

MINION-EB (Microbiome, INflammatlon & wOuNds in children with Epidermolysis bullosa) – Der Einfluss kutaner und systemischer Inflammation sowie von kutanem und enteralem Mikrobiom auf die Wachstumsentwicklungen von Kindern mit Epidermolysis bullosa: eine transversale monozentrische Studie

Englischer Titel: MINION-EB (Microbiome, INflammatlon & wOuNds in children with Epidermolysis bullosa) – Exploring the influence of inflammation and cutaneous and enteral microbiome on growth in children with epidermolysis bullosa: A transversal, monocentric study

Version 2, 25.02.2018

**Epidermolysis bullosa-
Zentrum**

Studienleitung:
Dr. med. Antonia Reimer

Telefon 0761 270-67010
E-Mail antonia.reimer@
uniklinik-freiburg.de
Hauptstraße 7, 79104 Freiburg

1. Zusammenfassung des Projekts

Bei schweren, generalisierten Formen der Genodermatose Epidermolysis bullosa (EB) kommt es lebenslang zur Bildung von Wunden an Haut und Schleimhäuten. Damit gehen lokale und systemische Entzündungsreaktionen einher. Wunden bei EB sind größtenteils bakteriell kolonisiert und oftmals superinfiziert. Neben Symptomen an Haut- und Schleimhäuten sind bei EB extrakutane Manifestationen wie Wachstumsverzögerungen, Gedeihstörungen und Anämie häufig. Die Einflussfaktoren auf das Wachstum bei EB sind vielfältig und schlecht verstanden. Unsere Hypothese ist, dass das Ausmaß der Wundfläche, systemische Inflammation und die Bakterienflora (Mikrobiom) von Haut, Schleimhaut und Darm einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum bei Kindern mit EB haben. In dieser Studie werden laborchemische Entzündungsparameter, das Ausmaß der Hautaffektation und die Beschaffenheit des kutanen und enteralen Mikrobioms erhoben. Die Daten werden dann mit den in einem vorausgegangenem Projekt erstellten EB-spezifischen Wachstumspercentilen für Gewicht, Größe und BMI korreliert. Durch die so gewonnenen neuen Erkenntnisse könnten sich wertvolle therapeutische Ansatzpunkte ergeben und somit eine Verbesserung der Lebensqualität für Kinder und Erwachsene mit EB erreicht werden.

2. Verantwortlichkeiten

Studienleitung: Frau Dr. Antonia Reimer, EB-Zentrum Freiburg und Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Freiburg, Hauptstraße 7, 79104 Freiburg, Tel 0761/270-67010, antonia.reimer@uniklinik-freiburg.de

Stellvertretende Studienleitung: Frau Prof. Dr. Cristina Has, ebenfalls Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Freiburg (Tel 0761/270-69920, cristina.has@uniklinik-freiburg.de): gemeinsame Konzeption und Durchführung der Studie

Weitere Beteiligte sind:

- Prof. Dr. Hauke Busch, Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie, ist als theoretischer Physiker auf dem Gebiet der Systembiologie versiert und wird die Mikrobiomsequenzierung durchführen.
- Dr. Dr. Melanie Börries, Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung: Wird als Experte für Systembiologie die Mikrobiomanalysen durchführen.
- Statistiker des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik (IMBI) am Universitätsklinikum Freiburg (noch nicht benannt).

Für die Durchführung dieser Studie wurden 90.600 € Drittmittel von der Stiftung DEBRA international zugesagt. Frau Reimers Stelle wird zu 50 % über das Berta-Ottenstein-Programm für Clinician Scientists der medizinischen Fakultät finanziert.

Nach positivem Ethikvotum wird diese Studie im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS) registriert.

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

Epidermolysis bullosa (EB) ist eine Gruppe seltener, angeborener, schwerwiegender Hauterkrankungen mit einer Inzidenz von ca. 1:25000¹ Lebendgeburten. Die Erkrankung manifestiert sich meist in den ersten Lebenstagen oder -wochen und ist durch Hautfragilität, Blasenbildung und Wunden an Haut und Schleimhäuten charakterisiert. Die zugrundeliegenden Genmutationen führen zu fehlerhaften oder fehlenden Strukturproteinen in der Haut, die die Spaltbildungsebene bedingen. Je nach Spaltbildungsebene werden verschiedene EB-Subtypen mit jeweils lokalisierten und generalisierten Ausprägungen unterschieden² (epidermale Spaltung: EB simplex, Spaltung innerhalb der Basalmembran: junctionale EB, Spaltung unterhalb der Basalmembran: dystrophe EB, variable Spaltbildungsebene: Kindler-Syndrom). Obwohl die betroffenen Gene überwiegend in der Haut exprimiert werden³, sind extrakutane Begleiterkrankungen häufig^{4,5}. Bei generalisierten Subtypen werden Gedeihstörungen bei bis zu 80 % der Betroffenen beobachtet^{4,6,7}. In einem vorausgehenden Projekt (Ethikvotum 78/17) erstellen wir krankheitsspezifische Perzentilen für Gewicht, Größe und Body mass index (BMI) von Kindern und Jugendlichen mit verschiedenen EB-Subtypen und vergleichen diese mit denen gesunder Kinder (Referenzdaten der Weltgesundheitsorganisation WHO, Abb. 1). Es zeigt sich dabei, dass das Wachstumsverhalten bei bestimmten EB-Typen bereits ab dem Kleinkindalter stark von dem gesunder Kinder differiert (Reimer et al, Manuskript in Vorbereitung). Besonders ausgeprägt sind diese Veränderungen bei der rezessiv-dystrophen EB (RDEB): Im Alter von 20 Jahren sind bis zu 90 Prozent der RDEB-Betroffenen in der von uns untersuchten Kohorte untergewichtig (BMI <18,5 kg/m²) und ihre Endgröße liegt im Mittel 20 Zentimeter unterhalb der Größe gesunder 20jähriger.

Die Ursachen des schlechten Gedeihens bei EB sind multifaktoriell; als Hauptgründe werden ein erhöhter Energiebedarf sowie die durch dentale und gastrointestinale Komplikationen erschwerte Nahrungsaufnahme genannt^{4,8}. Im Tiermodell, aber auch in humanen Fallstudien wurden bei EB erhöhte Inflamationsparameter, vorrangig TGF- β , nachgewiesen^{9,10}. Solche Zytokinveränderungen, scheinen, wie auch das Vorhandensein von Auto-Antikörpern gegen Strukturproteine der Haut, mit einer hohen Wundlast in RDEB zu korrelieren^{11,12}. Eine verminderte Aktivität von Inflamationskaskaden kann möglicherweise vor schweren Phänotypen schützen¹².

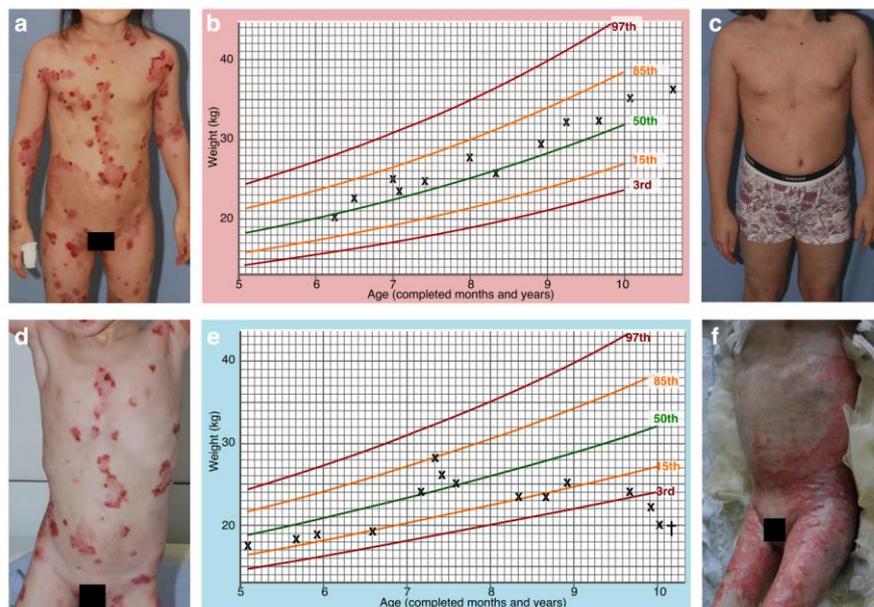


Abb. 1: Geschwister mit junctionaler EB generalisiert intermediär. Das Mädchen zeigt mit 8 Jahren, 4 Monaten (a) generalisierte, hämorrhagische Blasen. Seine Gewichtszunahme verläuft perzentilenparallel (b) (Perzentilen nach WHO¹³). Mit 9 Jahren, 3 Monaten ist es nahezu erscheinungsfrei (c). Der Bruder zeigt mit 5 Jahren, 1 Monat zunächst ein ähnliches Hautbild (d) wie initial seine Schwester. Ab dem vollendeten 8. Lebensjahr nimmt er an Gewicht ab und verstirbt mit 10 Jahren, 2 Monaten (e). Vor seinem Tod hatte sich die Wundfläche stark ausgebreitet und der Junge war kachektisch (f).

Als spezifisches Beispiel für den Einfluss von Wachstum und Inflammation auf den Verlauf von EB haben wir kürzlich über ein Geschwisterpaar mit junctionaler EB generalisiert intermediär berichtet¹³.

Beide Kinder trugen dieselbe homozygote Spleißmutation in *LAMA3*, dem für die α 3-Kette des Strukturproteins Laminin kodierenden Gen, aber der klinische Verlauf unterschied sich deutlich. Der Junge war kachektisch, hatte große chronische Wunden und starb im Alter von 10 Jahren (Abb. 1, d-f). Seine Schwester, bei der keine größeren chronischen Wunden bestanden, wuchs perzentilenparallel und erlebte nahezu blasenfreie Phasen (Abb. 1, a-c). Diese Fallstudie deutet auf die Bedeutung von modulierenden Faktoren für den Krankheits- und Wachstumsverlauf der Kinder mit EB jenseits des Genotyps hin. Unsere Hypothese ist, dass erhöhte Inflamationsaktivität und hohe Wundlast das Wachstum von Kindern und Jugendlichen mit Epidermolysis bullosa in Richtung niedriger Perzentilen beeinflussen. Dies soll in dieser Studie in einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden.

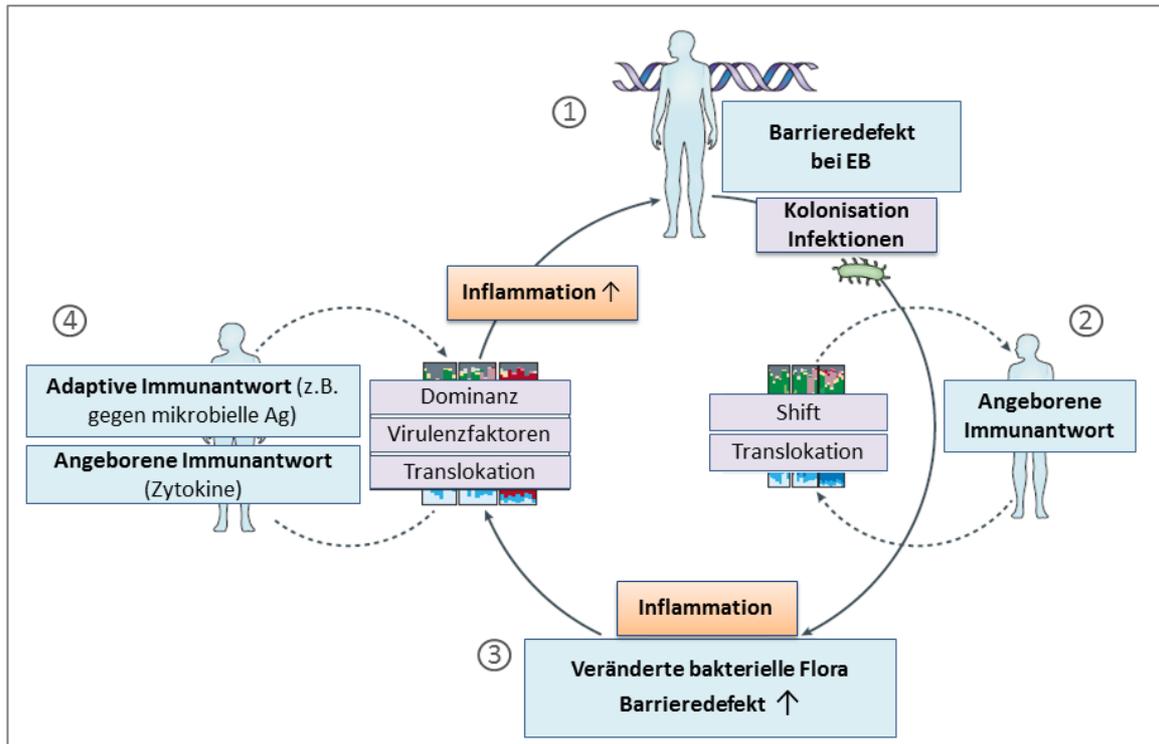


Abb. 2: Illustration der Arbeitshypothese: Vermuteter Inflamationskreislauf und Mikrobiotashift bei Epidermolysis bullosa. Bei Epidermolysis bullosa (EB) liegt ein Barriereverlust der Haut vor, der Kolonisationen und kutane Infektionen begünstigt (1). Die natürliche bakterielle Besiedlung verändert sich und es kommt durch die defekte Hautbarriere zur Translokation von Bakterien in tiefere Hautschichten (2). Hierauf reagiert die angeborene Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen. In der Folge kommt es zu Inflammation und zur Zunahme des Barrieredefektes (3). In dieser Situation kommt es zur Dominanz bestimmter Bakterienstämme (z.B. Staphylokokken), zur Ausbildung von Virulenzfaktoren und zur weiteren Translokation von Bakterien. Neben der fortlaufenden Zytokinausschüttung der angeborenen Immunantwort setzt nun auch die adaptive Immunantwort, z.B. mit gegen mikrobielle Antigene gerichtete Immunglobuline, ein. Durch diese Prozesse verstärken sich wiederum Inflammation und Barrieredefekt. Adaptiert von Belkaid Y. & Tamoutounour S, 2016¹⁴.

Wunden bei EB weisen häufig eine bakterielle Kolonisation auf und es kommt zu rezidivierenden kutanen Infektionen, beides insbesondere durch *Staphylococcus aureus*¹⁵⁻¹⁷. Im Tiermodell der Epidermolysis bullosa acquisita, einer erworbenen blasenbildenden Autoimmunerkrankung, wirkte sich ein reichhaltiges kutanes Mikrobiom schützend vor schweren klinischen Manifestationen aus¹⁸. Bislang sind keine Studien zum Mikrobiom bei der erblich bedingten EB veröffentlicht worden, sodass der Einfluss des Mikrobioms auf den Krankheitsverlauf hier unklar ist. Unsere Hypothese ist, dass die Hautbarrieredefekte bei EB zu Veränderungen des Mikrobioms führen, was Entzündungsprozesse auslöst, die den Barrieredefekt verstärken. Hierdurch wird dann wiederum die weitere bakterielle Besiedlung und Translokation gefördert und so chronische Inflammation unterhalten¹⁴ (Abb. 2). Es ist also zu erwarten, dass das kutane und enterale Mikrobiom bei den Kindern mit EB sich gegenüber der Mikrobiome gesunder Kinder unterscheidet, und zwar am ehesten durch verminderte Diversität. Sollte sich dies bestätigen, wäre in einer folgenden Untersuchung zu klären, ab welchem Lebensalter

derartige Veränderungen nachweisbar sind (Anmerkung: Sollte sich eine derartige Studie anschließen, würde hierfür ein weiterer Ethikantrag gestellt werden). Hieraus könnten sich dann neue therapeutische Konzepte ergeben, denkbar wäre beispielsweise ein präventiver Ansatz mit (noch zu definierenden) Probiotika, um schwere Krankheitsverläufe zu verhindern.

4. Projektziele

Diese Studie hat zum Ziel, mögliche Korrelationen zwischen erhöhten klinischen und laborchemischen Entzündungszeichen, Veränderungen im Mikrobiom von Haut und Darm und den krankheitsspezifischen Perzentilen von Größe, Gewicht und BMI bei bestimmten EB-Subtypen aufzudecken. Sollte sich die Hypothese bestätigen, dass Inflammation, Wundlast und bakterielle Flora starke Krankheitsmodifikatoren mit negativer Beeinflussung des Wachstums sind, ergäben sich hier wertvolle therapeutische Ansatzpunkte.

5. Zielgrößen

Die Zielgrößen umfassen laborchemische und klinische Parameter. Die Körpergröße in Zentimetern und das Körpergewicht in Kilogramm werden gemessen. Das Ausmaß der betroffenen Haut wird anhand eines Lund-Browder-Diagramms bestimmt (adaptiert nach ^{19,20}). Als „betroffene Haut“ gelten dabei Areale mit Blasen, Erosionen, Wunden, Erythem oder Narbenbildung. Systematisch erfasste anamnestische Angaben beinhalten:

- Vorausgegangene antibiotische Behandlungen
- Infektionen
- Fieberepisoden
- Zeitpunkt der/des letzten Waschung/Duschens
- Haustierhaltung
- Topische Therapien und Pflegeprodukte
- Körperliche Betätigung und Sport
- Jahreszeit und Zeitpunkt der Probensammlung
- Geburtsland und Ethnie
- Entbindungsmodus
- Ernährungsgewohnheiten
- Größe der Eltern (zur Berechnung der prospektiven Endgröße)

Aus Blutproben werden die Spiegel von C-reaktivem Protein (CRP), Leukozytenzahl, Immunglobulin-Spiegel (IgA, IgG, IgM, IgE) und Zytokin-Arrays²¹ (mit IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- β und Interferon- γ , growth hormone (GH), Insulin-like growth factor 1 (IGF1), Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGPB3) bestimmt. Das kutane Mikrobiom von verwundeter und intakter Haut und Wangenschleimhaut sowie das enterale Mikrobiom (Stuhlprobe) werden analysiert.

6. Studienpopulation

Einschlusskriterien: Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 20 Jahre

Teil A und B:

- gesicherte Diagnose einer Epidermolysis bullosa der Typen:
 - rezessiv-dystrophe EB (RDEB) schwer generalisiert
 - RDEB intermediär generalisiert
 - junktionale EB intermediär generalisiert

Teil C (gesunde Kontrollen, Mikrobiomanalyse):

- gesunde Kinder und Jugendliche

Ausschlusskriterien: Teil A und B:

- Keine gesicherte Diagnose einer Epidermolysis bullosa
- Akute virale oder bakterielle Infektion
- Plattenepithelkarzinom
- Schwerwiegende Begleiterkrankungen
- Alter > 20 Jahre
- gleichzeitige Teilnahme an einer Therapiestudie

Teil C (gesunde Kontrollen, Mikrobiomanalyse):

- Entzündliche Dermatosen (z. B. Psoriasis, atopisches Ekzem)
- Akute virale oder bakterielle Infektion
- Plattenepithelkarzinom
- Schwerwiegende Begleiterkrankungen
- Alter > 20 Jahre

Zusätzlich in Teil B und C (Mikrobiomanalyse):

Gebrauch von Antibiotika in den letzten 6 Monaten vor Vorstellung
<12 Stunden seit letzter Ganzkörperwaschung/Duschen

Anzahl der Studienteilnehmer:

- 50 Patienten mit generalisierter dystropher und junctionaler EB
- 20 alters- und geschlechtsgepaarte gesunde Kinder- und Jugendliche als Kontrollen

Rekrutierung:

- Die Rekrutierung der EB-Patienten erfolgt im Rahmen der klinischen Vorstellungen im EB-Zentrum Freiburg
- Die Rekrutierung der Kontrollen erfolgt über die kinderdermatologische Sprechstunde der Hautklinik Freiburg

Studienzeitraum:

- Die Datensammlung soll vom 1. Quartal 2018 bis zum 2. Quartal 2019 erfolgen, die Datenauswertung bis zum 2. Quartal 2020 abgeschlossen sein.

7. Methodik und Durchführung

Teil A: Inflammation (Klinische Untersuchung + Serumentnahme)

Die im EB-Zentrum Freiburg zu regulären Kontrollterminen angemeldeten, geeigneten Patienten (s. Inklusions- und Exklusionskriterien, Abschnitt 6.) werden ein bis zwei Wochen vor dem geplanten Termin schriftlich mit einem Einladungsschreiben über die Studie informiert und die altersentsprechenden Patienteninformationen mitgeschickt. Der Studieneinschluss erfolgt nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung, die Probanden und/oder ihre Sorgeberechtigten erhalten Kopien von Patienteninformationen und Einwilligung. Entsprechend der Datenerhebungsbögen erfolgt eine gezielte Anamnese bezüglich vorausgegangener Infekte, Fieberschübe, antibiotischer Therapien und letztem Duschen/Baden und Gebrauch von Hautpflegeprodukten. In der körperliche Untersuchung wird die betroffene Hautoberfläche anhand eines Lund-Browder-Diagramms geschätzt (adaptiert von^{19,20}) und der EB-Aktivitätsscore EBDASI (Epidermolysis Bullosa Disease Activity and Scarring Index^{22,23}) bestimmt. Eine Blutentnahme, wie sie routinemäßig bei einem Großteil der Termine im EB-Zentrum durchgeführt wird, erfolgt zur Bestimmung von Blutbild und Parametern der klinischen Chemie (u.a. CRP, Kreatinin, Harnstoff, Immunglobulinspiegel, Schilddrüsenparameter, Parameter des Eisen- und Knochenstoffwechsels, Protein-, Vitamin- und Spurenelementspiegel). Für diese Studie wird zusätzlich ein weiteres Serumröhrchen abgenommen, abzentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die eingelagerten Serumröhrchen werden nach abgeschlossener Rekrutierung auf Trockeneis per Kurier ins Labor IMD Berlin, Nicolaistraße 22, 12247 Berlin transportiert. Dort erfolgen die Bestimmung der Wachstumsfaktoren sowie die Analysen der Inflammationsparameter IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- β und Interferon- γ im Multiplex-Durchflusszytometrieverfahren. Für Details der Datenanalyse vergleiche Abschnitt 9.: Biometrie.

Teil B: Mikrobiomanalysen bei Kindern und Jugendlichen mit Epidermolysis bullosa

Bei jedem Probanden, der sich hierfür qualifiziert (d.h. keine Antibiotikaeinnahme in den vergangenen 6 Monaten, mindestens 12 Stunden seit letzter Ganzkörperwaschung/Duschen; vergleiche Einschluss-/Ausschlusskriterien), werden Mikrobiomanalysen veranlasst. Eine Mindestanzahl von 20 Patienten wird angestrebt. Dafür werden im selben Termin drei Abstriche von folgenden Bereichen entnommen:

- Wunde im Bereich eines Unterarmes
- Intakte Haut im Bereich eines Unterarmes
- Wangenschleimhaut

Die Abstrichentnahme erfolgt nach folgendem Protokoll:

1. Vorbereitung

- Abstrichtupfer bereitlegen: 4N6FLOQ Swabs der Firma Copan
- SCF-1 Lösung bereitstellen (Teknova, T5594): 50mM Tris (pH 7.6), 1mM EDTA (pH 8.0), 0,5% Tween-20
- Proteinase K bereitstellen (Qiagen, 19133 oder Merck 1.07393.0010)
- Für jede Probe wird ein einzeln verpacktes, steriles RNA/DNA-freies Eppendorf-Röhrchen (Sarstedt, 72.706.201) vorbereitet und mit der SCF-1 Lösung befüllt:
- Die Röhrchen und die Pufferlösung werden für 30 Minuten unter UV-Licht gestellt
- In jedes Röhrchen werden steril 600 µl SCF-1-Lösung pipettiert.

2. Abstrichentnahme:

- Die äußere Verpackung der Abstrichtupfer wird entfernt.
- Der Abstrichtupfer wird zur Befeuchtung in das Röhrchen mit steriler SCF-1 Lösung getaucht. Anschließend wird mit dem angefeuchteten Abstrichtupfer für 30 Sekunden die abzustreichende Haut/Schleimhaut berührt.
- Der Abstrichtupfer wird wiederum in die SCF-1 Lösung getaucht und an der vorgesehenen Sollbruchstelle abgebrochen, sodass das Röhrchen mit dem dafür vorgesehenen Deckel verschlossen werden kann.
- Die Lagerung bis zur späteren DNA-Analyse erfolgt bei -80°C.

3. Kontrollen

- Zum Ausschluss von Kontaminationen werden Proben von verwendeten Pufferlösungen und Kontrollabstriche im Rahmen der Probensammlung (z.B. durch Wedeln mit Abstrichtupfer im Raum des Patientenkontaktes) gesammelt und sequenziert.

Zudem wird von den an Teil B teilnehmenden Probanden eine Stuhlprobe asserviert. Die Studienteilnehmer und ihre Eltern werden hierüber im Einladungsschreiben bereits informiert und werden gebeten, nach Möglichkeit eine Stuhlprobe mitzubringen. Das entsprechende Set zur Stuhlgewinnung liegt dem Einladungsschreiben bei (Inhalt: Hämocult-Briefchen, 2x Stuhlfänger (Fa. Süsse, davon 1x Ersatz), 1x Holzspatel, 1 Paar Einmalhandschuhe Größe M, Formular und vorfrankierter Rückumschlag). Sollte keine Stuhlprobe mitgebracht werden, kann die Stuhlgewinnung sofern möglich im Rahmen des Termins in der Hautklinik Freiburg erfolgen. Falls dies nicht möglich ist, erfolgt der Versand erfolgt mit der Post; der Brief sollte idealerweise zwischen Montag und Mittwoch in einen Briefkasten geworfen werden, um eine reibungslose Lagerung und Weiterbearbeitung zu gewährleisten.

Der Stuhl wird nativ bei -80°C tiefgefroren. Für die Prozessierung der Stuhlproben werden die Stuhlprobe aufgetaut und eine erbsgroße Menge in ein mit 600 µl SCF-1 Lösung gefülltes, RNA/DNA-freies Eppendorf-Röhrchen (Sarstedt, 72.706.201; Vorgehen s. 6, Teil B 1.) gegeben.

Teil C: Mikrobiomanalysen gesunder Probanden

Für diesen Studienteil werden Proben 20 gesunder Kinder gepaarten Alters und Geschlechtes zu den ersten 20 EB-Patienten aus Teil B gesammelt. Ausgeschlossen werden Kinder mit entzündlichen Dermatosen wie Psoriasis oder atopischem Ekzem. Die Rekrutierung erfolgt im Rahmen der Kinderdermatologischen Sprechstunde der Hautklinik Freiburg, wo wöchentlich circa 10 Kinder gesehen werden. Es werden nach dem oben aufgeführten Schema je ein Abstrich von intakter Haut

an einem Unterarm sowie von der Wangenschleimhaut gewonnen und nach Möglichkeit eine Stuhlprobe gewonnen/angefordert.

Teile B und C:

Alle Abstriche und Stuhlproben werden nach Sammlung bzw. Eingang tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Analyse werden die Proben auf Trockeneis per Kurier nach Lübeck verbracht (Labor Prof. Busch). Die Probenverarbeitung, RNA-Sequenzierung und bioinformatischen Analysen werden nach den *state of the art* Methoden durchgeführt¹⁸. Die bioinformatische Datenanalyse erfolgt durch Prof. Busch und Dr. Dr. Bories.

Durch einen Statistiker (bislang noch nicht benannt) erfolgt die Korrelation der in den Teilen A und B erhobenen Ergebnisse mit den EB-spezifischen Wachstumskurven aus einer vorausgegangenen Studie (Ethikvotum 78/17; s. Abschnitt 9., Biometrie). Die Mikrobiomdaten von Kindern und Jugendlichen mit EB aus Teil B werden mit den Daten der gesunder Kontrollen aus der Region Baden-Württemberg aus Teil C verglichen. Zudem werden die Daten zum kutanen und enteralen Mikrobiom gesunder Probanden aus internationalen Mikrobiomdatenbanken (Human Genome Project, <http://hmpdacc.org>) zum Vergleich herangezogen.

8. Nutzen-Risiko-Abwägung

Der Nutzen für die teilnehmenden Patienten besteht in einer über die Routineversorgung hinausgehende Diagnostik und dadurch frühzeitiges Erkennen möglicher Pathologien. Darüber hinaus erwächst ein Nutzen für spätere Patientengenerationen: Das neue Wissen zur Rolle von Inflammation, Wundlast und Mikrobiom als Einflussfaktoren auf den natürlichen Krankheitsverlauf und insbesondere das Wachstum der betroffenen Kinder kann neue therapeutische Ansatzpunkte liefern und die Patientenstratifikation für mögliche kommende Interventionsstudien verbessern.

Die invasiven Untersuchungsteile dieser Studie sind die venöse Blutentnahme sowie Haut- und Schleimhautabstriche und die Gewinnung einer Stuhlprobe. Das etablierte Verfahren der Blutentnahme geht mit dem Risiko für Hämatome, lokale Infektionen und selten Verletzung von Strukturen wie Nerven, Sehnen oder Muskeln einher. Bei EB können im Rahmen der Stauung zur Blutabnahme neue Blasen auftreten, daher erfolgt eine Unterpolsterung des Stauschlauches mit Watte. Blutabnahmen erfolgen bei den Kontrollterminen der EB-Betroffenen im EB-Zentrum Freiburg mit medizinischer Indikation zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes. Durch das zusätzlich in dieser Studie entnommene Serumröhrchen erhöht sich das je Patient entnommene Blutvolumen einmalig um 7,5 ml (entsprechend dem Inhalt einer Serum-Gel-Monovette; üblicherweise Blutmenge pro Patient 10-15 ml). Diese zusätzliche Menge ist hämodynamisch kaum relevant und verursacht keine zusätzlichen Schmerzen; die Blutmenge wird so gering wie möglich gehalten. Die Abstrichdiagnostik (Teil B) kann von EB-Betroffenen auf Wunden vereinzelt als schmerzhaft empfunden werden. Die Schmerzhaftigkeit soll durch das vorherige Anfeuchten der Abstrichtupfer herabgesetzt werden; der Kontakt des Abstrichtupfers mit der Haut beträgt ca. 30 Sekunden, ein anhaltender Schmerz über diesen Zeitraum hinaus ist nicht zu erwarten.

Insgesamt ergeben sich ärztlicherseits keine Bedenken, die Studie ist ärztlich uneingeschränkt vertretbar.

9. Biometrie

In Teil A (50 prospektiv rekrutierte Patienten) wird der Einfluss der hier bestimmten Zytokine und Mediatoren auf die EB-spezifischen Perzentile von Gewicht, Größe und BMI jeweils mittels linearer Regression analysiert. Dazu werden diese Perzentile (erstellt in einem vorausgegangenen Projekt, Ethikvotum 78/17) in eine Normalverteilung rücktransformiert. Jeder Faktor wird auf eine Nullkorrelation mit Körpergröße, -gewicht und BMI hin getestet (zweiseitiges Signifikanzniveau von 5%). Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, wird bei diesen Analysen auf eine Korrektur des Signifikanzniveaus für multiples Testen verzichtet. Wenn die wahre Korrelation 0,375 beträgt, ergibt die geplante Fallzahl jeweils eine Teststärke von 80% für das Aufdecken einer Nicht-Null-Korrelation (nQuery Advisor 7.0). Anschließend wird eine multiple lineare Regressionsanalyse aller signifikanten Faktoren durchgeführt.

Bislang gibt es keine Daten zur Variabilität und Effektgröße des humanen Mikrobioms bei EB. Da

durch die Ausschlusskriterien „Antibiotikagebrauch in den letzten 6 Monaten“ und „Letzte Ganzkörperwaschung vor <12 Stunden“ mit einer geringeren Teilnehmerzahl in Teil B im Vergleich zu Teil A gerechnet wird, soll die minimale Probandenzahl in Teil B 20 nicht unterschreiten. Mit n=20 mit derselben 16S rRNA Sequenzierungstechnik konnten im Tiermodell der EB aquisita relevante Ergebnisse erzielt werden¹⁸. Daher gehen wir davon aus, dass der Vergleich von je vier Proben der 20 EB Patienten mit denen von 20 gepaarten Kontrollen mit einer ausreichend hohen Wahrscheinlichkeit einhergeht, relevante Signalunterschiede aufzudecken. P-Werte werden dabei mit einer *false discovery rate* von 5% nach dem Algorithmus von Benjamini und Hochberg für multiples Testen korrigiert²⁴. Die Auswertung erfolgt in „R“²⁵.

Die Zahl von 20 gepaarten Kontrollen dient dem Abgleich regionalen Mikrobiomgegebenheiten mit den verfügbaren internationalen Daten (NIH Human Microbiome Project, <http://hmpdacc.org>). Sollten sich hier relevante Unterschiede zwischen gesunden Kindern und Jugendlichen aus Baden-Württemberg mit den internationalen Daten ergeben, würde die Kontrollgruppe entsprechend auf bis zu 50 Kontrollen erweitert werden. Die Interpretation der Ergebnisse wird im interdisziplinären Austausch und regelmäßigen Diskussion mit den beteiligten Wissenschaftlern erfolgen.

10. Datenmanagement und Datenschutz

Die Datenerfassung erfolgt in Papierform auf den für diese Studie entwickelten Formularen (s. Anlage). Parallel werden patientenbezogene Daten, die im Rahmen der Routineuntersuchungen erhoben werden, teils handschriftlich (Papierakte), teils in der Klinik-EDV (digitale Patientenkurve in Meona, Arztbriefe in Prometheus) dokumentiert. Diese Programme sind als Medizinprodukte zugelassen und die Patientendaten nur durch berechtigte, d.h. entsprechende geschulte, Klinikmitarbeiter einsehbar. Die Daten werden in Freiburg ein Datenbanksystem übertragen (Microsoft Access und Excel). Die Speicherung dieser Daten erfolgt passwortgeschützt auf dem Server der Universitätsklinikums Freiburg. Die Daten jedes Probanden wird mittels einer ID pseudonymisiert; die Pseudonymisierung kann im Bedarfsfall durch die Studienleitung (A. Reimer) aufgehoben werden. Die Daten werden nicht an Dritte weitergegeben und spätestens 10 Jahre nach Erreichen des Forschungsziels gelöscht.

11. Umgang mit Biomaterialien

Beim Umgang mit Biomaterialien werden stets Handschuhe getragen. Für diese Studie wird eine venöse Blutprobe (ca. 19-24 ml) der Probanden nach schriftlicher Aufklärung im Rahmen des Studieneinschlusses entnommen. Die Laboranalysen von Differentialblutbild, Eisen, Ferritin, Protein gesamt, Albumin, CRP, Vitamin D3, Phosphat, Calcium; TSH, fT3, fT4 erfolgen im Zentrallabor des Universitätsklinikums Freiburg, in der Regel binnen 48 Stunden. Eine weitere Serum-Gel-Monovette wird nach der Befüllung zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die Analyse erfolgt blockweise, voraussichtlich nach 2,5 und 5 Jahren: die gefrorenen Proben werden auf Trockeneis an das Labor IMD Berlin, Nicolaistraße 22, 12247 Berlin verschickt. Dort erfolgen die Analysen von IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β TNF- β , Interferon- γ , GH, IGF1 und IGP3 im Multiplex-Durchflusszytometrieverfahren.

Die Abstriche von Haut (intakt und Wunde) und Schleimhaut werden in SCF-1-Lösung in RNA und DNA-freien Eppendorf-Röhrchen eingebracht. Die Lagerung bis zur späteren Analyse erfolgt bei -80°C. Der Versand in das Labor von Prof. Busch in Lübeck erfolgt auf Trockeneis durch ein Kurierunternehmen.

Für die Stuhlprobe werden Hämoccult-Briefchen eingesetzt. Die Mikrobiomanalyse aus Stuhlproben auf Hämoccult-Briefchen hat sich in einer vergleichenden Studie im Vergleich zu anderen Abnahmetechniken als besonders verlässlich und praktikabel bestätigt²⁶. Insbesondere wurden auch direkte Abnahme mit viertägiger Lagerung bei Raumtemperatur verglichen und kein nennenswerter Datenverlust festgestellt²⁶. Die Handhabung der Hämoccult-Briefchen ist einfach. Durch Abnahmemöglichkeit aus Windel, Töpfchen oder Gewinnung mittels Stuhlfänger ist für die teilnehmenden Kinder und Jugendlichen eine hohe Flexibilität gegeben.

Eine kommerzielle Verwendung des im Rahmen dieser Studie gewonnenen Materials erfolgt nicht. Es kann eine weitere Lagerung bei -80°C über weitere 2 Jahre nach Studienende erfolgen, anschließend werden die Proben vernichtet.

12. Publikationsregeln

Die Studie wird nach positivem Ethikvotum beim Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS) gelistet. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt im interdisziplinären Kreis der Koautoren. Ein Manuskript wird entsprechend der STROBE-Richtlinien für Querschnittsstudien²⁷ bei einer Fachzeitschrift mit peer-review-Verfahren eingereicht.

13. Unterschrift



Dr. Antonia Reimer, Studienleiterin

14. Referenzen

1. Has, C. Persönliche Kommunikation an A. Reimer: Inzidenz und Prävalenz von Epidermolysis bullosa in Deutschland. (2017).
2. Fine, J.-D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 1103–1126 (2014).
3. Wetzels, R. H. *et al.* Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am. J. Pathol.* **139**, 451–459 (1991).
4. Fine, J.-D., Bauer, E. E. & Moshell, A. *Epidermolysis Bullosa: Clinical, Epidemiologic, and Laboratory Advances and the Findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry.* (Johns Hopkins University Press, 1999).
5. Fine, J.-D. & Mellerio, J. E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: Part I. Epithelial associated tissues. *J. Am. Acad. Dermatol.* **61**, 367–384 (2009).
6. Martinez, A. E., Allgrove, J. & Brain, C. Growth and pubertal delay in patients with epidermolysis bullosa. *Dermatol. Clin.* **28**, 357–359, xii (2010).
7. Birge, K. Nutrition Management of Patients with Epidermolysis Bullosa. *J. Am. Diet. Assoc.* **95**, 575–579 (1995).
8. Haynes, L. Nutrition for Children with Epidermolysis Bullosa. *Dermatol. Clin.* **28**, 289–301 (2010).
9. Nyström, A. *et al.* Losartan ameliorates dystrophic epidermolysis bullosa and uncovers new disease mechanisms. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1211–1228 (2015).
10. Pesch, M., König, S. & Aumailley, M. Targeted Disruption of the Lama3 Gene in Adult Mice Is Sufficient to Induce Skin Inflammation and Fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 332–340 (2017).
11. Esposito, S. *et al.* Autoimmunity and Cytokine Imbalance in Inherited Epidermolysis Bullosa. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
12. Odorisio, T. *et al.* Monozygotische Zwillinge discordant für rezessive dystrophische epidermolysis bullosa phenotype highlight the role of TGF- β signalling in modifying disease severity. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3907–3922 (2014).
13. Reimer, A. *et al.* Natural history and clinical outcome of patients with junctional epidermolysis bullosa generalizada intermediaria due to a LAMA3 mutation. *Br. J. Dermatol.* **In Press**, (2017).
14. Belkaid, Y. & Tamoutounour, S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 353–366 (2016).
15. Brandling-Bennett, H. A. & Morel, K. D. Common Wound Colonizers in Patients with Epidermolysis Bullosa. *Pediatr. Dermatol.* **27**, 25–28 (2010).
16. Mellerio, J. E. Infection and Colonization in Epidermolysis Bullosa. *Dermatol. Clin.* **28**, 267–269 (2010).
17. van der Kooi-Pol, M. M., Duipmans, J. C., Jonkman, M. F. & van Dijk, J. M. Host–pathogen interactions in epidermolysis bullosa patients colonized with *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 195–203 (2014).
18. Ellebrecht, C. T. *et al.* Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J. Autoimmun.* **68**, 14–22 (2016).
19. Lund, C. & Browder, N. The estimation of areas of burns. *Surg Gynecol Obstet* 352–358 (1944).
20. Hettiaratchy, S. & Papini, R. Initial management of a major burn: II—assessment and resuscitation. *BMJ* **329**, 101–103 (2004).
21. Maier, K. *et al.* UV-B-induced cutaneous inflammation and prospects for antioxidant treatment in Kindler syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 5339–5352 (2016).
22. Loh, C. C. H. *et al.* Development, reliability, and validity of a novel Epidermolysis Bullosa Disease Activity and Scarring Index (EBDASI). *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 89–97.e13 (2014).
23. Jain, S. v. *et al.* The Epidermolysis Bullosa Disease Activity and Scarring Index (EBDASI): grading disease severity and assessing responsiveness to clinical change in epidermolysis bullosa. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **31**, 692–698 (2017).
24. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **57**, 289–300 (1995).

25. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016).
26. Sinha, R. *et al.* Collecting Fecal Samples for Microbiome Analyses in Epidemiology Studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **25**, 407–416 (2016).
27. von Elm, E. *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *The Lancet* **370**, 1453–1457 (2007).