
TEZĂ DE DOCTORAT

Abordări terapeutice rare în epidermoliza buloasă

Doctorand **Irina Condrat**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Rodica Cosgarea**

CLUJ-NAPOCA 2023



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Introducere	17
1.1 Structura membranei bazale	17
1.2 Hemidesmosomii	19
1.3 Colagen XVII	19
1.4 Funcțiile colagenului XVII	20
1.5 COL17A1	21
2. Epidermoliza buloasă	23
2.1 Epidermoliza buloasă joncțională	32
2.2 Clasificare JEB	32
2.3 Diagnostic, screening și prevenție	33
2.4 Management și tratament	35
2.5 Tratamentul complicațiilor	35
3. Abordări terapeutice și direcții viitoare	37
3.1 Citirea translației (Readthrough translațional)	37
3.2 Terapie readthrough: PTC-RT	40
3.3 Abordări terapeutice pentru mutațiile nonsense	41
3.4 Compuși care fac readthrough	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru. Obiective	49
2. Metodologie generală	51
3. Studiul 1 – Epidermoliza buloasă joncțională: heterogenitate alelică și stratificare mutațională în medicina de precizie	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteza de lucru	61
3.3. Rezultate	62
3.4. Discuții	68
3.5. Concluzii	73
4. Studiul 2 – Read-through pentru mutații nonsens în epidermoliza buloasă joncțională cu deficit de colagen de tip XVII	75
4.1. Introducere	75
4.2. Material și metodă	77
4.3. Rezultate	78
4.3.1. Descrierea cohortei de linii celulare	79
4.3.2. Aminoglicozidele și Amlexanox induc citirea translației și	82

readthrough în keratinocitele JEB	
4.3.3 Readthrough in mutația W464* in COL17 si JEB	83
4.3.4 Readthrough in mutația R688* in COL17 si JEB	85
4.3.5 Readthrough in mutația R1226* in COL17 si JEB	86
4.3.6 Identificarea colagenului XVII la IF pentru mutația W464* după tratament cu TRIDS	87
4.4. Discuții	91
5. Studiul 3- Caracterizarea în vitro a keratinocitelor din epidermoliza buloasă joncțională sub tratament cu Aminoglicozide și Amlexanox	93
5.1. Introducere	93
5.2 Materiale și metode	94
5.3 Rezultate	96
5.3.1 Modificări de viabilitate și morfologie la keratinocitele tratate cu TRIDS	96
5.3.2 Testele de citotoxicitate pe keratinocite JEB sub tratament TRIDS	98
5.4 Discuții	101
6. Discuții generale	103
7. Concluzii generale	105
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	108

INTRODUCERE

Epidermoliza buloasă (EB) este un grup heterogen de afecțiuni genetice rare caracterizate prin fragilitate cutanată și este cauzată de mutații la nivelul genelor care codează proteine cu rol în adeziunea celulară. Aceste proteine sunt componente ale hemidesmosomilor situați la nivelul joncțiunii dermo-epidermice, iar în lipsa acestor proteine adeziunea celulară este compromisă și apare clivaj în piele, clivaj pe baza căruia apar 4 tipuri de epidermoliza buloasă - simplex, joncțională, distrofică și sindrom Kindler.

Epidermoliza buloasă joncțională, caracterizată prin clivajul pielii în lamina lucidă, este heterogenă din punct de vedere molecular. Proteinele implicate sunt componentele transmembranare hemidesmosomale, collagenul XVII și integrina $\alpha 6\beta 4$, laminina extracelulară-332 sau subunitatea integrinei de adeziune focală $\alpha 3$. Principalele semne clinice includ vezicule și fliclene ale pielii și mucoasei, distrofia sau pierderea unghiilor și amelogeneza imperfectă. Epidermoliza buloasă joncțională este cauzată de mutații la nivelul genei COL17A1, care codează sinteza de collagen XVII, cu rol important în ancorarea epidermului de derm. Aceste mutații duc la pierderea completă sau incompletă a collagenului XVII în piele. În particular, pacienții care prezintă mutații nonsens cu codon stop prematur dezvoltă fenotipuri severe și au calitatea vieții semnificativ diminuată.

Până în prezent, tratamentul EB este simptomatic, având ca scop sprijinirea vindecării rănilor, prevenirea și rezolvarea complicațiilor într-o abordare multidisciplinară. În ultimii 20 de ani, cercetătorii au avut succes în identificarea mutațiilor care stau la baza EB, în crearea modelelor de șoareci și aplicarea acestor cunoștințe pentru proiectarea unor terapii moleculare și celulare specifice. Acestea vizează corectarea, înlocuirea sau reducerea activității genei sau proteinei defecte sau interferența în căile moleculare dereglate.

Pe baza datelor actuale, majoritatea mutațiilor care cauzează boli în EB joncțională sunt mutații nonsens care creează un PTC. Prin urmare, o abordare terapeutică pentru a depăși mutațiile PTC ar putea fi de un beneficiu considerabil pentru acești pacienți. Antibioticele aminoglicozidice precum gentamicina, paromomicina și un compus numit G418 pot promova citirea codonilor de terminare prematură (PTC) prin legarea de ARN-ul ribozomal, restabilind cu o eficiență diferită sinteza proteinelor de lungime completă în culturile de celule și în modelele animale. Amlexanox este o altă moleculă mică care stabilizează mutația nonsens care conține ARNm și induce sinteza proteinelor de lungime completă din aceste ARNm .

Scopul acestei teze este de a determina dacă mutațiile nonsens în COL17A1 răspund la moleculele mici care determină citirea PTC-urilor. Punctul de plecare îl reprezintă dovezile preclinice care susțin aceste moleculele mici pentru tratamentul pacienților care suferă de subtipuri de EB distrofică.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Grupul de epidermolize buloase dobândite cuprinde patologii heterogene care se manifestă prin fragilitate cutanată și la nivelul mucoaselor, apărute după un traumatism minor, pentru care nu există la ora actuală un tratament eficient. Studiul corelațiilor genotip-fenotip și al modelelor pe șoareci au indicat faptul că exprimarea a până la 10% a nivelurilor normale de proteine este asociată cu o ameliorare semnificativă a fenotipului.

Prezența codonilor de terminare prematură (PTC) este asociată cu o treime din toate tulburările genetice și apare fie din mutații nonsens, fie din mutații care conduc la splicing ARNm care modifică cadrul de citire ribozomal ducând la întâlnirea unui PTC. Mutațiile nonsense reprezintă mutațiile care schimbă un codon normal într-un codon stop, ducând la terminarea prematură a translației în cadrul sintezei de proteină.

În ultimele decenii s-a realizat suprimarea acestor codoni de terminare prematură în mașinăria de translație, un fenomen numit supresie nonsens sau readthrough PTC, care permite ca translația să continue, astfel încât o polipeptidă de lungime completă să poată fi sintetizată și funcția proteinei să fie restabilită. Această abordare terapeutică a fost utilizată pe diferite patologii, cum ar fi fibroza chistică (FC), distrofia musculară Duchenne (DMD), hemofilia, β -talasemia, atrofia musculară spinală, precum și în EB distrofică.

Au fost identificați astfel mai mulți compuși capabili să inducă readthrough prin supresia codonilor stop, numiți TRIDS (translational readthrough inducing drugs). În tratamentul EB recesiv distrofic (RDEB) pentru 22 de mutații nonsens distincte, antibioticele din clasa aminoglicozidelor (gentamicina, paramomicina și G418) au reușit să inducă diferite grade de PTC readthrough și să restaureze colagen VII funcțional prin creșterea stabilității ARNm COL7A1. Cogan și colaboratorii au arătat rezultate pozitive pentru Gentamicină, Paromomicină și G418 la concentrații optime de 400 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ și respectiv 8 $\mu\text{g/ml}$, cu sinteza de colagen VII de lungime completă. O singură doză de tratament a fost capabilă să inducă producția de colagen VII timp de până la două săptămâni și, de asemenea, să încorporeze proteina nou formată în joncțiunea epidermală dermică. Într-un trial clinic, în RDEB gentamicina topică a corectat separarea dermo-epidermică, a dus la închiderea îmbunătățită a plăgii și la reducerea formării de vezicule. Nu au existat efecte secundare nefavorabile ale tratamentelor cu gentamicina. Aceste rezultate sugerează că terapia de inhibare a mutațiilor nonsens mediată de aminoglicozide poate oferi o opțiune nouă și noninvazivă de tratament pentru pacienții cu EB recesiv distrofică cu mutații nonsens. Pentru alte afecțiuni, aminoglicozidele sunt deja în studii preclinice și trialuri clinice.

Amlexanox este o altă moleculă mică care stabilizează mutațiile nonsens ce conțin ARNm și induce sinteza proteinelor cu lungime întregă din aceste ARNm. Amlexanox este o moleculă mică, netoxică, cu proprietăți antialergice și antiinflamatorii, care a fost folosită în ultimele decenii pentru tratamentul ulcerului oral și astmului.

La pacienții care suferă de RDEB, Amlexanox a reușit să inducă sinteza de colagen VII de lungime completă atât în keratinocite, cât și în fibroblaste purtătoare de mutație nonsens PTC în unele cazuri mai mult de 50% față de controalele normale. Colagenul de tip VII sintetizat a fost ușor detectabil în mediul de cultură celulară și, de asemenea, localizat la joncțiunea dermo-epidermică în cultura organotipică a pielii. Acest studiu preclinic demonstrează potențialul utilizării amlexanoxului pentru tratamentul pacienților cu RDEB care adăpostesc mutația PTC în COL7A1.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiu 1. Epidermoliza buloasă joncțională: heterogenitate alelică și stratificare mutațională în medicina de precizie

Scop : Analiza mutațională a unei cohorte formată din 68 de pacienți cu epidermoliză buloasă joncțională cu mutații COL17A1 din Clinica de Dermatologie Uniklinik Freiburg (Germania), diagnosticată în ultimii 15 ani în vederea îmbunătățirii bazei de date internațională. Ulterior raportare de mutații noi, evaluare corelații genotip-fenotip și, în final, identificare de potențialele terapii experimentale pentru acești pacienți.

Materiale și metode: După consimțământul informat, a fost extras ADN-ul genomic din sânge EDTA, apoi s-a efectuat analiza mutațiilor prin secvențierea bidirecțională Sanger. Într-un caz a fost efectuată analiza exomului clinic. Ulterior s-au efectuat culturi celulare, izolare de ARN și RT-PCT, Pentru anumite cazuri s-au izolat protein și s-a efectuat și immunoblotting.

Rezultate: Au fost identificate cincizeci de mutații COL17A1 distincte, dintre care 9 mutații care, după cunoștințele noastre, nu au fost raportate înainte. Acestea includ două mutații nonsens c.1750C>T, p.R584* și c.4153C>T, p.Q1385*, cinci mutații frameshift, o mutație a codonului de inițiere a translației și o mutație a locului de îmbinare. Câteva dintre cazuri au demonstrat corelații interesante genotip-fenotip sau cursul clinic al bolii și au fost evidențiate.

Ulterior s-au stratificat aceste mutații pe baza numărului de întâlniri alelice și a tipului de mutație. Aproximativ 33% dintre alelele mutante COL17A1 sunt mutații nonsens, iar alte 33% sunt mutații de schimbare a cadrului care conduc la formarea de codoni de terminare prematură (PTC).

Concluzii : Descrierea cohortei cu poziția mutațiilor pe gena COL17A1 și tratamentul propus pe baza tipului de mutație, precum și corelațiile genotip-fenotip raportate suplimentar vor ajuta la diagnostic și consiliere genetică, oferind astfel avantaje în cadrul clinic. Stratificarea mutațiilor și consecințele lor ar trebui să ofere, de asemenea, perspective pentru strategiile de analiză a mutațiilor și potențialele terapii.

O astfel de stratificare a mutațiilor susține frecvența ridicată a mutațiilor nonsens sau schimbarea cadrului care duce la codoni de terminare prematură și necesitatea terapiei

pacienților cu JEB. Mai mult, ratele de recurență oferă perspectivă posibilelor asemănări între diferite medii culturale sau măsura în care factorii externi pot afecta această boală.

Studiul 2 – Read-through pentru mutații nonsens în epidermoliza buloasă joncțională cu deficit de colagen de tip XVII

Scop: Generarea de linii celulare keratinocitare de la pacienții cu mutații nonsens PTC în COL17A1 din Clinica de Dermatologie Uniklinik Freiburg (Germania) și tratarea acestora cu aminoglicozide (gentamicină, paromomicină și un derivat G418) și amlexanox și determinarea expresiei proteinei dacă aceasta este restabilă.

Determinarea concentrației optime pentru mutațiile și compușii promițători. Compușii capabili să restaureze expresia proteinelor au fost în continuare testați pentru a determina concentrația optimă și durata efectului acestora.

Materiale și metode: Keratinocitele au fost cultivate la 37 °C și 5% CO₂ în mediu de creștere keratinocitar. Apoi au fost însămânțate în plăci cu 6 godeuri, 200.000 celule/godeu până s-a obținut o confluență de 80-90% și s-au tratat cu concentrații diferite de compuși. Pentru Gentamicina s-au folosit concentrații de 100-200-400-800 μg/ml, pentru Paromomicină concentrații de 500-1000-1500 μg/ml, pentru G418 1-2-4-8 μg/ml, iar pentru Amlexanox fie 50, fie 250 μM. Ulterior s-a efectuat Western blot pentru evidențierea colagenului de tip XVII.

Rezultate: După 96 h de tratament cu Aminoglicozide și Amlexanox, răspunsul terapeutic a fost de sinteză de colagen tip XVII de lungime normală (180kDa) pentru 3 mutații nonsense W464*, R688* și R1226*, iar Gentamicina a avut mai mult succes decât Amlexanox. Pentru restul de 4 mutații nu s-a putut identifica gradul de readthrough indus. Colagenul a fost identificat atât în lizatele celulare, cât și în spațiul extracelular prin forma sa de 120 kDa, prin imunofluorescență. Nu a fost identificată o singură doză eficientă sau un compus eficient pe toate liniile studiate.

Concluzii: Răspunsurile la tratament au fost variabile în funcție de tipul mutației și s-au indus grade diferite de readthrough. Am aratat că aminoglicozidele pot induce citirea mutațiilor nonsens COL17A1, dar efectele și concentrația trebuie testate in vitro pentru fiecare mutație înainte ca acest tratament să poată fi propus pacienților ca terapie personalizată

Studiul 3- Caracterizarea in vitro a keratinocitelor din epidermoliză buloasă joncțională sub tratament cu Aminoglicozide și Amlexanox

Scop: Evaluarea efectelor compusilor de readthrough (aminoglicozide, Amlexanox) asupra viabilității keratinocitelor cu epidermoliză buloasă joncțională și asupra potențialului lor de toxicitate celulară. Caracterizarea morfologiei celulare cât și performanța celulelor sub aceste medicamente cu ajutorul unor teste colorimetrice bine stabilite cu saruri de tetrazolium (MTT)

Materiale si metode: S-au aplicat teste de proliferare celulara MTT pentru a măsura fie rata de proliferare celulară, fie reducerea viabilității celulare, cu ajutorul a două cititoare cu microtitrare cu 96 de godeuri (I și II) cu filtru de 650 și 570 nm, cu fund plat și keratinocite umane normale și keratinocite JEB cu două concentrații de celule, 2500 celule/godeu și 5000 celule/godeu.

Rezultate: Tratamentul cu aminoglicozide arată o structură modificată a keratinocitelor cu silueta alungită, formă sferoidă și comportament slab de formare a coloniilor , iar tratamentul cu Amlexanox duce la celule apoptotice, fără formarea de colonii și fără alungire dendritică.

În doze mari la 48 h, toate medicamentele testate au arătat o scădere a ratei de proliferare celulară, Amlexanox fiind cel care a scăzut cel mai mult rata proliferării celulare, asupra keratinocitelor suferind deja de JEB. Aminoglicozide precum gentamicina, paromomicină, G418 au la început un efect potențial nociv asupra celulelor, dar după 96 de ore celulele își revin și își îmbunătățesc viabilitatea. Același lucru se poate observa și cu Amlexanox.

Discutii: Toate TRIDS au un anumit grad de efect citotoxic detectabil asupra keratinocitelor JEB, dar sunt specifice pentru fiecare linie și ar trebui să se acorde o atenție specială fiecărei linii celulare. Stimularea readthrough-ului translațional este un fenomen tranzitoriu, iar utilizarea terapeutică a medicamentelor necesită administrarea constantă și probabil pe tot parcursul vieții a compușilor.

CONCLUZII GENERALE, ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚII INOVATIVE

În prezentul studiu, trecem în revistă cohorta din Clinica de Dermatologie Uniklinik Freiburg din Germania formată din 68 de pacienți JEB cu mutații COL17A1 diagnosticate în ultimii 15 ani. Am analizat baza de date mutațională existentă pe COL17A1 și am stratificat mutațiile întâlnite până în prezent, oferind un mic ghid de management terapeutic pentru pacienții cu JEB, în funcție de fiecare mutație în parte. De asemenea am raportat în literatura de specialitate și am îmbogățit baza de date internațională cu 9 noi mutații nepublicate anterior pe gena COL17A1.

Ulterior, am examinat șapte linii celulare de la pacienți care suferă de epidermoliza buloasă joncțională și mutații STOP în gena COL17A1, iar acestea au fost tratate cu antibiotice aminoglicozide (gentamicina, paromomicina și G418) sau compuși precum Amlexanox, cu potențial să inducă sinteza normală de COL17 și să reprezinte o potențială abordare terapeutică pentru acești pacienți, prin intermediul terapiei readthrough. În total 3 cazuri din 7 au răspuns la terapia readthrough, iar Gentamicina a avut mai mult succes decât Amlexanox. În rezumat, arătăm că aminoglicozidele pot induce citirea mutațiilor nonsens COL17A1, dar efectele și concentrația trebuie testate in vitro pentru fiecare mutație înainte ca acest tratament să poată fi propus pacienților ca terapie personalizată.

Ulterior, am evaluat efectul acestora asupra culturilor celulare, pentru a oferi cunoștințe suplimentare cu privire la utilizarea lor ca tratament. Gentamicina a scăzut viabilitatea celulară la 24 de ore, dar a fost recuperată și chiar a crescut în 48 de ore. Tratamentul cu Gentamicină, Paromomicină, G418 și Amlexanox, la început scade viabilitatea celulară, în 96 de ore celulele se recuperează și încep să prolifereze mai bine decât celulele ne tratate. Același lucru s-a putut observa și cu Amlexanox.

Rezultatele prezentului studiu confirmă dovezile pre-clinice care susțin utilizarea acestor molecule mici pentru tratamentul pacienților cu epidermoliză buloasă rară, precum epidermoliza buloasă jonctinală.

PHD THESIS

Therapeutic approaches in rare subtypes of epidermolysis bullosa

PhD student **Irina Condrat**

PhD supervisor Prof.dr. **Rodica Cosgarea**

CLUJ-NAPOCA 2023



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Introduction	17
1.1 The structure of the basement membrane	17
1.2 Hemidesmosomes	19
1.3 Collagen XVII	19
1.4 Functions of collagen XVII	20
1.5 COL17A1	21
2. Epidermolysis bullosa	23
2.1 Junctional epidermolysis bullosa	32
2.2 JEB classification	32
2.3 Diagnostic, screening and prevention	33
2.4 Management and treatment	35
2.5 Treatment of complications	35
3. Therapeutic approaches and future directions	37
3.1 Translational Readthrough	37
3.2 Readthrough therapy: PTC-RT	40
3.3 Therapeutic approaches for nonsense mutations	41
3.4 Readthrough compounds	41
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis. Objectives	49
2. General methodology	51
3. Study 1 – Junctional epidermolysis bullosa: allelic heterogeneity and mutational stratification in precision medicine	59
3.1. Introduction	59
3.2. Working hypothesis	61
3.3. Results	62
3.4. Discussion	68
3.5. Conclusions	73
4. Study 2 – Read-through for nonsense mutations in collagen deficient junctional epidermolysis bullosa type XVII	75
4.1. Introduction	75
4.2. Material and method	77
4.3. Results	78
4.3.1. Description of the cell line cohort	79
4.3.2 Aminoglycosides and Amlexanox induce translation reading and readthrough in JEB keratinocytes	82

4.3.3 Readthrough in mutation W464* in COL17 and JEB	83
4.3.4 Readthrough in mutation R688* in COL17 and JEB	85
4.3.5 Readthrough in mutation R1226* in COL17 and JEB	86
4.3.6 Identification of collagen XVII to IF for W464* mutation after TRIDS treatment	87
4.4. Discussions	91
5. Study 3- In vitro characterization of keratinocytes from junctional epidermolysis bullosa under treatment with aminoglycosides and Amlexanox	93
5.1. Introduction	93
5.2 Materials and methods	94
5.3 Results	96
5.3.1 Changes in viability and morphology in TRIDS-treated keratinocytes	96
5.3.2 Cytotoxicity tests on JEB keratinocytes under TRIDS treatment	98
5.4 Discussions	101
6. General discussions	103
7. General conclusions	105
8. Originality and innovative contributions of the thesis	107
BIBLIOGRAPHY	108

INTRODUCTION

Epidermolysis bullosa (EB) is a heterogeneous group of rare genetic disorders characterized by skin fragility and is caused by mutations in genes encoding proteins involved in cell adhesion. These proteins are components of the hemidesmosomes located at the dermo-epidermal junction, and in the absence of these proteins, cell adhesion is compromised and cleavage occurs in the skin, cleavage based on which 4 types of bullous epidermolysis appear - simplex, junctional, dystrophic and Kindler syndrome.

Junctional epidermolysis bullosa, characterized by splitting of the skin into the lamina lucida, is molecularly heterogeneous. The proteins involved are the hemidesmosomal transmembrane components, collagen XVII and $\alpha 6\beta 4$ integrin, extracellular laminin-332, or focal adhesion integrin subunit $\alpha 3$. The main clinical signs include blisters and blisters of the skin and mucosa, nail dystrophy or loss, and amelogenesis imperfecta. Junctional epidermolysis bullosa is caused by mutations in the COL17A1 gene, which encodes the synthesis of collagen XVII, with an important role in anchoring the epidermis to the dermis. These mutations lead to the complete or incomplete loss of collagen XVII in the skin. In particular, patients harboring premature stop codon nonsense mutations develop severe phenotypes and have significantly diminished quality of life.

To date, the treatment of EB is symptomatic, aiming to support wound healing, prevent and resolve complications in a multidisciplinary approach. Over the past 20 years, researchers have been successful in identifying the mutations that underlie EB, creating mouse models, and applying this knowledge to design specific molecular and cellular therapies. They are aimed at correcting, replacing or reducing the activity of the defective gene or protein or interfering with dysregulated molecular pathways.

Based on current data, most disease-causing mutations in junctional EB are nonsense mutations that create a PTC. Therefore, a therapeutic approach to overcome PTC mutations could be of considerable benefit to these patients. Aminoglycoside antibiotics such as gentamicin, paromomycin, and a compound called G418 can promote readthrough of premature termination codons (PTCs) by binding to ribosomal RNA, restoring full-length protein synthesis with varying efficiency in cell culture and animal models. Amlexanox is another small molecule that stabilizes nonsense mutation containing mRNAs and induces the synthesis of full-length proteins from these mRNAs.

The goal of this thesis is to determine whether nonsense mutations in COL17A1 respond to small molecules that cause PTCs to be read. The starting point is preclinical evidence supporting these small molecules for the treatment of patients suffering from subtypes of dystrophic EB.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The group of acquired bullous epidermolysis includes heterogeneous pathologies that are manifested by fragility of the skin and mucous membranes, appearing after a minor trauma, for which there is currently no effective treatment. Genotype-phenotype correlation studies and mouse models have indicated that expression of up to 10% of normal protein levels is associated with a significant amelioration of the phenotype.

The presence of premature termination codons (PTCs) is associated with one-third of all genetic disorders and arises from either nonsense mutations or mutations that lead to mRNA splicing that alter the ribosomal reading frame resulting in the encounter of a PTC. Nonsense mutations are mutations that change a normal codon into a stop codon, leading to premature termination of translation during protein synthesis.

Suppression of these premature termination codons in the translation machinery, a phenomenon called nonsense suppression or PTC readthrough, has been achieved in recent decades, allowing translation to continue so that a full-length polypeptide can be synthesized and protein function restored. This therapeutic approach has been used on different pathologies, such as cystic fibrosis (CF), Duchenne muscular dystrophy (DMD), hemophilia, β -thalassemia, spinal muscular atrophy, as well as in dystrophic EB.

Thus, several compounds capable of inducing readthrough by suppressing stop codons, called TRIDS (translational readthrough inducing drugs), have been identified. In the treatment of recessive dystrophic EB (RDEB) for 22 distinct nonsense mutations, antibiotics of the aminoglycoside class (gentamicin, paramomycin, and G418) were able to induce varying degrees of PTC readthrough and restore functional collagen VII by increasing COL7A1 mRNA stability. Cogan et al showed positive results for Gentamicin, Paromomycin, and G418 at optimal concentrations of 400 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively, with full-length collagen VII synthesis. A single dose of treatment was able to induce collagen VII production for up to two weeks and also incorporate the newly formed protein into the dermal epidermal junction. In a clinical trial, in RDEB topical gentamicin corrected dermo-epidermal separation, led to improved wound closure and reduced blistering. There were no adverse side effects of gentamicin treatments. These results suggest that aminoglycoside-mediated nonsense mutation inhibition therapy may provide a novel and noninvasive treatment option for patients with dystrophic recessive EB with nonsense mutations. For other conditions, aminoglycosides are already in preclinical studies and clinical trials.

Amlexanox is another small molecule that stabilizes mRNA-containing nonsense mutations and induces the synthesis of full-length proteins from these mRNAs. Amlexanox is a small, non-toxic molecule with anti-allergic and anti-inflammatory properties that has been used for decades to treat oral ulcers and asthma.

In patients suffering from RDEB, Amlexanox was able to induce the synthesis of full-length collagen VII in both keratinocytes and fibroblasts carrying the PTC nonsense mutation in some cases by more than 50% compared to normal controls. Synthesized type VII collagen was readily detectable in the cell culture medium and also localized at the dermo-epidermal junction in organotypic skin culture. This preclinical study demonstrates the potential of using amlexanox for the treatment of RDEB patients harboring the PTC mutation in COL7A1.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Junctional epidermolysis bullosa: allelic heterogeneity and mutational stratification in precision medicine

Purpose: Mutational analysis of a cohort of 68 patients with junctional epidermolysis bullosa with COL17A1 mutations from the Dermatology Clinic Uniklinik Freiburg (Germany), diagnosed in the last 15 years in order to improve the international database. Subsequently reporting new mutations, evaluating genotype-phenotype correlations and finally identifying potential experimental therapies for these patients.

Materials and methods: After informed consent, genomic DNA was extracted from EDTA blood, then mutation analysis was performed by bidirectional Sanger sequencing. Clinical exome analysis was performed in one case. Subsequently, cell cultures, RNA isolation and RT-PCT were performed. For certain cases, protein was isolated and immunoblotting was also performed.

Results: Fifty distinct COL17A1 mutations were identified, including 9 mutations that, to our knowledge, have not been reported before. These include two nonsense mutations c.1750C>T, p.R584* and c.4153C>T, p.Q1385*, five frameshift mutations, one translation initiation codon mutation and one splice site mutation. Several of the cases demonstrated interesting genotype-phenotype correlations or clinical course of the disease and have been highlighted.

We then stratified these mutations based on the number of allelic encounters and mutation type. About 33% of COL17A1 mutant alleles are nonsense mutations, and another 33% are frameshift mutations leading to the formation of premature termination codons (PTCs).

Conclusions: The description of the cohort with the position of mutations on the COL17A1 gene and the proposed treatment based on the type of mutation, as well as the genotype-phenotype correlations reported additionally will help in diagnosis and genetic counseling, thus providing advantages in the clinical setting. Stratification of mutations and their consequences should also provide insights for mutation analysis strategies and potential therapies.

Such mutational stratification supports the high frequency of nonsense or frameshift mutations leading to premature termination codons and the need for therapy of JEB patients. Furthermore, recurrence rates provide insight into possible similarities between different cultural backgrounds or the extent to which external factors may affect this disease.

Study 2 – Read-through for nonsense mutations in epidermolysis bullosa junctional with type XVII collagen deficiency

Aim: To generate keratinocyte cell lines from patients with PTC nonsense mutations in COL17A1 from the Dermatology Clinic Uniklinik Freiburg (Germany) and treat them with aminoglycosides (gentamicin, paromomycin and a G418 derivative) and amlexanox and determine if protein expression is restored.

Determination of optimal concentration for mutations and promising compounds. Compounds capable of restoring protein expression were further tested to determine the optimal concentration and duration of their effect.

Materials and methods: Keratinocytes were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in keratinocyte growth medium. They were then seeded in 6-well plates, 200,000 cells/well until 80-90% confluence was obtained and treated with different concentrations of compounds. For Gentamicin concentrations of 100-200-400-800 µg/ml were used, for Paromomycin concentrations of 500-1000-1500 µg/ml, for G418 1-2-4-8 µg/ml, and for Amlexanox either 50 , or 250 µM. Later, Western blotting was performed to highlight type XVII collagen.

Results: After 96 h of treatment with Aminoglycosides and Amlexanox, the therapeutic response was synthesis of collagen type XVII of normal length (180kDa) for 3 nonsense mutations W464*, R688* and R1226*, and Gentamicin was more successful than Amlexanox . For the remaining 4 mutations, the degree of induced readthrough could not be identified. Collagen was identified both in cell lysates and in the extracellular space by its 120 kDa form, by immunofluorescence. No single effective dose or compound was identified across all lines studied.

Conclusions: Responses to treatment were variable depending on the type of mutation and different degrees of readthrough were induced. We have shown that aminoglycosides can induce read-through of COL17A1 nonsense mutations, but the effects and concentration must be tested in vitro for each mutation before this treatment can be offered to patients as a personalized therapy.

this treatment can be proposed to patients as a personalized therapy.

Study 3- In vitro characterization of keratinocytes from junctional epidermolysis bullosa under treatment with Aminoglycosides and Amlexanox

Purpose: To evaluate the effects of readthrough compounds (aminoglycosides, Amlexanox) on keratinocyte viability with junctional epidermolysis bullosa and on their cellular toxicity potential. Characterization of cell morphology as well as cell performance under these drugs using well-established colorimetric assays with tetrazolium salts (MTT).

Materials and methods: MTT cell proliferation assays were applied to measure either the rate of cell proliferation or the reduction of cell viability using two 96-well microtitre readers (I and II) with 650 and 570 nm filter , flat bottom and normal human keratinocytes and JEB keratinocytes with two cell concentrations, 2500 cells/well and 5000 cells/well.

Results: Treatment with aminoglycosides shows an altered structure of keratinocytes with an elongated silhouette, spheroid shape and poor colony-forming behavior, and treatment with Amlexanox leads to apoptotic cells with no colony formation and no dendritic elongation.

In high doses at 48 h, all tested drugs showed a decrease in the rate of cell proliferation, Amlexanox being the one that decreased the rate of cell proliferation the most, on keratinocytes already suffering from JEB. Aminoglycosides such as gentamicin, paromomycin, G418 have a potentially harmful effect on the cells at first, but after 96 hours the cells recover and improve their viability. The same can be seen with Amlexanox.

Discussions: All TRIDS have some degree of detectable cytotoxic effect on JEB keratinocytes, but they are line-specific and special attention should be paid to each cell line. Stimulation of translational readthrough is a transient phenomenon, and therapeutic use of drugs requires constant and probably lifelong administration of the compounds.

GENERAL CONCLUSIONS, ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

In the present study, we review the cohort from the Dermatology Clinic Uniklinik Freiburg in Germany consisting of 68 JEB patients with COL17A1 mutations diagnosed during the last 15 years. We have analyzed the existing mutational database on COL17A1 and stratified the mutations encountered so far, providing a small guide to therapeutic management for patients with JEB, depending on each individual mutation. We also reported in the specialized literature and enriched the international database with 9 new mutations not previously published on the COL17A1 gene.

Subsequently, we examined seven cell lines from patients suffering from junctional epidermolysis bullosa and STOP mutations in the COL17A1 gene, and these were treated with aminoglycoside antibiotics (gentamicin, paromomycin and G418) or compounds such as Amlexanox, with the potential to induce the normal synthesis of COL17 and to represent a potential therapeutic approach for these patients, through readthrough therapy. A total of 3 cases out of 7 responded to readthrough therapy, and Gentamicin was more successful than Amlexanox. In summary, we show that aminoglycosides can induce readthrough of COL17A1 nonsense mutations, but the effects and concentration must be tested in vitro for each mutation before this treatment can be proposed to patients as a personalized therapy.

We then evaluated their effect on cell cultures to provide further insight into their use as a treatment. Gentamicin decreased cell viability at 24 h, but recovered and even increased at 48 h. Treatment with Gentamicin, Paromomycin, G418 and Amlexanox initially decreases cell viability, within 96 hours the cells recover and begin to proliferate better than untreated cells. The same could be seen with Amlexanox.

The results of the present study confirm the pre-clinical evidence supporting the use of these small molecules for the treatment of patients with rare epidermolysis bullosa, such as epidermolysis bullosa junctional.