

# De queeste naar nieuwe genen in het land van genodermatosen

M.C. Bolling

*Dermatoloog, afdeling Dermatologie, Universitair Medisch Centrum Groningen*

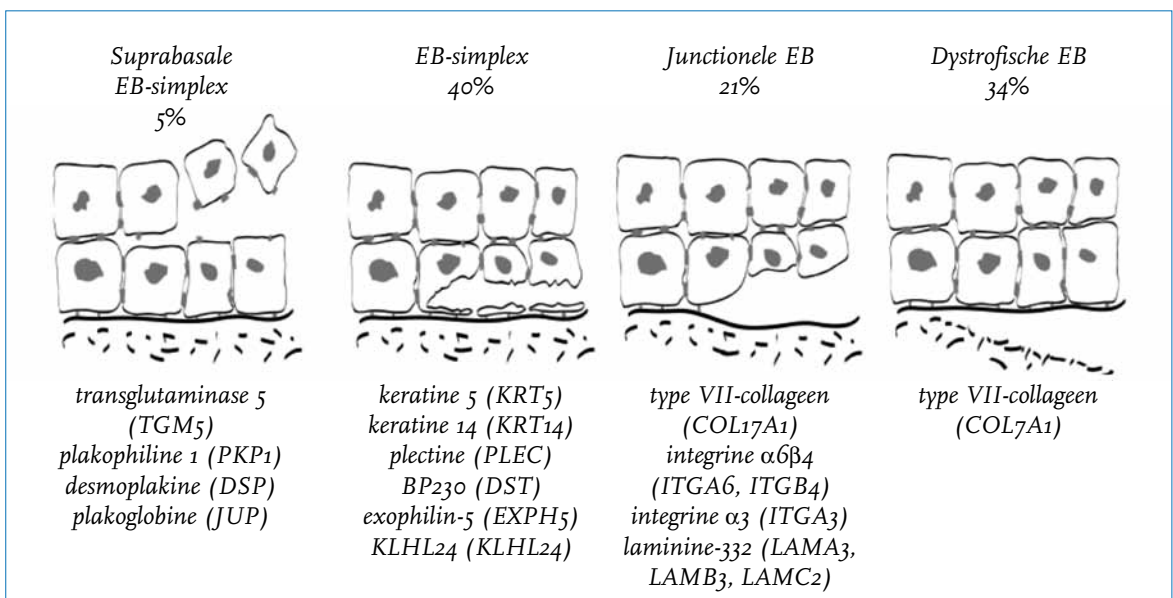
*Correspondentieadres:  
Dr. M.C. Bolling  
Universitair Medisch Centrum Groningen  
Afdeling Dermatologie  
Postbus 30.001  
9700 RB Groningen  
E-mail: m.c.bolling@umcg.nl*

De diagnostiek van erfelijke ziekten heeft de afgelopen tien jaar een enorme voortgang gekend. Waar voorheen gen voor gen gekeken werd of er een mutatie aanwezig was, een tijdrovende en kostbare kwestie, is het nu met nieuwe technieken mogelijk om binnen korte tijd meerdere genen, het hele exoom (coderende deel) van ons DNA, of zelfs het hele genoom (gehele DNA) tegelijk te bekijken. Dit betekent voor patiënten dat waar voorheen soms geen oorzaak gevonden werd, dit nu wel mogelijk is. Daarnaast is de snelheid waarmee DNA-uitslagen beschikbaar zijn, toegenomen. Maar wat is het belang van een snelle en adequate diagnose op DNA-niveau? Allereerst is het voor patiënten van belang om een

‘oorzaak’ te weten, zowel voor het begrip als de acceptatie van de (ongeneeslijke) erfelijke aandoening. Daarnaast geeft een diagnose op DNA-niveau ook duidelijkheid over de overerving, en meer informatie over de prognose, en de gezondheidsrisico’s voor de toekomst waar eventueel preventieve maatregelen voor genomen dienen te worden, en/of aanvullende controles voor dienen plaats te vinden. Verder biedt kennis over het onderliggende DNA-defect meer begrip over pathomechanismen, het functioneren van gezond weefsel, en mogelijk ingangen voor behandeling.

## DNA-DIAGNOSTIEK VAN EPIDERMOLYSIS BULLOSA, EEN ERFELIJKE HUIDZIEKTE: VERLEDEN, HEDEN, TOEKOMST

De afdeling Dermatologie van het Universitair Medisch Centrum Groningen is al vele jaren het Centrum voor Blaarziekten in Nederland. Hieronder vallen de auto-immuunblaarziekten en epidermolysis bullosa (EB). De laatste is een verzamelnaam voor een groep erfelijke blaarziekten, variërend in ernst en andere orgaanbetrokkenheid, en ingedeeld op basis van slijtingsniveau in de huid (figuur 1).<sup>1</sup> Thans zijn er mutaties in negentien genen bekend als oorzaak van de verschillende vormen. De diag-



Figuur 1. De slijtingsniveaus bij de verschillende hoofdtypen van EB. Onder de figuren zijn de betrokken eiwitten aangegeven met schuingedrukt erachter de coderende genen.

nostiek zoals deze was, nu is, en wat de toekomstige mogelijkheden zijn, zal geschetst worden. De routing van de huidige diagnostiek is geformuleerd in figuur 2.

### Kandidaat-genbenadering

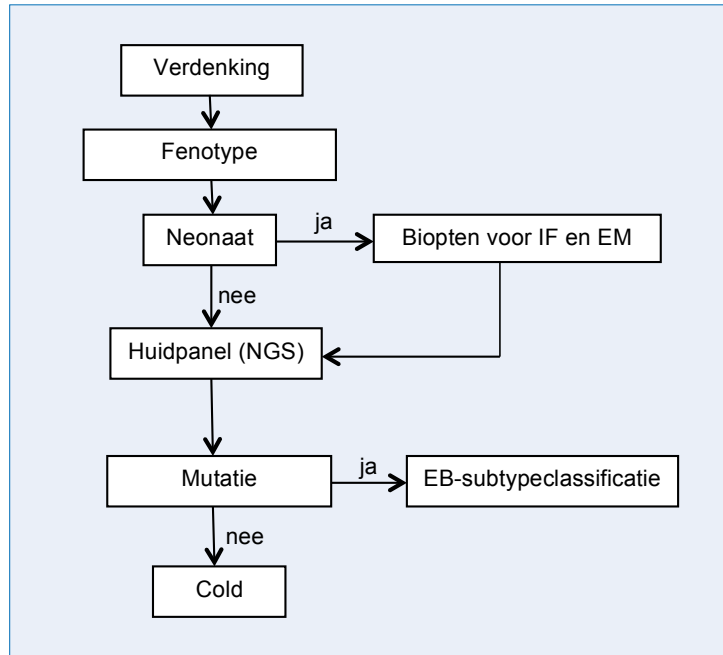
Vanaf het begin van de jaren negentig werden de eerste mutaties gevonden in genen als oorzaak van de verschillende vormen van EB. De techniek die dat mogelijk maakte, heet *Sanger sequencing* waarbij het DNA van genen stukje voor stukje vermenigvuldigd en afgelezen wordt. Een nauwkeurige, maar kostbare en tijdrovende techniek. Voor de diagnostiek van EB werd toen de volgende werkwijze aangehouden: een patiënt met de verdenking op een vorm van EB werd uitgebreid klinisch beoordeeld (gefenotypeerd), en bipten werden afgenomen voor immunofluorescentie en elektronenmicroscopie waarbij gekeken werd naar splijtingsniveau, afwezigheid/reductie van aan EB gerelateerde eiwitten, en andere kenmerken die op een bepaald gen wezen. Hierop werd dan DNA-diagnostiek ingezet waarbij *Sanger sequencing* van één gen tegelijk werd ingezet. Indien dit de mutatie opleverde, was daarmee de diagnose rond. Indien er geen mutatie werd gevonden, werden andere kandidaat-genen stuk voor stuk bekeken.

### Huidpanel

Vanaf het jaar 2005 ontstonden in rap tempo de *next-generation sequencing* (NGS)-machines en analysemethoden waarbij in veel kortere tijd en goedkoper grote stukken DNA vermenigvuldigd en afgelezen konden worden.<sup>2,3</sup> Een volgende doorbraak waren de *targeted enrichment*-methoden waarbij selectief bepaalde regio's van het DNA bekeken konden worden. Deze benadering is gebaseerd op een verzameling DNA-probes die de doelsequenties in het genoom representeren, en die DNA van deze doelsequenties selectief kunnen binden en extraheeren. Dit is ook de huidige techniek zoals die voor de DNA-diagnostiek van EB gebruikt wordt. Dit is het zogenoemde huidpanel waarin 33 genen zitten, waaronder de 19 met de verschillende vormen van EB-geassocieerde genen (figuur 1). Binnen 6-8 weken is hierbij een DNA-uitslag gerealiseerd (zie figuur 2).

### Op DNA-niveau geen mutatie, de toekomst

De EB-patiëntendatabank in Groningen bevat inmiddels ongeveer 580 indexpatiënten/families met een vorm van huidfragiliteit. Afhankelijk van het subtype werd bij 75-95% van deze patiënten met de kandidaat-genbenadering en vervolgens de introductie van het huidpanel de oorzakelijk mutatie gevonden.<sup>4</sup> De patiënten waarbij met bovengenoemde technieken geen mutatie in de met EB-geassocieerde genen werd gevonden, de *cold cases*, worden vervolgens besproken in het multidisciplinaire genodermatosen overleg, waar dermatologen, klinisch en moleculair genetici, en onderzoekers deel van uitmaken. De mogelijke verklaringen voor het niet vinden van de DNA-mutatie zijn: 1. Door limitaties van de technie-



Figuur 2. De routing bij verdenking EB in het Centrum voor Blaarziekten in Groningen.

ken, dus de mutatie zit wel degelijk in een EB-gen, maar is niet opgepikt, en 2. Er zijn mutaties in andere genen die huidfragiliteit kunnen veroorzaken die we nog niet kennen. Deze patiënten worden nogmaals uitgebreid gefenotypeerd, en de IF- en EM-biopsies worden opnieuw geanalyseerd. Bij hoge verdenking op een gemiste mutatie wordt er opnieuw naar de DNA-volgordes van het verwachte gen gekeken, en vindt er zo nodig RNA- en eiwit-analyse plaats. Daarnaast wordt er een *whole exome sequencing* (WES) ingezet waarbij met een NGS-techniek naar het hele coderende deel (exoom) van het genoom gekeken wordt. Met filters op basis van verwachte overerving en, indien mogelijk, DNA van familieleden vindt deze analyse plaats. Inmiddels is zodoende bij diverse EB-patiënten de oorzakelijke mutatie gevonden, zowel in bekende genen als in 'nieuwe' genen, hetgeen zowel voor patiënt, behandelaar, als onderzoeker een bevredigend resultaat is. Deze manier van analyse wordt daarom nu ook toegepast op patiënten met andere genodermatosen. Van de gevonden mutaties in bekende genen zien we dat het fenotypisch spectrum breder ligt dan aanvankelijk gedacht (een gen, meerdere fenotypen), en van de bevinding van mutaties in 'nieuwe' genen leren we dat bekende fenotypen ook door afwijkingen in tot nu toe onbekende eiwitten kunnen komen (een ziekte, meer genen).

### De toekomst

De verwachting is dat het huidige huidpanel op korte termijn vervangen zal worden door WES aangezien deze techniek steeds goedkoper en sneller uitvoerbaar wordt, en daarnaast meer informatie geeft. Indien ook met WES geen mutatie gevonden wordt, is het mogelijk om het hele genoom te analyseren (*whole genome sequencing*, WGS), echter de

analyse en interpretatie van alle gevonden varianten is voornamelijk tijdrovend. Een andere techniek zal wellicht de RNA-sequencing blijken te zijn, waarbij naar de transcripten van het DNA (RNA) die uiteindelijk tot eiwitten leiden, gekeken wordt. Met deze techniek is meer duidelijkheid te verkrijgen over DNA-varianten waarvan het effect op RNA en uiteindelijke eiwit onduidelijk is. Wanneer deze technieken goedkoper worden in de toekomst, zal een combinatie van deze technieken mogelijk de standaarddiagnostiek worden (WGS in combinatie met RNA-sequencing).

## LITERATUUR

1. Fine JD, et al. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:1103-26.
2. Petersen S, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genetics* 2017;18:14.
3. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nature* 2017;12:213-8.
4. Bolling MC, Lemmink HH, Jansen GH, Jonkman MF. Mutations in *KRT5* and *KRT14* cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *Br J Dermatol* 2009;164:637-44.

### SAMENVATTING

In de afgelopen tien jaar heeft de ontwikkeling van nieuwe technieken in de diagnostiek van erfelijke ziekten een enorme voortgang gekend. Deze nieuwe technieken bieden naast snelheid ook mogelijkheden om breder te zoeken dan één gen tegelijk. Ook op het gebied van genodermatosen heeft de DNA-diagnostiek zich in de afgelopen jaren ontwikkeld, en zijn er nieuwe mogelijkheden ontstaan om voor patiënten waarbij voorheen geen mutatie werd gevonden, dit nu wel te achterhalen. De ontwikkeling van de DNA-diagnostiek voor erfelijke huidziekten wordt hier beschreven.

### TREFWOORDEN

epidermolysis bullosa – genodermatose, –next generation sequencing – mutatie – gen

### SUMMARY

In the past 10 years novel DNA and RNA analysis techniques in the diagnostics for genetic diseases have developed rapidly. These techniques provide quick results, and make it possible to look at several genes, and even the whole exome and/or genome instead of one gene at a time. DNA diagnostics has also been developed for patients with genodermatoses. For patients in whom no mutation was found in the past, these mutations can now be exposed with these new techniques. The development of diagnostics for genodermatoses will be discussed in this article.

### KEYWORDS

epidermolysis bullosa – genodermatosis – next generation sequencing – mutation – gen