

University of Groningen

Revertant cell therapy for epidermolysis bullosa

Gostynski, Antoni

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Gostynski, A. (2014). *Revertant cell therapy for epidermolysis bullosa*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



SAMENVATTING

A. Gostynski

Center for Blistering Diseases, Department of Dermatology, University of Groningen,
University Medical Center Groningen, the Netherlands

9

123

Dit proefschrift weerspiegelt de zoektocht naar het begrijpen en gebruiken van revertant mozaïcisme bij de behandeling van de erfelijke huidziekte Epidermolysis Bullosa (EB). EB wordt veroorzaakt door verschillende mutaties in genen van epidermale hechtingseiwitten en wordt klinisch gekenmerkt door blaarvorming van de huid en slijmvliezen.

In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift beschrijven we de pathologische mechanismen achter EB. Daarnaast wordt het begrip revertant mozaïcisme geïntroduceerd en bespreken we de huidige stand van zaken van onderzoek naar behandelingen van EB. Op dit moment zijn er 18 genen geïdentificeerd welke, wanneer gemuteerd, tot EB kunnen lijden. Op basis van de huidige consensus wordt EB onderverdeeld in vier hoofdtypen en meer dan 30 subtypen. De classificatie vindt plaats op basis van het niveau van blaarvorming in de huid, de ernst van de ziekte, het aangetaste hechtingseiwit en de mutatie in het betrokken gen. Tevens geven we een gedetailleerd overzicht van de functies van de drie eiwitten die betrokken zijn bij de epidermale verbindingen in de huid. Deze eiwitten betreffen type XVII collageen (Col17), laminine-332 (lam-332) en type VII collageen (Col7). Mutaties in genen die coderen voor Col17 en lam-332 veroorzaken junctionele EB (JEB), terwijl mutaties in Col7 verantwoordelijk zijn voor de dystrofische variant van EB (DEB). Tot op heden bestaat er geen genezing voor EB. Momenteel worden er meerdere therapieën onderzocht en deze kunnen onderverdeeld worden in drie hoofdgroepen: gentherapie, eiwitvervangings therapie en celtherapie. Gentherapie is gericht op correctie van het aangetaste gen, eiwitvervangings therapie probeert de 'wild-type' vorm van het desbetreffende eiwit in het lichaam te introduceren, terwijl celtherapie autologe of allogene cellen gebruikt om de functie van de gemuteerde cellen over te nemen.

Dit proefschrift richt zich op een nieuwe methode om EB te behandelen, waarbij gebruik gemaakt wordt van het fenomeen van revertant mozaïcisme. Revertant mozaïcisme (RM) is een co-existentie van zieke (mutante) cellen en gezonde (revertante) cellen in één organisme. RM wordt ook vaak aangeduid als 'natuurlijke gentherapie'. Na de eerste beschrijving van RM bij een patiënt met de ziekte van Lesch-Nyhan in 1988 werd dit fenomeen ook gesignaleerd bij het Wiskott-Aldrich Syndroom (WAS), Fanconi anemie en EB. Er zijn verschillende mechanismen beschreven die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor RM, zoals een vervanging van enkele basenparen of een tweede mutatie. Het volledige overzicht van deze mechanismen is te vinden in **Hoofdstuk 1**. Bij aangedane patiënten kunnen veel verschillende correctiemechanismen voorkomen. Zo werden 38 verschillende reversies gevonden bij een patiënt met WAS.

De presentatie van RM in de huid werd voor het eerst beschreven in 1995 bij een patiënt met JEB. Tussen aangedane huidgebieden op de arm van deze patiënt werd gezond uitziende huid gevonden. Immunofluorescentiekleuringen van huidbiopten van gezond uitziende huid toonden aanwezigheid van Col17, terwijl de huidbiopten van de aangedane huid negatief waren voor

dit eiwit. De moleculaire verklaring volgde in 1997. De patiënt bleek mutaties in het *COL17A1* gen te hebben dat codeert voor het type XVII collageen (Col17) eiwit. In de cellen met normale Col17 aankleuring bleek één van de twee recessieve mutaties verdwenen door een genconversie. Deze huidcellen werden revertant genoemd, en de aanwezigheid van normale plekken huid werd revertant mozaïcisme gedoopt. Sinds 1997 is RM gevonden bij veel JEB en DEB patiënten, en wordt aangenomen dat bij alle patiënten die zijn aangedaan door mutaties in *COL17A1* sprake is van revertante plekken. De aanwezigheid van gezonde cellen in een aangedane patiënt is een unieke kans voor autologe celtherapie. In het verleden zijn verschillende werkwijzen gebruikt voor huidtransplantaties in de behandeling van brandwonden en chronische wonden. Het doel van revertante celtherapie is om door middel van transplantatie van revertante keratino-cyten het revertante huidoppervlak te vergroten.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we een poging om het revertante huidoppervlak te vergroten bij een patiënt met gegeneraliseerde intermediaire JEB (JEB-gen-intermed) door Col17 deficiëntie. De patiënt had een maternale 'frame shift' mutatie in exon 18 (c.1601delA) en een paternale 'nonsense' mutatie in exon 51 (c.3676C>T). Deze patiënt had meerdere gebieden van revertante huid. In een aantal van die gebieden werd onderstaand correctiemechanisme geïdentificeerd. Een deel van het paternale allel van *COL17A1*, welke een gezonde kopie van exon 18 bevatte, was verplaatst naar het tweede chromosoom. Daardoor werd de c.1601delA mutatie gecorrigeerd, wat resulteerde in een allel met een paternale mutatie en een 'wild-type' allel. Een huidbiopt werd genomen van een natuurlijk gecorrigeerde revertant gebied op de arm. Dit werd vervolgens *in vitro* gekweekt om twee 6x7 cm epidermale transplantaten te verkrijgen. Het wondbed werd voorbereid met "adhesive tape stripping" - een innovatieve methode die het pathologische mechanisme van EB gebruikt van verminderde adhesie in de lamina lucida. Kort gezegd werd er tape geplaatst op de dij van de patiënt en werden vervolgens rondom kleine incisies gemaakt. Het gebrek aan adhesies door de mutaties in *COL17A1* resulteerde in loslating van de epidermis bij het lostrekken van de tape. De huidtransplantaten werden op het geprepareerde wondbed geplaatst en het genezingsproces verliep succesvol en ongecompliceerd. De functionele test toonde helaas geen reversie van het EB fenotype en dus ook geen uitbreiding van het revertante huidoppervlak. Analyse van de huidbiopten, gekweekte cellen en epidermale huidtransplantaten liet een daling zien van het percentage revertante cellen tot 50% in het huidbiopt en tot minder dan 3% in het huidtransplantaat. De reden voor een dergelijke daling was op dat moment onbekend.

Hoofdstuk 3 beschrijft een diermodel voor de revertante celtherapie voor EB. In dit hoofdstuk hebben we gekeken naar de overleving van revertante cellen tijdens celisolatie, transplantaatproductie en transplantatie op immuundeficiënte muizen. Er werd een biopt gebruikt uit hetzelfde revertante gebied van de in **Hoofdstuk 2** beschreven patiënt. Van de geïsoleerde keratinocyten en fibroblasten bleek het percentage revertante cellen na de eerste passage 40% te zijn. Dit percentage daalde tot 25% en 20% na respectievelijk de tweede passage en in de (uiteindelijke) gekweekte huidequivalenten. We transplanteerden de huidequivalenten met 20% revertante cellen op de immuundeficiënte muizen en bepaalden na 10 en 16 weken het percentage revertante huidgebieden. Op beide meetpunten was er nog steeds 20% revertante cellen aanwezig, dit betekent dat langdurige overleving mogelijk is van revertante keratinocyten *in vivo*. Tevens werd het kolonievormende potentieel van revertante keratinocyten beschreven. Revertante keratinocyten bleken een hoge capaciteit te hebben om kolonies te vormen, echter waren deze kolonies kleiner van grootte dan de door de mutante cellen gevormde kolonies. In combinatie met recent gepubliceerd werk dat de invloed van Col17 op immunomodulatie en NF-kB niveaus beschrijft, gaf deze bevinding ons een uitgangspunt om een theorie over het terugbrengen van het percentage Col17 revertante cellen tijdens *in vitro* expansie te formuleren. Deze theorie wordt inhoudelijk beschreven in **Hoofdstuk 7**.

Hoofdstuk 4 beschrijft een andere benadering van de revertante celtherapie, waarbij *in vitro* expansie van revertante cellen wordt overgeslagen en natuurlijk gecorrigeerde huid direct getransplanteerd kan worden naar de acceptorplaats. Met succes hebben wij een 69-jarige patiënt behandeld door middel van revertante bioptransplantatie. Deze patiënt had een JEB-gen-termined als gevolg van een homozygote (c.628G>A) mutaties in het *LAMB3* gen. Al eerder werden bij deze patiënt meerdere revertante huidgebieden geïdentificeerd. Immunofluorescentiekleuring op een huidbiopt van de mutante huid toonde een sterk verminderde aankleuring voor lam-332, terwijl in de revertante huid een normale aankleuring voor lam-332 werd waargenomen. In 2012 presenteerde deze patiënt zich met meerdere, chronische ulcera die meer dan 1 jaar bestonden. We gebruikten een eerder geïdentificeerd revertant huidgebied op zijn rechter schouder als donorplek en oogsten 73 huidbiopten die werden teruggeplaatst in de ulcera. Alle biopten groeiden in, en de ulcera genazen binnen 2 weken. In de daaropvolgende 18 maanden werden geen nieuwe blaren of ulceraties in de behandelde gebieden waargenomen. Huidbiopten van de donor- en de acceptorplaats toonden re-epithelisatie, waarbij de revertante epidermis normale aankleuring voor lam-332 liet zien. Dit onderzoek toonde dat bij de behandeling van EB door middel van toepassing van revertante cellen een succesvolle uitbreiding van het revertante huidoppervlak verkregen kan worden.

Revertant mozaïcisme is een bron van natuurlijk gecorrigeerde cellen voor behandeling en is een interessant fenomeen omdat dit het mogelijk maakt om twee genetisch verschillende celpopulaties binnen het lichaam te bestuderen. In **Hoofdstuk 5** onderzoeken we waarom revertante huid gehyperpigmenteerd is bij patiënten met revertant mozaïcisme en *COL17A1* mutaties, in tegenstelling tot de mutante huid. We vergeleken het fenotype van mutante en revertante huid in een populatie van 13 patiënten met EB en revertant mozaïcisme met mutaties in *COL17A1* (n = 8), *LAMB3* (n = 2) en *COL7A1* (n = 3). In de afgenomen huidbiopten van zowel revertante als mutante huid hebben we de hoeveelheid pigment en de dichtheid van melanocyten bestudeerd. In de *COL17A1* groep werd een klinisch verschil in pigmentatie gevonden, welke niet aanwezig was in de andere twee groepen. In Col17 revertante huid vonden we meer pigment in de Fontana-Masson kleuring, daarnaast was de dichtheid van melanocyten significant hoger in de groep met revertante huid ten opzicht van de groep met mutante huid. Patiënten met mutaties in *LAMB3* toonden echter een lagere dichtheid van melanocyten en de hoeveelheid pigment in zowel de revertante als de mutante huidgebieden. Mutaties in *COL7A1* hadden geen correlatie met de hoeveelheid pigment of dichtheid van melanocyten. Wij concludeerden uit de studie in **Hoofdstuk 5** dat de pigmentatie afhankelijk is van Col17 en dat lam-332 een negatieve invloed zou kunnen hebben op de proliferatie van melanocyten en daarmee op pigmentatie. Het is nog onbekend hoe de eiwitten in de epidermale basaalmembraan zone de pigmentatie en dichtheid van melanocyten reguleren. Col17 lijkt echter een belangrijke rol te spelen bij ontstekingsreacties, communicatie tussen cellen en de overleving van de stamcellen van melanocyten, terwijl lam-332 de proliferatie van melanocyten zou kunnen beïnvloeden. Deze hypothese zou in de toekomst verder onderzocht moeten worden.

Tijdens mijn promotie-traject werden ook andere theorieën en hypothesen getest om uitbreiding van het revertante huidoppervlak te bereiken. In **Hoofdstuk 6** worden drie experimenten beschreven die niet een succes zijn geweest, maar mogelijk een belangrijke rol spelen bij de verdere ontwikkeling van revertante celtherapie. In het eerste gedeelte wordt een poging gedaan de revertante en mutante cellen te scheiden op basis van een mogelijk verschil in de aanhechtingsskracht. Helaas hebben keratinocyten meer aanhechtingseiwitten dan alleen Col17 en bleken de gebruikte krachten niet voldoende om een verschil te laten zien tussen beide celpopulaties. Daarnaast werd er een protocol ontwikkeld om levende keratinocyten met het 233 monoclonaal antilichaam gericht tegen Col17 aan te kleuren en vervolgens te scheiden door het gebruik van flow cytometrie. Helaas is flow cytometrie vanwege veiligheidsmaatregelen niet geschikt voor klinische toepassing, maar deze kan mogelijk verdere experimenten met revertante keratinocyten vereenvoudigen.

Het tweede deel van **Hoofdstuk 6** bespreekt een poging om de experimenten van **Hoofdstuk 3** te herhalen met Col7 revertante cellen. Een biopt werd genomen van een revertant huidgebied van de onderarm van een patiënte met recessieve dystrofische EB (RDEB) door mutaties in het *COL7A1* gen. Cellen werden geïsoleerd en gekweekt, waarna huidtransplantaten werden gemaakt en getransplanteerd op muizen zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**. In het biopt dat eerder van dezelfde patiënte afgenomen is, was 85% van de epidermis revertant. In de kweek van het nieuwe biopt was slechts 10% van de cellen revertant. In de op de muizen getransplanteerde huid werden na 10 en 16 weken geen revertante cellen gevonden. Wij denken dat het lage percentage van revertante cellen in het biopt een oorzaak was voor het niet succesvol verlopen van het experiment. Daarom zou Col7 revertante celtherapie verder onderzocht moeten worden.

Het laatste experiment dat beschreven wordt in **Hoofdstuk 6** betreft een transplantatie van niet-gekweekte keratinocyten-in-oplossing bij een patiënt eerder beschreven in **Hoofdstuk 4**.

Een chronisch ulcus cruris van deze patiënt werd behandeld met een oplossing van epidermale cellen, geogst uit zijn revertante huidgebied op de rechterschouder met behulp van een ReCell Kit®. Helaas werd complete genezing niet bereikt. De meest waarschijnlijke oorzaak is slechte wondgenezing door de hogere leeftijd en het onderliggend arterieel vaatlijden. Wij denken dat er een deel van de getransplanteerde cellen wel degelijk is ingegroeid, omdat het oorspronkelijke ulcus zes weken na de ingreep in tweeën verdeeld werd door gezond ogende huid. Dit gezond ogende huidgebied bleef stabiel tijdens de 7 maanden durende follow-up. Om antwoord te geven op de vraag of deze methode verder gebruikt kan worden voor revertante celtherapie is een klinische trial nodig met een goed voorbereide acceptor plek.

Hoofdstuk 7 van dit proefschrift geeft een overzicht van de bevindingen uit de **Hoofdstukken 2 t/m 6** en bespreekt de voordelen en nadelen van revertante celtherapie als een behandeling om EB te genezen. Momenteel zijn we in staat om een beperkt huidoppervlak te behandelen door middel van revertante biopttransplantaties. In de nabije toekomst hopen we nieuwe technieken in te kunnen zetten om revertante cellen te transplanteren met en zonder *in vitro* expansie, afhankelijk van de behoeften van de patiënt. Daarnaast wordt het toekomstige gebruik van geïnduceerde pluripotente stamceltechnologie besproken, zodat een populatie van natuurlijk gecorrigeerde stamcellen gebruikt zou kunnen worden om EB plaatselijk (met huidtransplantaten) of systemisch (via infuus) te behandelen.

9

130