

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33235> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Bergen, Janneke van den

Title: Diversity in disease course of Duchenne and Becker muscular dystrophy

Issue Date: 2015-06-24

10

Summary



Summary

Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) are caused by a mutation in the *DMD* gene, coding for the dystrophin protein. Dystrophin plays a key role in membrane stability, protecting the muscle fiber from contraction induced injury. Absence of dystrophin (as in DMD) or reduced quantity of truncated dystrophin (as in BMD) causes continuous muscle damage, clinically leading to progressive muscle weakness. The severity of disease differs between the two disorders, with DMD patients showing a faster decline in muscle function than BMD patients.

In recent decades improvements in the care for DMD patients have been made, including the prescription of corticosteroids and the use of mechanical home ventilation. We investigated the effect of these developments in the Netherlands (**chapter 2**). For this purpose, we investigated the disease course of 336 DMD patients, representing more than 70% of all known Dutch DMD patients. Through use of a standardized questionnaire patients provided personal clinical information. From these data, a picture about disease course emerged with mean age at diagnosis at 4 years, wheelchair dependence at 10 years, scoliosis surgery at 14 years (in about a third of patients) and start of mechanical ventilation at 17 years. The estimated mean survival was 27 years. Patients who (had) used corticosteroids became wheelchair dependent almost 2 years later than steroid-naïve patients. For investigation of the effect of other developments in care a comparison was made with an historical Dutch DMD cohort (born between 1961 and 1974). This comparison revealed an improvement in survival of almost 10 years, which most likely can be attributed to the introduction of mechanical home ventilation. The developments in supportive care like air stacking, coughing machines, cardiac medication, splints, physiotherapy and Achilles tendon lengthening also proved valuable, as they increased the age at loss of ambulation with several months.

Some variability in disease course of the DMD patients existed. When examining the age at wheelchair dependence in patients with an out-of-frame deletion who would benefit from skipping of exons 44, 45, 51 or 53, we found patients with a mutation amenable to skipping of exon 44 to remain ambulant significantly longer than patients with mutations requiring skipping of any of the other 3 exons (**chapter 3**). We believe this difference is the result of spontaneous skipping of exon 44, leading to restoration of the reading frame and the production of some dystrophin. These low levels of dystrophin would explain the relatively mild disease course of these exon 44 skippable patients.

Exon skipping is currently under investigation as a possible treatment for DMD patients. Clinical data about the BMD population provides valuable information for these developments. For this purpose, we described the clinical disease course of a group of 48 BMD patients with a mutation in the *DMD* gene leading to the production of a truncated dystrophin protein that would also be the result of successful exon skipping of 5 different exons in DMD patients with specific out-of-frame mutations (**chapter 4**). The relatively mild disease course of these BMD patients shows that DMD patients treated with exon skipping could indeed benefit from this therapy, as the disease associated with the to-be-formed truncated dystrophin is associated with a mild phenotype.

The disease course of BMD is more variable than that of DMD, with patients presenting with a disease course similar to DMD patients to patients remaining ambulant throughout life. Because BMD is a rare disease (affecting only 1:18.000 newborn boys) research into possible causes for this diversity is commonly performed in patients from different ages. Comparison of disease severity in this heterogeneous group is difficult. Therefore, we developed a disease severity scale for BMD patients (**chapter 5**). For this purpose, we interviewed 113 BMD patients from the Netherlands and Flanders (Belgium) about the age at reaching five disease milestones: first motor symptoms, difficulties walking stairs, use of a walking aid, wheelchair dependence and mechanical home ventilation. By assigning points to each milestone, individual sum scores for each age were calculated. These individual data were subsequently used to calculate a population mean sum score including a standard deviation for each age individually. Subsequently, these data can be used to calculate an individual Z-score. This age independent Z-score indicates the disease severity of individual patients and in that way facilitates comparison of BMD patients of different ages.

One of the factors implied to be involved in BMD disease severity is the level of dystrophin expression in muscle fibers. We examined this relationship in a group of 32 BMD patients (**chapter 6**). Patients participated in an interview focusing on the age at reaching above mentioned disease milestones, quantitative muscle testing of several muscle groups, a muscle biopsy of the anterior tibial muscle and an MRI of the lower leg. We concluded that no linear relationship between dystrophin levels and disease severity existed, as defined by age at reaching disease milestones, a composite muscle strength score and/or fatty infiltration on MRI. However, all three patients with dystrophin levels below 15% presented with a severe disease course, suggesting at least a threshold effect of dystrophin level on disease severity. When analysing a subgroup of patients with a deletion of exon 45 to 47, a relatively uniform disease severity was noted, illustrating the important role of the site of the mutation, and therefore the quality of the dystrophin protein produced, in determining disease severity.

As dystrophin is part of the dystrophin-associated glycoprotein complex, which connects the contractile cytoskeleton to the extracellular matrix and has a signaling function, the expression of other components of this complex could influence disease severity in BMD as well. To examine this hypothesis expression of beta-dystroglycan, gamma-sarcoglycan and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) was analysed in 24 BMD patients and correlated to the age at reaching disease milestones and to a composite muscle strength score (**chapter 7**). For none of these factors an association was found. However, we did find an inverse relationship between utrophin expression (a dystrophin homologue) and disease severity. This correlation could possibly be caused by an indirect relationship between dystrophin expression and disease severity, with higher utrophin expression being the result of low dystrophin expression.

Other factors that have been implicated as disease modifiers in DMD and BMD are inflammation and fibrosis. Previous studies pointed towards a role for SNPs in the *SPP1* and *LTBP4* genes, which both play a role in these processes, in determining disease severity in DMD. We tried to validate these results, by correlating their occurrence to the age at wheelchair dependence in a group of 336 DMD patients from five European neuromuscular centers, while also taking steroid use into account (**chapter 8**). By

this means, we were able to confirm the protective effect of the IAAM haplotype of the *LTBP4* gene on disease progression in DMD patients. However, we were unable to validate the effect of the *SPP1* SNP. In conclusion, this thesis presents information on disease course and disease severity in a large and representative cohort of patients with DMD or BMD. We showed the positive effect of several developments in care on slowing disease progression as well as investigated the role of dystrophin, several additional proteins and genetic factors on influencing disease severity. These data can be of value in the development of future therapeutic interventions, as they indicate if a specific factor contributes to disease progression and give estimation for the possible effect of exon skip therapies. As such, the information presented in this thesis will hopefully contribute to the optimization of DMD and BMD care and further development of effective therapies.

Nederlandse samenvatting

Duchenne en Becker spierdystrofie (DMD/BMD) worden beiden veroorzaakt door een mutatie in het *DMD* gen, dat codeert voor het dystrofine eiwit. Dystrofine speelt een belangrijke rol in de stabiliteit van het spiermembraan, doordat het de spiervezel beschermt tijdens de spiercontractie. Afwezigheid van dystrofine (zoals in DMD) of het verminderd aanwezig zijn van een verkorte vorm van dystrofine (zoals in BMD) heeft continue spierschade tot gevolg, wat klinisch leidt tot progressieve spierzwakte. De ernst van de ziekte verschilt tussen de twee aandoeningen, waarbij DMD patiënten een snellere ziekte progressie vertonen dan BMD patiënten.

In de laatste decennia zijn diverse verbeteringen in de zorg voor DMD patiënten doorgevoerd. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om het voorschrijven van corticosteroiden en het gebruik van thuisbeademing. We onderzochten het effect van deze ontwikkelingen in Nederland (**hoofdstuk 2**), waarbij we het ziektebeloop van 336 DMD patiënten (meer dan 70% van de Nederlandse DMD populatie) evalueerden. Via een gestandaardiseerde vragenlijst gaven patiënten informatie over hun persoonlijke ziekte geschiedenis. Uit deze data groeide een beeld van het gemiddeld ziektebeloop van DMD patiënten. De gemiddelde leeftijd waarop de diagnose werd gesteld was hierbij 4 jaar, patiënten werden rolstoelafhankelijk bij 10 jaar, een scoliose operatie vond gemiddeld plaats op 14-jarige leeftijd (in ongeveer 1/3 van de patiënten) en op gemiddeld 17-jarige leeftijd werd gestart met thuisbeademing. De geschatte gemiddelde overleving was 27 jaar. Patiënten die corticosteroiden gebruikten of hadden gebruikt, werden gemiddeld bijna 2 jaar later rolstoelafhankelijk dan patiënten die nooit steroiden hadden gebruikt. Om het effect van andere ontwikkelingen in de zorg voor DMD patiënten te onderzoeken werd een vergelijking gemaakt met een historisch Nederlands DMD cohort (geboren tussen 1961 en 1974). Deze vergelijking toonde een toename in overleving van bijna 10 jaar, die meest waarschijnlijk toegeschreven kan worden aan de introductie van de thuisbeademing. De ontwikkelingen in ondersteunende zorg, zoals airstacking, hoestmachines, cardiale medicatie, spalken, fysiotherapie en verlenging van de Achilles pezen bleek ook van waarde, aangezien deze zorgaspecten de leeftijd waarop een patiënt gemiddeld rolstoelafhankelijk werd liet toenemen met enkele maanden.

Er bestond enige diversiteit in het ziekte beloop van DMD patiënten. Een onderzoek in patiënten met een mutatie die het leesraam verstoort, maar die baat zouden hebben van het skippen van respectievelijk exon 44, 45, 51 of 53 liet een significant latere leeftijd van rolstoelafhankelijkheid zien van patiënten die in aanmerking komen voor het skippen van exon 44 dan van patiënten geschikt voor het skippen van een van de andere 3 exonen (**hoofdstuk 3**). Wij veronderstellen dat dit verschil het gevolg is van het spontaan skippen van exon 44. Dit leidt tot herstel van het leesraam, waardoor enig dystrofine geproduceerd kan worden.

Momenteel wordt onderzoek gedaan naar exon skipping als mogelijke therapie voor DMD patiënten. Klinische data van BMD patiënten zijn hiervoor van grote waarde. We hebben dan ook het ziektebeloop beschreven van 48 BMD patiënten met een mutatie in het *DMD* gen die leidt tot de productie van een verkort dystrofine eiwit dat overeenkomt met het eiwit dat geproduceerd zou worden na succesvol

exon skippen van 5 verschillende exonen in DMD patiënten met specifieke leesraam versturende mutaties (**hoofdstuk 4**). Het relatief milde ziektebeloop van deze BMD patiënten toont aan dat DMD patiënten inderdaad baat kunnen hebben bij exon skippen, aangezien het beoogde verkorte dystrofine geassocieerd is met een mild fenotype.

Het ziektebeloop in BMD is meer divers dan dat in DMD, variërend van patiënten met een beloop gelijk aan DMD tot patiënten die hun hele leven ambulant blijven. Aangezien BMD een zeldzame ziekte is (slechts 1:18.000 nieuwgeboren jongetjes) wordt onderzoek naar oorzaken voor deze diversiteit meestal verricht in patiënten van verschillende leeftijden. Vergelijking van het ziektebeloop in een dergelijke heterogene groep is moeilijk. Daarom hebben we een ziekte-ernst-schaal ontwikkeld (**hoofdstuk 5**). Hiervoor hebben we 113 BMD patiënten uit Nederland en Vlaanderen geïnterviewd over de leeftijd waarop vijf ziekte mijlpalen bereikt zijn: eerste motorische symptomen, problemen met traplopen, gebruik van een hulpmiddel bij het lopen, rolstoelafhankelijkheid en thuisbeademing. Door het toekennen van punten aan elke mijlpaal werd voor elke leeftijd een individuele som score verkregen. Deze individuele scores werden vervolgens gebruikt om per leeftijd een gemiddelde populatie som score, inclusief standaard deviatie, te berekenen. Deze data kunnen gebruikt worden om een individuele Z-score te berekenen. Deze leeftijds-onafhankelijke Z-score is een maat voor de ziekte ernst van de individuele patiënt en kan derhalve gebruikt worden om BMD patiënten van verschillende leeftijden met elkaar te vergelijken.

Dystrofine expressie in spiervezels is een van de factoren waarvan gedacht wordt dat deze een rol speelt in ziekte-ernst in BMD. We onderzochten deze mogelijke relatie in een groep van 32 BMD patiënten (**hoofdstuk 6**). Deelnemers werden geïnterviewd over de leeftijd waarop ze de bovenstaande vijf ziekte mijlpalen bereikten, ondergingen kwantitatieve krachtstesten van meerdere spiergroepen, een spierbiopsie uit de m. tibialis anterior en een MRI van het onderbeen. We concludeerden dat er geen lineaire relatie bestaat tussen dystrofine expressie en ziekte ernst, gedefinieerd als de leeftijd waarop ziekte mijlpalen bereikt werden, een som score van spierkracht en/of spiervetring op de MRI. Alle drie de patiënten met minder dan 15% dystrofine vertoonden echter een ernstig ziekte beloop, wat zou kunnen pleiten voor een drempel effect in de relatie tussen dystrofine expressie en ziekte ernst. Een subgroep analyse in patiënten met een deletie van exon 45 tot 47 liet een relatief uniform ziektebeloop zien. Dit illustreert de invloed van de plaats waar de mutatie in het *DMD* gen zich bevindt op de ziekte ernst en dus van de kwaliteit van het dystrofine eiwit.

Dystrofine maakt onderdeel uit van het dystrofine-geassocieerde glycoproteïne complex, dat het contractiele cytoskelet verbindt met de extracellulaire matrix en tevens een signaalfunctie heeft. De expressie van de andere componenten van dit complex kan dan ook van invloed zijn op de ziekte ernst in BMD patiënten. Om deze hypothese te testen werd de expressie van beta-dystroglycanen, gamma-sarcoglycanen en het neuronale nitric oxide synthase (nNOS) geanalyseerd in 24 BMD patiënten. Deze expressie werd vervolgens gecorreleerd aan de leeftijd waarop de ziekte mijlpalen werden bereikt en aan de som score van de spierkracht in verschillende spiergroepen (**hoofdstuk 7**). Voor geen van deze factoren werd een associatie gevonden. Daarentegen werd voor utrofine, een dystrofine homoloog, een

omgekeerde relatie met ziekte ernst gevonden. Deze correlatie berust mogelijk op een indirecte relatie tussen de hoeveelheid dystrofine en ziekte ernst, waarbij de hogere utrofine expressie het gevolg is van zeer weinig dystrofine expressie.

Andere mogelijke ziekte modulerende processen in DMD en BMD zijn inflammatie en fibrose. Eerdere studies impliceerden een rol voor single nucleotide polymorfismen (SNPs) in het *SPP1* en *LTBP4* gen, die beiden een rol spelen in deze processen. We hebben geprobeerd deze resultaten te valideren, door het voorkomen van deze SNPs te correleren aan de leeftijd waarop een groep van 336 DMD patiënten uit vijf Europese neuromusculaire centra rolstoelafhankelijk werden, rekening houdend met corticosteroid gebruik (**hoofdstuk 8**). Hierbij hebben we het beschermende effect van het IAAM haplotype in het *LTBP4* gen op ziekte progressie kunnen bevestigen, terwijl dit voor de *SPP1* SNP niet mogelijk bleek.

Samenvattend biedt dit proefschrift informatie over het ziekte beloop en de ziekte ernst in een grote, representatieve groep DMD en BMD patiënten. We toonden de positieve effecten op het ziektebeloop van meerdere ontwikkelingen in zorg voor DMD patiënten aan en bestudeerden de invloed van dystrofine expressie, dystrofine geassocieerde eiwitten en genetische factoren op ziekte ernst. Deze gegevens kunnen van belang zijn bij het ontwikkelen van toekomstige therapeutische strategieën, aangezien ze aangeven of een bepaalde factor een rol speelt in ziekte progressie en ze een inschatting mogelijk maken van het mogelijke effect van exon skip therapieën. De informatie die gepresenteerd wordt in dit proefschrift kan dan ook hopelijk bijdragen aan het optimaliseren van de zorg voor DMD en BMD patiënten en het verder ontwikkelen van effectieve therapieën.

