

Abstract

Collagen XII is a non-fibrillar collagen of the fibril-associated collagen with interrupted triple helices (FACIT) family. Pathogenic *COL12A1* mutations cause myopathic Ehlers-Danlos syndrome (mEDS), a connective tissue disorder characterized by muscle hypotonia, joint hypermobility and kyphoscoliosis. This study aimed to expand the collagen XII interactome within the musculoskeletal extracellular matrix (ECM) and determine how collagen XII deficiency affects the peripheral nervous system in the context of muscle weakness. Structural modelling identified integrin $\alpha 2\beta 1$ as a potential receptor for collagen XII with two integrin-binding motifs within the collagen I and II domains of collagen XII. Surface plasmon resonance confirmed specific binding of collagen XII to integrin $\alpha 2\beta 1$ via the collagen I domain, while $\beta 1$ -integrin blockade reduced the adhesion of HaCaT keratinocytes to this domain. The collagen II domain also mediated cell adhesion, but this adhesion was unaffected by $\beta 1$ -integrin blockade, suggesting the involvement of a different, as yet unidentified receptor. Solid-phase assays further identified AEBP1, MFAP2, MFAP5, LTBP1, perlecan and thrombospondins (TSPs) 1, 2, 4, 5 as novel interaction partners of collagen XII. These proteins, several of which are associated with connective tissue disorders that share phenotypic features with mEDS, contribute to collagen fibrillogenesis, ECM assembly and TGF- β signaling. To assess the consequences of collagen XII deficiency in the peripheral nervous system, *Col12a1* knockout mice and mEDS patients were examined. Nerve conduction studies revealed reduced compound motor action potentials, whereas distal motor latencies and sensory nerve action potentials remained unchanged, indicating motor-specific transmission impairment. Immunofluorescence showed localization of collagen XII at the nodes of Ranvier, with knockout mice exhibiting disrupted gliomedin structures, indicating structural abnormalities of the nodal ECM. Furthermore, neuromuscular junctions in knockout mice were smaller, suggesting altered development or maintenance. Proteomic analyses of the sciatic nerve and gastrocnemius muscle revealed surprisingly few significantly altered proteins. In the sciatic nerve, mitochondrial proteins related to energy metabolism were upregulated, suggesting an adaptive metabolic response to collagen XII deficiency. In muscle, TSP2 was upregulated, potentially reflecting a compensatory ECM response, whereas several muscle-associated proteins were downregulated, consistent with changes reported in congenital myopathies.

Zusammenfassung

Kollagen XII ist ein nicht-fibrilläres Kollagen aus der Familie der fibrillenassoziierten Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT). Pathogene Mutationen in *COL12A1* verursachen das myopathische Ehlers-Danlos-Syndrom (mEDS), eine Bindegewebserkrankung, die durch Muskelhypotonie, Gelenkhypermobilität und Kyphoskoliose gekennzeichnet ist. Ziel dieser Studie war es, das Interaktom von Kollagen XII innerhalb der muskuloskelettalen extrazellulären Matrix (EZM) zu erweitern und zu untersuchen, wie sich ein Kollagen XII Mangel im Zusammenhang mit Muskelschwäche auf das periphere Nervensystem auswirkt. Strukturmodellierungen identifizierten Integrin $\alpha 2\beta 1$ als potenziellen Rezeptor für Kollagen XII, wobei zwei Integrin-Bindungsmotive innerhalb der Kollagen I- und Kollagen II-Domänen von Kollagen XII gefunden wurden. Oberflächenplasmonenresonanz bestätigte eine spezifische Bindung von Kollagen XII an Integrin $\alpha 2\beta 1$ über die Kollagen I-Domäne, während die Blockade von $\beta 1$ -Integrinen die Adhäsion von HaCaT-Keratinocyten an diese Domäne verringerte. Auch die Kollagen II-Domäne vermittelte Zelladhäsion, diese wurde jedoch durch die Blockade von $\beta 1$ -Integrinen nicht beeinflusst, was auf die Beteiligung eines anderen, bislang nicht identifizierten Rezeptors hindeutet. Bindungsassays identifizierten zusätzlich AEBP1, MFAP2, MFAP5, LTBP1, Perlecan sowie die Thrombospondine (TSPs) 1, 2, 4 und 5 als neue Interaktionspartner von Kollagen XII. Diese Proteine, von denen mehrere mit Bindegewebserkrankungen assoziiert sind, die phänotypische Merkmale mit mEDS teilen, tragen zur Kollagenfibrillogenese, zum Aufbau der EZM und zur TGF- β -Signalübertragung bei. Zur Untersuchung der Folgen eines Kollagen XII-Mangels im peripheren Nervensystem wurden *Col12a1* Knockout-Mäuse und Patienten mit mEDS untersucht. Nervenleitungsstudien zeigten verringerte Muskelsummenaktionspotenziale, während die distalen motorischen Latenzen und die sensorischen Nervenaktionspotenziale unverändert blieben, was auf eine motorspezifische Beeinträchtigung der Erregungsübertragung hindeutet. Immunfluoreszenzanalysen zeigten die Lokalisation von Kollagen XII an den Ranvier-Schnürringen, wobei Knockout-Mäuse gestörte Gliomedin Strukturen aufwiesen, was auf strukturelle Veränderungen der nodalen EZM hinweist. Darüber hinaus waren die neuromuskulären Endplatten der Knockout-Mäuse kleiner, was auf eine veränderte Entwicklung oder Aufrechterhaltung hindeutet. Proteomische Analysen des Ischiasnervs und des Gastrocnemius Muskels ergaben überraschend wenige signifikant veränderte Proteine. Im Ischiasnerv waren mitochondriale Proteine, die mit

dem Energiestoffwechsel in Verbindung stehen, hochreguliert, was auf eine adaptive metabolische Reaktion auf den Kollagen XII-Mangel hindeutet. Im Muskel war TSP2 hochreguliert, möglicherweise als Ausdruck einer kompensatorischen Reaktion der ZM, während mehrere muskelassoziierte Proteine herunterreguliert waren, was mit Veränderungen übereinstimmt, die bei kongenitalen Myopathien beschrieben wurden.