

RNA-gerichte therapie voor epidermolysis bullosa – naar de kern

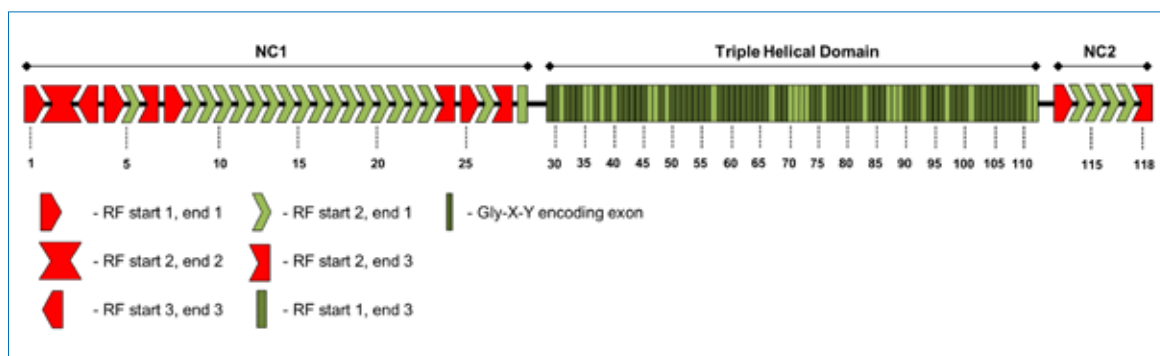
J. Bremer¹, P.C. van den Akker^{1,2}, A.M.G. Pasmooij¹

- ¹ Promovendus, afdeling Dermatologie, Expertisecentrum Blaarziekten, Rijksuniversiteit Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen
- ² Klinisch geneticus, afdeling Genetica, Rijksuniversiteit Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen
- ³ Celbioloog, afdeling Dermatologie, Expertisecentrum Blaarziekten, Rijksuniversiteit Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen

Correspondentieadres:
 J. Bremer
 UMCG
 Afdeling Dermatologie
 Hanzeplein 1
 9713 GZ Groningen,
 Tel.: 050-3612520
 E-mail: j.bremer@umcg.nl

Recessieve dystrofische epidermolysis bullosa (RDEB) is een erfelijke huidaandoening die wordt gekenmerkt door ernstige blaarvorming van huid en mucosa. Er is geen therapie beschikbaar en behandeling beperkt zich tot symptoombehandeling. Een veelbelovende categorie van therapieën richt zich op

het RNA. Exon skipping is een RNA-gerichte therapie die gebruikmaakt van korte synthetische RNA-sequenties (antisense oligonucleotiden: AON's) die kunnen worden toegediend om op RNA-niveau de mutatie die de ziekte veroorzaakt te excluderen. De meest ernstige variant van epidermolysis bullosa, RDEB-generalized severe (-gen sev), wordt veroorzaakt door stopmutaties in het COL7A1-gen die resulteren in de volledige afwezigheid van het type VII-collageeneiwit¹. Patiënten met RDEB-gen sev sterven vroegtijdig door complicaties van de ziekte. Eerder onderzoek liet een sterke correlatie zien tussen de hoeveelheid type VII-collageeneiwit in de huid en de ernst van het ziektebeeld.² In deze studie onderzochten we de potentie van AON-gemedieerde exon skipping als therapie voor RDEB-gen sev. Door herexpressie van het type VII-collageen te induceren is het doel om het klinisch beeld te verbeteren. De methode van AON-gemedieerde exon skipping wordt ook wel splicemodulatie genoemd. Splicing vindt plaats in de celkern en is het proces waarbij de niet voor eiwitcoderende sequenties (intronen) van het RNA worden verwijderd en de voor eiwitcoderende sequenties (exonen) uiteindelijk het volwassen messenger RNA vormt. Doordat de AON's specifiek aan het RNA binden, blokkeren ze hiermee specifiek splicesignalen van het exon, waarin zich de ziekteveroorzakende mutatie bevindt. De stop-



Figuur 1. In-silicoanalyse van het COL7A1-gen. In dit figuur zijn alle 118 exonen aangegeven en het bijbehorende leesraam. De vorm van de blokken is weergegeven als een puzzel en kan worden gebruikt als een houvast voor het ontwerpen van exon skipping voor RDEB. In rood zijn exonen aangegeven niet deelbaar door 3. In groen zijn alle skipbare exonen aangegeven. In donkergroen zijn exonen van het THD aangegeven die een perfecte glycine-x-y-herhaling coderen.

mutatie zal daardoor niet langer deel uitmaken van het RNA en er ontstaat een iets korter eiwit dat zijn functionaliteit grotendeels behoudt.³

Het COL7A1-gen is zeer geschikt voor exon skipping vanwege de structuur van type VII-collageen (figuur 1). Het is opgebouwd uit grofweg drie domeinen, het niet collagene domein 1 (NC1), het triple helix-domein (THD) en het niet collagene domein 2 (NC2).⁴ Het THD is voor het grootste deel opgebouwd uit een glycineherhaling (Gly-X-Y). Na translatie, dat wil zeggen de vertaling van mRNA naar eiwit, vormen drie type VII-collageen pro-eiwitten een triple helix. Na trimerisatie vindt antiparallelle dimerisatie plaats van de carboxylterminus, waarbij een deel van het NC2-domein wordt verwijderd. Het resultaat is een triple helix omringd door twee NC1-trimeren. Deze volwassen type VII-collageeneiwitten clusteren en verbinden de lamina densa aan de papillaire dermis. Interessant voor exon skipping is dat het hele THD wordt gecodeerd door kleine in-frame exonen zodat bij skipping het THD slechts enigszins korter wordt. Omdat zowel huid als slijmvliezen zijn aangedaan bij RDEB, zou het ideaal een systemische therapie zijn die zowel de huid als de slijmvliezen behandelt.

RESULTATEN

Selectie van exonen die in aanmerking komen voor exon skipping

Om de toepasbaarheid van exon skipping in het COL7A1-gen in kaart te brengen is het COL7A1-gen (NM_000094.3) geanalyseerd. Voor het overzicht zijn alle 118 exonen weergegeven in figuur 1. In figuur 1 is het leesraam aangegeven en zijn alle skipbare en niet-skipbare exonen weergegeven. Het THD codeert voor het grootste gedeelte een glycineherhaling die op 19 plaatsen onderbroken wordt.

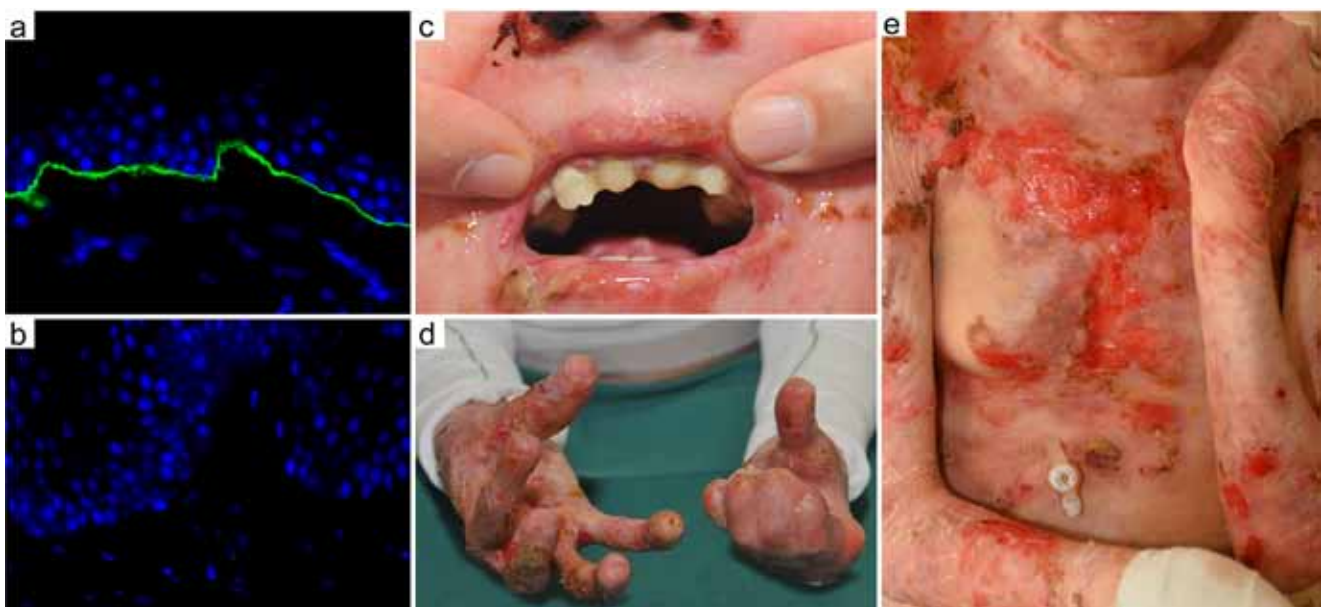
Deze glycineherhaling maakt de vorming van een triple helix mogelijk. In het figuur zijn de exonen die een perfecte glycineherhaling coderen aangegeven (donkergroen). Deze exonen zijn interessant voor exon skipping omdat het verwijderen ervan niet leidt tot een aminozuurverandering en de glycineherhaling zal niet worden verstoord.

Voor deze studie is exon 105 gekozen als target, omdat primaire keratinocyten en fibroblasten van een patiënt met RDEB-gen sev beschikbaar waren. De patiënt is drager van de homozygote c.7828C>T, p.Arg2610Ter-mutatie in exon 105. Deze nonsense mutatie leidt tot een vroegtijdig stopcodon en de volledige afwezigheid van type VII-collageen in de huid (figuur 2). Exon 105 is 81 bp lang, en codeert precies voor negen glycine-x-y-herhalingen.

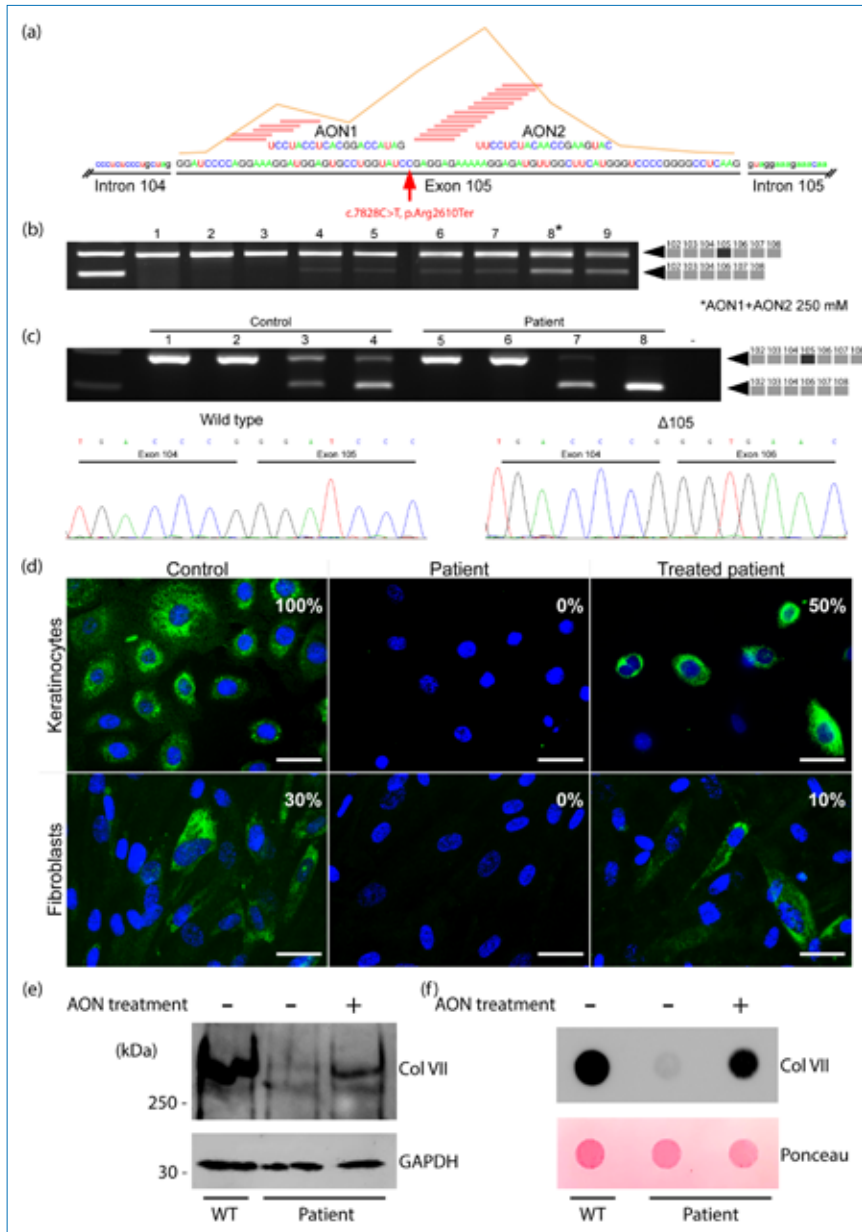
In-vitro-exon skipping leidt tot herexpressie van type VII-collageen

Alle 1134 mogelijke AON's voor exon 105 zijn geanalyseerd op smeltemperatuur (T_m), GC-percentage, bindingenergie en specificiteit. De sequentie van exon 105 is eveneens geanalyseerd op splicesignalen. 2 AON's zijn geselecteerd en gesynthetiseerd als 2'-O-Methyl phosphorothioates (figuur 3a). Door middel van RT-PCR van exon 102-108 is het effect op splicing geanalyseerd. De combinatie van beide AON's in een concentratie van 250 nM liet de beste resultaten zien (figuur 3b). Deze combinatie werd gebruikt in verdere experimenten.

Controle- en RDEB-patiëntencellen (keratinocyten en fibroblasten) werden vervolgens gekweekt en getransfected met de twee AON's. Exon 105-skipping werd geobserveerd en bevestigd met Sanger sequencing (figuur 3c). Om de novo expressie van type VII-collageen te onderzoeken werden patiëntencellen 72 uur na transfectie met immunofluorescentie (IF) geanalyseerd. IF liet, zoals verwacht, zien



Figuur 2. Klinisch beeld veroorzaakt door de homozygote nulmutatie. 2a. IF van gezonde controlehuid. 2b. IF van de patiënt laat zien dat de homozygote c.7828C>T-mutatie resulteert in complete afwezigheid van type VII-collageen. 2c,d,e. De volledige afwezigheid van type VII-collageen leidt tot een ernstig klinisch beeld waarbij mucosa en de gehele huid is aangedaan (c,e). Herhaaldelijke wonden en littekenweefsel aan de handen leidt tot het fuseren van de vingers (pseudo-syndactylie) (d).



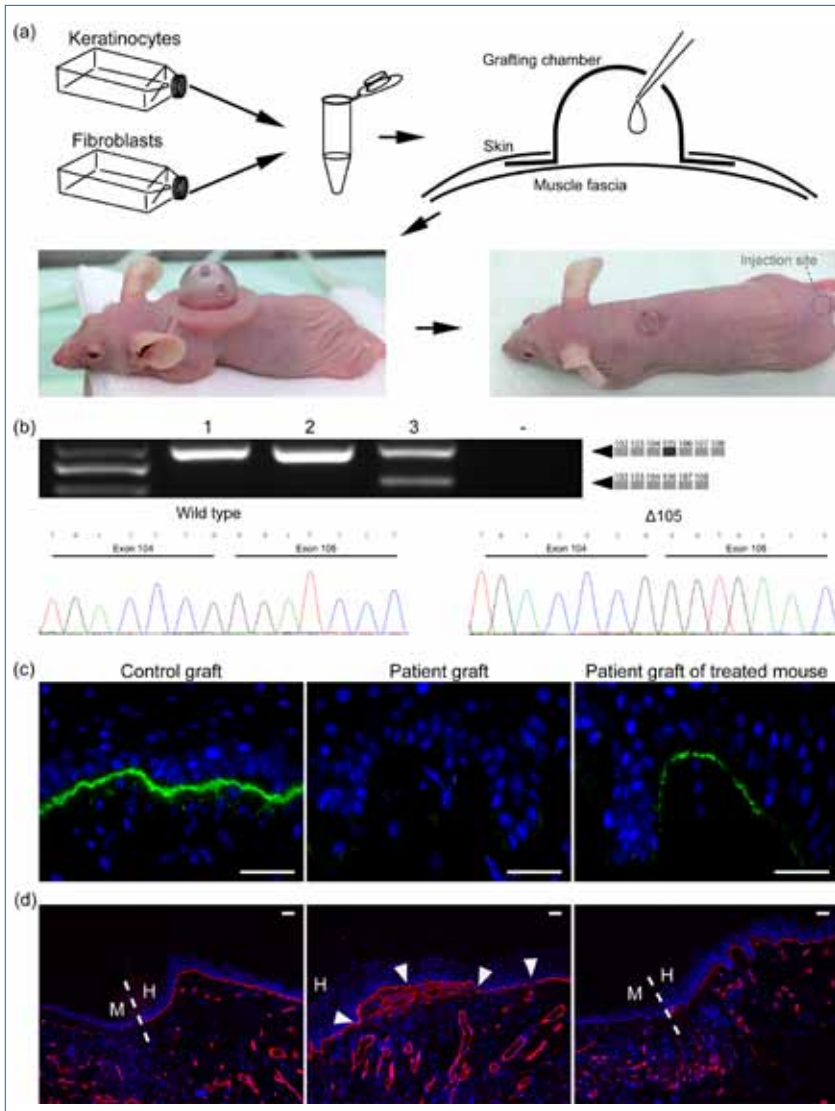
Figuur 3. In-vitro-exon skipping leidt tot de novo expressie van type VII-collageen. 3a. De positie van de twee AON's ten opzichte van exon 105 is weergegeven. Ook zijn de splicingsignalen weergegeven met de relatieve bindingsenergie (respectievelijk roze balkjes en oranje lijn). 3b. RT-PCR laat het beste resultaat zien met de combinatie van de twee AON's in een eindconcentratie van 250 nM. In de laantjes is te zien: geen transfectie (1); scrambled AON's 250 mM (2) en 500 mM (3); AON1, 250 mM (4) en 500 mM (5); AON2, 250 mM (6) en 500 mM (7); combinatie van AON1+2 250 mM (8) en 500 mM (9). 3c. RT-PCR laat efficiënte exon skip zien bij controle en patiëntenkeratinocyten en -fibroblasten (respectievelijk 3, 4 en 7, 8). Skipping van exon 105 werd bevestigd met Sanger sequencing. 3d. IF laat herstel van eiwitsynthese zien in behandelde patiëntencellen. Zowel keratinocyten als fibroblasten laten expressie van type VII-collageen zien, respectievelijk 50% en 10%. 3e,f. Westernblot en dot-blotanalyse laten verwachte lengte en uitscheiding van het eiwit zien.

dat onbehandelde patiëntencellen volledig negatief waren voor type VII-collageen. Na transfectie vormden patiëntenkeratinocyten en -fibroblasten respectievelijk 50% en 10% type VII-collageeneiwit in vergelijking met gezonde controlekeratinocyten (100%) en fibroblasten (30%) (figuur 3d). Om de grootte van dit type VII-collageeneiwit te onderzoeken werd vervolgens westernblot gedaan. Zoals in figuur 3e te zien is, heeft het eiwit de verwachte lengte, en is het niet afgebroken in kleinere

fragmenten. Daarnaast laat dot-blotanalyse van het medium zien dat het eiwit door de cellen kan worden uitgescheiden (figuur 3f). Dit is een belangrijke observatie, omdat uitscheiding door de cellen essentieel is voor de functie van het extracellulaire type VII-collageen.

Systemisch geïnduceerde exon skipping en restauratie van eiwitsynthese in vivo

Om het systemische effect van onze AON's en daar-



Figuur 4. Systemische behandeling met AON's leidt tot herexpressie van type VII-collageen. *4a.* Illustratieve weergave van de graftingtechniek. In de foto rechtsonder is de injectieplek aangegeven. Deze bevindt zich ongeveer 7 cm bij de graft vandaan. *4b.* RT-PCR op gezonde controlegrafts en patiëntengrafts behandeld met fysiologisch zout (respectievelijk 1 en 2) en met AON's behandelde patiëntengraft (3). *4c.* IF met specifieke anti-humaan type VII-collageen antilichamen laat herexpressie zien in behandelde patiëntengrafts. *4d.* IF tegen type IV-collageen. Verwijding van het BMZ bij onbehandelde patiëntengrafts. Deze morfologische deformatie werd niet geobserveerd in gezonde controlegrafts en behandelde patiëntengrafts. De humane en muizenhuid is aangegeven (H en M).

mee de klinische toepasbaarheid te onderzoeken, werden de AON's in een in-vivomodel getest. Op de rug van zes muizen werd patiëntenhuid ge-graft. De muizen ontvingen vijfmaal per week acht weken lang subcutane injecties distaal van de graft (figuur 4a). Na acht weken behandeling werden de grafts geoogst, ingevroren en geanalyseerd voor exon skipping en type VII-collageen expressie. RT-PCR liet skipping van exon 105 zien in grafts van muizen behandeld met de AON's (figuur 4b). Hiermee werd aangetoond dat de AON's een systemisch effect op RNA-niveau induceerden. Om het effect op eiwit-niveau te onderzoeken werden parallel cryosecties gekleurd met LH7.2, specifiek voor humaan type VII-collageen. In tegenstelling tot onbehandelde patiëntengrafts werd de novo expressie van type VII-collageen geobserveerd in behandelde patiëntengrafts (figuur 4c).

grafts (figuur 4c).

Om de integriteit en structuur van de basale membraanzone (BMZ) te onderzoeken, werd daarnaast IF uitgevoerd voor type IV-collageen, een belangrijk component van de lamina densa van het BMZ. IF liet een verwijde aankleuring zien in onbehandelde patiëntengrafts dat een desorganisatie van het BMZ indiceert (figuur 4d). Bij behandelde patiëntengrafts werd dit niet gezien en is de aankleuring vergelijkbaar met controlegrafts, wat functionaliteit van het resulterende eiwit aangeeft.

DISCUSSIE

In deze studie hebben we een stap gezet richting klinische toepassing door AON-gemedieerde exon skipping te onderzoeken als systemische therapie

voor RDEB. Onze in-vivodata laten voor het eerst systemische exon skipping in het COL7A1-gen zien. Eerdere onderzoeken lieten ook de potentie zien van antisense oligonucleotiden voor de behandeling van andere ziekten, bijvoorbeeld duchennespieroefie en spinale musculaire atrofie, veroorzaakt respectievelijk door mutaties in het DMD-en het SMN1-gen.^{5,6} Dit heeft geleid tot de recente goedkeuring door de Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) van twee medicijnen: eteplirsen, een exon skipping therapie voor exon 51 van het DMD-gen, en nusinersen, een AON die er voor zorgt dat exon 7 van het SMN2-gen juist wordt geïncorporeerd in het mRNA zodat het SMN2-gen wordt omgezet naar een analoog van het SMN1-gen. Belangrijk is om na te gaan of het gevormde, kleinere type VII-collageen na behandeling met onze AON's dezelfde functionaliteit heeft als het eiwit van wildtype lengte. Bornert et al. toonden aan dat de functionaliteit van het type VII-collageen niet wordt aangedaan door het skippen van exon 105 in verschillende functionele tests.³ Zo bleef de binding met de bindingspartner type IV-collageen gelijk. Ook werd de migratie van fibroblasten en triple helix-formatie niet gehinderd door het verwijderen van exon 105. Ook werd in vivo het type VII-collageen zonder exon 105 correct ingebouwd in de BMZ en stimuleerde daar de stabiliteit van de huid. Of fibroblasten of keratinocyten verantwoordelijk zijn voor de herexpressie van het type VII-collageen blijft nog een vraagstuk. Dit is een belangrijke vraag, omdat de basale keratinocyten een hogere expressie van type VII-collageen laten zien dan dermale fibroblasten. Echter, injecties met type VII-collageenproducerende fibroblasten resulteren in een verbetering van het klinisch beeld.⁷ Daarnaast is met injecties van type VII-collageen in hypomorfe muizen aangetoond dat ongeveer 35% type VII-collageen voldoende is om blaren te voorkomen. In combinatie met de sterke correlatie tussen de hoeveelheid type VII-collageen en de ernst van het klinisch beeld wordt verwacht dat ook kleine hoeveelheden herexpressie klinisch relevant zullen zijn en resulteren in een verbetering van het ziektebeeld. Er zijn inmiddels meer dan 435 mutaties beschreven die leiden tot RDEB (www.deb-central.org). Van deze mutaties ligt ongeveer 38% in Gly-X-Y-coderende exonen. In het meest gunstige geval zou theoretisch dus 38% (165) van de patiënten behandeld kunnen worden. Echter, hoeveel patiënten met RDEB er daadwerkelijk behandeld kunnen worden met exon skipping moet nog worden onderzocht. Dat heeft voornamelijk te maken met welke exonen in aanmerking komen voor exon skipping en ook welke patiëntengroepen in aanmerking komen. Allereerst zal de focus liggen op de ernstig aangedane patiënten met RDEB-gen sev omdat kleine hoeveelheden eiwit al significante verbetering van het klinisch beeld kunnen geven. Er zullen ook exonen zijn die om praktische redenen niet geskippt kunnen worden, bijvoorbeeld door de sequentie van een exon of de intron-exon-overgang het niet toelaat AON's in die regio te ontwikkelen. Ook zullen som-

mige exonen essentieel zijn voor de functie van het eiwit en zal skipping leiden tot een niet functioneel eiwit. Exon skipping zal dus een gepersonaliseerde therapie worden die voor elk exon afzonderlijk ontwikkeld zal moeten worden. Er zijn echter wel zogeheten hotspots voor mutaties, zoals exon 13 en exon 80.^{8,9} Deze zijn interessant om te onderzoeken, omdat hiermee een grotere groep patiënten geholpen zou kunnen worden.

Hoe vaak de patiënten vervolgens behandeld moeten worden en via welke toedieningswijze is nog onbekend. Het toedieningsinterval zal afhankelijk zijn van de stabiliteit van het gevormde mRNA en het resulterende eiwit. Dit zou wekelijks kunnen zijn, zoals eteplirsen¹⁰, of zelfs maandelijks. In onze studie zijn AON's subcutaan toegediend in muizen. In klinische trials voor duchennespieroefie werden ernstige injectiesite-reacties gerapporteerd na subcutane injecties. Deze reacties ontstonden tegen de chemische modificatie van de AON's. Om die reden werd ook besloten eteplirsen intraveneus te gaan toedienen. Deze reacties ontstaan niet bij intraveneuze toediening en toekomstige systemische toediening voor epidermolysis bullosa zal zich daarom ook focussen op de intraveneuze route. Onze studie is een eerste stap in de richting van AON-gemedieerde exon skipping als therapie voor RDEB-sev gen.

LITERATUUR

1. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification *J Am Acad Dermatol* 2014;70:1103-26.
2. van den Akker PC, van Essen AJ, Kraak MM, Meijer R, Nijenhuis M, Meijer G, et al. Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J Dermatol Sci* 2009;56:9-18.
3. Bornert O, Kuhl T, Bremer J, Van Den Akker PC, Pasmooij AM, Nystrom A. Functional evaluation of targeted exon deletion reveals prospect for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol Ther* 2016; doi: 10.1038/mt.2016.92
4. Burgeson RE, Morris NP, Murray LW, Duncan KG, Keene DR, Sakai LY. The structure of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci* 1985;460:47-57.
5. Sivanesan S, Howell MD, Didonato CJ, Singh RN. Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci* 2013; doi: 10.2478/s13380-013-0109-2.
6. Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; doi: 10.1016/j.addr.2015.05.008.
7. Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, Hausser I, Roth W, Magin TM, et al. Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. *Mol Ther* 2009;17:1605-15.
8. Mohammedi R, Mellerio JE, Ashton GH, Eady RA, McGrath JA. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:37-9.
9. Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corralles N, Llamas SG,

- Charlesworth A, De Luca N, et al. The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* 2010;163:155-61.
10. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206488lbl.pdf
11. Goemans NM, Tulinius M, van den Hauwe M, Kroksmark AK, Buyse G, Wilson RJ, et al. Long-Term Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Drisapersen in Duchenne Muscular Dystrophy: Results from an Open-Label Extension Study. *PLoS One* 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0161955.

SAMENVATTING

De ernstige gegeneraliseerde vorm van recessieve dystrofische epidermolysis bullosa (RDEB-gen sev), wordt veroorzaakt door bi-allelische nulmutaties in het COL7A1-gen. Deze mutaties leiden tot volledige afwezigheid van het type VII-collageen dat normaliter zorgt voor aanhechting van de epidermis aan de dermis in de vorm van ankerfibrillen. RDEB-gen sev wordt gekenmerkt door blaren van huid en mucosa na geringe wrijving. Op dit moment is er geen therapie beschikbaar voor de ziekte en is behandeling gericht op symptoombestrijding. RNA-gerichte therapieën zijn een veelbelovende groep van therapieën die op het RNA-niveau ingrijpen om de ziekte te voorkomen. In deze studie hebben we antisense-gemedieerde exon skipping onderzocht als potentiële therapie voor RDEB-gen sev. Na grondige in-silicoselectie en optimalisatie van exon skipping in vitro, hebben we de stap richting klinische toepasbaarheid onderzocht in een in-vivohuid-graftmodel. Omdat de gehele huid en ook mucosa is aangedaan in de patiënten is een systemische therapie wenselijk voor RDEB. Om de systemische toepasbaarheid van exon skipping te onderzoeken hebben we antisense oligonucleotiden systemisch toegediend via subcutane injecties in het graftmodel. Na acht weken en een totaal van veertig injecties werden de grafts geoogst en onderzocht voor exon skipping en type VII-collageenexpressie. Exon skipping en herexpressie van type VII-collageen werd gezien in de patiëntengrafts van behandelde muizen. Dit laat de potentie zien van exon skipping als systemische therapie voor RDEB-gen sev.

TREFWOORDEN

recessieve dystrofische epidermolysis bullosa – therapie – Exon skipping – COL7A1

SUMMARY

The severe generalized form of recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB-gen sev) is caused by bi-allelic null mutations in the COL7A1 gene. These mutations lead to the complete absence of type VII-collagen, which normally secures attachment of the epidermis to the dermis via the formation of anchoring fibrils. RDEB-gen sev is characterized by blister formation of skin and mucosae, upon minor trauma. At this moment there is no therapy available for RDEB-gen sev, and treatment is primarily symptomatic. RNA-therapeutics is a group of promising therapeutic approaches that act on the RNA-level. In this study, we examined antisense-mediated exon skipping as potential therapeutic approach for RDEB-gen sev. After thoroughly selecting antisense oligos in silico and optimizing in vitro, we made the step towards clinical applicability by examining exon skipping in an in vivo skin graft model. Because the entire skin, and also mucosa, is affected, a systemic therapeutic approach is preferable for RDEB. In our in vivo model, we investigated the systemic effect of exon skipping by subcutaneously administering AONs distal to the grafts. After eight weeks and a total of 40 injections, the grafts were harvested and examined for exon skipping and type VII-collagen expression. Systemically induced exon skipping and re-expression of type VII-collagen was observed in patient grafts of treated mice, demonstrating the potential of exon skipping as systemic therapeutic approach for RDEB-gen sev.

KEYWORDS

recessive dystrophic epidermolysis bullosa – therapy – Exon skipping – COL7A1

GEMELDE (FINANCIËLE) BELANGENVERSTRENGELING

De Rijksuniversiteit Groningen heeft een patent ingediend op het gebied van exon skipping als therapeutische toepassing voor dystrofische epidermolysis bullosa.

DISCLOSURE

The figures used in this manuscript were previously published by Bremer et al., in *Molecular Therapeutics-Nucleic Acids* (DOI: 10.1038/mtna.2016.87) under the license: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International.