
TEZĂ DE DOCTORAT

STUDIUL CLINIC,
EPIDEMIOLOGIC ȘI
INVESTIGATIV AL
EPIDERMOLIZEI BULOASE

Rezumat

Doctorand Ana Sorina Dănescu

Conducător de doctorat Prof Dr Rodica Cosgarea



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Definiție. Clasificare. Epidemiologie	17
1.1. Definiția epidermolizei buloase	17
1.2. Clasificarea epidermolizei buloase	17
1.3. Epidermoliza buloasă distrofică	22
1.3.1. Tabloul clinic al epidermolizei buloase distrofice	22
1.3.2. Patogeneza epidermolizei buloase distrofice	28
1.3.2.1. Fibrilele de ancoraj și zona joncțiunii dermo-epidermice	28
1.3.2.2. Mutațiile genei COL7A1 în epidermoliza buloasă distrofică	31
1.3.3. Tratamentul epidermolizei buloase distrofice	36
1.4. Epidemiologia epidermolizei buloase	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective generale	41
2. Studiu epidemiologic al epidermolizei buloase	43
2.1. Introducere	43
2.2. Obiective	43
2.3. Material și metodă	43
2.4. Rezultate	44
2.5. Discuții și concluzii	45
3. Studiu clinic al epidermolizei buloase	47
3.1. Introducere	47
3.2. Obiective	47
3.3. Material și metodă	47
3.4. Rezultate	49
3.5. Discuții	55
3.6. Concluzii	56
4. Studiu investigativ al epidermolizei buloase	57
4.1. Introducere	57
4.2. Obiective	57
4.3. Material și metodă	57
4.3.1. Mapping prin imunofluorescență	57
4.3.2. Analiza ADN	59

4.3.2.1. Izolarea ADN-ului genomic	59
4.3.2.2. Amplificarea fragmentelor de ADN genomic prin metoda PCR	63
4.3.2.3. Secvențierea ADN	68
4.3.2.4. Digestia cu enzime de restricție	71
4.4. Rezultate	72
4.4.1. Caz 1	74
4.4.2. Caz 2	76
4.4.3. Caz 3	79
4.4.4. Caz 4	82
4.4.5. Caz 5	85
4.4.6. Caz 6	86
4.4.7. Caz 7	87
4.4.8. Caz 8	90
4.4.9. Caz 9	91
4.4.10. Caz10	93
4.4.11. Caz 11	94
4.4.12. Caz 12	96
4.4.13. Caz 13	97
4.4.14. Caz 14	98
4.4.15. Caz 15	99
4.4.16. Caz 16	101
4.5. Discuții	105
5. Discuții generale	113
6. Concluzii generale	115
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	117
REFERINȚE	119

Cuvinte cheie: epidermoliza buloasă, diagnostic molecular, mapping prin imunofluorescență, analiză ADN, collagen VII, autosomal dominant, autosomal recesiv

INTRODUCERE

Epidermoliza buloasă este o afecțiune rară și incurabilă până în prezent. Debutază de cele mai multe ori imediat după naștere, afectând pielea și mucoasele, și se manifestă prin apariția de bule și eroziuni, fie spontan, fie după traumatisme minore. În timp pot fi afectate articulațiile, unghiile, dantura, pot apărea deficite proteice, de vitamine și minerale, conducând la malnutriții severe. Epidermoliza buloasă este împărțită în mai multe tipuri, dintre care am ales să studiez tipul distrofic, deoarece este cel mai frecvent în România, sau mai exact pacienții cu această afecțiune se adresează mai frecvent medicului, fiind una dintre cele mai grave forme de epidermoliză buloasă. Spectrul clinic al acestui tip de epidermoliză buloasă este totuși unul destul de variat, de la manifestări clinice ușoare, cu afectare cutanată minoră, până la manifestări clinice majore, cu afectare cutanată și mucoasă, mutilări ale membrilor, malnutriții severe și cancer cutanat. La momentul actual se cunosc multe din genele și mutațiile implicate în patogeneză, însă procesul de diagnostic rămâne totuși dificil, lent și costisitor, iar un tratament eficient, adresat cauzelor, nu doar simptomelor, este încă departe. Din acest motiv, domeniul epidermolizei buloase prezintă în continuare interes pentru cercetare.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Epidermoliza buloasă reprezintă un grup de boli cutanate ereditare, heterogene din punct de vedere clinic și genetic, care se caracterizează prin apariția de bule la nivelul pielii și mucoaselor, cauzate de un traumatism minor.

Epidermoliza buloasă este împărțită în patru tipuri majore: intraepidermală (epidermoliza buloasă simplă), joncțională (epidermoliza buloasă joncțională), dermolitică (epidermoliza buloasă distrofică) și mixtă (sindromul Kindler) în funcție de localizarea bulei față de joncțiunea dermo-epidermică.

Prevalența EB este de 1: 20000 – 1: 100000 în USA și Europa .

Se consideră că prevalența EB simple este de 24,3 cazuri la 1 milion de locuitori; prevalența EB joncționale nu se cunoaște, iar prevalența EB distrofice este de 9,3 cazuri la 1 milion de locuitori .

Incidența EB este estimată a fi de 20 la 1 milion de nou-născuți.

Statistic, EB simplă reprezintă 92% din totalul EB, EB distrofică reprezintă 5%, iar EB joncțională reprezintă 1%; restul de 2% rămân neclasificate .

Epidermoliza buloasă distrofică se caracterizează prin formarea de bule intradermic și apariția de cicatrici. Se poate transmite autosomal dominant sau autosomal recesiv. În general, EB distrofică are tendința de a se manifesta mai sever atunci când modul de transmitere este autosomal recesiv.

EB distrofică este cauzată de mutații la nivelul genei COL7A1, care asigură sinteza colagenului VII. În EB distrofică sinteza colagenului VII este redusă sau absentă.

Până în prezent au fost identificate peste 200 de mutații la nivelul genei COL7A1 care stau la baza EB distrofice. Acestea sunt distribuite în întreaga genă și sunt heterogene din punct de vedere molecular: mutații "missense", "splice-site", care duc la sărirea exonului (skipping) în interiorul cadrului de citire sau în afara acestuia, sau la inserții de introni, mutații "nonsense", mici inserții-deleții care duc la terminarea prematură a codonului (PTC).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiective generale

Ca material de studiu am avut la dispoziție 16 pacienți cu epidermoliză buloasă distrofică.

Diagnosticul epidermolizei buloase se bazează pe anamneza și examenul clinic al pacientului și familiei acestuia, pe investigațiile paraclinice standard, urmând recoltarea biopsiei în vederea efectuării mapping-ului prin imunofluorescență și în final recoltarea sângelui de la pacienți, pe baza unui acord semnat, pentru analiza ADN. Analiza ADN cuprinde mai multe etape: izolarea ADN din sângele periferic, amplificarea unor fragmente de ADN prin metoda PCR și secvențierea ADN-ului. Pentru confirmarea mutațiilor se repetă procedura de analiză ADN sau se poate efectua tehnica de digestie cu enzime de restricție.

Principalele obiective ale tezei sunt:

1. Situația epidemiologică a epidermolizei buloase în România
2. Evaluarea clinică a pacienților cu EBD
3. Îmbunătățirea procesului de diagnostic molecular al epidermolizei buloase distrofice
4. Contribuții la înțelegerea mecanismului patogenetic prin descoperirea de noi mutații și de noi manifestări fenotipice ale mutațiilor cunoscute

Studiu epidemiologic al epidermolizelor buloase

Introducere

În prezent, nu este în totalitate cunoscută situația epidemiologică a bolilor din familia EB din România.

În ultima perioadă s-a acordat o atenție deosebită EBD, aceasta fiind o afecțiune cronică, severă, care necesită asistență medicală permanentă și ajutor din partea societății. În acest sens a luat ființă asociația pacienților cu epidermoliză buloasă (miniDebra: <http://www.minidebra.ro/>) și astfel a fost posibilă o evaluare a numărului total al pacienților.

Obiective

Principalele obiective ale acestui studiu au fost următoarele:

1. Estimarea numărului total de pacienți cu EB în România;
2. Estimarea distribuției celor trei categorii de EB (simplă, joncțională, distrofică) în România;
3. Estimarea repartiției pacienților cu EB, pe sexe, categorii de vârstă, mediul de proveniență (urban/rural), principalele cauze de deces înregistrate și la ce vârstă a survenit decesul;
4. Efectuarea unei comparații între situația epidemiologică în România și cea din alte regiuni ale globului;
5. Estimare a prevalenței și incidenței EB în România.

Material și metodă

Pentru atingerea obiectivelor, s-a realizat un registru al EB. Acest registru a fost inițiat în anul 2006 și finalizat în anul 2012. În acest registru au fost incluși pacienții cu EB aflați în evidența Clinicii de Dermatologie Cluj-Napoca, precum și pacienți aflați în evidența unor medici dermatologi din România și pacienții înscriși în asociația MiniDebra (asociația pacienților cu EB).

Diagnosticarea acestor pacienți s-a bazat în mare parte pe tabloul clinic, iar în unele situații a fost completat cu mapping-ul prin imunofluorescență și analiza moleculară. Datele colectate de la pacienți au fost următoarele:

-vârstă, sex, zona geografică, istoric familial, istoricul bolii, explorări paraclinice, tablou clinic general și dermatologic. În cazul pacienților aflați în evidența Clinicii de Dermatologie a putut fi evaluată fișa de internare a pacientului. În cazul celorlați

pacienți datele au fost obținute prin contactarea telefonică sau prin email a pacienților și a medicilor care supraveghează acești pacienți.

Rezultate

Pe baza datelor colectate personal și cu ajutorul colaboratorilor, am reușit să realizez un registru al epidermolizei buloase în România, cuprinzând 86 de pacienți. Dintre cele 86 de cazuri, 51 au prezentat tabloul clinic al EB distrofice, 19 au prezentat aspectul de EB simplă, iar la 16 cazuri nu s-a putut preciza cu exactitate tipul EB. Repartiția pe sexe femei : bărbați este de 1,3:1, majoritatea pacienților fiind de sex feminin.

În ceea ce privește repartiția pe zone geografice, cel mai mare număr de cazuri a fost înregistrat în Transilvania, respectiv 47 cazuri, apoi în Muntenia, 20 de cazuri, urmată de Moldova cu 17 cazuri. Cele mai puține cazuri, au fost înregistrate în Dobrogea (2 cazuri). Aceste date sunt doar orientative, deoarece nu știm dacă acestea sunt cifrele reale, fiind posibil ca în zonele geografice cu mai puține cazuri adresabilitatea la medic să fie mai mică, sau mai dificilă datorită locației centrului, Transilvania.

În ceea ce privește repartiția pe categorii de vârstă, cei mai mulți pacienți fac parte din categoria de vârstă 0-10 ani, respectiv 35 pacienți, urmează cei cu vârstă cuprinsă între 11-20 ani: 23 pacienți, apoi cei cu vârstă cuprinsă între 21-30 ani: 13 pacienți, apoi cei cu vârstă cuprinsă între 31-40 ani: 11 pacienți. În categoria de vârstă 41-50 ani au fost înregistrați 2 pacienți, un singur pacient având peste 50 de ani (51 de ani).

S-a înregistrat o pondere mai mare a pacienților care locuiesc în mediul urban (50 de pacienți), comparativ cu mediul rural (36 de pacienți), un raport de 1,38:1.

Principalele cauze de deces înregistrate la pacienții cu EBD au fost septicemia și carcinomul spinocelular.

Discuții și concluzii

În România incidența EB este de 25 la 1 milion de nou-născuți, iar prevalența EB de 4,5 cazuri la 1 milion de locuitori.

La nivel internațional prevalența EB este mult mai mare (49 cazuri la 1 milion de locuitori în Scoția; 8 cazuri la 1 milion de locuitori în SUA; 10,3 cazuri la 1 milion de locuitori în Australia și Noua Zeelandă).

În ceea ce privește incidența EB la nivel internațional, în SUA a fost raportată o incidență de 19 la 1 milion de nou-născuți.

Prevalența aparent redusă în România poate fi explicată astfel:

-pacienții cu EB nu se adresează sistemului medical, mai ales medicului dermatolog capabil să recunoască această afecțiune;

-condițiile improprii din unele medii determină o mortalitate ridicată.

Incidența se apropie de realitate, explicația fiind că în ultimii ani oamenii au devenit mai conștienți de posibilitatea îmbunătățirii condițiilor de viață, au devenit "mai vizibili", aceasta datorându-se contactului pe care l-am avut cu acești pacienți dar și datorită comunicării mai bune în cadrul asociației MiniDebra.

Studiu clinic al epidermolizei buloase

Introducere

Debutul EB este la naștere, pentru majoritatea formelor acestei afecțiuni.

Tabloul clinic al EB variază de la forme ușoare până la forme extrem de severe, care pun în pericol viața pacientului.

Tipul și subtipul EB sunt greu de diagnosticat cu precizie la naștere, doar pe baza aspectului clinic.

Obiective

Pe baza cazurilor aflate în evidența noastră, acest studiu clinic a încercat să satisfacă următoarele obiective:

1. Stabilirea unei imagini actualizate a fenotipurilor pacienților cu EBD
2. Evaluarea gradelor de severitate ale afecțiunilor din categoria EBD

Material și metodă

Evaluarea clinică a pacienților a constat în analiza antecedentelor heredocolaterale în cadrul anchetei familiale și în descrierea fenotipului clinic.

Ancheta familială a constat în evaluarea clinică a membrilor familiei, respectiv afectarea pielii sau a anexelor cutanate (păr, unghii, dinți). Am alcătuit arborele genealogic pentru acele familii la care am avut aceste date.

Datele clinice au fost obținute pentru fiecare pacient și rudele sale afectate prin anamneză și examen obiectiv, sau din documentele medicale furnizate de către medicii care supraveghează pacienții respectivi.

În studiul de față am analizat 16 pacienți. Criteriile clinice de includere au fost reprezentate de: prezența bulelor/eroziunilor la nivelul pielii sau mucoaselor,

vindecarea leziunilor cu cicatrice sau milia, afectarea unghială, afectarea dentară, sinechia sau mutilația membrelor.

Rezultate

Am evaluat clinic 16 pacienți cu EB. Dintre aceștia, cinci pacienți au prezentat un tablou clinic moderat, de EBD-AD, trei pacienți au prezentat EBD-AR generalizată, un pacient a prezentat EBD-AR inversată, iar șapte pacienți au prezentat EBD-AR severă, generalizată.

Discuții

La majoritatea pacienților am obținut o corelație fenotip-genotip, observându-se faptul că fenotipurile ușoare se corelează cu EBD-AD, iar fenotipurile severe se corelează cu EBD-AR.

La adulți diagnosticul a fost formulat pe baza aspectului clinic tipic, confirmat ulterior de analiza moleculară. La copii, inițial diagnosticul este furnizat de analiza moleculară. Pe baza datelor furnizate de literatura de specialitate (corelații între mutațiile identificate și fenotipul pacientului) ne orientăm spre subtipul EB, însă formularea unui prognostic este rezervat deoarece evoluția în timp este cea decisivă.

Concluzii

Diagnosticul EBD la naștere este extrem de dificil, deoarece tabloul clinic complet, bazat pe elemente caracteristice, se conturează în perioada de adult.

Au fost luați în studiu 16 pacienți cu EB, dintre care șase copii și nouă adulți. Majoritatea cazurilor studiate au prezentat forma severă a EBD.

Este importantă caracterizarea clinică a pacientului cu EB la naștere dar este foarte importantă evaluarea clinică periodică pentru a identifica momentul apariției complicațiilor.

Este prudent ca medicul să evite formularea unui prognostic deoarece situația devine mai clară mai târziu. Evoluția afecțiunii depinde de forma epidermolizei buloase dar și de modul de îngrijire al copilului.

Studiu investigativ al EB

Introducere

Diagnosticul final al EB s-a formulat pe baza analizei moleculare, la pacienții care au prezentat un tablou clinic sugestiv pt EBD. Analiza moleculară constă în

efectuarea mapping-ului prin imunofluorescență pentru orientarea spre tipul major al EB, respectiv simplă, jonțională sau distrofică, urmat apoi de analiza ADN, care presupune izolarea, amplificarea și secvențierea ADN în vederea identificării mutațiilor implicate în patogeneză afecțiunii. În urma analizei moleculare putem preciza cu exactitate subtipul EB.

Obiective

a. Implementarea diagnosticului molecular al epidermolizei buloase distrofice

-Colectarea de date individuale

-Includerea în studiu a pacienților suspecți de epidermoliză buloasă distrofică (pe baza anamnezei, examenului clinic și mapping-ului prin imunofluorescență)

-Diagnosticul molecular pentru cazurile suspecte de epidermoliză buloasă distrofică

-Identificarea unei strategii de identificare mai rapidă a mutațiilor

b. Contribuții la înțelegerea mecanismului patogenetic prin descoperirea de noi mutații și de noi manifestări fenotipice ale mutațiilor cunoscute

-Analiza mutațiilor identificate la pacienții cu EB din România și la pacienții străini.

-Stabilirea unei corelații fenotip-genotip

-Identificarea de mutații noi.

Material și metodă

Mapping prin imunofluorescență

Mapping-ul prin imunofluorescență (IFM) se utilizează pentru diagnosticul EB. Această tehnică permite identificarea nivelului la care se produce clivajul în pielea pacienților cu EB, acesta fiind intraepidermic, intra-lamina lucida sau sub-lamina densa.

IFM ne oferă date despre cele trei forme de EB dar și despre proteina structurală afectată. Se indică efectuarea acestei analize înainte de efectuarea analizei moleculare.

Principiul acestei metode are la bază utilizarea a doi anticorpi- primul este anticorpul primar, care are ca țintă o anumită proteină din jonțiunea dermo-epidermică, iar al doilea anticorp, secundar este marcat fluorescent și acesta recunoaște primul anticorp.

În EBD imunofluorescența pielii a arătat că principala componentă a fibrilelor de ancoraj, respectiv colagenul VII, este redusă (colorația fiind la polul superior al bulei) sau chiar absentă.

Analiza ADN

Izolarea ADN-ului genomic

ADN-ul genomic (ADNg) a fost extras din leucocitele periferice. S-a utilizat pentru această metodă un mini kit QIAamp (firma producătoare se numește QIAGEN) iar protocolul este furnizat împreună cu kit-ul.

Amplificarea fragmentelor de ADN genomic prin metoda PCR

PCR (polymerase chain reaction) este o procedură rapidă pentru amplificarea enzimatică *in vitro* a unui segment specific de ADN. Această metodă are la bază principiul extensiei unei amorse ("primer sau amplimer"). Tehnica folosește două amorse, acestea fiind două oligonucleotide de sinteză (amorsa sens și amorsa antisens), situate la capătul 3' a celor două catene ale segmentului de ADN și care declanșează sinteza ADN, după matrița fragmentului ADN inițial.

Componentele necesare reacției sunt următoarele: matrița de ADN, primerii, deoxinucleotid trifosfați (dNTPs), ADN polimeraza termostabilă –Taq polimeraza termostabilă, diferite substanțe tampon.

Gena COL7A1 este alcătuită din 118 exoni, fiind una din genele cu cei mai mulți exoni. Pentru amplificarea tuturor celor 118 exoni și a fragmentelor de la granița exon-intron avem nevoie de 73 perechi de primeri. Am folosit o strategie pentru detectarea mai rapidă a mutațiilor. Aceasta a constat în împărțirea exonilor în 3 categorii, în funcție de frecvența mutațiilor care au fost descrise în literatura de specialitate: exoni cu o rată crescută a mutațiilor, exoni cu o rată medie a mutațiilor și exoni cu o rată redusă a mutațiilor. Pe baza acestui principiu am împărțit primerii în concordanță cu rata de mutație la nivelul exonilor și cu temperatura annealing.

Secvențierea ADN

Această metodă permite analiza structurii genei, identificarea mutațiilor care au stat la baza bolii respective și analiza secvențele de aminoacizi ai proteinei codificate de gena respectivă.

Prođușii obținuți au fost analizați cu ajutorul unui sistem, numit ABI prism 3100.

Digestia cu enzime de restricție

Această metodă este utilizată pentru confirmarea rezultatelor obținute prin reacția de secvențiere.

Enzimele de restricție secționează ADN-ul la nivelul situsului de restricție rezultând un număr definit, caracteristic și reproductibil de fragmente de ADN. Situsurile de restricție sunt dispuse la distanțe variate, iar fragmentele produse prin secționare sunt inegale, astfel putând fi ușor separate prin electroforeză pe baza greutății moleculare. Diferite mutații pot modifica situsul de restricție (care nu va mai fi recunoscut de enzima de restricție) sau pot crea situsuri noi.

Rezultate

Am analizat un număr de 16 pacienți cu EBD, din care 5 au prezentat EBD-AD, 3 au prezentat EBD-AR, 1 pacient EBD-AR inversată și 7 pacienți au prezentat EBD-AR generalizată, severă.

Majoritatea mutațiilor identificate au fost situate la nivelul exonilor cu prioritate mare.

Discuții

Analiza mutației este o tehnică ce consumă timp și bani, deoarece pentru a identifica subtipul de EB este nevoie să se secvențieze o genă întreagă, EB putând fi cauzată de numeroase mutații. Pentru identificarea mai rapidă a mutațiilor am utilizat o strategie care a constat în împărțirea celor 118 exoni în 3 grupe, respectiv cei cu prioritate mare (la nivelul cărora s-a identificat, în literatura de specialitate, o frecvență mai mare a mutațiilor), exoni cu prioritate medie și exoni cu prioritate mică. Cea mai frecventă mutație identificată este c.425A>G, p. K142R, situată la nivelul exonului 3, care se asociază cu un fenotip sever, fiind o mutație care determină terminarea prematură a codonului și sinteza unei cantități foarte mici de proteină. În ceea ce privește EBD-AD, aceasta se asociază cu un fenotip mai ușor, iar mutațiile au fost identificate la nivelul exonilor 73, 74 și 75.

Se observă faptul că în general fenotipurile ușoare se asociază cu o colorație pozitivă pentru colagenul VII la imunofluorescență și cu mutațiile de tip missense, iar fenotipurile grave se asociază cu absența colorației pentru colagenul VII și cu mutații de tip nonsense, sau care cauzează terminarea prematură a codonului.

Discuții generale

Diagnosticul EB este unul complex, ce are la bază diagnosticul clinic al pacientului și al familiei acestuia, precum și diagnosticul molecular care include mapping-ul prin imunofluorescență și analiza mutațiilor. Mapping-ul prin imunofluorescență ne oferă date despre cele trei forme de EB, dar și despre proteina structurală afectată, și se efectuează înaintea analizei mutației. Totuși, această metodă este semicantitativă, fiind imposibil a distinge cu mare sensibilitate și specificitate

între toate subtipurile de EB doar pe baza gradului de colorație a anticorpilor la nivel tisular. Cu toate acestea, mapping-ul prin imunofluorescență ne ajută să excludem o EBD-AR severă generalizată, unde colorația pentru colagenul VII este total absentă.

Analiza mutațiilor reprezintă ultima etapă prin care se determină modul de transmitere, locul și tipul mutației moleculare la pacienții cu EB. În cazul în care se va aplica terapia genică, pacienții cu EB depind de determinarea mutațiilor specifice. De asemenea, această analiză este utilă în cazul efectuării diagnosticului prenatal sau în cazul fertilizării in vitro.

Una dintre consecințele identificării mutației în gena COL7A1 constă în dezvoltarea testării prenatale bazate pe ADN în familiile la risc pentru recurență sau pentru formele severe ale bolii.

O altă consecință a detecției mutației constă în impactul asupra consilierii genetice a familiilor cu EBD.

La momentul actual, cercetarea de vârf se axează în principal pe domeniul terapiei cu colagen VII și al terapiei genice, prin urmare urmărirea evoluției naturale a pacienților cu EB este vitală, deoarece se încearcă determinarea cu precizie a momentului în care este necesară aplicarea terapiei la acești pacienți.

Evaluarea periodică a pacienților este importantă pentru identificarea cât mai precoce a leziunilor de carcinom spinocelular și tratarea cât mai precoce a acestuia, deoarece s-a observat că acest carcinom are un comportament foarte agresiv.

Concluzii generale

Am realizat pentru prima dată în România o estimare a numărului total de pacienți cu EB. De asemenea am realizat o estimare a distribuției celor trei categorii de EB (simplă, joctțională și distrofică) în România. Am realizat o repartiție a pacienților cu EB pe sexe, categorii de vârstă, mediul de proveniență, principalele cauze de deces înregistrate la acești pacienți. Pe baza rezultatelor obținute am estimat prevalența și incidența EB în România și am comparat situația epidemiologică din România cu cea din alte regiuni ale globului.

Studiul clinic a permis stabilirea unei imagini actualizate a pacienților cu EB. În studiu am inclus 16 pacienți, majoritatea cazurilor prezentând forma severă a EBD. Am prezentat o evaluare clinică a pacienților cu tipuri diferite EBD, spectrul clinic variind de la forme ușoare (EBD-AD), la forme intermediare (EBD-AR generalizată) și severe (EBD-AR severă generalizată).

În cadrul studiului investigativ am realizat implementarea procesului de diagnostic molecular al epidermolizei buloase distrofice. Diagnosticul molecular a

constat în efectuarea mapping-ului prin imunofluorescență și a analizei genetice. A fost elaborată o strategie de identificare mai rapidă a mutațiilor.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În capitolul “Stadiul actual al cunoașterii” am realizat un studiu al literaturii recente din domeniu, și o clasificare etiologică succintă a bolilor din familia epidermolizei buloase. Datorită progreselor efectuate în domeniul geneticii, în prezent se încearcă o caracterizare a afecțiunilor genetice bazată pe analiza moleculară și mai puțin pe aspectul clinic.

În capitolul “Contribuții personale” am realizat mai multe studii. În studiul epidemiologic am realizat o evidență a statistică a cazurilor de EB în România, precum și o comparație cu situația din alte țări și regiuni

În cel de-al doilea studiu am realizat o prezentare clinică a unor cazuri de EB și o stadializare a acestora în funcție de gravitatea tabloului clinic.

Cel de-al treilea studiu cuprinde o metodologie actuală, rafinată prin experimente practice, pentru diagnosticul molecular al EB. Am realizat prima implementare a acestei complexe metodologii în România. Prin descoperirea de mutații noi, am contribuit la îmbunătățirea înțelegerii pe plan mondial a patogenezei genodermatozelor.

PhD THESIS

CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND INVESTIGATIVE STUDY OF EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Abstract

PhD Student Ana Sorina Dănescu

Thesis coordinator Prof Dr Rodica Cosgarea



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Definition. Clasification. Epidemiology	17
1.1. Definition of epidermolysis bullosa	17
1.2. Clasification of epidermolysis bullosa	17
1.3. Dystrophic Epidermoliza Bullosa	22
1.3.1. The clinical picture of dystrophic epidermolysis bullosa	22
1.3.2. The pathogenesis of dystrophic epidermolysis bullosa	28
1.3.2.1. Anchoring fibrils and dermo-epidermic junction	28
1.3.2.2. COL7A1 gene mutations in dystrophic epidermolysis bullosa	31
1.3.3. Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa	36
1.4. The epidemiology of epidermolysis bullosa	37
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. General objectives	41
2. The epidemiological study of epidermolysis bullosa	43
2.1. Introduction	43
2.2. Objectives	43
2.3. Material and method	43
2.4. Results	44
2.5. Discussions and conclusions	45
3. The clinical study of epidermolysis bullosa	47
3.1. Introduction	47
3.2. Objectives	47
3.3. Material and method	47
3.4. Results	49
3.5. Discussions	55
3.6. Conclusions	56
4. The investigative study of epidermolysis bullosa	57
4.1. Introduction	57
4.2. Objectives	57
4.3. Material and method	57
4.3.1. Immunofluorescence mapping	57

4.3.2. DNA analysis	59
4.3.2.1. Isolation of genomic DNA	59
4.3.2.2. Genomic DNA fragments amplification through PCR	63
4.3.2.3. DNA sequencing	68
4.3.2.4. Restriction enzyme digestion	71
4.4. Results	72
4.4.1. Case 1	74
4.4.2. Case2	76
4.4.3. Case 3	79
4.4.4. Case 4	82
4.4.5. Case 5	85
4.4.6. Case 6	86
4.4.7. Case 7	87
4.4.8. Case 8	90
4.4.9. Case 9	91
4.4.10. Case10	93
4.4.11. Case 11	94
4.4.12. Case 12	96
4.4.13. Case 13	97
4.4.14. Case 14	98
4.4.15. Case 15	99
4.4.16. Case 16	101
4.5. Discussion	105
5. General discussions	113
6. General conclusions	115
7. Originality and personal contributions	117
REFERENCES	119

Keyword: epidermolysis bullosa, molecular diagnosis, immunofluorescence mapping, DNA analysis, collagen VII, autosomal dominant, autosomal recessive

INTRODUCTION

Epidermolysis bullosa (EB) is a rare and so far incurable disease. Its onset is usually immediately after birth, affecting mainly the skin and mucosa and its manifestations are represented by blisters and sores which can be either spontaneous or triggered by minor traumas. In time, it can affect the articulations, nails, teeth and it can decrease the protein, vitamin and mineral deposits causing severe malnutrition. There are several types of EB, out of which Dystrophic Epidermolysis Bullosa (DEB) is the focus of this thesis, as the most widely spread in Romania, or, at least as the one most reported by patients due to the fact that it is the most severe. Its manifestations are quite various, ranging from mild symptoms, with minor skin problems, up to major ones, severely affecting the skin and mucosa, causing limbs mutilations, severe malnutrition and skin cancer. Although there is a lot of information on the genes and mutations involved in its pathogenesis, its diagnosis is still difficult, slow and expensive and a lot more research is needed for discovering an efficient treatment that would target the cause of the disease and not merely its symptoms. Because of this, DEB is still a subject of great interest for research.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Epidermolysis Bullosa represents a group of hereditary skin diseases, clinically and genetically heterogeneous, characterised by skin and mucosa blisters resulted from even minor traumas.

Depending on the location of the blister from the dermoepidermal junction, there are 4 major types of EB: intra-epidermal (Epidermolysis Bullosa simplex), junctional (junctional Epidermolysis Bullosa), dermolytic (dystrophic Epidermolysis Bullosa) and mixed (the Kindler syndrome).

The EB prevalence is 1: 20000 – 1: 100000 in USA and Europe.

It is considered that the prevalence of the simplex EB is of 24.3 cases per 1 million people; the prevalence of the junctional EB is not known, whereas the prevalence of the dystrophic EB is of 9.3 cases per 1 million people.

The EB incidence is estimated at 20 cases per 1 million new-borns.

Statistically, EB simplex is 92% of the total EB cases, dystrophic EB is 5% and junctional EB is 1%, whereas the other types are still unclassified.

Intradermal blisters and scars are characteristic to dystrophic EB, which can be transmitted as autosomal dominant inheritance or as autosomal recessive inheritance. In the case of the latter, its manifestations tend to be more severe.

Dystrophic EB is caused by mutations at the level of the COL7A1 gene responsible for the collagen VII synthesis. In dystrophic EB, the synthesis of collagen VII is reduced or even absent.

So far, over 200 mutations at the level of the COL7A1 gene have been identified as causes for dystrophic EB. These mutations, distributed throughout the entire gene, are molecularly heterogeneous: 'missense', 'splice-site' mutations, leading to either exon skipping within or outside the inner reading frame or to intron insertions; 'nonsense' mutations, small insertions-deletions leading to premature termination codon (PTC).

PERSONAL CONTRIBUTION

General objectives

Sixteen (16) patients diagnosed with dystrophic EB served as study material.

The diagnosis of Epidermolysis Bullosa is based on anamnesis, the clinical examination of the patient and his/her family, as well as on standard paraclinical investigations, followed by biopsy for immunofluorescence mapping and, in the end, blood sampling from patients for DNA analysis previously agreed and signed upon. DNA analysis implies the following stages: DNA isolation from peripheral blood, amplification of DNA samples through PCR, followed by DNA sequencing. Mutation confirmation can be obtained either by repeating the DNA analysis or by applying restriction enzyme digestion.

The main objectives of the present thesis are as follows:

1. Provide an overview of the epidemiological situation of Epidermolysis Bullosa in Romania.
2. Clinically assess DEB patients.
3. Improve the DEB molecular diagnosis process.
4. Extend the knowledge over the pathogenesis mechanism by the discovery of new mutations and new phenotypic manifestations of the already-known mutations.

THE EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Introduction

Currently, the epidemiological situation of diseases in the EB family is not entirely known in Romania.

Increased interest has been dedicated to DEB lately, due to its severity and the fact that patients affected require permanent medical assistance and help from society. Within this context, the association of patients suffering from EB was founded (miniDebra: <http://www.minidebra.ro/>), permitting a possible evaluation of the total number of patients.

Objectives

The main objectives of this study are as follows:

1. Estimate the total number of EB patients in Romania;
2. Estimate the distribution of the 3 types of EB (simplex, junctional and dystrophic) in Romania;
3. Estimate the distribution of patients according to sex, age, origin (urban or rural), cause of death and death age;
4. Compare the epidemiological situation in Romania with the one in other regions of the world;
5. Estimate the EB prevalence and incidence in Romania.

Material and method

To meet the objectives, an EB registry was created in 2006 and finalised in 2012. This registry contains all EB patients registered at the Clinic of Dermatology Cluj Napoca, as well as patients monitored by other dermatologists in Romania and patients recorded at the MiniDebra association (the association of EB patients).

These patients were mainly diagnosed on clinical bases; in some cases, the immunofluorescence and molecular analysis mapping were performed. Patients data recorded were as follows:

- age, sex, geographical area, family history, history of disease, paraclinical investigations, general and dermatological clinical picture. In the case of patients monitored within the Clinic of Dermatology, the patient's admission form could also be

consulted, whereas for other patients, information was obtained by directly contacting the patients themselves or their doctors via telephone or e-mail.

Results

A registry on the EB situation in Romania, comprising 86 patients was created based on data collected personally or with the help of collaborators. Out of the 86 cases, 51 patients manifested dystrophic EB symptoms, 19 manifested simplex EB symptoms, and in the case of the other 16 patients, the type of EB could not be clearly stated. Female: male sex distribution is 1.3:1, the majority of patients being female.

As far as the geographical distribution of the patients is concerned, it can be stated that the majority of the cases were reported in Transylvania (47 patients), followed by Muntenia (20 cases) and Moldavia (17 cases). The smallest number of patients was registered in Dobrogea (2 cases). These data are just a rough guide, because it cannot be precisely known whether these are the real figures taking into account that for the regions that reported a small number of cases, access to patient-care might be lower or more difficult than for patients living the centre, Transylvania.

From the point of view of age distribution, the majority of the patients are aged 0 to 10 (35 patients), followed by those aged 11 to 20 (23 patients). There were 13 patients aged 21 to 30 and 11 patients aged 31 to 40. There were only 2 patients aged 41 to 50 and one over 50 (51).

The majority of the patients live in urban areas (50 patients in urban areas and 36 in rural ones), patients' distribution being 1.38:1.

The main causes of death for DEB patients were septicaemia and squamous cell carcinoma.

Discussions and conclusions

EB incidence in Romania is 25 per 1 million new-borns, and its prevalence is 4.5 cases per 1 million people.

At an international level, EB prevalence is much higher (49 cases per 1 million people in Scotland; 8 cases per 1 million people in USA; 10.3 cases per 1 million people in Australia and New Zealand).

As far as EB incidence at an international level is concerned, USA reported an incidence of 19 cases per 1 million new-borns.

The seemingly low EB prevalence in Romania can be explained as follows:

- EB patients do not address medical professionals, and particularly the dermatologist who is able to identify the disease;

- Inappropriate living conditions in certain environments increase the mortality rate.

However, the incidence gets gradually closer to reality as people have become more and more aware of the fact that their life quality can be improved, they are now more 'visible' and this is due to the contact and better communication we have had with these patients within the MiniDebra association.

A CLINICAL STUDY OF EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Introduction

The onset of EB is at birth for the majority of its forms.

The clinical manifestations of EB range from mild up to more severe forms that may endanger the life of the patient.

The EB type and subtype are quite difficult to identify at birth just based on the clinical aspect.

Objectives

Based on the cases under our monitoring, our clinical study has tried to meet the following objectives:

1. To establish an updated view over the phenotypes of DEB patients;
2. To assess the degree of severity for all affections within the DEB category.

Materials and method

The clinical assessment of patients involved the hereditary collateral analysis within the family investigation as well as the clinical description of the phenotype.

The family investigation implied the clinical evaluation of the family members as well as the assessment of the way in which their skin or cutaneous annexes (hair, nails and teeth) had been affected. We built the family tree of the families for which we possessed this information.

Clinical data was gathered for each individual patient and their affected relatives through anamnesis and objective examination, on the one hand, or by consulting the documents provided by the doctors monitoring these patients, on the other.

We have analysed 16 patients in this study. The clinical criteria for their inclusion in our group were: blisters/erosions on the skin or mucosa, intensive scarring for lesion healing or milia, nail or teeth affections, synechia or limb mutilation.

Results

We have clinically examined 16 patients. Out of these, 5 patients presented with mild DEB (autosomal dominant type - AD), other 3 with generalised DEB (autosomal recessive type - AR), 1 patient with inverse autosomal recessive DEB and 7 patients suffered from generalised, severe autosomal recessive DEB.

Discussions

For the majority of our patients we identified a phenotype-genotype correlation, and reported the fact the mild phenotypes correlate with DEB-AD whereas severe phenotypes correlated with DEB-AR.

Adults were diagnosed based on the typical clinical aspect, further on confirmed by molecular analysis. Children were initially diagnosed through molecular analysis. Based on literature data (the correlations between the identified mutations and the phenotype of the patient) we target the EB subtype. However, the prognosis is reserved because evolution in time is the deciding factor.

Conclusions

To diagnose DEB at birth is extremely difficult because its characteristic clinical picture is only completed during adulthood.

Sixteen patients suffering from EB have been considered, out of whom 6 children and 9 adults. The majority of these cases presented with severe DEB.

The clinical examination of the patient at birth is important but it is crucial to periodically clinically monitor the patient to identify the moment the complications appear.

Therefore, it is more cautious to avoid issuing a clear prognosis as the situation is only clear later. The way in which the disease evolves depends on the EB form as well as on the child's treatment and caretaking.

EB INVESTIGATIVE STUDY

Introduction

The final diagnosis of EB was formulated based on molecular analysis for patients that presented clinical manifestations indicating DEB. Molecular analysis implies immunofluorescence mapping to indicate the major type of EB (simplex, junctional or dystrophic). This was then followed by DNA analysis which comprised DNA isolation, amplification and sequencing in order to identify the mutations that

trigger the pathogenesis of this disease. Molecular analysis can precisely indicate the EB subtype.

Objectives

- a. To implement the molecular diagnosis of DEB
 - Collect individual data
 - Include patients with suspicion of DEB in the study (based on anamnesis, clinical examination and immunofluorescence mapping)
 - Identify DEB for cases with suspicion of DEB via molecular diagnosis
 - Design a more rapid strategy to identify mutations
- b. To improve our comprehension of the pathogenesis mechanism by discovering new mutations and new phenotypic manifestation of the already-known mutations
 - Analyse mutations identified at EB patients in Romania as well as foreign patients
 - Establish the phenotype-genotype correlation
 - Identify new mutations

Materials and method

Immunofluorescence mapping

Immunofluorescence mapping (IFM) is used to diagnose EB. This technique enables the identification of the level at which the cleavage takes place within the skin of the EB patients. Cleavage can be intradermic, intra-lamina lucida or sub-lamina densa.

IFM can offer information on the three types of EB as well as the affected structural protein. This procedure should be performed before the molecular analysis.

This method is based on the use of two antibodies – the primary antibody which targets a certain protein within the dermic-epidermic junction, and the second antibody, marked fluorescently and which recognizes the first antibody.

In DEB, skin fluorescence showed that the main component of anchorage fibres, collagen VII, is reduced (the coloration is at the superior pole of the blister) or even absent.

DNA Analysis

Isolation of genomic DNA

Genomic DNA (gDNA) was extracted from peripheral leukocytes. A QIAamp mini kit (produced by QIAGEN) was used for this procedure; the protocol employed was provided with the kit.

Genomic DNA fragments amplification through PCR

PCR (polymerase chain reaction) is a quick procedure for the *in vitro* enzyme amplification of a specific DNA fragment. The method is based on the principle of primer extension ('primer' or 'amplimer'). This technique uses 2 synthetically-made oligonucleotide primers ('forward primer' and 'reverse primer'), complementary to the 3' (three prime) ends of each of the sense and anti-sense strands of the DNA target. They trigger the synthesis of the DNA according to the initial DNA fragment template.

The necessary components for the reaction are the following: DNA template, primers, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), thermostable DNA polymerase - thermostable Taq polymerase, various buffer solutions.

COL7A1 gene, one of the genes with the highest number of exons, is made of 118 exons. We needed 73 pairs of primers to amplify the 118 exons and the fragments situated on the border between exon and intron. We used a strategy to identify mutations more rapidly; we divided the exons into 3 categories, according to the frequency of mutations (as described in literature) as follows: exons with high frequency mutations, exons with medium frequency mutations and exons with low frequency mutations. Based on this division, we split primers according to the mutation rate at the exon level and the annealing temperature.

DNA sequencing

This method allows for gene structure analysis, identification of the mutations that triggered the disease as well as the analysis of the amino acids sequences of the protein codified by the respective gene.

The resulted descendants were evaluated with the help of ABI prism 3100 system.

Restriction enzyme digestion

This procedure is used to confirm the results obtained through the sequencing reaction.

Restriction enzymes fragment the DNA at its restriction site. The result is a definite, characteristic and reproducible number of DNA fragments. Restriction sites are located at various distances; therefore resulted fragments are not equal and are easy to separate through electrophoresis based on the molecular weight. Various

mutations might modify the restriction site (no longer recognized by the restriction enzyme) or can even create new sites.

Results

We have analysed a number of 16 DEB patients, out of whom 5 presented with DEB-AD, 3 with DEB-AR, 1 with inverse DEB-AR and 7 patients with severe, generalised DEB-AR.

The majority of the mutations identified were at the level of the high priority exons.

Discussions

Mutation analysis is a time and money consuming technique because it needs an entire gene to enable the identification of the EB subtype. EB can be caused by various and numerous mutations. In order to identify the particular mutation, we used a strategy that implied the division of the 118 exons into 3 groups, as follows: high priority exons (identified by the literature with a high frequency of mutations), medium priority exons and low priority exons. The most frequent mutation identified is 425A>G, p. K142R, located at the level of exon 3, associated with a severe phenotype. It is a mutation that determines a premature termination of the codon and the synthesis of a very low quantity of protein. DEB-AD is associated with a milder phenotype, and the mutations were identified at the level of exons 73, 74 and 75.

It can be concluded that milder phenotypes are associated with a positive staining for collagen VII at immunofluorescence as well as with mutations of the missense type, whereas severe phenotypes are associated with the absence of staining for collagen VII as well as with mutations of the nonsense type or which cause a premature termination of the codon.

GENERAL DISCUSSION

EB diagnosis is complex one and it is based on the clinical assessment of the patient and their family as well as on the molecular diagnosis which includes immunofluorescence mapping and mutation analysis. Immunofluorescence mapping provides information on the three forms of EB as well as on the structural protein affected. It is performed before mutation analysis. However, this method is not quantitatively efficient as it is impossible to precisely distinguish all the EB subtypes merely on the degree of antibodies staining at tissue level. In spite of this limitation, immunofluorescence mapping can help us exclude severe generalized DEB -AR, in the case of which the collagen VII staining is absent.

Mutation analysis is the last stage through which the method of transmission as well as the location and type of molecular mutation is determined for EB patients. In the situation in which gene therapy is applied, EB patients depend on the determination of the specific mutations. Moreover, this analysis is also useful for prenatal diagnosis or *in vitro* fertilization.

One of the advantages in identifying COL7A1 gene mutation is the development of DNA-based prenatal testing within the risk families to identify recurrence or severe forms of the disease.

Another consequence is the impact on the genetic counselling for EB families.

Currently, high level research focuses on the collagen VII therapy as well as on gene therapy. Consequently, monitoring the natural evolution of EB patients is vital especially in precisely identifying the moment therapy becomes necessary for these patients.

Periodic examination of patients is important for the early identification and treatment of squamous-cell carcinoma lesions as this type of carcinoma has been rated as extremely aggressive.

GENERAL CONCLUSIONS

We have estimated, for the first time in Romania, the total number of EB patients. Moreover, we have also managed to approximate the distribution of the 3 EB categories (simplex, junctional and dystrophic) in Romania. We have grouped patients according to sex, age categories, urban/rural origin as well as their main causes of death. Based on our results, we have estimated the prevalence and incidence of EB in Romania and compared its epidemiological situation in our country with the one as reported in other regions of the world.

Our clinical study helped in establishing an updated image for EB patients. Sixteen patients, suffering from different types of EB were included in the study, the clinical manifestations ranging from mild forms (DEB-AD) to intermediary forms (generalised DEB-AR) and even severe (severe generalised DEB-AR).

We have implemented the process of molecular diagnosis of DEB, which consisted in immunofluorescence mapping and genetic analysis. We have, thus, obtained a more rapid way of identifying mutations.

ORIGINALITY AND PERSONAL CONTRIBUTIONS

The chapter entitled 'Current State of Knowledge' comprises an overview on recent literature in this field as well as a brief etiological classification of diseases within the EB family. Due to progress in the field of genetics, genetic disorders are more and more characterized through molecular analysis and less clinically.

Several studies have been performed in chapter 'Personal Contributions'. The epidemiological study is a statistical representation of EB cases in Romania as well as a comparison with the situation in other countries and regions.

The second study comprises clinical presentations of EB cases as well as their staging according to the severity of the clinical manifestations.

In the third study we offered an updated, experimentally-proven methodology for EB molecular diagnosis. We have implemented this complex methodology for the first time in Romania and, by discovering new mutations, we have improved the worldwide knowledge on the pathogenesis of genodermatoses.