

University of Groningen

## Substantiating atypical phenotypes of epidermolysis bullosa

Gostynska, Katarzyna Barbara

**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:*  
2016

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

*Citation for published version (APA):*

Gostynska, K. B. (2016). *Substantiating atypical phenotypes of epidermolysis bullosa*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

**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

Katarzyna B. Gostyńska

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

In dit proefschrift worden studies beschreven die zich concentreren op de moleculaire diagnostiek van epidermolysis bullosa (EB). De studies zijn tot stand gekomen door de samenwerking van het Centrum voor Blaarziekten van de afdelingen Dermatologie en Genetica van het Universitair Medisch Centrum Groningen, Nederland.

Het doel van de studies was tweeledig: I) het beschrijven en verklaren van atypische fenotypes binnen het EB spectrum met een nauwkeurige beschrijving van de verschillende klinische fenotypes, ondersteund door functionele en moleculaire studies. Het doel van deze studies was het verbeteren van de huidige kennis omtrent de specifieke adhesie moleculen die betrokken zijn bij EB; en II) het oplossen van de zogenaamde "cold cases" binnen EB. Dit betreft EB patiënten bij wie een moleculaire diagnose tot op heden nog ontbreekt. Hierbij richtte het onderzoek zich met name op patiënten met (basale) epidermolysis bullosa simplex (EBS). Dit is de grootste groep van EB patiënten binnen de Nederlandse EB database.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de nieuwe isovorm specifieke mutatie die geïdentificeerd werd binnen de 1a isoform van *PLEC*. We onderzochten twee zussen geboren uit een consanguin huwelijk (een huwelijk tussen twee familieleden). Beide zussen leden sinds de leeftijd van 1,5 jaar aan milde blaarvorming van de huid. Vanaf driejarige leeftijd ontwikkelden ze onychodystrofie (abnormale nagels) van de handen- en teennagels. De blaarvorming ontstond gegeneraliseerd over het lichaam in hun puberteit, waarbij de huidlaesies genazen met littekenvorming en hyperpigmentatie. De slijmvliezen en het tandvles waren niet aangedaan. Met routine immunofluorescentie (IF) antigeen mapping van laesionale (aangedane) huid werd intra-epidermale splijting in de onderste lagen van de basaalcellen gezien, wat wijst op een pseudojunctionele splijting, passend bij EBS. In vergelijking met huid van gezonde controles, toonde de huid van deze aangedane zussen een verminderde intensiteit van de kleuring met antilichamen tegen alle isovormen van plectine (10F6). De kleuring met een 1a isovorm specifiek puur antilichaam (plectine-1a) was negatief bij aangedane huid. Transmissie electronen microscopie (TEM) toonde hypoplastische desmosomen en intra-epidermale pseudojunctionele splijting in de epidermis. Met mutatie analyse werd een homozygote nonsense mutatie in de 1a isoform (P1a), c46C>T, geïdentificeerd, resulterend in een prematuur stopcodon, p.Arg16Ter. Om de gevolgen van mutaties in P1a op het uiteindelijke fenotype verder te onderzoeken werd IF onderzoek verricht op gestreept spierweefsel en myocard van gezonde humane kadavers om de expressie van 10F6 en P1a in deze weefsels bij gezonde controles nader te bestuderen. In beide weefsels kwam P1a niet tot expressie, terwijl het antilichaam gericht tegen het gezamenlijke plectine epitoom wel duidelijk aankleurde ter plaatse van de Z-discs van gestreept spierweefsel en de intercalated discs van het myocard. Nader onderzoek door een neuroloog en cardioloog toonde inderdaad geen tekenen van myopathie of cardiomyopathie bij de zussen. Op basis van aanvullende functionele studies konden we concluderen dat de 1a isoform van plectine de dominante plectine isoform in de basaallaag van de epidermis is. Dit werd aangetoond door: 1) het identieke patroon van plectine 1a en van pan-plectine in huid door IF kleuring; 2) een 84% afname van pan-plectine polypeptide met Western blotting op keratinocyten extract van patiënten en 3) een hoger aantal plectine 1a mRNA transcripten in gekweekte humane keratinocyten. De nieuwe mutatie die wij identificeerden bij deze twee zussen

leidde tot een nieuwe plectinopathie veroorzaakt door een P1a tekort, resulterend in EBS beperkt tot de huid.

In **hoofdstuk 3** zetten we het onderzoek naar onconventionele *PLEC* genotypes voort door een "cold case" patiënt te onderzoeken met klinische verschijnselen van EBS gepaard gaande met progressieve spierdystrofie door onbekende oorzaak. Derhalve valt deze patiënt binnen het subtype EBS met musculaire dystrofie (EBS-MD). Het betreft een jonge vrouw van consanguïne ouders die sinds kort na de geboorte lijdt aan acrale blaarvorming en nageldystrofie. In de puberteit ontwikkelde ze tevens skeletspierdystrofie. IF kleuringen met pan-plectine antilichamen toonden een sterk gereduceerde expressie van plectine. TEM toonde een pseudojunctionele splijting. De neuroloog en cardioloog diagnosticeerden respectievelijk myopathie en cardiomyopathie. De vader en broer van patiënte waren op jonge leeftijd overleden aan plotselinge hartdood, en twee van haar drie zussen leden aan cardiomyopathie. Binnen de familie had haar broer ook blaarvorming gehad. Haar klinisch fenotype gecombineerd met de resultaten van de onderzochte huidbiopten suggereerden *PLEC* als kandidaat gen. Met de initiële mutatie screening met Sanger sequencing van de 32 coderende exonen van *PLEC*, inclusief intron/exon overgangen, werden geen mutaties geïdentificeerd. Aangezien de functionele onderzoeken en het klinisch beeld zeer verdacht waren voor EBS-MD, werd het *PLEC* gen opnieuw nauwkeurig gescreend, inclusief de complete intronisch sequenties. Er werd een homozygote deletie, c.906+19\_40del, in intron 8 van de index patiënte gevonden. In de opvolgende mRNA studies werd gebruik gemaakt van geïsoleerd RNA uit keratinocyten van de index patiënte. Deze studies toonden retentie van intron 8 leidend tot een frameshift en prematuur stopcodon, p.Val303\_Pro313ins11\*. Deze mutatie duidde erop dat er waarschijnlijk een compleet verlies van plectine expressie was, doordat alle isovormen aangedaan waren. Een onverwachte bevinding tijdens de RNA analyse was een additioneel transcript welke 12 nucleotiden korter bleek te zijn dan het wildtype transcript. Dit product was het resultaat van het gebruik van een alternatieve splice site, 12 baseparen opwaarts van de exon 8 splice donor site. Het gebruik van deze splice site resulteerde in de productie van een plectine eiwit dat 4 aminozuren miste van het actine bindende domein van plectine. Dit iets te korte eiwit verklaart het resterende, maar gereduceerde, plectine signaal in de huid van de index patiënte. De locatie van de homozygote nul mutatie in de index patiënte komt normaal gesproken overeen met het lethale subtype van EBS die gepaard gaat met pylorus atresie (EBS-PA). Door het gebruik van de alternatieve splice site werd de ontwikkeling van EBS-PA echter afgewend en ontwikkelde de patiënte een minder ernstige vorm van EBS-MD. Het kortere transcript werd tevens aangetoond in gezonde controle huid, gestreept spierweefsel en myocard. Een tot op heden onbekende fysiologische plectine isovorm heeft er middels alternatieve splicing voor gezorgd dat patiënte uiteindelijk een mildere vorm van EB had ontwikkeld.

In **hoofdstuk 4** bestudeerden we de tweede EBS "cold case" familie. Het betrof een Nederlandse familie met veel aangedane individuen binnen vier generaties. Dit subtype, EBS, generalized severe wordt in de meerderheid van de gevallen veroorzaakt door autosomale missense mutaties die de noodzakelijke "coiled coil" formatie van de keratine heterodimeren aantasten. Alle aangedane familieleden presenteerden zich met aplasia cutis bij de geboorte, herpetiforme blaarvorming van de huid en slijmvliesen die verbeterden bij het ouder worden en palmoplantaire keratoderma. In het kader van functionele

studies werden huidbiopten genomen van de 50-jarige vrouwelijke index patient. Met IF onderzoek werd intra-epidermale splijting van de basaallaag en een onveranderde expressie van keratine 5 en 14 gezien. TEM toonde laterale aggregatie van keratinefilamenten, onvoldoende insertie van tonofilamenten in de hemidesmosomen en acantholyse. Mutatie analyse van *KRT5* bij alle aangedane individuen toonde een heterozygote intronisch deletie c.1218+2\_1218+31del. De deletie resulteerde op mRNA niveau in een in-frame skipping van exon 6 op *KRT5*, welke het klassieke EBS, generalized severe fenotype verklaarde. Het interessante aan deze casus is dat het wederom een intron betreft die de pathogene mutatie draagt. Dit is de eerste casus van in-frame exon skipping in *KRT5* leidend tot EBS, generalized severe en deze casus benadrukt nogmaals het belang van het screenen van intronen bij onopgeloste EBS casussen.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we tandglazuur pathologie bij junctionele EB (JEB). Glazuurdefecten van het hele gebit zijn een universeel kenmerk van JEB. Recentelijk ontdekte onze groep dat heterozygote dragers van nul mutaties in *LAMA3* subtiele pitting van het tandglazuur toonden zonder dat er sprake was van fragiliteit van de huid. Wij ontdekten twee nieuwe *LAMA3* functionele nul mutaties: nonsense c.2377C>T (p.Arg793Ter) en splice site c.4684+1G>A mutaties in heterozygote dragers met focaal glazuur hypoplasie en putjes. Beide ouders hadden kinderen met JEB, en hadden subtiele tandglazuur pitting van het secundaire gebit zonder dat er sprake was van blaarvorming op de huid. Wij toonden aan dat de splice site mutatie c.4684+1G>A zich gedraagt als een *LAMA3* nul mutatie, aangezien minder dan 2% expressie van intact laminine  $\alpha 3$  eiwit werd gezien in de immunoblot die verricht werd met keratinocyten van het aangedane kind. Glazuurdefecten zijn bij dragers van nul *LAMA3* mutaties milder dan bij dragers van dominant-negatieve *LAMB3* mutaties. We concludeerden dat milde, focale glazuurafwijkingen een gevolg kunnen zijn van haploinsufficiëntie van de  $\alpha 3$  keten van laminine 332.

Het belang van het onderkennen van fenotypische kenmerken binnen het uitgebreide klinische spectrum van EB wordt wederom onderstreept in **hoofdstuk 6**, ditmaal in een subtype van dystrofische EB (DEB) die zich presenteerde met intense jeuk. Twee jonge niet-gerelateerde vrouwen met dominante DEB door heterozygote glycine substitutie mutaties werden bestudeerd. Door de intense jeuk van beide patiënten werd dit subtype verder geclassificeerd binnen DEB, namelijk EB pruriginosa (EBP). De vrouwen hadden jeuk ter plaatse van het decolleté en het gelaat. Een presentatie die niet eerder beschreven werd bij EBP in de literatuur. Opmerkelijk bij deze twee patiënten was dat de jeuk niet begon op de klassieke voorkeurlocaties, zoals de pretibiale huid, en niet leidde tot de vorming van paarsachtige papels en plaques na traumatisch krabben. De jeuk was niet secundair aan EB laesies, maar gelokaliseerd op intacte niet ontstoken huid van het gelaat en het decolleté. Door compulsief krabgedrag ontwikkelden zich excoriaties die sterk leken op neurotische artefacten. Psychogene oorzaken werden uitgesloten. Wij classificeerden deze presentatie als EBP-excoriëe.

Tenslotte worden onze bevindingen bediscussieerd in **hoofdstuk 7** in het licht van de nieuwste genetische sequencing technieken. In dit hoofdstuk geven we ook suggesties voor een overzichtelijke klinische benadering van onopgeloste genetische casuïstiek binnen EB.



