken zijn.

Symoens et al. constateerde dat collageen type VI één van de bindingspartners van collageen type V is (1). Een defect in collageen type VI kan zich, door zijn interactie met collageen type V, uiten in een gelijkaardig fenotype. De interactie tussen collageen type V en VI is immers belangrijk bij het onderhoud van de ECM organisatie en verstoring van deze interactie kan de

overlap in ultrastructurele abnormaliteiten tussen Ullrich congenitale musculaire dystrofie (UCMD) en EDS verklaren.

Er werd aan de hand van de literatuur nagegaan in hoeverre collageen VI deficiëntie, in kader van Ullrich congenitale musculaire dystrofie/Bethlem myopathie (BM), en collageen V deficiëntie, in kader van klassieke EDS overlap vertonen in klinisch beeld en ultrastructurele eigenschappen. Aangezien tenascine-X deficiëntie grote overlap vertoont met klassieke EDS wordt dit ook besproken.

De oorspronkelijke onderzoeksvraag van deze masterproef was ‘de rol van collageen type V in erfelijke bindweefselaandoeningen’. Deze werd later uitgebreid naar ‘de rol van collageen type V en VI in erfelijke bindweefselaandoeningen’. Vóór het eerste contact met de promotor, dr. Symoens, werd er rond collageen type V informatie opgezocht. Er werd tevens bekeken aan welke erfelijke bindweefselaandoeningen collageen type V mutaties gekoppeld zijn, wat leidde naar het Ehlers-Danlos Syndroom. Dankzij de promotor kon een symposium rond EDS worden bijgewoond. Alzo werd een globaal beeld gevormd over die aandoening. Dr. Symoens wees tevens op het bestaan van het boek ‘Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects’ van Royce P. en Steinmann B. Vervolgens werd er gezocht naar artikels rond collageen type V en EDS (en later bij het uitwerken van de onderzoeksvraag eveneens rond collageen type VI en UCMD). Dit werd gedaan via Pubmed, een systeem dat toelaat Medline, een grote database van biomedische publicaties, te doorzoeken. De gebruikte trefwoorden waren onder andere ‘extracellular matrix’, ‘collagen type V’, ‘classical EDS’, ‘EDS classic type’, ‘collagen type VI’, ‘UCMD’, ‘collagen VI myopathies’, ‘collagen type I biosynthesis’, ‘hereditary connective tissue disease’, ‘COL5A1’, ‘COL5A2’, ‘COL6A1’, ‘COL6A2’, ‘COL6A3’, ‘ER stress’, ‘collagen family’ en ‘tenascin X deficiency’. Deze werden afzonderlijk gebruikt of onderling gecombineerd. Initieel werd er een filter ingevoerd waardoor de artikels die in de voorbije 5 jaar waren gepubliceerd, geselecteerd werden. Dit bleek echter onvoldoende te zijn waardoor ook oudere artikels in de zoekopdracht werden geïncludeerd. De taal werd beperkt tot het Engels. Er werd zowel gezocht op ‘mens’ als op ‘dier’, aangezien dierenmodellen gebruikt worden voor de uitwerking van de pathogenese. Van de hieruit bekomen artikels werd vervolgens het abstract gelezen. Afhankelijk daarvan werd beslist of het artikel bruikbaar was. Het artikel werd dan volledig gelezen. Reviews waren nuttig om een globaal beeld te krijgen over de verschillende onderwerpen, maar er werd voornamelijk gefocust op case reports. Als er een geschikt artikel werd gevonden werd er gekeken naar de referenties en door welke andere artikels het gerefereerd werd. Hiervoor werd gebruik gemaakt van Web of Science, een citatie index, die dit gemakkelijk toeliet. Er werd geen rekening gehouden met de impact factor van de tijdschriften waarin de artikels gepubliceerd werden.

Alvorens de overlap tussen de ziektebeelden kan bekeken worden moet eerst de structuur van collageen type VI besproken worden en diens interactie met collageen type V.

1. Bindingspartners

Symoens et al. onderzocht de bindingspartners van het geconserveerde $\alpha 1(V)$ -N-propeptide domein (1). Van de 12 geïdentificeerde proteïnes konden er 11 bevestigd worden: $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -ketens van collageen type I; $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - en $\alpha 3$ - ketens van collageen type VI; tenascin-C; fibronectine; PCPE-1 (procollagen C-proteinase enhancer-1); TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1); MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) en TGF- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$). De rol van de interactie van het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide bij de interactie tussen collageen types V en VI werd in deze studie voor het eerst aangetoond.

Aangezien het N-acetylgalactosaminyltransferase-7 enzym commercieel niet beschikbaar is, noch recombinant geproduceerd kan worden, kon diens interactie met het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide niet bevestigd worden. (1)

Microfibril vormende collagenen

Biosynthese

Alvorens de interactie tussen collageen types V en VI kan verklaard worden zal dieper ingegaan worden op collageen type VI. De volgende passages handelen over de biosynthese van collageen type VI en het verschil met collageen type I. Vervolgens wordt de interactie met collageen type V besproken.

Collageen type VI

Collageen type VI behoort tot de microfibril vormende collagenen. Het komt voor in praktisch al het bindweefsel en is abundant aanwezig in huid en cornea (14).

COL6A1, *COL6A2*, *COL6A3*, *COL6A4*, *COL6A5* en *COL6A6* coderen respectievelijk voor de $\alpha 1(VI)$ -, $\alpha 2(VI)$ -, $\alpha 3(VI)$ -, $\alpha 4(VI)$ -, $\alpha 5(VI)$ - en $\alpha 6(VI)$ -polypeptideketens van collageen type VI (45). Drie van deze α -ketens vormen samen een collageen type VI monomeer, die gestabiliseerd wordt door disulfidebruggen (figuur 11a) (5).

Een collageen type VI monomeer is opgebouwd uit een relatief korte triple helix van herhalende Gly-X-Y sequenties, met aan weerszijden zeer grote N- en C-terminale

‘globulaire’ domeinen die opgebouwd zijn uit motieven homolog aan de von Willebrand factor type A domeinen. Hierbij is de moleculaire massa van de N-terminus dubbel zo groot als dat van de C-terminus.

De best gekarakteriseerde vorm is het [$\alpha 1(\text{VI}), \alpha 2(\text{VI}), \alpha 3(\text{VI})$] heterotrimeer. (5)

INTRACELLULAIR

Transcriptie en translatie

Bij de mens wordt het *COL6A4* gen niet vertaald, aangezien dit onderbroken is. De expressie van *COL6A5* is beperkt tot enkele weefsels, waaronder de longen, de testes en het colon.

Het *COL6A6* gen komt tot expressie in zowel foetaal als volwassen weefsel (long, nier, lever, milt, thymus, hart- en skeletspier). (45)

Een bijzondere eigenschap van collageen type VI is dat deze zich reeds intracellulair organiseert tot een supramoleculaire structuur.

Supramoleculaire structuur

Eerst associëren twee antiparallel georiënteerde monomeren lateraal tot een dimeer (figuur 11b) (14). Ze worden per 30 nm gestapeld waarbij de C-terminale domeinen interageren met de helicale domeinen. Door deze overlap ontstaat een centraal helicaal domein die geflankeerd wordt door een niet-overlappende regio met de N- en C-‘globulaire’ domeinen. Disulfidebruggen in de buurt van de overlappende regio stabiliseren dit. (5)

Het ‘single’ cysteïne (gelocaliseerd op AZ 89) van de triple helix domeinen in de $\alpha 1(\text{VI})$ of de $\alpha 2(\text{VI})$ collageenketens is verantwoordelijk voor de samenstelling/stabiliteit van de dimeren (46, 47).

In de overlappende helices van twee monomeren ontstaat in de centrale regio een ‘supercoil’.

Vervolgens vormen twee parallelle dimeren, tevens gestabiliseerd door disulfidebruggen, een tetrameer (figuur 11c). Hier zorgt een ‘single’ cysteïne residu (gelocaliseerd op AZ 50) in het triple helix domein $\alpha 3(\text{VI})$ collageenketen ook voor de vorming/stabiliteit van het tetrameer. (14)

Nadien worden de tetrameren gesecreteerd (5).

EXTRACELLULAIR

Supramoleculaire structuur

Eens gesecreteerd in de ECM geven de tetrameren aanleiding tot filamenten met uitzicht van een 'parelsnoer' door 'end-to-end' associatie, via niet-covalente interactie van de 'globulaire' domeinen, ter hoogte van de N-uiteinden (14). Deze filamenten zullen lateraal associëren tot microfibrillen met uitzicht van een 'parelsnoer' (figuur 11d) (5).

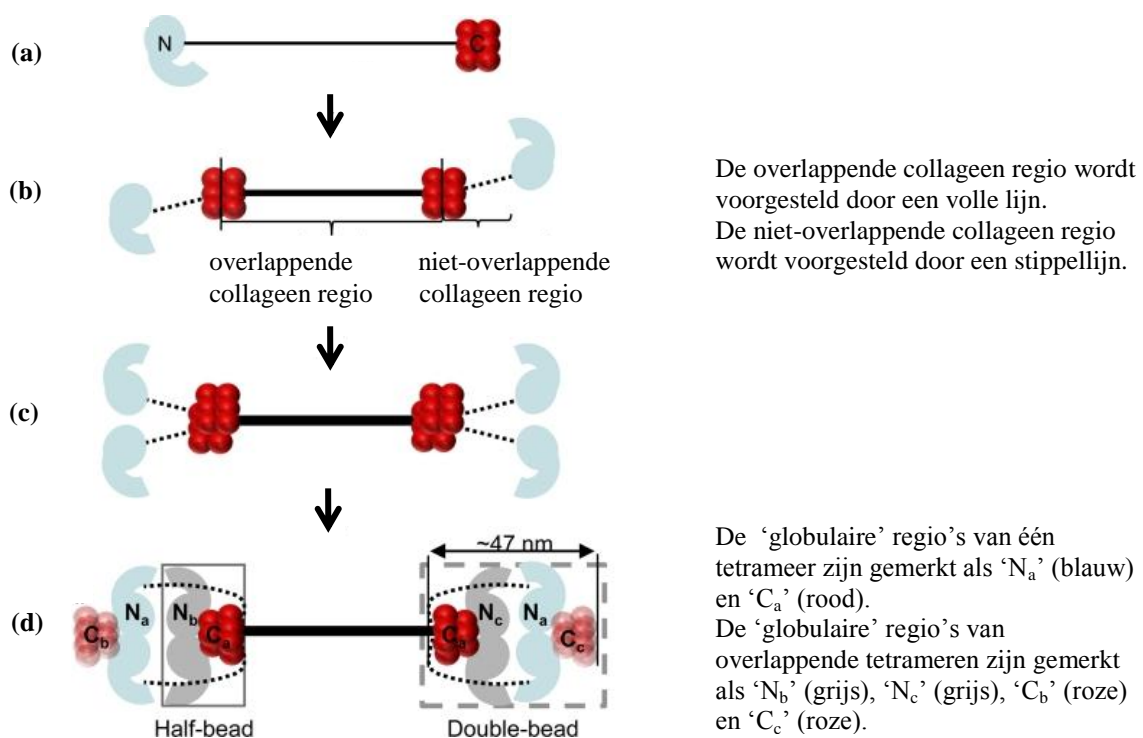
De microfibrillen situeren zich ter hoogte van de lamina reticularis van de basale membraan waar ze interageren met cellen en ook ter hoogte van het endo- en perimysium (48).

Mogelijks draagt collageen type VI bij tot het verankeren van de basale membraan van de spier in de pericellulaire regio (48).

Collageen type VI kan ook nog deel uitmaken van andere supramoleculaire structuren.

In dwarsgestreept spierweefsel zijn collageen type VI moleculen en proteoglycanen niet-covalent gebonden aan beide zijden van collageen type I fibrillen om zo dikkere collageen vezels te vormen (4).

Analoog aan het fibrillaire collageen beïnvloeden SLRP's de structuur van het collageen type VI bevattend weefselaggregaat en zo diens functie (5).



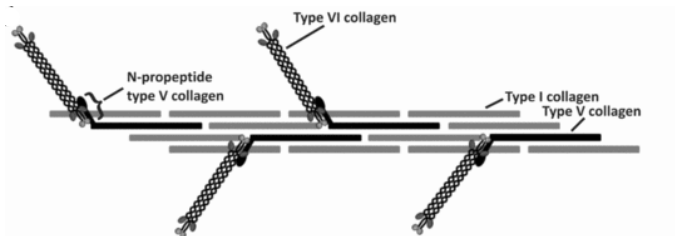
Figuur 11 Samenstelling van collageen type VI (overgenomen van Beecher et al. (49)). (a) de $\alpha 1$, $\alpha 2$, en $\alpha 3$ ketens vormen samen een triple helix monomeer; (b) anti-parallelle overlap van twee monomeren vormt een dimeer; (c) parallelle associatie van twee dimeren vormt een tetrameer; (d) 'end-to-end' interactie van tetrameren vormen microfibrillen.

Interactie met collageen type V

Aangezien het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide het enige collageen type V domein is dat boven het heterotypische fibriloppervlak uitsteekt, zal interactie van collageen type V met de ECM tot dit domein beperkt zijn. Symoens et al. onderzocht de bindingspartners van het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide domein, in kader van de pathogenese van klassieke EDS (1).

De auteurs toonden een directe interactie aan met collageen type VI. De $\alpha 1(VI)$ en $\alpha 3(VI)$ -ketens van collageen type VI interageren via hun 'globulaire' domeinen met het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide van collageen type V (figuur 12).

Vermoedelijk bevinden deze bindingsplaatsen zich binnenin de 'globulaire' domeinen (1). De $\alpha 2(VI)$ -ketens interageren met het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide via hun triple helix.



Figuur 12. Werkmodel interactie collageen type V en VI (overgenomen van Symoens et al. (1)). De triple helix van collageen type V is begraven binnenin collageen type I fibrillen, terwijl diens N-propeptide domein doorheen een opening zijn 'globulaire' domeinen op het oppervlak van de collageen fibril kan plaatsen. Deze 'globulaire' domeinen kunnen dan interageren met collageen type VI.

De studie toonde tevens aan dat collageen type VI na proteolyse met pepsine, de intacte mature vorm van type V collageen bindt. Deze bevinding illustreert de interactie van type VI collageen met de fysiologische vorm van collageen type V. (1)

Dit doet vermoeden dat de interactie tussen collageen type V en VI een brug vormt tussen cellen en matrix. Mogelijks speelt het een belangrijke rol in het behoud van de matrix van de dermis. (1) Dit vermoeden werd bevestigd door Bonod-Bidaud et al. (50).

Bonod-Bidaud et al. bestudeerde de rol van de $\alpha 1(V)_3$ mineure vorm van collageen type V²⁶. Er werd vastgesteld dat het homotrimeer deel uitmaakt van een proteïne netwerk dat collageen type IV, laminine-111 en dermaal collageen type VI bevat. Het homotrimeer draagt als een overbruggende molecule bij tot de epidermis-dermis 'interface'. Deze bevinding doet sterk vermoeden dat collageen type V in de huid tot expressie komt als verschillende subtypes met

²⁶ Hiervoor werden transgene muizen gegeneerd waarbij menselijk pro- $\alpha 1(V)$ tot overexpressie werd gebracht. Zo werd het homotrimeer geproduceerd in cellen waar endogeen pro- $\alpha 2(V)$ normaal niet tot expressie kwam, om te verhinderen dat ze samen een hybride heterotrime molecule zouden vormen. Overexpressie van het $\alpha 1(V)_3$ homotrimeer zorgde voor een toename in de densiteit van de fibrillen, gelegen onder de basale membraan van de epidermis. Dit liet toe de rol *in vivo* van het $\alpha 1(V)_3$ homotrimeer te analyseren.

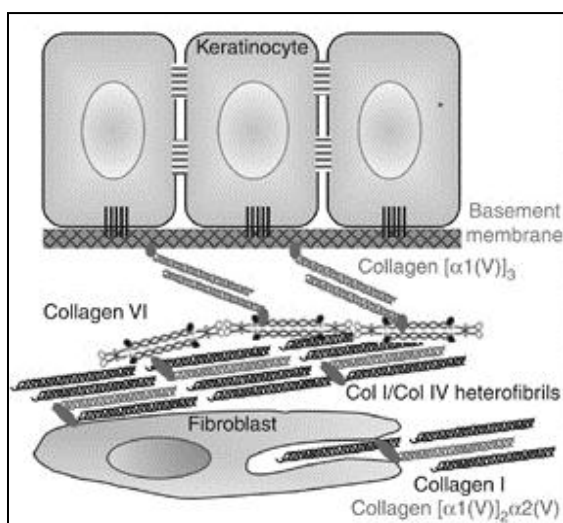
belangrijke, maar duidelijk verschillende functies in de matrixorganisatie en stabiliteit. (50)

Ook directe interacties tussen het collageen type V homotrimeer en componenten van de basale membraan en de dermis werden vastgesteld. Het collageen type V homotrimeer bindt direct aan de collageen IV-bevattende netwerken en collageen type VI filamenten met hun typische parelsnoer vorm en maakt zo deel uit van het structureel netwerk dat de epidermale basale membraan tot de dermale ECM overspant. (50)

Dit bevestigt wat Symoens et al. had bevonden wat betreft de interactie tussen het $\alpha 1(V)$ -N-propeptide en de collageen type VI ketens.

De studie van Bonod-Bidaud et al. toonde aan dat directe interacties onder andere gemedieerd worden door het $\alpha 1(V)$ -N-terminaal recombinant domein. (50)

Het bestaan van een proteïne netwerk met collageen type V homotrimeer fibrillen tussen collageen type IV en laminine-111 enerzijds (ter hoogte van de basale membraan) en collageen type VI anderzijds (ter hoogte van de dermis) is plausibel (figuur 13).



Collageen type V homotrimeer overspant de ruimte tussen collageen type IV en laminine-111 enerzijds en collageen type VI anderzijds.

Figuur 13 Diagram van de organisatie en locatie van de collageen V subtypes (homotrimeer versus heterotrimeer) in de huid (overgenomen van Bonod-Bidaud et al. (50)).

Het ontbreken van één van de elementen van het proteïne netwerk kan de hele structuur destabiliseren en defecten veroorzaken in zowel huid cohesie als functie (50).

Aangezien collageen types V en VI en tenascine-X deel uitmaken van hetzelfde proteïne complex zou dit hun overlap in kliniek bij bindweefselaandoeningen kunnen verklaren. De overlap in klinisch beeld en ultrastructurele eigenschappen die UCMD/BM en EDS klassieke type vertonen wordt meer uitgediept in het onderdeel 'resultaten'.

Mits slechts in 79% van de gevallen een defect van collageen type VI kan aangetoond worden bij UCMD patiënten zou een defect in collageen type V een verklaring kunnen zijn voor de overige gevallen (51). Analooft kan voor klassieke EDS patiënten waarvoor geen defect van type V collageen kan aangetoond worden, mogelijks verklaard worden door afwijkend type VI collageen (1).

2. Congenitale musculaire dystrofie

Congenitale musculaire dystrofie (CMD) is een heterogene groep van overerfbare spieraandoeningen, gekenmerkt door spierzwakte en vervormingen van gewrichten en wervelkolom (52).

CMD wordt ingedeeld volgens het causale gen en het daaruitvolgend dysfunctioneel eiwit (52). Er zijn vier grote groepen: deficiënt structureel proteïne, deficiënte glycosylatie, deficiënte ER proteïnen en deficiënte proteïnen van de kernenvelop. Voor een volledig overzicht zie tabel 5 in bijlage.

Classificatie

In de groep van de deficiënte structurele proteïnen bevindt zich collageen VI deficiënte congenitale musculaire dystrofie, waartoe onder andere Ullrich Congenitale Musculaire Dystrofie (UCMD) en Bethlem Myopathie (BM) behoren. Oorspronkelijk werden deze aandoeningen beschouwd als aparte klinische entiteiten, maar tegenwoordig wordt aanvaard dat ze deel uitmaken van hetzelfde klinische spectrum, waarbij UCMD zich aan het ernstige eind en BM aan het milde eind van het spectrum bevindt. Ook al worden UCMD en BM beschouwd als een continuüm van overlappende fenotypes, deze aparte onderverdeling blijft handig voor het voorspellen van de prognose en het instellen van een beleid. (52)

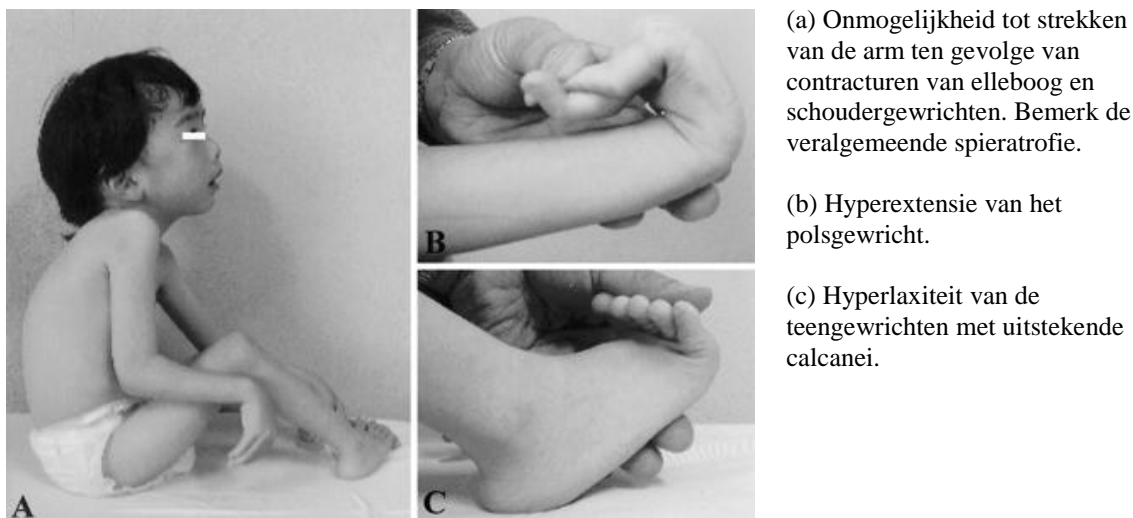
Logischerwijs zou het bespreken van een overlap tussen het fenotype van BM en dat van klassieke EDS meer voor de hand liggend zijn. BM is immers de mildere vorm. Echter, UCMD toont naast contracturen, hypotonie en ongewone huidkenmerken eveneens meer uitgesproken hyperlaxiteit van de distale gewrichten. Dit laatste is belangrijk in de overlap met klassieke EDS. Bijgevolg wordt hier enkel UCMD besproken.

Klinisch beeld

UCMD wordt voornamelijk gekenmerkt door hypotonie op jonge leeftijd, traag progressieve proximale tot veralgemeende spierzwakte, uitgesproken laxiteit van de distale gewrichten

(vingers, polsen en enkels) en contracturen van de proximale gewrichten (figuur 14a). Later ontstaan ook contracturen van de distale gewrichten. De patiënten hebben typisch een rond gezicht, een afhangend onderste ooglid en uitgesproken oren.

Er zijn tevens andere orthopedische afwijkingen zoals kyfoscoliose, torticollis en heupluxatie. Ook vaak aanwezig is een prominente calcaneus (figuur 14c). De ernst van de aandoening varieert. Sommige patiënten kunnen nooit wandelen, terwijl anderen dit initieel wel kunnen doch hun mogelijkheid tot stappen verliezen door progressieve zwakte en contracturen. (48) Ook veralgemeende spieratrofie wordt gezien.



Figuur 14 Kliniek van UCMD (overgenomen van Ishikawa et al. (53)).

Om de motorische functie en de spierzwakte objectief te kunnen evalueren bestaan er enkele testen. Een voorbeeld hiervan is de Hammersmith Functional Motor Scale (HHFMS). De HHFMS test de spierfunctie bij kinderen met neuromusculaire aandoeningen die een beperking hebben bij het stappen. De test laat tevens toe om de progressie van de aandoening na te gaan. (54)

De 10 meter looptest meet de snelheid van het lopen over een afstand van 10 meter. De patiënt moet kunnen stappen zonder hulp van derden. Er mag wel gebruik gemaakt worden van loophulpmiddelen en orthesen. (54)

Een veelgebruikte methode om de spierfunctie te testen is de kwantitatieve myometrie. (54)

Naast de spierfunctie wordt ook de graad van contracturen nagegaan aan de hand van het testen van de passieve amplitude van de gewrichten. (54)

Respiratoire insufficiëntie treedt altijd op in de eerste of tweede levensdecade. Op latere leeftijd leidt dit vaak tot noodzaak van mechanische ventilatie. Ook folliculaire hyperkeratose is aanwezig, wat de huid een ruw aspect geeft. Abnormale wondheling die leidt tot vorming van keloïd of atrofische littekens is minder frequent. (48)

Pathogenese

UCMD wordt zowel door recessieve als *de novo* dominante autosomale mutaties van *COL6A1*, *COL6A2* of *COL6A3* veroorzaakt²⁷ (55). Gelijkaardige mutaties of mutaties in hetzelfde domein van een proteïne leiden niet noodzakelijk tot gelijkaardige ernst van fenotype (56). De variabiliteit van het klinische fenotype kan mogelijks te wijten zijn aan de talrijke polymorfismen (56).

Aan de basis van UCMD liggen twee mechanismen: recessief overerfbare loss-of-function mutaties en heterozygote mutaties die een dominant negatief effect uitoefenen. De dominante mutaties ontstaan meestal *de novo*, maar kunnen autosomaal overerfbaar zijn (57, 58).

In de $\alpha 2(\text{VI})$ -keten komen mutaties in gelijke mate voor in de N-terminale, triple helix en C-terminale domeinen. In de $\alpha 1(\text{VI})$ - en $\alpha 3(\text{VI})$ -ketens bevinden de mutaties zich voornamelijk in de triple helix en de N-terminale domeinen. Mutaties in de C-terminale domeinen zijn zeldzaam. (56)

De recessieve mutaties bevinden zich meestal in het triple helix domein en wijzigen de glycine residu's. De dominante mutaties bevinden zich vaak in de N-terminus, proximaal van het cysteine residu in het triple helix domein.

Recessief

Een groot aantal van de recessieve mutaties resulteert in een prematuur stopcodon (premature termination codon, PTC). Deze PTC's zijn het gevolg van een nonsense mutatie (51, 59) of van een frameshift. Dit leidt ofwel tot verkorting van het proteïne ofwel tot verlies van de gemuteerde keten (en dus afwezigheid van collageen type VI (60, 61)) via 'nonsense mediated mRNA decay' (62). De ouders van deze patiënten, heterozygote dragers van de mutatie, vertonen een reductie van het mRNA van het *COL6A* gen waarin de mutatie zich bevindt, maar op lange termijn zijn de collageen type VI deposities vergelijkbaar met de

²⁷ Voor een volledig overzicht van de *COL6A1*, *COL6A2* en *COL6A3* mutaties zie de 'Leiden Muscular Dystrophy pages' (<http://www.dmd.nl/>).

controle populatie. De bijna volledige afwezigheid van abnormaal proteïne en bijna normale accumulatie van microfibrillen zou ervoor kunnen zorgen dat de ouders van deze patiënten geen myopathische kenmerken vertonen (62).

Ook missense mutaties zijn frequent. (51, 57)

Splice site mutaties kunnen leiden tot out-of-frame exon skipping en zich zo als recessieve ‘null’ mutaties gedragen. Aangezien haploinsufficiëntie voor één van de *COL6* ketens niet tot een klinisch fenotype leidt zijn dragers van deze mutaties niet beduidend aangetast. (53, 61, 63)

Foley et al. beschreef eveneens een nieuw type mutatie: recessief overerfbare grote genoom deleties (64). Grote genoom deleties zijn in recessieve aandoeningen enkel pathogeen indien een pathogene mutatie zich bevindt op het andere allel. Bij UCMD patiënten met ernstig fenotype is deze mutatie allicht een andere loss-of-function mutatie.

Dominant

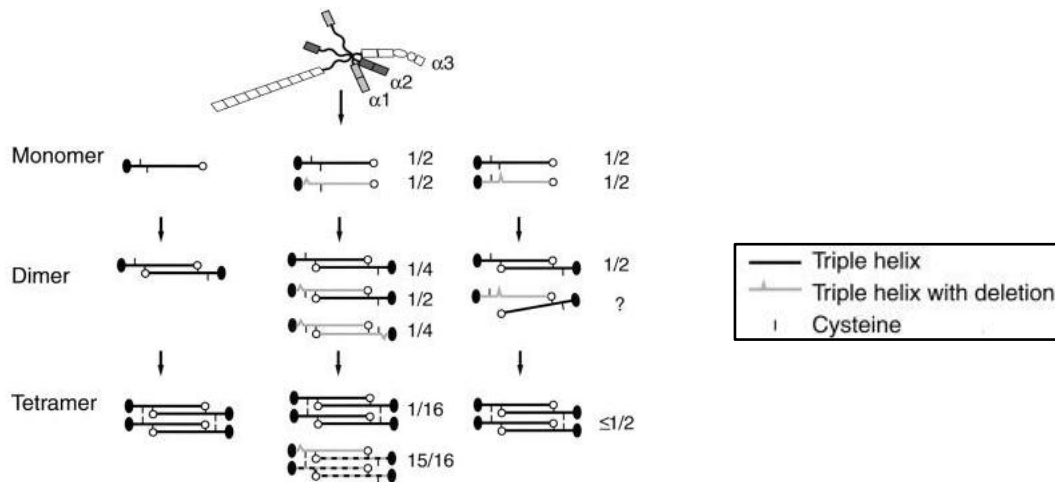
Splice mutaties die leiden tot in-frame exon deleties en in-frame genoom deleties zijn eveneens frequent bij UCMD en oefenen een dominant negatief effect uit op de samenstelling van de microfibrillen (51, 57-59, 65).

Pan et al. beschreef 2 heterozygote in-frame deleties ter hoogte van het N-terminaal deel van de triple helix. Beide mutaties waren dichtbij de N-terminus gelegen, maar de meer ‘downstream’ gelegen mutatie vertoonde een milder fenotype (58).

Ervan uitgaande dat het vouwen van een collageen VI triple helix op analoge wijze gebeurt als de fibrillaire collagenen (nl. als een soort van rits, startend van de C-terminus en verder lopend naar de N-terminus) zullen deleties in het N-terminaal deel dit proces niet verhinderen. De gemuteerde monomeren bevatten kortere triple helix domeinen doordat de deleties in de gemuteerde keten vermoedelijk geacommodeerd worden door de corresponderende regio's van de normale ketens eruit te ‘lopen’. (58)

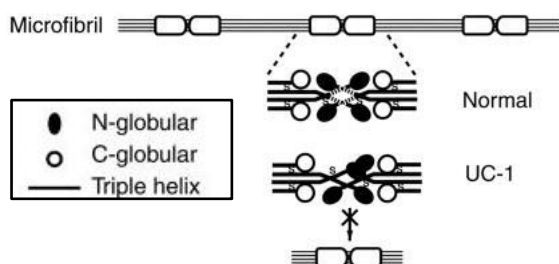
Als de essentiële regio's die betrokken zijn bij de vorming van supramoleculaire structuren in de kortere gemuteerde keten worden behouden kan deze keten geïncorporeerd worden in tetrameren die vervolgens gesecreteerd worden. Deze incorporatie amplificiert de mutatie. Er wordt verwacht dat 3/4 van de dimeren en 15/16 van de tetrameren minstens één gemuteerde

keten bevat. In experimentele setting bleek echter dat bepaalde types van abnormale tetrameren niet gevormd en/of gesecreteerd worden (figuur 15). (58)



Figuur 15 Schematische voorstelling van het intracellulair effect van twee verschillende in-frame deleties op de samenstelling van collageen type VI (overgenomen van Pan et al. (58)). In beide gevallen worden gelijke hoeveelheden van normale en mutante (grijs) $\alpha 1$ (VI) collageenketens geïncorporeerd. Indien de cysteïne residu's (verticale lijnen) behouden zijn (links) ontstaan zowel normale als mutante monomeren in alle mogelijke combinaties. 15/16 van de tetrameren bevatten zowel normale als mutante ketens (grijze stippellijn). Indien cysteïne in de triple helix (in dit geval in de $\alpha 1$ (VI) collageenketen) ontbreekt kunnen abnormale monomeren geen dimeren vormen. Enkel normale tetrameren worden gevormd en gesecreteerd. Indien de cysteïnes ontbreken kan de mutante keten interfereren met de samenstelling van de normale dimeren. Dit kan de vorming en secretie van normale tetrameren halveren, vergeleken met de normale situatie.

Het effect van de deletie wordt verder versterkt bij het vormen van de microfibrillen. De gemuteerde tetrameren met structureel afwijkende N-termini zullen namelijk niet correct aligneren met de naburige tetrameren. Dit verstoort de samenstelling van de collageen VI microfibrillen (figuur 16). (58)



Figuur 16 Schematische voorstelling van het extracellulair effect van een in-frame deletie, met behoud van het cysteïne residu, op de vorming van microfibrillen (overgenomen van Pan et al. (58)). Normaliter worden de gesecreteerde tetrameren geassocieerd 'end-to-end' zodat microfibrillen ontstaan met het uitzicht van een parelsnoer (boven). Microfibrillen komen tot stand door interacties van de N- en C-'globulaire' domeinen en het triple helix domein. De hier afgebeelde deletie bevindt zich dichtbij het N-terminale deel van het triple helix domein (vette stippellijn). Mogelijks is de triple helix in het mutante monomeer verkort omdat de normale $\alpha 2$ (VI) en $\alpha 3$ (VI) collageenketens uit de regio waarin de deletie zich bevindt gelust zijn (onderaan). Hierdoor kunnen gemuteerde tetrameren niet goed aligneren met de normale tetrameren om zo microfibrillen te vormen. Aangezien de meerderheid van de gesecreteerde tetrameren abnormaal zijn kunnen lange microfibrillen niet tot stand komen.

Dit uit zich in een bijna volledige afwezigheid van collageen VI microfibrillen in de fibroblasten en resulteert in een ernstig fenotype, zoals beschreven door Pan et al. Eveneens werd geobserveerd dat deze mutatie leidt tot verlies of foute positionering van collageen VI proteïne in de basale membraan van de spier. (58)

Pan et al. vermoedt dat enkel de samengestelde collageen VI microfibrillen correct verankerd kunnen worden aan de basale membraan. De in de ECM gesecreteerde hoeveelheden gemuteerd collageen VI tetrameren worden niet afgebroken, maar opgestapeld in de interstitiële en perivasculaire ruimte. (58)

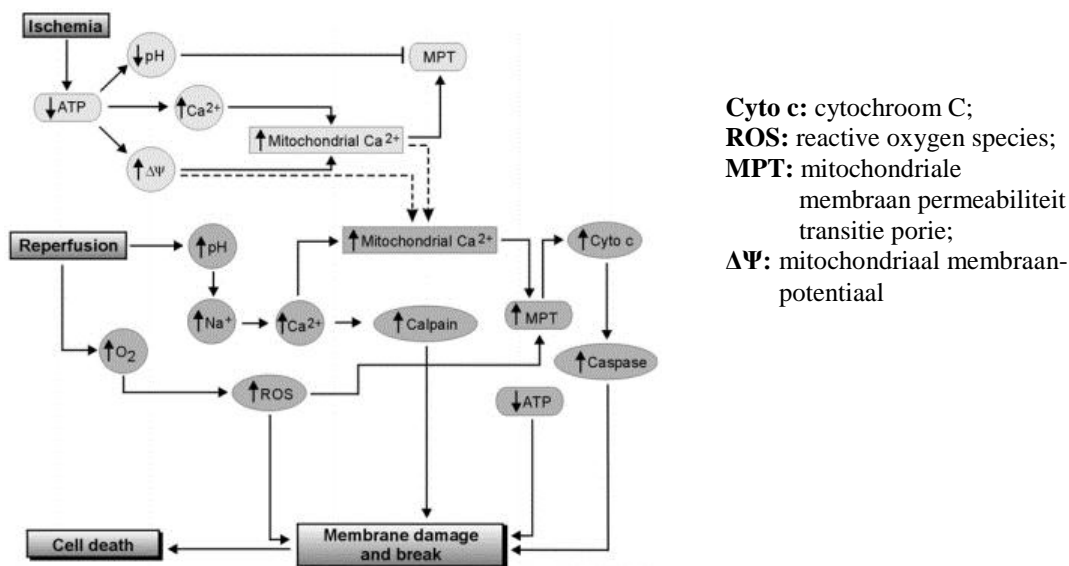
Bij de patiënt met het mildere fenotype beschreven door Pan et al. daarentegen verhinderde de deletie van cysteïne op AZ 89 het samenstellen van een abnormale monomeer tot een dimeer. Enkel normale dimeren en tetrameren werden gevormd. Desondanks bestaat de mogelijkheid dat, door posttranslationele modificatie en de geringe omvang van de deletie, de gemuteerde keten gesecreteerd wordt maar niet kan onderscheiden worden van de normale keten op elektroforese. Daarenboven kan de gemuteerde keten samen met een normale keten intracellulair een partieel samengesteld dimeer vormen (figuur 15). In beide gevallen kan de gemuteerde keten een licht dominant negatief effect uitoefenen. Bijgevolg zou bij een deletie van het cysteïne residu $\leq 50\%$ van de collageen VI microfibrillen samengesteld worden. Bij deze patiënt werd een significante reductie van collageen VI microfibrillen in de fibroblasten en in de basale membraan bij biopsie vastgesteld. Dit doet vermoeden dat de gemuteerde keten een licht dominant negatief effect uitoefent, intra- of extracellulair. (58)

De pathogenese van UCMD is nog niet volledig opgehelderd. Bij UCMD patiënten wordt een afwezigheid van collageen VI microfibrillen ter hoogte van het sarcolemma vastgesteld (53, 65). Dit zou te wijten kunnen zijn aan een verminderde bindingsaffiniteit van mutant collageen type VI voor de ECM van fibroblasten (66). Collageen VI lijkt cruciaal te zijn voor correcte organisatie van fibronectine in de ECM in fibroblasten. Collageen VI speelt een rol in de verankering van de basale membraan aan de rest van de ECM. Zonder deze verankering zou de ECM van de fibroblasten, waar collageen VI een rol speelt in de organisatie (67), een neiging vertonen tot desorganisatie.

Zowel *in vivo* als *in vitro* onderzoek van de skeletspieren van UCMD patiënten toont een toegenomen graad van apoptose (55). In normale aërobe cellen wordt de membraanpotentiaal

van de mitochondriën onderhouden doordat de respiratoire keten²⁸ protonen pompt. De daardoor ontstane H⁺ elektrochemische gradiënt wordt vervolgens gebruikt voor het aandrijven van de ATP synthase.

Vermoedelijk wordt de membraanpotential in spiervezels van *col6a1*^{-/-} muizen en myoblasten van UCMD patiënten op peil gehouden door het mitochondriale ATP synthase (F₁F₀-ATPase) dat in de omgekeerde richting werkt en zo protonen van de matrix naar de intermembranaire ruimte pompt en glycolytisch ATP verbruikt (55, 68). Een tekort aan collageen VI kan een mitochondriale dysfunctie veroorzaken en de openingsduur van de ‘mitochondriaal membraan permeabiliteit transitie porie’ (MPT) verlengen, wat apoptose (figuur 17) bewerkstelligt (55). Dit leidt tot structurele defecten van zowel mitochondriën als sarcoplasmatisch reticulum (SR) (68).



Figuur 17 Celdood bij ischemie/reperfusie (overgenomen van Inserm (69), gebaseerd op Murphy en Steenbergen 2008). Tijdens ischemie wordt ATP verbruikt, o.a. via het omkeren van het F₁F₀ATPase. Deze energie wordt gebruikt om het mitochondriaal membraanpotential (Δψ) te genereren. Afname van ATP resulteert in een pH daling via anaërobe glycolyse. De toename van protonen (H⁺) stimuleert de Na-H uitwisseling, waarna Na⁺ wordt uitgewisseld voor Ca²⁺. Hierdoor neemt het cytosolisch Ca²⁺ toe. De negatieve Δψ zorgt ervoor dat dit Ca²⁺ wordt opgenomen in de mitochondriën. De aanwezigheid van een hoge [Ca²⁺], ROS, een hoge [NADH], alsook depletie van de adenine nucleotiden en verlies van Δψ zijn vereist voor de opening van MPT. Een lage pH, die ontstaat tijdens ischemie, inhibeert MPT. Tijdens de reperfusie normaliseert de intracellulaire pH snel, wat de MPT activeert. Het gereduceerd Δψ zou normaliter de uptake van mitochondriaal Ca²⁺ beperken, maar Δψ wordt hersteld tijdens de reperfusie dankzij de herintroductie van O₂. Het opgenomen O₂ genereert eveneens ROS, wat wordt versterkt door een hoge Δψ. Opening van de MPT veroorzaakt snel Δψ verlies, volledige celdepletie van ATP en mitochondriale zwellen. Uitgebreide mitochondriale zwellen resulteert in een ruptuur van het buitenste mitochondriale membraan en verlies van cytochrom c. Dit kan apoptose induceren, o.a. via caspases. Activatie van deze proteolytische pathways samen met totaal verlies van ATP en ROS gemedieerde schade leidt snel tot verlies van de plasmamembraan integriteit.

²⁸ Het proces van oxidatieve fosforylatie in de mitochondriën waarbij ATP wordt geproduceerd. Dit gebeurt aan de hand van transport van elektronen en protonen langs het mitochondriaal membraan.

De accumulatie van abnormale mitochondriën en SR is te wijten aan een defect in de autofagie, meer bepaald een foutieve formatie van autofagosomen (70). Deze accumulatie gaat gepaard met oxidatieve stress en verhoogde aanmaak van ‘reactive oxygen species’ (ROS) wat bijdraagt tot de apoptose (71).

Deze mitochondriale dysfunctie wordt gezien bij UCMD patiënten, onafhankelijk of ze een primair genetisch defect in *COL6A1* of *COL6A3* tonen en zowel bij homo- als heterozygote mutaties (55). Angelin et al. vermoedt dat naast een afwijking in collageen type VI genotype bijkomstige genetische en/of omgevingsfactoren een rol spelen in de individuele vatbaarheid voor het verloren gaan van spiervezels (55).

Hicks et al. toonde aan dat MPT ontregeling niet specifiek is voor collageen type VI defect (72). Verder onderzoek is vereist.

Diagnostiek

Om het vermoeden van UCMD bij een proband te bevestigen kan, naast evaluatie van de kliniek, het gehalte van het serum creatinekinase²⁹ bepaald worden. Dit kan normaal of licht (tot twee- à driemaal de normaalwaarde) gestegen zijn. Het serum creatinekinase kan normaliseren in de loop van de tijd. Eveneens kunnen enkele bijkomende onderzoeken uitgevoerd worden.

Histopathologisch onderzoek van spierweefsel, bekomen via een spierbiopsie, toont vaak dystrofische kenmerken met degeneratie en regeneratie waarbij het spierweefsel vervangen wordt door vet en fibreus bindweefsel.

MRI is een hulpmiddel bij het vermoeden van collageen VI myopathieën. Het is zeker een meerwaarde bij UCMD patiënten met een normale expressie van collageen type VI ter hoogte van spier en/of huid (73). Mercuri et al. stelde op MRI opnames van UCMD patiënten een typisch patroon vast waarbij de dijspieren meer diffuus betrokken waren en de *M. sartorius*, *M. gracilis* en *M. adductor longus* relatief gespaard werden. In de vastus lateralis was er een concentrisch patroon waarbij de centrale zone relatief gespaard bleef, in tegenstelling tot de perifere rand waar een hoger signaal gedetecteerd werd. De centrale zone van de rectus

²⁹ Maat voor spiernecrose/spierschade

femoris was tevens aangetast. Ook de kuitspieren, met name de M. soleus en de M. gastrocnemius, waren diffuus betrokken terwijl de M. tibialis anterior en/of M. popliteus relatief gespaard bleven. De MRI opnames toonden overlap met BM. (73)

De expressie van collageen type VI kan *in vivo* geanalyseerd worden door middel van immunolabeling van spierweefsel, bekomen via een spierbiopsie. Immunolabeling van het endomysium en de lamina basalis toont een gereduceerd tot afwezig collageen type VI dat normaal kan zijn rond de capillairen (74). Indien de overlap tussen collageen VI en de basale membraan verloren is, wat op gesecreteerd maar dysfunctioneel collageen VI wijst, kan ‘double-labeling’ van de basale membraan aangewend worden (58, 65). Hierbij worden antilichamen gericht tegen collageen IV, laminine γ -1 of perlecan gebruikt voor de lokalisatie van collageen VI in het weefsel.

Een normaal resultaat van labeling sluit een diagnose van UCMD echter niet uit.

Als een spierbiopsie niet mogelijk is, dan kan immunolabeling van dermale fibroblast culturen *in vitro* gereduceerd collageen VI opsporen. Deze *in vitro* analyse is echter arbeidsintensief en niet-kwantitatief en heeft bijgevolg beperkingen voor de diagnostiek (48).

Sequentieanalyse op gDNA niveau toont een mutatie aan in één van de *COL6A* genen, wat een definitieve diagnose en bijkomende informatie over de manier van overerving oplevert. Wegens de grootte van de genen is dit onderzoek echter moeilijk en tijdrovend (48).

Een flowchart van de diagnostiek bij het vermoeden van UCMD is terug te vinden in bijlage (schema 2).

3. Overlap

Voermans et al. bemerkte dat *TNXB* mutaties aanleiding geven tot verminderde expressie van collageen type VI (75). Sommige EDS patiënten met tenascine-X deficiëntie vertonen myopathische kenmerken zoals gezien bij collageen VI myopathieën (zoals BM of UCMD). Bijgevolg wordt niet alleen klassieke EDS ten gevolge van collageen V deficiëntie vergeleken met UCMD, maar wordt ook tenascine-X deficiënte EDS besproken.

Kliniek

Onderstaande tabel (tabel 1) bevat een samenvatting van de reeds besproken kliniek van het klassieke type van EDS, tenascine-X deficiënte EDS en UCMD.

Tabel 1 Samenvatting kliniek klassieke EDS, tenascin-X deficiënte EDS en UCMD.

Locatie	Klassieke EDS	Tenascin-X deficiëntie	UCMD
Pees/skelet	Vergemeende gewrichtshypermobiliteit	Gewrichtshypermobiliteit, distale contracturen	Distale gewrichtshypermobiliteit ³⁰ (metacarpofalangeaal gewricht (MCP), proximaal en distaal interfalangeaal gewricht (PIP, DIP), tenen), heupdislocatie, contracturen (pols, elleboog, enkel), prominente calcaneus, hoog verhemelte, kyphoscoliose, torticollis
Huid	Hyperelasticiteit, verbrede atrofische littekens, zachte fluweelachtige huid, molluscoïde pseudotumoren ³¹ , subcutane sferoïden ³²	Hyperelasticiteit, gladde fluweelachtige huid, minimale atrofische littekens	Minimale atrofische littekens, fluweelachtige huid, striae distentiae vorming, keloïd vorming, folliculaire hyperkeratose
Spier	Hypotonie	Vergemeende spierzwakte, hypotonie	Milde tot ernstige spierzwakte, respiratoir falen, hypotonie
Vasculatuur	Spontane ecchymosen	Spontane ecchymosen	Nvt
Overerving	AD	AR	AD, AR

Voermans et al. onderzocht 20 EDS patiënten, waarvan de ene helft klassieke EDS en de andere helft tenascin-X deficiëntie vertoonde (76). Bij ondervraging bleek het grootste deel van de patiënten last te hebben van spierzwakte. Bijna allen kloegen van myalgie. Ongeveer de helft van de patiënten met klassieke EDS had paresthesieën in armen en/of benen, maar deze symptomen waren slechts bij een minderheid van de tenascin-X deficiënte patiënten aanwezig. Ongeveer de helft van de EDS patiënten gebruikten hulpmiddelen bij het stappen.

Klinisch onderzoek en technische investigaties

Neuromusculair

EDS

Het grootste deel van de EDS patiënten vertoonde bij klinisch onderzoek milde tot matige spierzwakte. Hypotonie werd bij 2/3 vastgesteld. Bij 1/3 was de coördinatie gestoord en bij ongeveer tweederde de sensibiliteit. Hyporeflexie was bij een minderheid van de klassieke EDS patiënten aanwezig, bij ongeveer 2/3 van de tenascin-X deficiënte vorm. (76)

Het creatinekinase was bij geen enkel van de patiënten toegenomen, met uitzondering van 1 patiënt met tenascin-X deficiëntie³³. (76)

³⁰ De hypermobiliteit in PIP en DIP kan naar contracturen evolueren.

³¹ Vlezige laesies ter hoogte van drukpunten

³² Harde cyste-achtige nodules

³³ Bovengrens klassieke EDS is 169U/L; bovengrens tenascin-X deficiënte EDS is 287 U/L

Bij deze patiënten werd ook een elektromyografisch onderzoek (EMG) verricht.

Een routine EMG bestaat enerzijds uit het testen van de zenuwgeleiding (sensibel/motorisch) en uit een naaldonderzoek. De zenuwgeleiding onderzoekt de snelheid waarmee een impuls geleid wordt langs een motorische, sensorische of gemengde zenuw. De actiepotentialen die ontstaan als reactie op een stimulus, de CMAP (compound muscle action potential) bij een motorische zenuw en de CNAP (compound nerve action potential) bij een sensorische of gemengde zenuw, worden gemeten. (77)

De zenuwgeleidingssnelheid was bij een kleine minderheid van de patiënten met klassieke EDS afwijkend en bij een meerderheid van de patiënten met tenascine-X deficiëntie.

Voornamelijk de CMAP was gestoord. (76)

Het naald EMG zegt iets meer over de (patho)fysiologische toestand van de spieren.

Elektrische potentialen worden gemeten na insertie van een naaldelektrode in de spier. Bij kinderen wordt dit vaak slecht verdragen door de pijn. Bij een naald EMG wordt de spontane elektrische activiteit (spier in rust), de configuratie³⁴ van de MUP (=motor unit action potential) (zwakke willekeurige spiercontractie) en het recruteringspatroon³⁵ van de MUP (maximale spiercontractie) nagegaan. (77)

De MUP karakteristieken en het recruteringspatroon bij een willekeurige contractie van het naald EMG worden als volgt gedefinieerd: overwegend myopathisch (smalle, 3-8 ms, polyfasische units met matige-tot-normale recrutering), overwegend neurogeen (grote, > 12 ms, units met slechte-tot-matige recrutering) of gemengd. (76)

De MUP karakteristieken en het recruteringspatroon waren bij bijna alle klassieke EDS patiënten hoofdzakelijk gemengd myopathisch neurogeen. Bij de tenascine-X deficiënte patiënten had ongeveer 2/3 een afwijkend EMG, waarvan de helft gemengd myopathisch-neurogeen was. Een kleine minderheid toonde een overwegend neurogeen en één patiënt van de zeven had een overwegend myopathisch patroon. (76)

Echografie van de spieren toonde een toegenomen intensiteit bij 2/3 van de klassieke EDS en bij 1/3 van de tenascine-X deficiëntie. Ongeveer de helft van de patiënten, van beide vormen, hadden een gereduceerde spierdiameter. (76)

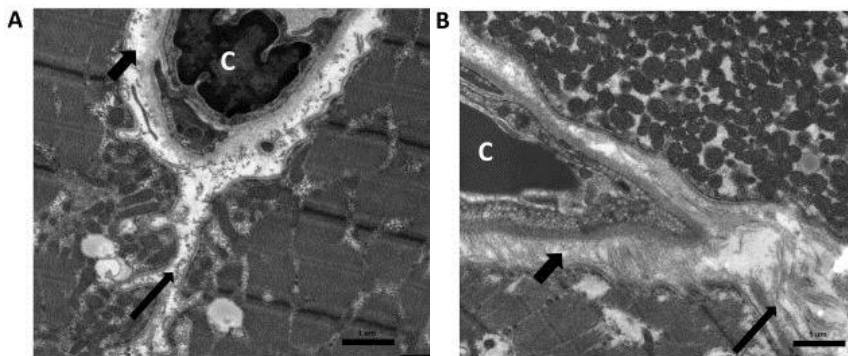
³⁴ Amplitude, duur, aantal fasen

³⁵ Zenuwvezels 'recruteren' motor units om bij te dragen aan de contractie. De amplitude van de motor units is bij een neurologische aandoening groot, maar het aantal is gereduceerd (de zenuw kan geen contact maken met zoveel units). Bij een myopathische aandoening is het aantal dezelfde, maar is de amplitude gereduceerd wegens afname van het aantal functionele cellen binnenin een motor unit.

Een spierbiopsie toonde slechts bij een zeer kleine minderheid milde myopathische kenmerken. Hierbij werd een toegenomen variatie van de vezeldiameter en sporadisch geïsoleerde atrofische vezels waargenomen. Necrotische vezels en tekenen van fibrose waren afwezig. De dichtheid van bindweefsel was relatief laag, maar dit varieerde naargelang de histologische locatie van het biopt (endomysium - tussen individuele spiervezels of tussen spiervezel en capillair - of perimysium ter hoogte van de septa). (76)

Histochemische en enzymhistochemische kleuring toonde geen tekenen van congenitale dystrofie of myopathie. Collageen VI kleurde aan in endomysium en perimysium en het distributiepatroon was niet veranderd. Perivasculaire infiltraties, - fibrose en afwijkende vaatafmetingen waren afwezig. (76)

Elektronenmicroscopie van een biopt van een patiënt met klassieke EDS toonde korte collageen fragmenten ter hoogte van het sarcolemma (figuur 18). (76)



Figuur 18 Elektronenmicroscopie van een biopt van een klassieke EDS patiënt (overgenomen van Voermans et al. (76)). (a) Lagere dichtheid van collageen fibrillen in de ECM tussen spiervezels (lange pijl) en tussen spiervezels en capillairen (korte pijl) in vergelijking met de controle biopsie (b). Collageen fibrillen zijn vaak korter bij de klassieke EDS patiënt. (b) Controle biopsie. (c=capillair, staaf = 1 μ m)

UCMD

Quijano-Roy et al. stelde bij drie UCMD patiënten op 2-jarige leeftijd op EMG myopathische veranderingen vast (in twee of meer spieren), voornamelijk in de proximale spieren (78).

Abnormale spontane activiteit of een gereduceerd recruteringspatroon werden niet vastgesteld. Eén van de patiënten vertoonde geen myopathische tekenen op naald EMG in de neonatale periode. Deze patiënt toonde op latere leeftijd wel myopathische veranderingen.

Twee patiënten toonden randnormale motorische en sensorische zenuwgeleiding. (78)

Het serum creatinekinase bedroeg bij één patiënt het dubbele van de normaalwaarde³⁶. Bij de anderen was dit normaal. (78)

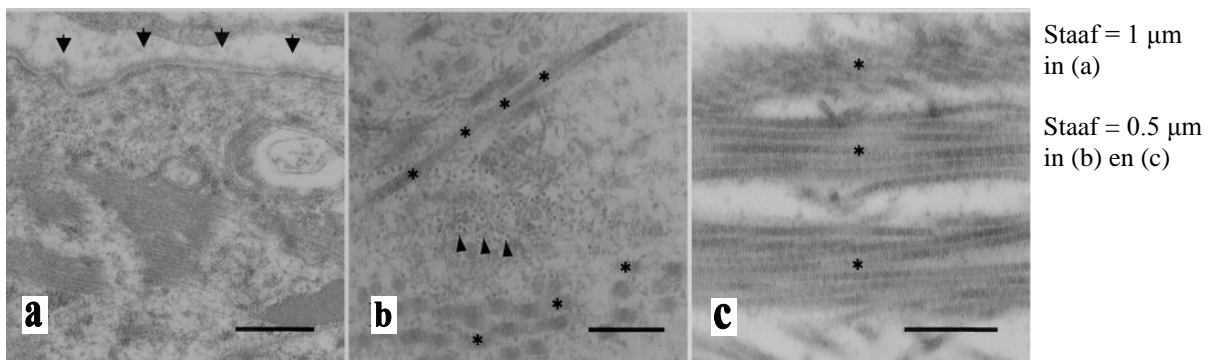
³⁶ Relatief ten opzichte van de bovengrens van de normaalwaarde (200U/L)

Op de spierbiopsie van de patiënt die in de neonatale periode geen myopathische tekenen op naald EMG vertoonde, waren initieel milde niet-specifieke veranderingen (disproportionele vezelgrootte en overheersing van type I vezels³⁷) zichtbaar. Op latere leeftijd kon op de biopsie wel myopathische en dystrofische veranderingen gezien worden. (78)

De aantasting van de skeletspier van UCMD patiënten gaat van mild myopathisch tot volledig dystrofisch. De dystrofische spier toont een toegenomen variatie in vezelgrootte. Zowel necrotische als regenererende vezels zijn zichtbaar. Ook vertoont het biopt prominente endomysiale en perimysiale fibrose en eveneens substitutie door vetweefsel. (78)

Elektronenmicroscopie van een spier toont volledige afwezigheid van microfibrillen, die typisch geassocieerd zijn met collageen fibrillen, maar een intacte lamina basalis (zelfs bij degenererende spiervezels). Collageen fibrillen in het interstitium lijken normaal (53).

Collageen VI is gereduceerd of volledig afwezig in de spier (74).



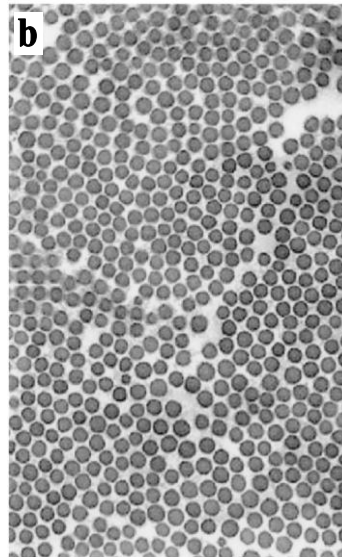
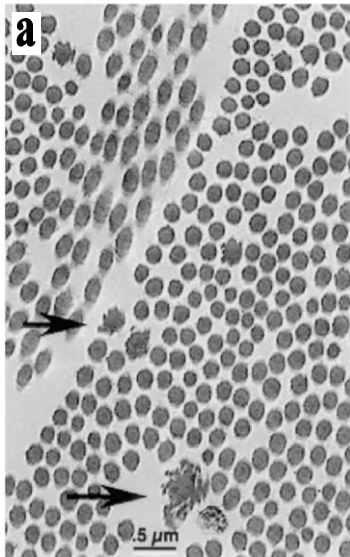
Figuur 19 Elektronenmicroscopie van een spierbiopt van een UCMD patiënt (overgenomen van Ishikawa et al. (53)). (a) De lamina basalis (pijlpunten) is intact, zelfs bij degenererende spiervezels. (b) Fukuyama musculaire dystrofie, als controle biopt. In het interstitium zijn collageen fibrillen van ± 50 nm in diameter (sterren) en periodisch patroon van 65 nm aanwezig, alsook microfibrillen (pijlpunten) doch met veel smallere diameter. (c) Collageen fibrillen zijn aanwezig (sterren) maar geen microfibrillen.

Huid

EDS

Huidbiopsieën van klassieke of hypermobile EDS tonen vaak morfologische abnormaliteiten van collageen fibrillen en de omgevende ECM (44). Een elektronenmicroscop toont karakteristiek ‘cauliflower’ vervorming van de collageen fibrillen (figuur 20). Deze ultrastructurele veranderingen zijn het meest uitgesproken in de centrale delen van de reticulair dermis en kunnen over het hoofd gezien worden als de biopsie niet over de volledige dikte van de huid gebeurt (79). Biopsie bij een controle populatie en andere EDS types kunnen ook ‘cauliflowers’ vertonen, maar in minder grote mate dan klassieke EDS.

³⁷ Er zijn 3 spiervezeltypes (I, IIa en IIx). Type I wordt o.a. gekenmerkt door een hoge mitochondriën densiteit.



De fibrillen van de patiënt met EDS klassieke type (a) zijn groter en meer onregelmatig vergeleken met de controle (b).

Ook zijn er 'cauliflower'-achtige fibrillen (pijlen) aanwezig.

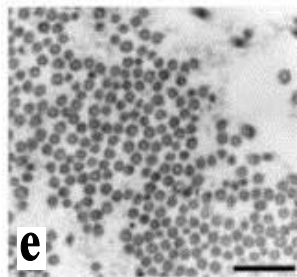
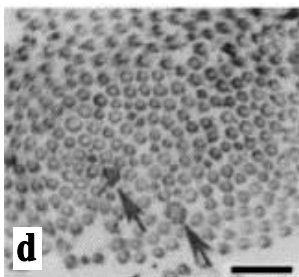
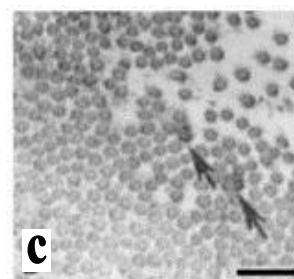
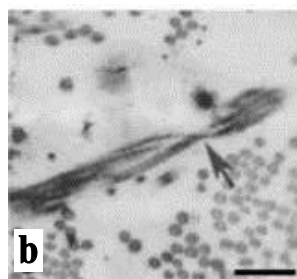
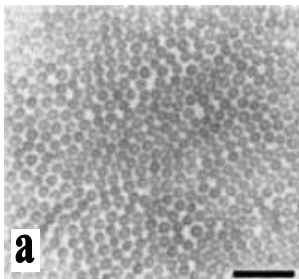
Op doorsnede hebben normale collageen fibrillen een ronde vorm.

Figuur 20 Elektronenmicroscopie van een huidbiopt van een klassieke EDS patiënt met *COL5A1* 'null' mutatie (overgenomen van Schwarze et al. (29)).

Tenascin-X deficiënte collageen fibrillen zijn niet onregelmatig, maar hebben wel een kleinere diameter dan normaal en zijn minder talrijk in de dermis. De 'cauliflower'-achtige collageen fibrillen die typisch zijn voor klassieke EDS ontbreken in de dermis. (24, 80)

UCMD

Om na te gaan of collageen VI deficiëntie de vorming van de ECM zou beïnvloeden (wat de EDS-achtige aspecten van het fenotype zou kunnen verklaren) onderzocht Kirschner et al. huidbiopsieën van UCMD patiënten op ultrastructurele wijzigingen (81).



Staaft = 0,5 μm

Figuur 21 Elektronenmicroscopie van huidbiopt van UCMD patiënten (overgenomen van Kirschner et al. (81)). (a) Controle biopt met uniforme fibrilgrootte en vorm. (b) UCMD patiënt met gedraaide vezels (pijl) en onregelmatige dwarsdoorsneden van collageen fibrillen. (c,d) UCMD patiënten met onregelmatige en vergrote 'cauliflower'-achtige doorsneden (pijlen). (e) UCMD patiënt toont los gestapelde en eerder smalle fibrillen.

Collageen is één van de bouwstenen van de ECM. Het is een glycoproteïne met een COL domein dat opgebouwd is door een herhalende (Glycine-X-Y)_n sequentie. Er bestaan 28 verschillende types collageen. Collageen type V komt voor in alle niet-kraakbenige weefsels. Mutaties in de genen die coderen voor collageen type V, *COL5A1* en *COL5A2*, veroorzaken het klassieke type van het Ehlers-Danlos Syndroom. EDS is een heterogene groep van erfelijke bindweefselaandoeningen, gekenmerkt door hyperelasticiteit van de huid, hypermobilititeit van de gewrichten en kwetsbaarheid van huid, ligamenten, gewrichten, bloedvaten en inwendige organen. Niet bij alle klassieke EDS patiënten kan een mutatie in het collageen type V vastgesteld worden. Mogelijks zijn mutaties van de bindingspartners van collageen V in de ECM moleculen hiervoor verantwoordelijk. Aangezien collageen type V en VI deel tot eenzelfde proteïne netwerk behoren zouden door hun interactie aandoeningen ten gevolge van collageen type V afwijking overlap kunnen vertonen met aandoeningen ten gevolge van collageen type VI afwijking. Er werd nagegaan in hoeverre collageen VI deficiëntie, wat zich kan uiten in Ullrich Congenitale Musculaire Dystrofie of Bethlem Myopathie, overlap vertoont met klassieke EDS. Daarom werd de oorspronkelijke onderzoeksvraag van deze masterproef ('de rol van collageen type V in erfelijke bindweefselaandoeningen') vervangen door 'de rol van collageen types V en VI in erfelijke bindweefselaandoeningen'.

Deze thesis probeerde te antwoorden op de volgende vragen:

1. Is er overlap tussen klassieke EDS, tenascin-X deficiënte EDS en UCMD?
 - a. neuromusculair/skeletaal
 - b. dermaal
2. Wat is de implicatie van deze bevindingen?

Is er overlap tussen klassieke EDS, tenascin-X deficiënte EDS en UCMD?

Neuromusculaire/skeletaal

Er is beperkte overlap in de kliniek tussen beide aandoeningen. Zowel klassieke EDS, tenascin X deficiënte EDS, als UCMD vertonen gewrichtshypermobilititeit. Er is echter een duidelijk verschil tussen klassieke EDS, waarbij de hypermobilititeit veralgemeend is, en UCMD, waar de hypermobilititeit zich beperkt tot de distale gewrichten.

Patiënten met klassieke EDS en tenascine-X deficiëntie vertonen een verminderde sensibiliteit, spierkracht en een milde beperking in het functioneren. Bij een UCMD patiënt is er matige tot ernstige spierzwakte, alsook milde tot ernstige beperking in het functioneren. Hypotonie is meer uitgesproken bij de tenascine-X deficiëntie dan de klassieke EDS, doch het meest uitgesproken bij UCMD. Ook worden bij UCMD distale contracturen en afwijkingen in het skelet, zoals kyphoscoliose en torticollis gezien. Distale contracturen worden ook bij tenascine-X deficiëntie gezien. Respiratoire insufficiëntie is frequent bij UCMD.

Een EMG laat toe te bepalen of spierzwakte te wijten is aan een aantasting op zenuw- of op spierniveau. De zenuwgeleidingssnelheid is voornamelijk bij tenascine-X deficiëntie vertraagd en bij een minderheid van de klassieke EDS patiënten. Zowel klassieke EDS als tenascine-X deficiënte EDS vertonen op naald EMG hoofdzakelijk een gemengd myopathisch-neurogeen patroon (aantasting van zowel spier als zenuwen). Bij UCMD patiënten is de zenuwgeleidingssnelheid randnormaal. Naald EMG vertoont een myopathisch patroon (afwijking op spierniveau).

Op echo is er een milde toename in intensiteit bij het merendeel van klassieke EDS patiënten en een minderheid bij tenascine-X deficiëntie. Dit zou kunnen wijzen op een toename van vet- en fibreusweefsel in de spier. De helft van de patiënten heeft een gereduceerde spierdiameter, wat wijst op spieratrofie. Bij UCMD patiënten wordt MRI verricht. Op MRI is vetinfiltratie zichtbaar met bepaalde patronen intramusculair. De dijspieren zijn diffuus aangetast en de anteromediale spieren relatief gespaard. Ook de kuitspieren zijn diffuus aangetast.

Spierbiopsie toont milde myopathische veranderingen bij een klein deel van de patiënten met klassieke EDS en tenascine-X deficiëntie. Collageen VI is aanwezig in endo- en perimysium in een ongewijzigd distributiepatroon. EM toont korte collageen fragmenten ter hoogte van het sarcolemma. Bij UCMD worden milde tot volledig dystrofische en myopathische veranderingen aangetroffen. De dystrofische spier toont een toegenomen variatie in vezelgrootte. Er zijn necrotische en regenererende vezels aanwezig. Endomysiale en perimysiale fibrose zijn prominent aanwezig, alsook substitutie door vetweefsel. Collageen VI is afwezig, alsook de microfibrillen. Collageen fibrillen in het interstitium lijken normaal. De lamina basalis is intact.

Het serum creatinekinase is slechts bij een minderheid verhoogd bij tenascin-X deficiëntie. Bij UCMD is het serum creatinekinase normaal tot licht verhoogd, wat wijst op spierschade.

Dermaal

Er is beperkte overlap tussen de aandoeningen. Bij alle drie de aandoeningen is er een hyperelastische huid, atrofische littekens (met uitzondering van tenascin-X deficiëntie) en een fluweelachtige huid. De huidaandoeningen zijn meer uitgesproken bij klassieke EDS. Hier worden eveneens molluscoïde pseudotumoren en subcutane sferoïden teruggevonden die niet bij tenascin-X deficiënte EDS of UCMD gezien worden.

Omgekeerd kenmerkt UCMD zich door striae distentiae, keloïd vorming en folliculaire hyperkeratose, die niet bij klassieke EDS worden teruggevonden.

Spontane ecchymosen worden enkel bij klassieke EDS en tenascin-X deficiëntie gezien.

De huid van de klassieke EDS patiënt toont grotere en onregelmatigere collageen fibrillen op elektronenmicroscopie. Eveneens worden collageen fibrillen met 'cauliflower' vorm gezien. De collageebundels kunnen los gestapeld zijn. Bij tenascin-X deficiëntie zijn de fibrillen kleiner dan normaal en zijn er geen 'cauliflowers'. De dichtheid is al dan niet gereduceerd. Bij UCMD zijn de collageen fibrillen van relatief normaal kaliber, soms iets smaller. Er is toename in variabiliteit of asymmetrie. Eveneens hebben bij UCMD de collageen fibrillen een 'cauliflower' of onregelmatige vorm op doorsnede.

Wat is de implicatie van deze bevindingen?

De bevindingen van Voermans et al. doen vermoeden dat de ECM van spieren en perifere zenuwen een rol spelen in de pathofysiologie van klassieke EDS en tenascin-X deficiëntie. Dit staat haaks op de algemene opvatting dat spierzwakte en vermoeidheid het gevolg zouden zijn van het ontwijken van inspanning wegens angst voor luxaties enz., ... Een mogelijke verklaring voor het feit dat de zenuwen bij tenascin-X deficiënte EDS meer zijn aangetast kan zijn dat tenascin-X wijdverspreid is in de ECM van perifere zenuwen en spieren, terwijl collageen type V maar een klein deel uitmaakt van de ECM van de perifere zenuw. (76)

Afname van dichtheid van collageen fibrillen in de ECM van spierweefsel op EM heeft een veranderde ECM samenstelling tot gevolg. Dit kan de spierfunctie beïnvloeden door wijziging van de myofasciale krachttransmissie. Naast krachttransmissie van spier op pees kan kracht overgedragen worden via spiervezels op het bindweefsel binnenin en tussen aanliggend

spierweefsel. Dit kan verklaren waarom de spierkracht gereduceerd is bij EDS, terwijl de spierhistologie slechts milde afwijkingen vertoont en de creatinekinase concentratie niet is toegenomen. (76)

Er dient vermeld te worden dat er geen consensus is omtrent de reductie van de collageen densiteit (24, 80) bij tenascin-X deficiëntie. Dit is mogelijk te wijten aan een niet-homogene patiënten populatie.

Aangezien *TNX*^{-/-} fibroblasten collageen VI $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - en $\alpha 3$ mRNA downreguleert kan een andere verklaring voor discrepantie tussen kliniek en resultaten van onderzoek zijn dat spierzwakte tot stand komt door mitochondriale dysfunctie, analoog aan de pathogenese van UCMD (43).

De bevindingen bij patiënten met collageen VI deficiëntie suggereren dat een afwijking in collageen type VI een effect heeft op de collageen type I fibrillogenese.

Volgens Kirschner et al. heeft het hebben van karakteristieken die zowel horen bij een myopathie als bij een bindweefselaandoening belangrijke implicaties voor de praktijk. Tijdens de eerste levensjaren kunnen patiënten met collageen VI-gerelateerde aandoeningen zich presenteren met uitgesproken gewrichtshypermobiliteit of afwezige contracturen en slechts milde spierzwakte. Vice versa kan hypotonie een klinische uiting zijn van EDS. (81)

Twee studies hebben aangetoond dat collageen V en VI interageren. Dit uit zich in een overlap in kliniek. (1, 50)

Bij 10% van de patiënten met klassieke EDS is nog geen oorzakelijke mutatie vastgesteld. Hier zijn twee verklaringen mogelijk.

Deze gevallen zijn te wijten aan tot op heden ongedetecteerde collageen V mutaties. De detectiemethoden zijn er de laatste jaren enorm op vooruit gegaan. Zo kon in 2005 bij 50% van de klassieke EDS patiënten een afwijking in collageen V vastgesteld worden (28), terwijl dit aantal in 2012 ruim 90% bedroeg (26). Toch blijft 10% ongedetecteerd.

De oorzaak kan eveneens liggen bij één van de bindingspartners van collageen type V, het collageen type VI. Wegens de overlap tussen klassieke EDS en UCMD is dit plausibel.

Indien collageen VI mutaties aan de grond liggen van de onverklaarde klassieke EDS gevallen zullen er allicht enkel milde afwijkingen van collageen VI zijn. Bij ernstige collageen VI afwijking zou bij de EDS patiënt spieraantasting meer op de voorgrond staan (cfr. UCMD).

Conclusie

Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de overige 10% van de klassieke EDS patiënten met ongedetecteerde mutaties het gevolg is van collageen V mutatie of er gezocht moet worden in de richting van collageen VI of andere ECM moleculen.

Tabel 2 Samenvatting kenmerken UCMD, klassieke en tenascine-X deficiënte EDS (gebaseerd op tabel van Voermans et al. (76)).

	UCMD	Klassieke EDS	Tenascine-X deficiënte EDS
Neuromusculair			
Klinisch onderzoek:			
Sensibiliteit	Nvt	Mild gestoord	Mild gestoord
Spierkracht	Matig tot ernstig verminderd	Matig verminderd	Matig verminderd
Functioneren	Matig tot ernstig beperkt	Matig beperkt	Matig beperkt
Zenuwgeleidingssnelheid:			
CMAP	Randnormaal	Afwijkend bij minderheid	Afwijkend bij meerderheid
CNAP	Randnormaal	Afwijking	Afwijking (>>)
Naald EMG:			
MUAP & recruteringspatroon	Myopathisch	Myopathisch (<<), Gemengd myopathisch-neurogeen (>>)	Myopathisch (<), neurogeen (<) Gemengd myopathisch-neurogeen (>>)
Beeldvorming spier	Diffuse betrokkenheid dij- en kuitspieren, concentrisch patroon vastus lateralis met hoger signaal perifeer op MRI	Milde toename intensiteit op echo	Milde toename intensiteit op echo
Spierbiopsie	Myopathische veranderingen: mild tot volledig dystrofisch	Myopathische veranderingen: mild bij deel van de patiënten	Myopathische veranderingen: mild bij deel van de patiënten
Laboratoriumtesten:			
Serum creatinekinase	Normaal tot licht verhoogd	Normaal	Verhoogd bij kleine minderheid
Dermaal			
Huidbiopsie:			
Grootte collageen fibril	Relatief normaal of smal kaliber met toename in variabiliteit of asymmetrisch met vele kleine vezels	Groter	Kleiner dan normaal
Vorm collageen fibril	‘Cauliflower’-achtig op doorsnede (niet altijd) of onregelmatig	‘Cauliflower’, meer onregelmatig	Geen ‘cauliflower’, niet onregelmatig
‘Packing’ collageenbundels	Normaal compact of los gestapeld	Verstoorde organisatie, afname fibril aantal per mm ² (verminderde densiteit)	(Niet) gereduceerd ³⁸

³⁸ Homogene populatie

1. Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, et al. Identification of binding partners interacting with the alpha1-N-propeptide of type V collagen. *The Biochemical journal*. 2011;433(2):371-81.
2. Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, et al. Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(18):12888-95.
3. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron (Oxford, England : 1993)*. 2001;32(3):223-37.
4. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. Integrating cells into tissues. *Molecular cell biology*. 6 ed: W. H. Freeman and Company; 2007. p. 801-46.
5. Birk D, Brückner P. Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. In: Mecham RP, editor. *The Extracellular Matrix: an Overview. Biology of Extracellular Matrix*: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 77-115.
6. Engel J, Chiquet M. An Overview of Extracellular Matrix Structure and Function. In: Mecham RP, editor. *The Extracellular Matrix: an Overview. Biology of Extracellular Matrix*: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 1-39.
7. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *The Human Genome: Gene Structure and Function*. Thompson & Thompson Genetics In Medicine. 7 ed: Saunders Elsevier; 2007. p. 25-39.
8. van Dijk FS, Cobben JM, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR, Pals G. [Osteogenesis imperfecta: clinical and genetic heterogeneity]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2012;156(21):A4585.
9. Ishikawa Y, Bachinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(11):2479-91.
10. Makareeva E, Leikin S. Procollagen triple helix assembly: an unconventional chaperone-assisted folding paradigm. *PloS one*. 2007;2(10):e1029.
11. Sauk JJ, Nikitakis N, Siavash H. Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:107-18.
12. Greenspan D. Biosynthetic Processing of Collagen Molecules. In: Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK, editors. *Collagen. Topics in Current Chemistry*. 247: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 149-83.
13. Boudko SP, Engel J, Bachinger HP. The crucial role of trimerization domains in collagen folding. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(1):21-32.
14. Kielty CM, Grant ME. *The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. Connective Tissue and Its Heritable Disorders*: John Wiley & Sons, Inc.; 2003. p. 159-221.
15. Maki JM. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histology and histopathology*. 2009;24(5):651-60.
16. Maruhashi T, Kii I, Saito M, Kudo A. Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(17):13294-303.
17. McLaughlin JS, Linsenmayer TF, Birk DE. Type V collagen synthesis and deposition by chicken embryo corneal fibroblasts in vitro. *Journal of cell science*. 1989;94 (Pt 2):371-9.
18. Weil D, Bernard M, Gargano S, Ramirez F. The pro alpha 2(V) collagen gene is evolutionarily related to the major fibrillar-forming collagens. *Nucleic acids research*. 1987;15(1):181-98.
19. Imamura Y, Scott IC, Greenspan DS. The pro-alpha3(V) collagen chain. Complete primary structure, expression domains in adult and developing tissues, and comparison to the structures and expression domains of the other types V and XI procollagen chains. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(12):8749-59.
20. Gopalakrishnan B, Wang WM, Greenspan DS. Biosynthetic processing of the Pro-alpha1(V)Pro-alpha2(V)Pro-alpha3(V) procollagen heterotrimer. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(29):30904-12.
21. Unsold C, Pappano WN, Imamura Y, Steiglitiz BM, Greenspan DS. Biosynthetic processing of the pro-alpha 1(V)2pro-alpha 2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):5596-602.
22. Sun M, Chen S, Adams SM, Florer JB, Liu H, Kao WW, et al. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 23):4096-105.
23. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *Journal of cell science*. 1990;95 (Pt 4):649-57.
24. Steinmann B, Royce PM, Superti-Furga A. *The Ehlers-Danlos Syndrome. Connective Tissue and Its Heritable Disorders*: John Wiley & Sons, Inc.; 2003. p. 431-523.
25. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *American journal of medical genetics*. 1998;77(1):31-7.

26. Symoens S, Syx D, Malfait F, Callewaert B, De Backer J, Vanakker O, et al. Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Human mutation*. 2012;33(10):1485-93.
27. Bulbena A, Duro JC, Porta M, Faus S, Vallescar R, Martin-Santos R. Clinical assessment of hypermobility of joints: assembling criteria. *The Journal of rheumatology*. 1992;19(1):115-22.
28. Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, De Paepe A. The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Human mutation*. 2005;25(1):28-37.
29. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *American journal of human genetics*. 2000;66(6):1757-65.
30. Mitchell AL, Schwarze U, Jennings JF, Byers PH. Molecular mechanisms of classical Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *Human mutation*. 2009;30(6):995-1002.
31. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, et al. COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *American journal of human genetics*. 2000;66(6):1766-76.
32. Symoens S, Malfait F, Renard M, Andre J, Hausser I, Loeys B, et al. COL5A1 signal peptide mutations interfere with protein secretion and cause classic Ehlers-Danlos syndrome. *Human mutation*. 2009;30(2):E395-403.
33. De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert JM. Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *American journal of human genetics*. 1997;60(3):547-54.
34. Giunta C, Nuytinck L, Raghunath M, Hausser I, De Paepe A, Steinmann B. Homozygous Gly530Ser substitution in COL5A1 causes mild classical Ehlers-Danlos syndrome. *American journal of medical genetics*. 2002;109(4):284-90.
35. Takahara K, Schwarze U, Imamura Y, Hoffman GG, Toriello H, Smith LT, et al. Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *American journal of human genetics*. 2002;71(3):451-65.
36. Malfait F, Wenstrup R, De Paepe A. Ehlers-Danlos Syndrome, Classic Type [Internet]. University of Washington, Seattle; [updated 2011 Aug 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1244/#eds.REF.malfait.2005.28>.
37. Zoppi N, Gardella R, De Paepe A, Barlati S, Colombi M. Human fibroblasts with mutations in COL5A1 and COL3A1 genes do not organize collagens and fibronectin in the extracellular matrix, down-regulate alpha2beta1 integrin, and recruit alphavbeta3 Instead of alpha5beta1 integrin. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(18):18157-68.
38. Boot-Handford RP, Briggs MD. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. *Cell and tissue research*. 2010;339(1):197-211.
39. Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *American journal of human genetics*. 2000;66(4):1398-402.
40. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med*. 2001;345(16):1167-75.
41. Veit G, Hansen U, Keene DR, Bruckner P, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M, et al. Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(37):27461-70.
42. O'Connell M, Burrows NP, van Vlijmen-Willems MJ, Clark SM, Schalkwijk J. Tenascin-X deficiency and Ehlers-Danlos syndrome: a case report and review of the literature. *The British journal of dermatology*. 2010;163(6):1340-5.
43. Minamitani T, Ariga H, Matsumoto K. Deficiency of tenascin-X causes a decrease in the level of expression of type VI collagen. *Experimental cell research*. 2004;297(1):49-60.
44. Hausser I, Anton-Lamprecht I. Differential ultrastructural aberrations of collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome types I-IV as a means of diagnostics and classification. *Human genetics*. 1994;93(4):394-407.
45. Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH, Hansen U. Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(29):20170-80.
46. Furthmayr H, Wiedemann H, Timpl R, Odermatt E, Engel J. Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. *The Biochemical journal*. 1983;211(2):303-11.
47. Chu ML, Conway D, Pan TC, Baldwin C, Mann K, Deutzmann R, et al. Amino acid sequence of the triple-helical domain of human collagen type VI. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(35):18601-6.
48. Jimenez-Mallebrera C, Maioli MA, Kim J, Brown SC, Feng L, Lampe AK, et al. A comparative analysis of collagen VI production in muscle, skin and fibroblasts from 14 Ullrich congenital muscular

- dystrophy patients with dominant and recessive COL6A mutations. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2006;16(9-10):571-82.
49. Beecher N, Roseman AM, Jowitt TA, Berry R, Troilo H, Kammerer RA, et al. Collagen VI, conformation of A-domain arrays and microfibril architecture. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(46):40266-75.
 50. Bonod-Bidaud C, Roulet M, Hansen U, Elsheikh A, Malbouyres M, Ricard-Blum S, et al. In vivo evidence for a bridging role of a collagen V subtype at the epidermis-dermis interface. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(7):1841-9.
 51. Lampe AK, Dunn DM, von Niederhausern AC, Hamil C, Aoyagi A, Laval SH, et al. Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Journal of medical genetics*. 2005;42(2):108-20.
 52. Sparks S, Quijano-Roy S, Harper A, Rutkowski A, Gordon E, Hoffman EP, et al. Congenital Muscular Dystrophy Overview [Internet]. University of Washington, Seattle; [updated 2012 Aug 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1291/>.
 53. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, et al. Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology*. 2002;59(6):920-3.
 54. Bonnemann CG, Rutkowski A, Mercuri E, Muntoni F. 173rd ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy outcome measures 5-7 March 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2011;21(7):513-22.
 55. Angelin A, Tiepolo T, Sabatelli P, Grumati P, Bergamin N, Golfieri C, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(3):991-6.
 56. Brinas L, Richard P, Quijano-Roy S, Gartioux C, Ledeuil C, Lacene E, et al. Early onset collagen VI myopathies: Genetic and clinical correlations. *Annals of neurology*. 2010;68(4):511-20.
 57. Baker NL, Morgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, et al. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2005;14(2):279-93.
 58. Pan TC, Zhang RZ, Sudano DG, Marie SK, Bonnemann CG, Chu ML. New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *American journal of human genetics*. 2003;73(2):355-69.
 59. Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreiro A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, et al. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *American journal of human genetics*. 2002;70(6):1446-58.
 60. Higuchi I, Shiraishi T, Hashiguchi T, Suehara M, Niiyama T, Nakagawa M, et al. Frameshift mutation in the collagen VI gene causes Ullrich's disease. *Annals of neurology*. 2001;50(2):261-5.
 61. Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, et al. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(13):7516-21.
 62. Zhang RZ, Sabatelli P, Pan TC, Squarzone S, Mattioli E, Bertini E, et al. Effects on collagen VI mRNA stability and microfibrillar assembly of three COL6A2 mutations in two families with Ullrich congenital muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(46):43557-64.
 63. Lucarini L, Giusti B, Zhang RZ, Pan TC, Jimenez-Mallebrera C, Mercuri E, et al. A homozygous COL6A2 intron mutation causes in-frame triple-helical deletion and nonsense-mediated mRNA decay in a patient with Ullrich congenital muscular dystrophy. *Human genetics*. 2005;117(5):460-6.
 64. Foley AR, Hu Y, Zou Y, Yang M, Medne L, Leach M, et al. Large genomic deletions: a novel cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Annals of neurology*. 2011;69(1):206-11.
 65. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Noguchi S, et al. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology*. 2004;62(4):620-3.
 66. Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, et al. Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology*. 2007;69(10):1043-9.
 67. Sabatelli P, Bonaldo P, Lattanzi G, Braghetta P, Bergamin N, Capanni C, et al. Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2001;20(7):475-86.
 68. Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature genetics*. 2003;35(4):367-71.
 69. INSERM. Organ Transplantation: Research perspectives [Internet]. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris; 2008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK24616/>.
 70. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, Bertaglia E, et al. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature medicine*. 2010;16(11):1313-20.

71. Menazza S, Blaauw B, Tiepolo T, Toniolo L, Braghetta P, Spolaore B, et al. Oxidative stress by monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2010;19(21):4207-15.
72. Hicks D, Lampe AK, Laval SH, Allamand V, Jimenez-Mallebrera C, Walter MC, et al. Cyclosporine A treatment for Ullrich congenital muscular dystrophy: a cellular study of mitochondrial dysfunction and its rescue. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 1):147-55.
73. Mercuri E, Lampe A, Allsop J, Knight R, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2005;15(4):303-10.
74. Higuchi I, Horikiri T, Niiyama T, Suehara M, Shiraishi T, Hu J, et al. Pathological characteristics of skeletal muscle in Ullrich's disease with collagen VI deficiency. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2003;13(4):310-6.
75. Voermans NC, Jenniskens GJ, Hamel BC, Schalkwijk J, Guicheney P, van Engelen BG. Ehlers-Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency: muscle weakness and contractures support overlap with collagen VI myopathies. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A(18):2215-9.
76. Voermans NC, van Alfen N, Pillen S, Lammens M, Schalkwijk J, Zwarts MJ, et al. Neuromuscular involvement in various types of Ehlers-Danlos syndrome. *Annals of neurology*. 2009;65(6):687-97.
77. Oh SJ. *General Concepts of Electrodiagnostic Studies in Neuromuscular Disease. Clinical electromyography: Nerve Conduction Studies*. 2 ed: Williams & Wilkins; 1993. p. 15-25.
78. Quijano-Roy S, Renault F, Romero N, Guicheney P, Fardeau M, Estournet B. EMG and nerve conduction studies in children with congenital muscular dystrophy. *Muscle & nerve*. 2004;29(2):292-9.
79. Malfait F, Wenstrup RJ, De Paepe A. Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010;12(10):597-605.
80. Zweers MC, van Vlijmen-Willems IM, van Kuppevelt TH, Mecham RP, Steijlen PM, Bristow J, et al. Deficiency of tenascin-X causes abnormalities in dermal elastic fiber morphology. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(4):885-91.
81. Kirschner J, Hausser I, Zou Y, Schreiber G, Christen HJ, Brown SC, et al. Ullrich congenital muscular dystrophy: connective tissue abnormalities in the skin support overlap with Ehlers-Danlos syndromes. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;132A(3):296-301.

BIJLAGE

Lijst met afkortingen					
AD	Autosomal dominant	FACT1	Fibril associated molecules with large noncollagenous domains	PIP	Proximaal interfalangeaal gewricht
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	FKBP	FK506 binding protein	PLOD2	Procollageen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase
AR	Autosomaal recessief	GLT25D1	Glycosyl transferase 25 domain 1	PPI	Peptidyl prolyl Cis-trans isomerasen
AZ	Aminozuur	GLT25D2	Glycosyl transferase 25 domain 2	PTC	Premature termination codon
BM	Bethlem myopathie	HHFMS	Hammersmith Functional Motor Scale	rER	Ruw endoplasmatisch reticulum
BMP-1	Bone morphogenetic protein-1	Hsp47	Heat shock protein 47	ROS	Reactive oxygen species
CMAP	Compound muscle action potential	LH	Lysyl hydroxylase	SERPIN	Serine protease inhibitor familie
CMD	Congenitale musculaire dystrofie	LOX	Lysyl oxidase	SLRP	Small leucine rich proteoglycan
CNAP	Compound nerve action potential	MCP	Metacarpofalangeaal gewricht	SR	Sarcoplasmatisch reticulum
COL domein	Collageen domein	MMP-2	Matrix metalloproteinase 2	TGF-β1	Transforming growth factor β1
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	MPT	Mitochondriaal membraan permeabiliteit transitie porie	TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1
COPI	Coat protein 1	MUP	Motor unit action potential	UCMD	Ullrich congenitale musculaire dystrofie
COPII	Coat protein 2	NC domein	Niet-collageen domein	UPR	Unfolding protein response
CR	Cysteine rich	N-terminus	Amino-terminus	VAR	variabel
CRTAP	Cartilage associated protein	P3H	Prolyl 3-hydroxylase		
C-terminus	Carboxy-terminus	P4H	Prolyl 4-hydroxylase		
CypB	Cyclophiline B	PARP	Proline and arginine rich peptide		
DIP	Distaal interfalangeaal gewricht	PCPE-1	Procollagen C-proteinase enhancer-1		
ECM	Extracellulaire matrix	PDI	Protein disulfide isomerase		
EDS	Ehlers-Danlos Syndroom				
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay				
EMG	Elektromyografisch onderzoek				

Tabel 3 Collageen types ((5, 14), NCBI Gene³⁹).

Collageen types	Indeling	Gen	α -ketens	Collageenmoleculen	Lokalisatie
I	fibrillair collageen (majeur)	COL1A1	$\alpha 1(I)$	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	bot, cornea, dermis, pees
		COL1A2	$\alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_3$	
II	fibrillair collageen (majeur)	COL2A1	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	kraakbeen, glasvocht oog
III	fibrillair collageen (majeur)	COL3A1	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	dermis, long, uterus, darm, aorta
IV	basaal membraan collageen	COL4A1	$\alpha 1(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)$ $[\alpha 5(IV)]_2\alpha 6(IV)$	basaal membraan
		COL4A2	$\alpha 2(IV)$		
		COL4A3	$\alpha 3(IV)$		
		COL4A4	$\alpha 4(IV)$		
		COL4A5	$\alpha 5(IV)$		
		COL4A6	$\alpha 6(IV)$		
V	fibrillair collageen (mineur)	COL5A1	$\alpha 1(V)$	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	placenta, bot, dermis, cornea
		COL5A2	$\alpha 2(V)$ ⁴⁰	$[\alpha 1(V)]_3$	
		COL5A3	$\alpha 3(V)$	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	
VI	microfibrillen	COL6A1	$\alpha 1(VI)$	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 4(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 5(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 6(VI)$	uterus, dermis, cornea, kraakbeen
		COL6A2	$\alpha 2(VI)$		
		COL6A3	$\alpha 3(VI)$		
		COL6A4	$\alpha 4(VI)$		
		COL6A5	$\alpha 5(VI)$		
		COL6A6	$\alpha 6(VI)$		
VII	verankerend collageen	COL7A1	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	huid, mucosaal epitheel, membraan van amnion
VIII	collageen met korte keten (hexagonaal netwerk)	COL8A1	$\alpha 1(VIII)$	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	endothelcellen, membraan van Descemet
		COL8A2	$\alpha 2(VIII)$	$[\alpha 1(VIII)]_3$ $[\alpha 2(VIII)]_3$	
IX	FACIT ⁴¹	COL9A1	$\alpha 1(IX)$	$[\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)]$	kraakbeen, glasvocht oog
		COL9A2	$\alpha 2(IX)$		
		COL9A3	$\alpha 3(IX)$		
X	collageen met korte keten (hexagonaal netwerk)	COL10A1	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	chondrocyten tijdens endochondrale ossificatie
XI	fibrillair collageen (mineur)	COL11A1	$\alpha 1(XI)$	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$ ⁴²	kraakbeen, discus intervertebralis
		COL11A2	$\alpha 2(XI)$		
XII	FACIT	COL12A1	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$	dermis, pees, kraakbeen
XIII	transmembraan collageen	COL13A1	$\alpha 1(XIII)$	$[\alpha 1(XIII)]_3$	endothelcellen, epidermis
XIV	FACIT	COL14A1	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$	dermis, pees, kraakbeen
XV	FACIT	COL15A1	$\alpha 1(XV)$	$[\alpha 1(XV)]_3$	voornamelijk basale membraan
XVI	FACIT-like ⁴³	COL16A1	$\alpha 1(XVI)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$	Fibroblasten, keratinocyten, glad spierweefsel, amnion
XVII	transmembraan proteïne	COL17A1	$\alpha 1(XVII)$	$[\alpha 1(XVII)]_3$	hemidesmosomen
XVIII	multiplexines ⁴⁴	COL18A1	$\alpha 1(XVIII)$	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	nier, lever, long

³⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

⁴⁰ $\alpha 1(XI)$ en $\alpha 2(V)$ vormen heterotrimeren

⁴¹ fibril-associated collagens with interrupted helices

⁴² $\alpha 3(XI)$ -keten komt tot stand door post-translatie modificatie van de $\alpha 1(II)$ -keten

⁴³ Vertonen gemeenschappelijke kenmerken met FACIT, maar zijn structureel en functioneel uniek

XIX	FACIT-like	COL19A1	$\alpha 1(\text{XIX})$	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	fibroblast cellijnen
XX ⁴⁵	/	COL20A1	$\alpha 1(\text{XX})$	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	/
XXI	FACIT-like	COL21A1	$\alpha 1(\text{XXI})$	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	bot, cornea, dermis, pees
XXII	FACIT-like	COL22A1	$\alpha 1(\text{XXII})$	$[\alpha 1(\text{XXII})]_3$	weefseljuncties
XXIII	transmembraan proteïne	COL23A1	$\alpha 1(\text{XXIII})$	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$	epidermis, prostaat
XXIV	Fibrillair collageen	COL24A1	$\alpha 1(\text{XXIV})$	$[\alpha 1(\text{XXIV})]_3$	Bot, oog
XXV	Transmembranair collageen	COL25A1	$\alpha 1(\text{XXV})$	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$	hersenspecifiek membraan geassocieerd collageen
XXVI	Moleculen met collageen domeinen	COL26A1	$\alpha 1(\text{XXVI})$	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$	ovaria, testes
XXVII	Fibrillair collageen	COL27A1	$\alpha 1(\text{XXVII})$	$[\alpha 1(\text{XXVII})]_3$	kraakbeen, huid, pees
XXVIII	Moleculen met collageen domeinen	COL28A1	$\alpha 1(\text{XXVIII})$	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	perifeer zenuwstelsel

⁴⁴ Extracellulaire matrix proteïnen die meerdere triple helix domeinen (collageen domeinen) bevatten die onderbroken worden door niet-collageen domeinen

⁴⁵ Beschreven bij de kip, (nog) niet bij de mens

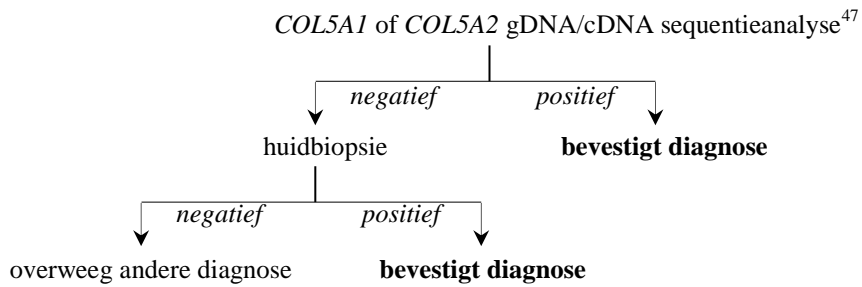
Tabel 4 Classificatie van het Ehlers-Danlos Syndroom volgens Villefranche criteria (25).

Subtypes	Criteria	
	Major	Minor
Klassieke type	Hyperelastische huid; atrofische littekens; hyperlaxiteit van de gewrichten	Zachte, fluweelachtige huid; molluscoïde pseudotumoren; subcutane sferoïden; complicaties ten gevolge van gewrichtshyperlaxiteit (verstuiking, (sub)luxatie, pes planus); spierhypotonie (met vertraagde motorische ontwikkeling); Gemakkelijk ecchymosen; complicaties ten gevolge van de fragiliteit van weefsels (anale prolaps op kinderleeftijd, cervicale insufficiëntie); positieve familiale voorgeschiedenis; heelkundige complicaties (postoperatieve hernia)
Hypermobiele type	Veralgemeende gewrichtshyperlaxiteit; hyperelastische huid en/of zachte fluweelachtige huid	Recidiverende ontwrichtingen; chronische gewrichtspijn
Vasculaire type	Dunne, translucente huid; fragiliteit en rupturen van de arterieën/ingewanden/uterus; gemakkelijke hematoomvorming; uitgebreide kneuzingen; karakteristieke facies	Acrogeria; hyperlaxiteit van de kleine gewrichten; spier- en pees ruptuur; klompvoet; vroegtijdige varices; arterioveneuze fistels; pneumo(hemo)thorax; gingiva recessie; positieve familiale voorgeschiedenis; plotse dood nauw verwant familielid
Kyphoscoliosis type	Veralgemeende gewrichtshyperlaxiteit; ernstige spierhypotonie (bij geboorte); progressieve scoliose (vanaf geboorte); fragiele sclera; ruptuur van de oogbol	atrofische littekens; gemakkelijk ecchymosen; ruptuur van arterieën; Marfan-achtige kenmerken; microcornea; osteopenie; positieve familiale voorgeschiedenis (broers/zussen)
Arthrochalasie type	Ernstige veralgemeende gewrichtshyperlaxiteit (recurrente subluxaties); Congenitale bilaterale heupluxatie	hyperelastische huid; atrofische littekens; gemakkelijk ecchymosen; spierhypotonie; kyphoscoliose; osteopenie
Dermatosparaxis type	Zeer fragiele huid; overtollige huid	Zachte, deeg-achtige textuur; gemakkelijk ecchymosen; premature ruptie van foetale membranen; grote hernia's (umbilicaal, inguinaal)

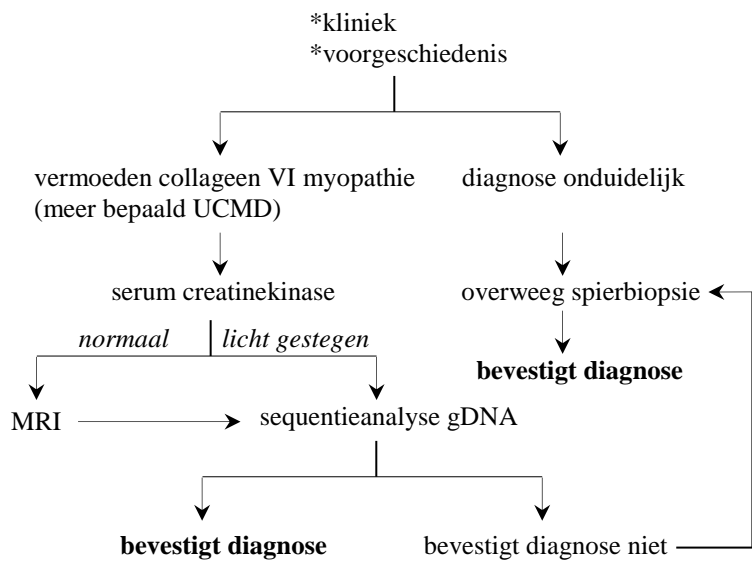
Tabel 5 Overzicht types congenitale musculaire dystrofieën (52).

	Type	Subtypes	Aangetast proteïne	Gen
Structureel proteïne defect (proteïne bevindt zich in basaal membraan of ECM)	Laminine α -2 deficiëntie		Laminine α 2	<i>LAMA2</i>
	Collageen VI-deficiënt congenitale musculaire dystrofie	UCMD	Collageen VI	<i>COL6A1</i> <i>COL6A2</i> <i>COL6A3</i>
		BM		
		Autosomaal dominante limb-girdle musculaire dystrofie		
	Autosomaal recessieve myosclerosis myopathie			
Glycosylatiedefect	Dystrglycanopathie	Walker-Warburg syndroom	Proteïne-O-mannosyltransferase 1	<i>POMT1</i>
			Proteïne-O-mannosyltransferase 2	<i>POMT2</i>
			Fukutine	<i>FKTN</i>
			Fukutine-gerelateerd proteïne	<i>FKRP</i>
			glycosyltransferase-like proteïne	<i>LARGE</i>
			2-C-methyl-D-erythritol 4-fosfaat cytidylyltransferase-like proteïne	<i>ISPD</i>
		Autosomaal recessieve limb-girdle musculaire dystrofie	Proteïne-O-mannosyltransferase 1	<i>POMT1</i>
			Proteïne-O-mannosyltransferase 2	<i>POMT2</i>
			Fukutine	<i>FKTN</i>
			fukutine-gerelateerd proteïne	<i>FKRP</i>
			O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminytransferase	<i>POMGNT1</i>
		MEB (muscle-eye-brain)-like congenitale musculaire dystrofie	Fukutine	<i>FKTN</i>
			fukutine-gerelateerd proteïne	<i>FKRP</i>
		MEB (muscle-eye-brain) ziekte	O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminytransferase	<i>POMGNT1</i>
		Fukuyama congenitale musculaire dystrofie	Fukutine	<i>FKTN</i>
		Congenitale musculaire dystrofie-dystrglycanopathie	Fukutine-gerelateerd proteïne	<i>FKRP</i>
glycosyltransferase-like proteïne	<i>LARGE</i>			
Defecten van ER proteïnen	<i>SEPN1</i> -related myopathie	Rigid spine musculaire dystrofie type 1	Selenoproteïne N	<i>SEPN1</i>
Defecten van nucleair envelop proteïnen	LMNA-gerelateerd musculaire dystrofie	Dropped head syndrome	Lamine A/C	<i>LMNA</i>
		Emery-Dreifuss musculaire dystrofie		

Schema 1. Bevestigen diagnose van EDS klassieke type bij “proband”⁴⁶ (36)



Schema 2. Bevestigen diagnose UCMD bij “proband” (52)



⁴⁶ Het getroffen individu waardoor bij een familie een genetische aandoening kan vastgesteld worden; deze persoon kan tevens de consultant zijn (nl. diegene die zich voor genetische counseling presenteert)

⁴⁷ Het bepalen van de nucleotide-sequentie voor een DNA segment

Tabel 6 Samenvatting moleculaire pathogenese.

	molecule	gen	overervingspatroon
Klassieke type EDS	collageen type V	<i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i>	autosomaal dominant
	collageen type I	<i>COL1A1</i>	
Tenascine-X deficiënte EDS	tenascine X	<i>TNX-B</i>	autosomaal recessief
UCMD	collageen type VI	<i>COL6A1</i> <i>COL6A2</i> <i>COL6A3</i>	autosomaal dominant, autosomaal recessief