



Revertant mozaïcisme: natuurlijke gentherapie voor epidermolysis bullosa

M.C. Bolling¹, P.C. van de Akker², A.M.G. Pasmooij³

Eind jaren '80 raakte Marcel Jonkman, werkzaam bij de afdeling Dermatologie van het Universitair Medisch Centrum Groningen, geïntrigeerd door de ernst en de nog te ontdekken pathogenese van blaarziekten, in het bijzonder genetisch bepaalde en auto-immuun blaarziekten. Het Centrum voor Blaarziekten in Groningen was geboren.

Epidermolysis bullosa (EB) is de benaming voor de groep van erfelijke, klinisch en moleculair heterogene aandoeningen gekenmerkt door verhoogde mechanische huid- en slijmvlies-fragiliteit, met blaren en wonden als gevolg. Over de jaren is de consensus over de classificatie van de subtypen EB menigmaal veranderd. Thans worden vier hoofdtypen onderscheiden gebaseerd op het niveau van slijting in de huid, namelijk EB simplex (EBS) met slijting door de basale keratinocyten, junctionele EB (JEB) met slijting door de lamina lucida van de basaalmembraan zone, dystrofische EB (DEB) met een slijting net onder de lamina densa in de oppervlakkige dermis, en Kindler EB (KEB) met slijting op al bovengenoemde niveaus (figuur 1). Voor een uitgebreide uiteenzetting van de kliniek en het onderliggende moleculaire defect, verwijzen wij naar de laatste twee consensus papers. [1,2] De meeste vormen van EB betreffen ernstige en invaliderende aandoeningen gekenmerkt door uitgebreide blaren, wonden, wondgenezingsproblemen, verlittekening, en potentieel orale, laryngo-faryngeale, oculaire, en genitale betrokkenheid. Daarnaast ontstaan bij patiënten met ernstige recessieve DEB tussen de 2^e en 4^e decade agressieve plaveiselcelcarcinomen met een hoge mortaliteit binnen 3 jaar na ontstaan van het

eerste plaveiselcelcarcinoom. Ook bij JEB en KEB is het risico op agressieve plaveiselcelcarcinomen op atypische lokalisaties verhoogd, zij het op latere leeftijd. Bij EB kan er sprake zijn van systeembetrokkenheid door het primaire moleculaire defect, wanneer het gen met de oorzakelijke mutatie(s) codeert voor een eiwit dat ook belangrijk is voor het functioneren van een ander orgaan, zoals bijvoorbeeld het hart, de nieren of de spieren. Daarnaast kunnen de ernst van de blaren, de wonden en de chronische inflammatie leiden tot bloedarmoede, voedingsdeficiënties en secundaire systeembetrokkenheid. Al met al is EB een aandoening met een enorme impact op de kwaliteit van leven van zowel patiënten als hun omgeving. Helaas is er nog geen curatieve en zelfs geen ziekte-modificerende behandeling beschikbaar. De zorg is met name gericht op zo goed als mogelijke huidzorg, het uitstellen van complicaties en indien aanwezig en mogelijk deze te behandelen, en het bieden van hulp bij het omgaan met deze ziekte op diverse vlakken in het dagelijks leven. Wel zijn er veelbelovende studies onderweg, zowel pre-klinisch als klinisch, waarbij onderzoekers op verschillende manieren pogen het moleculaire defect (lokaal) te corrigeren, dan wel het pathomechanisme te modificeren.



Figuur 1. Schematische weergave van de slijtingsniveaus van de hoofdvormen van EB, van links naar rechts EBS, JEB en DEB (KEB kan op alle niveaus slijting geven).

¹ Dermatoloog, Centrum voor Blaarziekten, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen

² Klinisch geneticus, Centrum voor Blaarziekten, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen

³ Bioloog, Centrum voor Blaarziekten, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen

Eén van die intrigerende ontwikkelingen begon met de ontdekking van een fenomeen dat revertant mozaïcisme werd genoemd bij patiënten met EB. Deze ontdekking deed Jonkman begin jaren '90 en alsmede het genetisch mechanisme erachter. Zijn publicatie verscheen in het vooraanstaande tijdschrift *Cell* in 1997. [3] Revertant mozaïcisme betreft het fenomeen dat door een lokale, additionele, waarschijnlijk vroeg-embryonaal ontstane, genetische verandering de gevolgen van de oorspronkelijke genetische kiembaan mutatie(s) ongedaan gemaakt worden, waardoor er weer een plek als gezond functionerende huid is ontstaan (figuur 2). Dit wordt ook wel natuurlijke genterapie genoemd. Op huid van patiënten met de ernstigere vormen van EB zijn deze plekken herkenbaar aan het normale, niet-verlittekende aspect met aanwezigheid van adnexen, en een normale resistentie tegen wrijving. Patiënten kunnen de revertante plekken vaak zelf uitstekend aangeven. In de jaren na deze publicatie bleek dat deze revertante plekken geen zeldzaamheid zijn bij patiënten met EB en inmiddels gaat men ervan uit dat alle patiënten met JEB deze plekken zouden moeten hebben. [4] Tevens werd ook bij alle andere vormen van EB naast JEB (KEB, DEB en EBS) dit fenomeen van revertant mozaïcisme aangetoond. [5,6,7] In het kader van een potentiële (lokaal) curatieve behandeling voor EB was meteen de potentie duidelijk van de revertante plekken bij EB patiënten. Het principe om cellen uit de revertante plekken te gebruiken om andere aangedane plekken bij dezelfde patiënt te genezen, heet revertante celtherapie. Dit idee zou als groot voordeel hebben dat er geen potentieel gevaarlijke genetische correctie meer hoeft plaats te vinden. Daarnaast betreft het lichaamseigen weefsel, wat de kans op afstoting verkleint. Nadelen zijn dat het vaak maar kleine plekken betreft waardoor maar betrekkelijk weinig cellen verkregen kunnen worden voor bijvoorbeeld het direct transplanteren van revertante biopten of het genereren van revertante huidtransplantaten. Ook is de optimalisatie van isolatie van langlevende revertante stamcellen en het laten uitgroeien van een groter autoloog huidtransplantaat hieruit een arbeidsintensief proces met vele drempels gebleken.

Desalniettemin verschenen in 2014 de resultaten van een succesvolle stansbiopt transplantatie van revertante huid naar een aangedaan stuk huid (wond) van een patiënt met JEB door mutaties in het *LAMB3* gen. [8] Een eerdere studie waarbij na afname van een biopt van een revertante plek gepoogd werd de revertante keratinocyten uit te laten groeien tot grotere transplantaten mislukte echter doordat de revertante cellen verloren gingen gedurende het kweekproces. [9] Dus alhoewel deze cellen *in vivo* een groeivoordeel lijken te hebben, mogelijk binnen een bepaalde 'window of opportunity' in de embryonale fase, lijkt dit groeivoordeel *in vitro* niet te bestaan. [10] Ondanks deze tegenslag toonden onderzoekers in een recente studie aan in staat te zijn om *ex vivo* genetisch gecorrigeerde autologe keratinocyten (dus geen revertante keratinocyten) uit te laten groeien tot grotere huidtransplantaten en deze succesvol terug te transplanteren bij een jonge patiënt met JEB. [11] De 'holy grail' voor het gebruik maken van de 'natuurlijke genterapie' met revertante huid zou wel eens kunnen liggen in het combineren van de daar gebruikte



Figuur 2. Een afgetekende revertante plek te midden van aangedane huid van een patiënt met JEB.

kweektechnieken en de selectie van lang levende revertante stamcellen. Daarnaast zal onderzoek naar, en optimalisatie van, de meest geschikte graft methode moeten plaatsvinden. Deze onderzoeken zullen we in Groningen continueren.

Een alternatieve methode om tot een oneindige bron van revertante patiënt-eigen cellen te komen, zou de met de Nobelprijs bekroonde techniek van het creëren van *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) van revertante huidcellen kunnen zijn. Huidtransplantaten gecreëerd uit revertante iPSCs leken in een muismodel zeer veel belovend. [12] iPSC afgeleide cellen en weefsels worden echter nog niet veilig genoeg geacht om *in vivo* op mensen toe te passen.

Concluderend lijkt revertant mozaïcisme bij EB patiënten een veelbelovende bron voor potentieel lokale, en mogelijk zelfs systemische, behandeling van EB. De ontdekking van het bestaan ervan in EB patiënten, de mechanismen, en het daaropvolgende onderzoek verricht door Jonkman en zijn team in Groningen, hebben hiervoor de basis gelegd. Het onderzoek naar revertant mozaïcisme en de daadwerkelijke toepassing als therapie bij patiënten met EB wordt in het Centrum voor Blaarziekten voortgezet.

LITERATUUR

1. Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, Fine JD, Heagerty A, Hovnanian A, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Moss C, Murrell DF, Palissson F, Schwieger-Briel A, Sprecher E, Tamai K, Uitto J, Woodley DT, Zambruno G, Mellerio JE. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders

- with skin fragility. *Br J Dermatol*. 2020 Oct;183(4):614-627. doi: 10.1111/bjd.18921. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32017015.
2. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Mellerio JE, Moss C, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Woodley D, Zambruno G. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Jun;70(6):1103-26. doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.903. Epub 2014 Mar 29. PMID: 24690439.
 3. Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, Owaribe K, Pulkkinen L, Uitto J. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*. 1997 Feb 21;88(4):543-51. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81894-2. PMID: 9038345.
 4. Pasmooij AM, Nijenhuis M, Brander R, Jonkman MF. Natural gene therapy may occur in all patients with generalized non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa with COL17A1 mutations. *J Invest Dermatol*. 2012 May;132(5):1374-83. doi: 10.1038/jid.2011.477. Epub 2012 Feb 9. PMID: 22318390.
 5. Kiritsi D, Garcia M, Brander R, Has C, Meijer R, Jose Escámez M, Kohlhase J, van den Akker PC, Scheffer H, Jonkman MF, Del Rio M, Bruckner-Tuderman L, Pasmooij AMG. Mechanisms of natural gene therapy in dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2097-2104. doi: 10.1038/jid.2014.118. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24577406.
 6. Schuilenga-Hut PH, Scheffer H, Pas HH, Nijenhuis M, Buys CH, Jonkman MF. Partial revertant mosaicism of keratin 14 in a patient with recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*. 2002 Apr;118(4):626-30. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01715.x. PMID: 11918708.
 7. Kiritsi D, He Y, Pasmooij AM, Onder M, Happel R, Jonkman MF, Bruckner-Tuderman L, Has C. Revertant mosaicism in a human skin fragility disorder results from slipped mispairing and mitotic recombination. *J Clin Invest*. 2012 May;122(5):1742-6. doi: 10.1172/JCI61976. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22466645; PMCID: PMC3336993.
 8. Gostyński A, Pasmooij AM, Jonkman MF. Successful therapeutic transplantation of revertant skin in epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Jan;70(1):98-101. doi: 10.1016/j.jaad.2013.08.052. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24176523.
 9. Gostyński A, Deviaene FCL, Pasmooij AMG, Pas HH, Jonkman MF. (2009). Adhesive stripping to remove epidermis in junctional epidermolysis bullosa for revertant cell therapy. *British Journal of Dermatology*, 161(2), 444-447.
 10. Van den Akker PC, Pasmooij AMG, Joenje H, Hofstra RMW, Te Meerman GJ, Jonkman MF. A "late-but-fitter revertant cell" explains the high frequency of revertant mosaicism in epidermolysis bullosa. *PLoS One*. 2018 Feb 22;13(2):e0192994. doi: 10.1371/journal.pone.0192994. PMID: 29470523; PMCID: PMC5823395.
 11. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klaussegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Biccato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*. 2017 Nov 16;551(7680):327-332. doi: 10.1038/nature24487. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29144448; PMCID: PMC6283270.
 12. Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, Cerise JE, Guo Z, Levy B, Gostyński A, Rothman LR, Jonkman MF, Christiano AM. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med*. 2014 Nov 26;6(264):264ra164. doi: 10.1126/scitranslmed.3009342. PMID: 25429057.

CORRESPONDENTIEADRES

Marieke Bolling
E-mail: m.c. bolling@umcg.nl