

- the societal needs working group. September, 1996. <http://rcpsc.medical.org/juni/2005>
3. Larsen K. Intelligent uddannelsesprogram på Vejle Sygehus. *Ugeskr Læger* 2000;162:5410-4.
  4. Speciallægeuddannelse i Danmark – en empirisk undersøgelse af tendenser inden for speciallægeuddannelsen for implementeringen af den nye speciallægeuddannelse. Første delrapport fra forsknings- og udviklingsprojektet »Reform af speciallægeuddannelsen i Danmark«. København: Sundhedsstyrelsen, 2004.
  5. Målbekrivelse for turnus. København: Sundhedsstyrelsen, 2003.
  6. Nørgaard K, Ringsted CV, Dolmans D. Validering af en tjekliste til vurdering af lægers kompetence i stuegang. *Ugeskr Læger* 2004;166:2027-31.
  7. Mørcke AM. Lægeuddannelsens mål – hvad, hvordan og hvorfor. *Ugeskr Læger* 2004;166:389.
  8. Ravn LI. Vejlederfunktionen i den nye speciallægeuddannelse. *Ugeskr Læger* 2004;166:2020-2.
  9. David TJ, Dolmans DH, Patel et al. Problem-based learning as an alternative to lecture-based continuing medical education. *J R Soc Med* 1999;92:103-4.

# Vaskulær Ehlers-Danlos-syndrom – proteinkemisk og molekylærgenetisk udredning

Overlæge Allan Meldgaard Lund

H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret,  
Klinisk Genetisk Afdeling

## Resume

**Introduktion:** Ehlers-Danlos-syndrom (EDS) er en heterogen gruppe af arvelige bindevævssygdomme. Kriterier for diagnosen er blevet forenklet ved Villefranche-klassifikationen, men diagnostik af EDS er fortsat svær hos børn og unge med vaskulær eller hypermobil EDS samt hos patienter uden positiv familiehistorie. Diagnose af vaskulær EDS er vigtig for at kunne etablere et kontrolprogram og give genetisk rådgivning og tilbud om prænatal diagnostik. Vi beskriver her diagnostik af vaskulær EDS ved proteinkemiske og molekylærgenetiske analyser.

**Materialer og metoder:** I fem familier med vaskulær EDS blev (pro)kollagen fra dyrkede fibroblaster analyseret med *sodium dodecyl sulphate*-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE), og struktur og mængde af (pro)kollagen I, III og V blev vurderet med autoradiofluorografi. Kollagenanalyse blev også udført på 362 patienter uden vaskulær EDS. Molekylærgenetisk udredning foregik ved sekventering af *COL3A1*-genet.

**Resultater:** (Pro)kollagen III fra alle fem patienter med vaskulær EDS var abnormt ved SDS-PAGE: intracellulær ophobning, nedsat sekretion og overmodifikation af  $\alpha 1$ -kæderne af (pro)kollagen III. Molekylærgenetiske analyser afdækkede en abnormitet i *COL3A1*-genet hos alle patienter. (Pro)kollagen III-forandringer blev ikke set ved analyse af 362 personer uden vaskulær EDS. Hos 90 patienter med ikkevaskulær EDS blev der fundet en patient med forandringer af (pro)kollagen I.

**Konklusion:** Kollagenanalyse er en god screeningsanalyse for vaskulær EDS, men den er kun i begrænset omfang brugbar ved ikkevaskulær EDS. Molekylærgenetisk analyse kan afsløre abnormiteter i *COL3A1*-genet hos mange patienter med abnormt (pro)kollagen III. Fundene ved kollagenanalyse og molekylærgenetisk analyse muliggør præcis genetisk rådgivning og prænatal diagnostik.

Ehlers-Danlos-syndrom (EDS) er en heterogen gruppe af arvelige bindevævssygdomme med meget variable symptomer. Ikke alle patienter med EDS har den såkaldte EDS-triade med hyperelastisk hud, hypermobilitet af led og vævsskørhed [1]). Villefranche-kriterierne opdeler EDS i seks hovedtyper og enkelte andre, meget sjældne typer (**Tabel 1**) [2]. Kriterierne er en forenkling af tidligere opdelinger, men diagnostik af EDS er fortsat vanskelig. De største udfordringer er at skelne vaskulær EDS fra andre EDS-typer og at skelne hypermobil EDS fra andre tilstande med hypermobilitet. I dette arbejde fokuseres der på vaskulær EDS. Uden en positiv familiehistorie er en klinisk diagnose af vaskulær EDS vanskelig, især hos børn og unge voksne uden komplikationer i forbindelse med sygdommen. Mange får formentlig aldrig stillet diagnosen [1], som er afgørende for at give en korrekt prognose, etablere et relevant kontrolprogram og tilbyde genetisk rådgivning og prænatal diagnostik. Proteinkemiske og molekylærgenetiske analyser er i dag de eneste pålidelige diagnostiske redskaber ved vaskulær EDS.

Vaskulær EDS er relativt sjælden, også blandt EDS-patienter, med en prævalens på mellem 1:50.000 og 1:100.000 [1, 3]. Vævsskørhed giver patienterne den dårligste prognose i EDS-gruppen, mens hypermobilitet (et minor kriterium i Villefranche-klassifikationen, jf. **Tabel 1**) er begrænset til de små led i hænder og fødder [1]. Huden er tynd, pergamentagtig og gennemsigtig med udbredte ekkymoser, men den er ikke hyperelastisk. Nogle patienter har karakteristiske ansigtstræk, som bliver tydeligere med alderen: en reduceret mængde subkutant fedt giver stramtsiddende hud, tynd, spids næse, hule kinder, tynde læber og ofte prominente og stirrende øjne (**Figur 1**). Ruptur af indre organer, f.eks. colon og uterus hos gravide, er sammen med bristninger af aneurismer på mindre intraabdominale arterier samt aorta årsag til en median overlevelse på kun 48 år [3]. Alvorlige komplikationer som hæmoptyse, hæmaturi, akut abdomen, cerebralt insult, shock og

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

pludselig død er sjældne i barnealderen, men er forekommet hos 25% og 80% i henholdsvis 20-års- og 40-års-alderen [3]. Mortaliteten ved graviditet er på omkring 12% [3].

Årsagen til vaskulær EDS er en defekt omsætning af (pro)kollagen III. Den normale dannelse af kollagen III skal kort beskrives. Genet for kollagen III, *COL3A1* på kromosom 2, koder for en pro $\alpha$ 1(III)-kæde på knap 1.500 aminosyrer; hver pro $\alpha$ 1(III)-kæde består af et centralt tripelhelisk område flankeret af et nitrogen (N)- og carboxy (C)-terminalt propeptid. For at danne prokollagen III, associeres tre pro $\alpha$ 1(III)-kæder ved deres C-terminale propeptider, således at de identiske kæder lægges parallelt med hinanden. De tre kæder danner herefter, nærmest ved en lynlåsmekanisme, en tripelhelix, der forløber fra C- til N-terminus og stopper ved det N-terminale propeptid. Samtidig med helixdannelsen hydroxyleres og glykosyleres pro $\alpha$ 1(III)-kæderne. Det er essentielt for den normale tripelhelixdannelse, at hver tredje aminosyre er glycin: Som den mindste af vore aminosyrer, er det den eneste, der er plads til i centrum af tripelhelix. Udskiftninger af glycin er da også den hyppigste årsag til vaskulær EDS. Ovenstående processer foregår i specifikke intracellulære kompartementer.

Resultatet er prokollagen III, som secernerer til det ekstracellulære rum, hvor det processeres med fraspaltning af de N- og C-terminale peptider til en færdig kollagen III-monomer, såkaldt  $[\alpha(\text{III})]_3$ . Efter denne fraspaltning, dannes kollagenfibre ud fra flere kollagen III-monomerer.

Hos den typiske patient er sekretionen af prokollagen III

Figur 1. Klinisk foto af proband P4.



fra cellerne nedsat til 10-15%. I stedet bliver prokollagen III ophobet intracellulært og nedbrudt i det endoplasmatiske retikulum [4]. Baggrunden for dette er genetiske fejl i strukturen af prokollagen III, primært udskiftninger af aminosyren glycin [3]. Hos et fåtal patienter er den reducerede sekretion af prokollagen III forårsaget af haploinsufficiens af den ene *COL3A1*-allel (se diskussion) [5]. Uanset den molekylærge-

Tabel 1. De seks hovedtyper af Ehlers-Danlos-syndrom ifølge Villefranche-kriterierne [2].

| Type <sup>a</sup>            | Hud            |        |            | Hyper-mobilitet | Andre karakteristika   | Arve-gang <sup>b</sup> | Defekt protein eller enzym | Brugbarhed af kollagenanalyse   |
|------------------------------|----------------|--------|------------|-----------------|--|------------------------|----------------------------|---|
|                              | hyper-elastisk | fragil | blå mærker |                 |  |                        |                            |   |
| Klassisk (I, II)             | +++            | +++    | ++         | +++             | Atrofiske ar, blød hud, hernier, rektal prolaps, komplikationer i forbindelse med hypermobilitet; sjældent involvering af indre organer/arterier | AD (AR)                | Kollagen V (Tenascin-X)    | Lav sensitivitet, men enkelte patienter har kollagen V- og I-forandringer |
| Hypermobil (III)             | +              | -      | +          | +++             | Udprægede ledgener med mange ledkomplikationer og smerter; fravær af vævsskørhed og atrofiske ar, men hudinvolvering nødvendig                   | AD                     | ?                          | Ikke anvendelig   |
| Vaskulær (IV)                | -              | ++++   | +++        | +               | Ruptur af indre organer og arterier, tynd hud, karakteristiske ansigtstræk, hypermobilitet begrænset til små led                                 | AD                     | Kollagen III               | Diagnostisk i de fleste tilfælde (se tekst)                               |
| Kyfoskoliotisk (VI)          | +++            | ++     | ++         | +++             | Kyfoskoliose, øjeninvolvering og kongenit hypotoni, atrofiske ar, marfanoid kropsbygning, osteoporose  | AR                     | Lysyl-hydroxylase          | Lav sensitivitet  |
| Artrokalasisk (VIIA og VIIB) | ++             | +      | +          | +++             | Altid kongenit hofteledsluksation, svær hypermobilitet   | AD                     | Kollagen I                 | Diagnostisk i alle tilfælde   |
| Dermatosparaktisk            | -              | ++++   | +++        | +               | Dejagtig og løs, ikkehyperelastisk hud   | AR                     | Prokollagen I N-proteinase | Diagnostisk i alle tilfælde   |

a) Først er angivet typens navn i Villefranche-kriterierne og dernæst i parentes nummereringen i den gamle klassifikation. Kun de seks hovedtyper er medtaget her, men få patienter med andre EDS-typer er kendt [1, 2]; b) AD = autosomal dominant, AR = autosomal recessiv.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

netiske baggrund har patienter med vaskulær EDS en nedsat mængde kollagen III i de væv, som normalt er rige på denne type kollagen, herunder hud, kar og indre organer [1]. Vaskulær EDS nedarves autosomt dominant, og omkring halvdelen af patienterne har nymutationer [4]. I nærværende arbejde beskrives den proteinkemiske og molekylærgenetiske udredning af fem patienter med vaskulær EDS, og indikation for og brugbarhed af kollagenanalyse til diagnose af EDS drøftes.

**Metoder****Patienter**

Fem ubeslægtede probander havde vaskulær EDS bedømt ud fra Villefranche-klassifikationen [2], idet de opfyldte mindst to major kriterier og et antal minor kriterier (**Tabel 2**). Alle patienter havde karakteristiske ansigtstræk (Figur 1) og abnorm hud. EDS optrådte familiært i fire af de fem familier (Tabel 2).

**Kollagenanalyse**

Kollagenanalyse blev udført som beskrevet tidligere [6-8]. I korte træk blev fibroblastkulturer etableret fra hudbiopsi efter

standardmetoder. Efter inkubering af 250.000 celler i medium tilsat tritieret glycin og prolin blev medie og celler høstet i adskilte fraktioner, og prokollagen blev isoleret herfra. En fraktion af prokollagen fra mediet blev behandlet med pepsin med henblik på dannelse af kollagen ved fraspaltning af propeptider. Herefter fulgte *sodium dodecyl sulphate*-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) af prokollagen og kollagen under både reducerende og nonreducerende betingelser. (Pro)kollagen blev visuelt erkendt ved autoradiofluorografi. Ud fra autoradiofluorogrammet bedømte vi kollagen I og III's struktur (ved  $\alpha$ -kædernes elektroforetiske migration) og deres mængde (ved ratio mellem (pro)kollagentyperne). Kollagen III's struktur blev scoret som abnorm, såfremt den intracellulære pepsinerede fraktion (ikkepepsineret prokollagen anvendes ikke til vurdering af struktur) udviste forsinket migration (**Figur 2**); ekstracellulært kollagen III (pepsineret prokollagen III) kan også være abnormt, som hos tre af vore fem patienter, men dette er mere inkonstant. Normal ratio mellem secerneret, ekstracellulært (pro)kollagen III og (pro)kollagen I er ca. 1:5 (1:4-1:6) bedømt ved densitometri efter gelskanning. Pga. en sekretion af normalt prokollagen III på maksimalt 15% er

Tabel 2. Kliniske og biokemiske fund i fem probander med vaskulær Ehlers-Danlos-syndrom.

| Proband | Facies                               | Hud  | Led   | Vaskulært   | Familiehistorie   | Histologi/<br>elektron-<br>mikroskopi <sup>a</sup> | Kollagenanalyse  | Mutation                           |
|---------|--------------------------------------|--|---|---|---|--|--|------------------------------------|
| P1      | Smal næse, store øjne, slankt ansigt | Pellucid, tydelige årer, vulnerabel, blå mærker, ej hyperelastisk, atrofiske ar, ældet udseende  | Ej hypermobil   | Intet   | Ingen   | Intracellulær ophobning af kollagen III            | Nedsat sekretion af normalt samt abnormt over-modificeret (pro)kollagen som ophobes intracellulært | c3490G>T<br>Gly997Tryp             |
| P2      | Smal næse og ansigt                  | Pellucid, mange blå mærker, striæ, ej hyperelastisk  | Hypermobil i både store og små led, luksationer, klumpfod | Intet   | Mor død ved partus af bristet aortaaneurisme, morfar også afficeret   | Ej udført  | Nedsat sekretion, intracellulær ophobning af over-modificeret (pro)kollagen III                    | c3418-2A>C<br>Inklusion af exon 47 |
| P3      | Smal næse                            | Pellucid, tydelige årer, vulnerabel, blå mærker, striæ, ej hyperelastisk, ældet udseende         | Ej hypermobil (håndbold-træner)                           | Cerebrale infarkter   | Far har også vaskulær Ehlers-Danlos-syndrom, er 62 år og har ikke haft vaskulære insulter   | Normale forhold mht. kollagen III                  | Nedsat sekretion af normalt samt abnormt over-modificeret (pro)kollagen som ophobes intracellulært | c1923+1G>A<br>Skipning af exon 28  |
| P4      | Smal, spids næse, slankt ansigt      | Pellucid, tydelige årer, vulnerabel med ekkymoser atrofiske ar, ej hyperelastisk, ældet udseende | Hypermobil i små led og knæ, klumpfod                     | Aneurisme på a. iliaca int. dxt., blødning fra a. iliaca communis | Mor død af bristet aortaaneurisme, bror afficeret i lignende grad   | Intracellulær ophobning af kollagen III            | Nedsat sekretion, intracellulær ophobning af over-modificeret (pro)kollagen III                    | c3509G>A<br>Gly1003Asn             |
| P5      | Smal næse, slankt ansigt             | Blå mærker, vulnerabel hud, ej pellucid, ej hyperelastisk  | Klumpfod, ej hypermobil                                   | Intet   | Søster, far, farbror, farfar og oldefar også afficeret, farfar og oldefar død hhv. 42 år og 46 år gammel af blødning, far død af maveblødning, farbror har flere aneurismer | Ej udført  | Nedsat sekretion af normalt samt abnormt over-modificeret (pro)kollagen som ophobes intracellulært | c2612G>A<br>Gly670Asp              |

a) Udført af overlæge Ole Clemmensen, Odense Universitetshospital.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

denne ratio ved vaskulær EDS teoretisk ca. 1:30; i dette studie er der anvendt en ratio på <1:15. Initialt blev ratio densitometrisk bestemt hos alle patienter og kontrolpersoner, men nu foretages bedømmelsen ved direkte inspektion af autoradiofourogrammet [8]. Der er foretaget minimum dobbeltbestemmelse af alle abnorme kollagenanalyser.

### Molekylærgenetisk analyse

Sekventering af *COL3A1*-genet blev foretaget i professor *Anne de Paepes* laboratorium, Gent, Belgien.

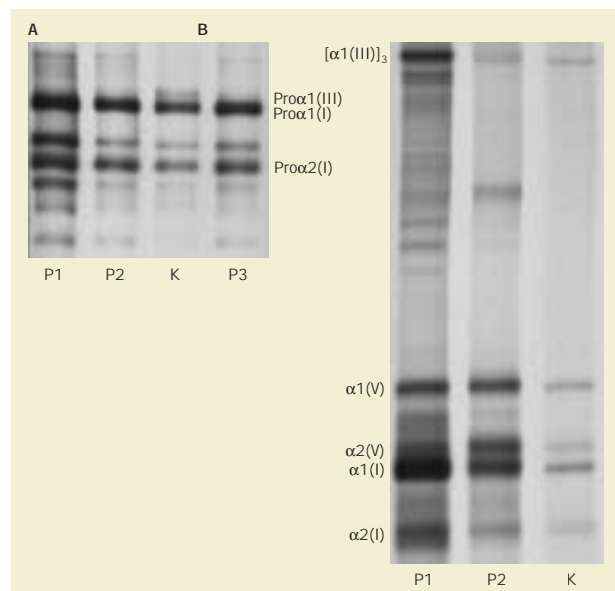
### Resultater

Ved kollagenanalyse blev der fundet intracellulær ophobning af strukturelt abnormt kollagen III i dyrkede fibroblaster fra alle fem probander. Autoradiofourogrammerne viste en øget mængde kollagen III isoleret fra cellelaget. Det intracellulære kollagen III havde forsinket elektroforetisk migration (Figur 2). Mængden af (pro)kollagen III isoleret fra mediet var reduceret vurderet ud fra forholdet mellem (pro)kollagen III og (pro)kollagen I (se metoder og Figur 2) som følge af en øget intracellulær degradering af prokollagen III og nedsat sekretion fra cellerne. I cellekulturer fra tre probander (1, 3 og 5) blev en

lille mængde strukturelt abnormt kollagen III secerneret til mediet, mens det secernerede kollagen i cellekulturer fra de to andre probander var normalt.

I laboratoriet er der ved 362 kollagenanalyser af patienter med ikkevaskulære typer af EDS, osteogenesis imperfecta og juvenil osteoporose samt af kontrolpersoner aldrig observeret hverken kvantitative eller kvalitative abnormiteter af (pro)kollagen III. Dobbeltbestemmelse af abnorme kollagenanalyser og udførelse af kollagenanalyser hos forskellige familiemedlemmer fra samme familie gav identiske resultater. Sekventering af *COL3A1* kunne i alle fem tilfælde vise en heterozygot ændring, der var forenelig med introduktion af en strukturel abnormitet i (pro) $\alpha$ 1(III)-kæderne: tre substitutioner af glycin (i position 670 med aspartat, i position 997 med tryptofan og i position 1003 med asparagin), et tilfælde af skipning af exon 28 og et med inklusion af intron 47 af *COL3A1*-genet i mRNA (Tabel 2).

Vi har på indikationen EDS udført kollagenanalyse på 99 patienter. Hos ni patienter fra fem familier fandt vi (pro)kollagen III-abnormiteter, som beskrevet ovenfor, og i en analyse fandt vi (pro)kollagen I-abnormitet (en patient med artrokalsisk EDS). De øvrige havde normale forhold, og specielt fandt vi ikke kollagen V-forandringer hos patienter med klassisk EDS efter Villefranche-kriterierne.



**Figur 2.** A. Autoradiofourogram af prokollagener secerneret til mediet fra dyrkede fibroblaster inkuberet i medie med tritieret prolin og glycin. Efter høst af prokollagenerne er elektroforese udført under reducerende forhold. Pro $\alpha$ -kæderne af prokollagen I (pro $\alpha$ 1(I) og pro $\alpha$ 2(I)) og III (pro $\alpha$ 1(III)) er markeret. P1 er en patient med Gly997Tryp-substitution, P2 er en patient med inklusion af intron 47 af *COL3A1* i mRNA, og P3 er en patient med skipning af exon 28 af *COL3A1*. K er en kontrolperson. I forhold til kontrolpersonen ses nedsat forhold mellem pro $\alpha$ 1(III) og pro $\alpha$ 1(I) forårsaget af stærkt reduceret pro $\alpha$ 1(III). B. Autoradiofourogram af kollagener isoleret fra cellelaget fra dyrkede fibroblaster inkuberet i medie med tritieret prolin og glycin. Efter høst og pepsinering af prokollagenerne er der udført elektroforese under ikke-reducerende forhold.  $\alpha$ -kæderne af kollagen I ( $\alpha$ 1(I) og  $\alpha$ 2(I)), kollagen III, [ $\alpha$ 1(III)]<sub>3</sub> og kollagen V ( $\alpha$ 1(V) og  $\alpha$ 2(V)) er markeret. P1 er en patient med Gly997Tryp-substitution, og P2 er en patient med inklusion af intron 47 af *COL3A1* i mRNA. K er en kontrolperson. Der er forsinket migration af [ $\alpha$ 1(III)]<sub>3</sub> i forhold til kontrolpersonen samt intracellulær retention set i forhold til den secernerede mængde.

### Diskussion

De fem probander i dette arbejde blev alle henvist med typiske fund og/eller familiehistorie for vaskulær EDS. Hos alle var der abnorme fund ved proteinkemisk analyse, og fundene kunne bekræftes ved efterfølgende sekventering af genotyper for kollagen III, *COL3A1*. Det tyder på, at proteinkemisk kollagenanalyse er en god screening for vaskulær EDS. Normalt (pro)kollagen III hos 362 andre personer uden vaskulær EDS, der blev undersøgt i vort laboratorium, tyder også på, at analysen er specifik. Erfaringer fra udenlandske laboratorier bekræfter, at abnormiteter af (pro)kollagen III som beskrevet her stort set er patognomone for vaskulær EDS. Nogle patienter uden vaskulær EDS, men med aorta- og cerebrale aneurismer har dog abnormt (pro)kollagen III [9-11]. Dette fund er formentlig sjældent, og man har ikke genfundet det blandt mange andre patienter med aneurismer [12, 13].

Der er ingen systematiske opgørelser af sensitiviteten af kollagenanalyse blandt patienter, der ud fra Villefranche-kriterier er klassificeret som afficeret med vaskulær EDS, men ud fra erfaringer fra vort og udenlandske laboratorier vil der hos næsten alle sådanne patienter være et abnormt resultat af kollagenanalyse [1, 3, 14]. Der foreligger rapporter om enkelte patienter med vaskulær EDS og patienter med mildere fænotyper (ikke klassificeret som vaskulær EDS efter Villefranche-kriterierne), som har normale forhold undersøgt med proteinkemisk kollagenanalyse, men abnormiteter af *COL3A1*-genet undersøgt ved molekylærgenetisk analyse. *Schwarze et al* [15] beskrev fire patienter med haploinsufficiens af den ene

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

*COL3A1*-allel, og kun for en patient var der abnorme resultater af kollagenanalyse. Alle havde symptomer, der var forenelige med vaskulær EDS. Fundet er overraskende, da haploinsufficiens af en *COL3A1*-allel må formodes at få færre kliniske konsekvenser end tilstedeværelse af strukturelt abnormt (pro)kollagen III. Haploinsufficiens medfører en reduktion af (pro)kollagen III på 50%, mens strukturelle defekter vil reducere mængden af (pro)kollagen III med 90% (tallet fremkommer pga. støkiometrien for  $\alpha 1$ -kæderne i (pro)kollagen III [1]. *Schwarzes* arbejde [16] er foreløbig det eneste af sin art, og ifølge onlinedatabasen for *COL3A1*-mutationer (<http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/col3a1.html>) er mutationer, der forårsager strukturelt abnormt (pro)kollagen III langt hyppigere end dem, der forårsager haploinsufficiens, og de første er fundet hos >200 patienter med vaskulær EDS. *Schwarzes* fund betyder imidlertid, at man med kollagenanalyse ikke vil finde alle patienter med vaskulær EDS. En løsning kunne være anvendelse af genomisk molekyलगenetisk analyse, men den er på nuværende tidspunkt hverken tilstrækkelig sensitiv (hos ca. 35% findes ingen mutationer på trods af abnorme resultater af kollagenanalyse [3]) eller praktisk og økonomisk gennemførlig som screeningsanalyse.

Vore resultater viser, at kollagenanalysens anvendelighed ved de øvrige EDS-typer er begrænset; specielt fandt vi ingen kollagen V-forandringer hos patienter med klassisk EDS. Disse resultater svarer til erfaringer fra andre laboratorier: af ikkevaskulære EDS-typer kan kun artrokalasisk og dermatosparaktisk EDS (Tabel 1) med sikkerhed diagnosticeres ved kollagenanalyse. I en molekyलगenetisk analyse af 35 familier med klassisk EDS fandt man seks patienter med forandringer i genet for kollagen V (*COL5A1*), og kun to af disse seks havde et abnorm resultat ved kollagenanalyse [17]. Op til halvdelen af patienterne med klassisk EDS har formentlig mutationer i *COL5A1* [18, 19], der forårsager haploinsufficiens og dermed en reduceret produktion af kollagen V. Da fibroblasters normale sekretion af kollagen V er meget begrænset, kan der ved kollagenanalyse af dyrkede fibroblaster fra sådanne patienter ikke påvises kvantitative forandringer med nogen høj sensitivitet. Enkelte patienter med klassisk EDS har (pro)kollagen I-abnormiteter, og disse vil være påviselige ved kollagenanalyse [1, 20]. Kollagenforandringer er kun rapporteret i kasuistisk form ved hypermobil EDS, og kollagenanalyse er derfor ikke brugbar ved denne type.

Påvisning af abnormt (pro)kollagen I eller III ved kollagenanalyse og fund af *COL3A1*-mutation muliggør prænatal diagnostik ved kollagenanalyse af chorion villus-celler [21] eller ved molekyलगenetisk undersøgelse. Erfaringerne med kollagenanalyse af chorion villus-celler er imidlertid begrænsede, og såfremt der er ønske om prænatal diagnostik, er det hensigtsmæssigt at udrede familien molekyलगenetisk og om muligt anvende mutationsanalyse som metode ved den prænatale diagnostik.

Sammenfattende er hovedindikationen for kollagenana-

lyse ved EDS en be- eller afkræftelse af vaskulær EDS. På denne indikation har analysen en høj specificitet og sensitivitet. Kollagenanalyse er ligeledes sikker ved artrokalasisk og dermatosparaktisk EDS, mens sensitiviteten vil være meget lav ved klassisk EDS og hypermobil EDS. Differentialdiagnosen mellem vaskulær EDS og de øvrige EDS-typer er svær hos børn og unge, men det er prognostisk, opfølgingsmæssigt og rådgivningsmæssigt vigtigt at vide, om patienten har vaskulær EDS eller ej. Hos børn og unge vil det derfor være rimeligt at gennemføre kollagenanalyse. Et abnormt fund ved analysen vil desuden muliggøre prænatal diagnostik i familien.

Korrespondance: *Allan Meldgaard Lund*, Klinisk Genetisk Afdeling, Juliane Marie Centret, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: [alund@rh.dk](mailto:alund@rh.dk)

Antaget: 21. marts 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelser: Bioanalytiker *Anne S. Olsen* og bioanalytiker *Kirsten Glarborg* takkes for kompetent udførelse af kollagenanalyser. Pædiatriske og dermatologiske kollegaer i hele landet takkes for henvisning af patienter til kollagenanalyse. Professor *Anne de Paepe* og dr. *Paul Croucke* takkes for udførelse af de molekyलगenetiske analyser. Professor *Flemming Skovby* takkes for kritisk gennemlæsning og diskussion af manuskriptet.

#### Litteratur

- Steinmann B, Royce PM, Superti-Furga A. The Ehlers-Danlos Syndrome. I: Royce PM, Steinmann B, red. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley-Liss 2002:431-523.
- Beighton P, De Paepe A, Steinmann B et al. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 1998;77:31-7.
- Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A et al. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med* 2000; 342:673-80.
- Byers PH, Holbrook KA, Barsh GS et al. Altered secretion of type III procollagen in a form of type IV Ehlers-Danlos syndrome. Biochemical studies in cultured fibroblasts. *Lab Invest* 1981;44:336-41.
- Schwarze U, Schievink WI, Petty E et al. Haploinsufficiency for one COL1A3 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of ehlers-danlos syndrome, ehlers-danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 2001;69:989-1001.
- Lund AM, Schwartz M, Raghunath M et al. Gly802Asp substitution in the pro $\alpha 2(I)$  collagen chain in a family with recurrent osteogenesis imperfecta due to paternal mosaicism. *Eur J Hum Genet* 1996;4:39-45.
- Lund AM, Skovby F, Schwartz M. Deletion of a Gly-Pro-Pro repeat in the pro $\alpha 2(I)$  chain of procollagen I in a family with dominant osteogenesis imperfecta type IV. *Hum Genet* 1996;97:287-90.
- Lund AM. Biochemical and molecular genetic studies of osteogenesis imperfecta. 1-32. København: H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Klinisk Genetisk Afdeling, 2002.
- Kontusaari S, Tromp G, Kuivaniemi H et al. A mutation in the gene for type III procollagen (COL3A1) in a family with aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1990;86:1465-73.
- Kontusaari S, Tromp G, Kuivaniemi H et al. Inheritance of an RNA splicing mutation (G+ 1 IVS20) in the type III procollagen gene (COL3A1) in a family having aortic aneurysms and easy bruising: phenotypic overlap between familial arterial aneurysms and Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 1990;47:112-20.
- Østergaard JR, Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg* 1987;67:690-6.
- Tromp G, Wu YL, Prockop DJ et al. Sequencing of cDNA from 50 unrelated patients reveals that mutations in the triple-helical domain of type-III procollagen are an infrequent cause of aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1993;91: 2539-45.
- Kuivaniemi H, Prockop DJ, Wu Y et al. Exclusion of mutations in the gene for type-III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections - results from sequence analysis of the coding sequences of type-III collagen from 55 unrelated patients. *Neurology* 1993;43:2652-8.
- De Paepe A. The Ehlers-Danlos syndrome: a heritable collagen disorder as cause of bleeding. *Thromb Haemost* 1996;75:379-86.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | KASUISTIK

15. Schwarze U, Schievink WI, Petty E et al. Haploinsufficiency for one COL1A3 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of ehlers-danlos syndrome, ehlers-danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 2001;69:989-1001.
16. Schwarze U, Schievink WI, Petty E et al. Haploinsufficiency for one COL1A3 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of ehlers-danlos syndrome, ehlers-danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 2001;69:989-1001.
17. De Paepe A, Nuytinck L. Biochemical and molecular study of type V collagen defects in 35 unrelated patients/families with classical Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hum Genet* 1998;63:A265.
18. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC et al. COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *Am J Hum Genet* 2000;66:1766-76.
19. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG et al. 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). *Am J Hum Genet* 2000;66:1757-65.
20. Nuytinck L, Freund M, Lagae L et al. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet* 2000;66:1398-402.
21. Raghunath M, Steinmann B, Delozier-Blanchet C et al. Prenatal diagnosis of collagen disorders by direct biochemical analysis of chorionic villus biopsies. *Pediatr Res* 1994;36:441-8.

## Diabetisk ketoacidose hos en hiv-positiv patient i antiretroviral behandling

Læge Malene Rahbek Holm, læge Birgitte Rønde Hansen & overlæge Michael E. Røder

H:S Hvidovre Hospital, Endokrinologisk Klinik, Infektionsmedicins Afdeling, og H:S Bispebjerg Hospital, Klinik I, Endokrinologisk Sektion

Behandling af hiv-infektion med højaktiv antiretroviral terapi (HAART) kan medføre hiv-associeret lipodystrofi (HALS), i form af metaboliske ændringer som insulinresistens og dyslipidæmi med risiko for udvikling af diabetes [1]. Diabetes opstået sekundært til HAART er normalt ikke relateret til udvikling af ketoacidose og er ikke tidligere beskrevet i Danmark. Her præsenteres en sygehistorie, hvor diabetisk ketoacidose muligvis kan relateres til HAART.

### Sygehistorie

En 48-årig kvinde af afrikansk herkomst havde været hiv-positiv igennem tre år. Hun havde været i HAART i to et halvt år og blev indlagt efter tre dages tiltagende tørst, sløvhed, konfusion og opkastning. Der målttes et blodglukoseniveau på 76 mmol pr. l og urinstiks med maks. udslag for glukose og ketonstoffer. Ved en arteriepunktur blev der påvist metabolisk acidose med pH på 7,24, bicarbonat på 13,2 mmol pr. l og laktat på 2,0 mmol pr. l. Patienten var afebril, og der var ikke tegn på infektion. Ketoacidosebehandling med rehydrering, elektrolytkorrektion og insulin blev initieret. Acidosen blev korrigeret, og patienten overgik på tredje dagen til subkutan insulinadministration.

Patienten var behandlet med lamivudin, ritonavir, saquinavir og efavirenz, havde været i proteasehæmmer (PI)-behandling i halvandet år og i den aktuelle HAART-kombination fem måneder forud for ketoacidosen. Hiv-infektionen var

i en stabil fase med CD4-tal på  $530 \times 10^6$  pr. l og hiv-RNA  $< 20 \times 10^3$  kbp pr. l. HAART blev pauseret i den akutte fase.

Patienten havde initialt tegn på insulinresistens med behov for 62 IE insulin givet subkutan pr. døgn ud over glukose-insulin-kalium-infusion. Ø-celle- og GAD-65-antistoftitre var negative. En glukagontest viste stimuleret C-peptid på 435 pmol pr. l, hvilket indikerede et permanent insulinbehov. Patienten havde en fedtfordeling, der var forenelig med lipodystrofi. Totalkolesterol var på 7,5 mmol pr. l, *low density lipoprotein* (LDL)-kolesterol på 5,0 mmol pr. l, *high density lipoprotein* (HDL)-kolesterol på 1,7 mmol pr. l og triglycerider 1,7 mmol pr. l.

To år tidligere var patientens pancreas fundet hård og forstørret. Der var ingen alkoholanamnese. Ved en ultralydskanning blev der påvist forkalkninger, der var forenelige med kronisk pankreatit, dog uden eksokrin insufficiens.

Ved udskrivelsen var blodglukoseniveauet på 8-10 mmol pr. l med 50 IE insulin pr. døgn. Ved en efterfølgende ambulant kontrol kunne insulinindosissen reduceres gradvist til 26 IE pr. døgn (0,3 IE pr. kg) med Hb-A1C på 0,065 et år efter ketoacidosen. Patienten fortsatte i samme HAART.

### Diskussion

Prævalensen af diabetes hos patienter med HALS er ikke sikkert kendt, men diabetes hos patienter i PI-behandling er beskrevet at variere fra 1 til 6% [2]. I alt tre tilfælde er beskrevet, hvor ketoacidose opstod under HAART [3-5]. Fælles var PI-behandling 8-24 måneder forud for ketoacidosen. Ingen havde familiære dispositioner for diabetes. Hos to var der ikke infektion og negative autoantistoffer. I det tredje tilfælde var der pneumoni, mens tilstedeværelsen af autoantistoffer var ukendt. I alle tilfælde var der initialt insulinresistens og derefter gradvist faldende insulinbehov. Vores patient havde fået PI 18 måneder forud for ketoacidosen. Der var ikke infek-