



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Optimising antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy**

Verhaart, I.E.C.

### **Citation**

Verhaart, I. E. C. (2014, May 20). *Optimising antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/25807>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/25807>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25807> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Verhaart, Ingrid

**Title:** Optimising antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy

**Issue Date:** 2014-05-20

Summary  
Samenvatting voor niet-ingewijden  
List of abbreviations  
Curriculum Vitae  
List of publications  
Dankwoord

Appendix

## Summary

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe, progressive neuromuscular disorder, nowadays affecting around 1 in 5 000 newborn boys worldwide. First symptoms of muscle weakness appear around the age of two or three years, reflected by difficulties with running, standing upright and climbing stairs. Progressive loss of muscle function leads to wheel-chair-dependency around the age of ten to fifteen. Involvement of respiratory and cardiac muscles will lead to premature death, often before the age of thirty. Becker muscular dystrophy (BMD) is a related disease, but symptoms are often much milder and life expectancies are nearly normal.

DMD is caused by the absence of the dystrophin protein, encoded by the *DMD* gene. Dystrophin forms a bridge between the actin cytoskeleton inside the muscle fibres and the extracellular matrix surrounding the fibres. Hereby it provides mechanical stability to the muscle fibres during contractions. In the absence of dystrophin, fibres easily get damaged during use. Normally, muscles are capable of repairing this damage. When this becomes chronic, the repair system gets exhausted and eventually muscle tissue will be replaced by fat and fibrotic tissue, leading to a loss of muscle function.

Three base pairs of a gene encode one amino acid of a protein (genetic code). Translation occurs by first transcribing the DNA-code in an RNA-code and thereafter translating the RNA into protein. Translation starts at the 'start signal' and ends at the 'stop signal' of the transcript. The genetic code is dispersed over exons, divided by introns (non-coding parts), which are removed at RNA-level during splicing. In DMD patients mutations in the *DMD* gene cause a disruption of the genetic code, *i.e.* by insertion or deletion of (an) exon(s) consisting of a number of base pairs not divisible by three, or by introduction of a premature stop signal. This leads to premature termination of protein synthesis and complete absence of a functional protein, since one of the anchoring parts is missing. BMD is also caused by mutations in the *DMD* gene, but the reading frame stays intact, *i.e.* the number of base pairs inserted or deleted is divisible by three. This allows the production of a largely functional protein, containing both anchoring parts, which only is shorter or longer in the middle.

At the moment no treatments addressing the underlying genetic cause are available for DMD. A limited number of therapies targets one or a few of the symptoms, delaying disease progression, but not preventing it. Corticosteroid treatment has shown to be effective and ACE-inhibitors can delay the onset of cardiomyopathy. Many more compounds are tested pre-clinically, some showing positive effects on some of the mechanisms deregulated by the disease.

Antisense oligonucleotide (AON)-mediated exon skipping aims to restore the disrupted open reading frame in DMD patients, by removing ('skipping') an exon, thereby allowing the production of shorter, but largely functional Becker-like dystrophin proteins. The exon is hidden during splicing by covering it with an AON specific for the targeted exon. Proof-of-principle for this approach has been shown in cell cultures and animal models for DMD and is currently tested in clinical trials.

The efficiency of AON-mediated exon skipping relies on several aspects. First of all the presence of the target tissue. Dystrophin is only expressed by muscle tissue and not by adipose and fibrotic tissue, which replaces the muscle tissue during disease progression. Better preservation and improvement of quality of muscle tissue would increase the amount of target for AON-mediated exon skipping. Secondly it depends on the amount of AON that

reaches this target. One way to influence this is optimisation of dosing regimen. In this thesis both aspects have been studied in (DMD) cell cultures and the *mdx* mouse model (a mouse model with a mutation in the *DMD* gene leading to the absence of a functional dystrophin protein).

In **chapter 3** different dosage treatment regimens were compared in *mdx* mice. This revealed that if the same total amount of AON compound is given in multiple smaller portions, it leads to more uptake of the compound by the muscles, where it is needed for therapeutic effects. This in turn led to higher exon skipping percentages and restoration of dystrophin production. On the other hand, a higher uptake of AONs by other organs such as the liver and the kidney was also observed.

AONs do not lead to a permanent change in exon skipping or dystrophin restoration. Due to turn-over of the compound, chronic treatment will be required. Comparison of different maintenance schemes, after initial treatment, showed that more frequent repetition of treatment led to higher maintenance of the effects in muscle, but again also increased the AON level in the other organs (**chapter 3**). To search for a balance between these effects, the turn-over of effects at AON, RNA and protein levels were studied in more detailed (**chapter 4**). This showed, unfortunately, that for AONs this was comparable between muscle and other organs. However the dystrophin protein was still detectable six months after treatment, long after the exon skipping or AONs could be detected. These results indicate that the use of an intermittent dosing schedule might be useful to maintain treatment effects, but reduce side effects.

Small molecules could be used to enhance exon skipping efficiency. We tested one of these compounds (called 6TG), described by others to enhance skipping efficiency (**chapter 5**). However, we discovered that, although it indeed enhanced exon skipping mainly in DMD cell cultures, also various other skipping events were observed next to the skipping of the targeted exon. This increases the chance of off-target effects and therefore we do not consider 6TG as a suitable candidate for further use.

As mentioned, dystrophin is only expressed by muscle tissue and not by adipose and fibrotic tissue. Therefore less targets remain when disease progresses. Improving muscle quality with pharmaceutical compounds is another way to enhance treatment outcomes. Nowadays most patients are already treated with corticosteroids. Prednisolone (the most used corticosteroid) did not negatively influence the AON treatment itself or its functional outcomes in *mdx* mice (**chapter 6**). For prednisolone this is important to know, since patients in clinical trials are often treated with corticosteroids.

While searching for muscle quality improving compounds, losartan was tested (**chapter 7**), as literature described it as a promising candidate. However, no positive effects on muscle quality of losartan itself or on AON treatment were observed. Furthermore, during experiments more literature became available doubting its positive effects. Therefore these experiments were stopped. Unfortunately no other candidate could be found that enhanced therapeutic outcomes by dual treatment with AONs.

## Samenvatting voor niet-ingewijden

Duchenne spierdystrofie (DMD) is een ernstige, X-gebonden spierziekte, die voorkomt bij ongeveer 1 op de 5 000 pasgeboren jongetjes. De ziekte wordt gekenmerkt door progressieve spierzwakte. Bij deze patiënten worden de eerste symptomen zichtbaar rond hun tweede of derde levensjaar: ze hebben moeite met rennen, opstaan en traplopen. Toename van spierzwakte zorgt ervoor dat ze meestal tussen hun tiende en vijftiende in een rolstoel belanden en uiteindelijk door ademhalings- en tegenwoordig met name hartproblemen sterven voor het dertigste levensjaar. Becker spierdystrofie (BMD) is een verwante ziekte. In BMD zijn de symptomen echter over het algemeen een stuk milder en de levensverwachting is vrijwel normaal.

Duchenne wordt veroorzaakt door mutaties in het *DMD*-gen dat codeert voor het dystrofine eiwit. Dit eiwit vormt een brug tussen het actine cytoskelet in spiervezels en de extracellulaire matrix rondom de spiervezels, noodzakelijk voor de stabiliteit. Door de afwezigheid van dystrofine raken de spiervezels gemakkelijk beschadigd tijdens bewegingen. Normaal gesproken kunnen de spieren deze schade herstellen, maar als de beschadiging chronisch wordt, raakt het herstelsysteem uitgeput en wordt steeds meer spierweefsel vervangen door bind- en vetweefsel. Dit leidt uiteindelijk tot een verlies van spierfunctie.

Genen (DNA) bevatten de genetische code voor eiwitten. Hierbij coderen drie baseparen in een gen voor één aminozuur van een eiwit. Vertaling van de genetische code vindt plaats door eerst de DNA-code over te schrijven naar een RNA-code en vervolgens deze te vertalen in een eiwit. De vertaling begint bij een 'start signaal' en eindigt bij een 'stop signaal' van een transcript. De genetische code is verdeeld over exonen, waartussen zich intronen (niet-coderende delen) bevinden. Deze intronen worden er op RNA-niveau uitgeknipt tijdens een proces genaamd 'splicing'. Bij Duchenne patiënten zorgen mutaties in het *DMD*-gen voor verstoringen in de genetische code; bijvoorbeeld door de insertie of deletie van één of meerdere exonen waarvan het aantal baseparen niet deelbaar is door drie, of door de introductie van een vroegtijdig stop signaal. Dit zorgt ervoor dat de aanmaak van eiwit vroegtijdig gestopt wordt. Een functioneel eiwit ontbreekt dan, aangezien het één van de verbindingsdelen mist. Becker wordt ook veroorzaakt door mutaties in het *DMD*-gen. In dit geval blijft echter het leesraam behouden, d.w.z. het aantal toegevoegde of verwijderde baseparen is deelbaar door drie. Hierdoor kan een grotendeels functioneel eiwit gevormd worden dat beide verbindingsdelen bevat en alleen in het midden een stukje korter of langer is.

Op dit moment zijn er voor Duchenne geen therapieën beschikbaar die de onderliggende genetische oorzaak aanpakken. Er bestaan slechts een klein aantal therapieën gericht op één of een paar symptomen van de ziekte. Deze kunnen hooguit de progressie van de ziekte vertragen, maar niet voorkomen. Corticosteroïden zijn één van de weinige middelen die bewezen hebben effectief te zijn (hierdoor belanden patiënten gemiddeld drie jaar later in een rolstoel) Deze worden dan ook door de meeste patiënten gebruikt. Verder kunnen ACE-inhibitoren de eerste symptomen van hartfalen vertragen. Verder worden momenteel veel middelen preklinisch getest, waarvan enkele positieve effecten laten zien op sommige mechanismen die door de ziekte verstoord zijn.

Exon skippen door middel van antisense oligonucleotides (AONs) probeert het verstoorde leesraam te herstellen door een extra exon te verwijderen ('skippen'), waardoor een korter, maar grotendeels functioneel Becker-achtig dystrofine eiwit gevormd kan worden. Het wordt gedaan met behulp van AONs die binden aan een specifiek exon waardoor dit

tijdens het splicen niet meer herkend wordt als exon. Het eerste bewijs dat dit daadwerkelijk mogelijk was, is aangetoond in celkweken en diermodellen voor Duchenne. De aanpak wordt momenteel getest in klinische trials.

Verschillende aspecten beïnvloeden de effectiviteit van het exon skippen m.b.v. AONs. Allereerst de aanwezigheid van spierweefsel waarin de skip plaats moet vinden. Dystrofine wordt namelijk alleen tot expressie gebracht in spierweefsel en niet in het bind- en vetweefsel, dat het spierweefsel in latere stadia van de ziekte vervangt. Als het spierweefsel beter behouden zou blijven en van betere kwaliteit zou zijn, zou er meer beschikbaar zijn voor de AONs. Een andere manier om de effectiviteit te verbeteren, is door het verhogen van de hoeveelheid AON die daadwerkelijk in de spiercellen terecht komt. Dit kan onder andere beïnvloed worden door de toediening te optimaliseren. In dit proefschrift is naar beide aspecten onderzoek gedaan in (patiënten) cellen en in de *mdx* muis (een muismodel met een mutatie in het *DMD*-gen waardoor geen functioneel dystrofine eiwit aanwezig is). Er is onderzocht of het kon leiden tot een verhoogde effectiviteit van de AON therapie.

In **hoofdstuk 3** zijn verschillende doseringsschema's vergeleken in de *mdx* muis. Dit liet zien dat als dezelfde totale hoeveelheid AON toegediend werd in meerdere, kleinere porties, meer AON opgenomen werd door de spieren (de plek waar het nodig is voor de therapeutische effecten). Dit leidde tot hogere exon skip percentages en meer herstel van dystrofine productie. Het leidde echter ook tot een hoger opname van AONs door andere organen zoals de lever en de nieren.

Het exon skippen en het herstel van dystrofine eiwit productie door AONs is niet permanent. Omdat de AONs afgebroken en/of uitgescheiden worden door het lichaam, zal chronische behandeling nodig zijn. Vergelijking van verschillende onderhoudsdoseringen na initiële behandeling, liet zien dat vaker herhalen van de injecties ervoor zorgde dat de effecten in de spier beter behouden bleven, maar dat eveneens dit leidde tot hogere AON niveaus in andere organen (**hoofdstuk 3**). Om hier een evenwicht tussen te vinden, is het verloop van de effecten op AON, RNA en eiwit niveau in meer detail bestudeerd in **hoofdstuk 4**. Hieruit bleek, helaas, dat het verloop van de niveaus van de AONs vergelijkbaar was voor spieren en andere organen. Dystrofine eiwit was echter zes maanden na de behandeling nog steeds detecteerbaar. Dit is lang nadat exon skippen en AONs gedetecteerd konden worden. Deze resultaten geven aan dat een doseringsschema met onderbrekingen mogelijk gebruik zou kunnen worden om de therapeutische effecten te behouden, maar de bijwerkingen te verminderen.

Kleine moleculen kunnen gebruikt worden om de effectiviteit van het exon skippen te verhogen. Wij hebben één van deze moleculen (6TG genaamd) getest. In de literatuur is beschreven dat dit de exon skip effectiviteit verhoogt (**hoofdstuk 5**). Uit ons onderzoek, dat hoofdzakelijk in celkweken werd uitgevoerd, bleek echter dat, hoewel de exon skip percentages inderdaad hoger werden, ook verschillende andere exonen onbedoeld geskippt werden. Dit verhoogt de kans op bijwerkingen en daardoor is 6TG naar onze mening geen goede kandidaat voor verdere experimenten.

Zoals eerder genoemd wordt dystrofine alleen tot expressie gebracht in spierweefsel en niet in bind- en vetweefsel, waardoor minder aangrijpingspunten voor de therapie overblijven naarmate de ziekte vordert. Daarom is het verbeteren van de spierkwaliteit met farmaceutica een andere manier om therapeutische effecten te verhogen. Tegenwoordig worden de meeste

patiënten behandeld met corticosteroiden, voornamelijk prednisolone. Prednisolone had geen negatieve effecten op de AON behandeling of de functionele effecten daarvan in *mdx* muizen (**hoofdstuk 6**). Dit is van belang voor klinische trials, aangezien de meeste patiënten die daaraan deel nemen, behandeld zullen worden met corticosteroiden.

Van de verschillende middelen die volgens beschrijvingen in de literatuur de spierkwaliteit verhogen, was losartan één van de meest belovende. Daarom hebben wij losartan ook getest, alleen en in combinatie met AONs (**hoofdstuk 7**). Hierbij werden echter geen positieve effecten van losartan op de spierkwaliteit of op de effectiviteit van de AONs gezien. Daar kwam bij dat tijdens de experimenten, meer literatuur naar buiten kwam die de eerder beschreven resultaten in twijfel trokken. Dit heeft ons doen besluiten de experimenten te stoppen. Helaas hebben we tot op heden geen andere kandidaat kunnen vinden die tot verbeterde therapeutische effecten leidde bij combinatiebehandeling met AONs.





**List of Abbreviations**

|        |                                            |
|--------|--------------------------------------------|
| 2OMe   | 2'- <i>O</i> -methyl                       |
| 2OMOE  | 2'- <i>O</i> -(2-methoxy)ethyl             |
| 6TG    | 6-thioguanine                              |
| AAS    | Anabolic androgenic steroids               |
| AAV    | Adeno-associated virus                     |
| ABD    | Actin-binding domain                       |
| ACE    | Angiotensin-converting enzyme              |
| Acvr   | Activin receptor                           |
| AMPK   | AMP-activated protein kinase               |
| ANP    | Atrial natriuretic peptide                 |
| AON    | Antisense oligonucleotide                  |
| ASC    | Adipose-derived stromal cell               |
| AT     | Angiotensin II receptor                    |
| BMD    | Becker muscular dystrophy                  |
| BMP    | Bone morphogenic protein                   |
| BNP    | Brain natriuretic peptide                  |
| CK     | Creatine kinase                            |
| CMV    | Cytomegalo virus                           |
| CNS    | Central nervous system                     |
| CXMD   | Canine X-linked muscular dystrophy         |
| DGC    | Dystrophin-associated glycoprotein complex |
| DMD    | Duchenne muscular dystrophy                |
| ECM    | Extracellular matrix                       |
| EGCG   | Epigallocatechin gallate                   |
| EIS    | Exon inclusion sequence                    |
| ENA    | Ethylene bridged nucleic acid              |
| ESC    | Embryonic stem cell                        |
| ESE    | Exonic splicing enhancer                   |
| GAPDH  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase   |
| GRMD   | Golden retriever muscular dystrophy        |
| HDAC   | Histone deacetylase                        |
| HFMD   | Hypertrophic feline muscular dystrophy     |
| IGF    | Insulin-like growth factor                 |
| IFN    | Interferon                                 |
| IKK    | I $\kappa$ B kinase                        |
| Lgals3 | Lectin, galactoside binding, soluble, 3    |
| LGMD   | Limb girdle muscular dystrophy             |
| LNA    | Locked nucleic acid                        |
| LVEF   | Left ventricular ejection fraction         |
| MDSC   | Muscle-derived stem cell                   |
| MHC    | Major histocompatibility complex           |
| MMP    | Matrix metalloproteinase                   |
| MNF    | Myocyte nuclear factor                     |
| MRI    | Magnetic resonance imaging                 |
| MSP    | Muscle-targeting heptapeptide              |

|        |                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| NBD    | NEMO-binding domain                                       |
| NF-AT  | Nuclear transcription factor of activated T-cell          |
| NMD    | Nonsense-mediated decay                                   |
| nNOS   | Neuronal nitric oxide synthase                            |
| NP     | Nanoparticle                                              |
| NSAID  | Non-steroidal anti-inflammatory drug                      |
| PD     | Pharmacodynamic                                           |
| PDE    | Phosphodiesterase                                         |
| PDGF   | Platelet-derived growth factor                            |
| PDTC   | Pyrrolidine dithiocarbamate                               |
| Pip    | PMO or PNA internalisation peptide                        |
| PK     | Pharmacokinetic                                           |
| PMMA   | Polymethylmethacrylate                                    |
| PMO    | Phosphorodiamidate morpholino oligomer                    |
| PNA    | Peptide nucleic acid                                      |
| PO     | Phosphodiester                                            |
| pPMO   | Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer |
| PS     | Phosphorothioate                                          |
| PTM    | Pre- <i>trans</i> -splicing molecule                      |
| PV     | Parvalbumin                                               |
| RA(A)S | Renin-angiotensin(-aldosterone) system                    |
| ROS    | Reactive oxygen species                                   |
| RyR    | Ryanodine receptor                                        |
| SACNSC | Stretch-activated channels for non-specific cations       |
| snRNP  | Small nuclear ribonucleoprotein                           |
| SOCE   | Store-operated calcium entry                              |
| SR     | Serine-and arginine-rich                                  |
| TALEN  | Transcription activator-like effector nuclease            |
| TGF    | Transforming growth factor                                |
| TNF    | Tumour necrosis factor                                    |
| Utrn   | Utrophin                                                  |
| XCI    | X-chromosome inactivation                                 |



## Curriculum Vitae

Ingrid Verhaart was born in Eindhoven on the 19th of March 1986. After finishing gymnasium at the Christiaan Huygens College in Eindhoven, she moved to Leiden in 2004 to study Biomedical Sciences. During her bachelors, she participated in an exchange program with the Karolinska Institute in Stockholm, Sweden. She did her internship in the group of Prof. dr. Ferry Ossendorp at the department of Immunoematology and Blood Transfusion. The subject was “The use of antigen-antibody immune complexes for CTL mediated immunotherapy of melanoma” and was supervised by Nadine van Montfoort. Thereafter, in 2007, she continued with her masters Biomedical Sciences in Leiden. Her first internship, entitled “Study of the effects of the flavonoid silibinin on glucose uptake in insulin signalling in muscle cells”, was conducted at the department of Molecular Cell Biology, guided by Dr. Bruno Guigas. She did her final internship and wrote her master’s thesis at the department of Human Genetics under supervision of Hans Heemskerk in the group of Dr. Annemieke Aartsma-Rus. Here she studied the effect of combining prednisolone and antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy in the *mdx* mouse. After obtaining her master’s degree, she continued this research in the same group from September 2009 until 2014 as a PhD student of Prof. dr. Gertjan van Ommen. This resulted in this thesis “Optimising antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy”.



## List of Publications

1. Verhaart IEC, van Vliet-van den Dool L, Sipkens JA, de Kimpe SJ, Kolfshoten IG, van Deutekom JC, Liefwaard L, Ridings JE, Hood SR and Aartsma-Rus A, *The dynamics of compound, transcript, and protein effects after treatment with 2OMePS antisense oligonucleotides in mdx mice*. Mol Ther Nucleic Acids 2014; 3:e148.
2. Verhaart IEC, van Vliet-van den Dool L, Sipkens JA, de Kimpe SJ, Kolfshoten IG, van Deutekom JC, Liefwaard L, Ridings JE, Hood SR, Aartsma-Rus A (2014), *The dynamics of 2OMePS antisense oligonucleotides, transcripts, and protein effects in mdx mice*. Mol Ther Nucleic Acids; 3: e148.
3. Verhaart IEC, Tanganyika-de Winter CL, Karnaoukh TG, Kolfshoten IG, de Kimpe SJ, van Deutekom JC, Aartsma-Rus A (2013), *Dose-dependent pharmacokinetic profiles of 2'-O-methyl phosphorothioate antisense oligonucleotides in mdx mice*. Nucleic Acid Ther; 23: 228-237.
4. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A (2012), *The effect of 6-thioguanine on alternative splicing and antisense-mediated exon skipping treatment for duchenne muscular dystrophy*. PLoS Curr MD; 4.
5. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A (2012), *Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy*. Curr Opin Neurol; 25: 588-596.
6. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A (2012), *AON-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy*. In: Zaher A, editor, Neuromuscular Disorders. ISBN 978-953-51-0696-8, InTech.
7. Verhaart IEC, van Duijn RJ, den Adel B, Roest AA, Verschuuren JJ, Aartsma-Rus A, van der Weerd L (2012), *Assessment of cardiac function in three mouse dystrophinopathies by magnetic resonance imaging*. Neuromuscul Disord; 22: 418-426.
8. Verhaart IEC, Heemskerk H, Karnaoukh TG, Kolfshoten IG, Vroon A, van Ommen GJ, van Deutekom JC, Aartsma-Rus A (2012), *Prednisolone treatment does not interfere with 2'-O-methyl phosphorothioate antisense-mediated exon skipping in Duchenne muscular dystrophy*. Hum Gene Ther; 23: 262-273.
9. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A (2011), *Therapeutic approaches in development for Duchenne muscular dystrophy*. Journal for Neurology and Psychiatry of Child and Adolescent in Romania; 4.
10. van Putten M, van der Pijl EM, Hulsker M, Verhaart IEC, Nadarajah VD, van der Weerd L, Aartsma-Rus A (2014), *Low dystrophin levels in heart can delay heart failure in mdx mice*. J Mol Cell Cardiol.
11. Spitali P, van den Bergen JC, Verhaart IEC, Wokke B, Janson AA, van den Eijnde R, den Dunnen JT, Laros JF, Verschuuren JJ, 't Hoen PA, Aartsma-Rus A (2013), *DMD transcript imbalance determines dystrophin levels*. FASEB J; 27: 4909-4916.
12. de Brouwer AP, Nabuurs SB, Verhaart IEC, Oudakker AR, Hordijk R, Yntema HG, Hordijk-Hos JM, Voeselek K, de Vries BB, van Essen T, Chen W, Hu H, Chelly J, den Dunnen JT, Kalscheuer VM, Aartsma-Rus AM, Hamel BC, van Bokhoven H, Kleefstra T (2013), *A 3-base pair deletion, c.9711\_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy*. Eur J Hum Genet.
13. van Montfoort N, Mangsbo SM, Camps MG, van Maren WW, Verhaart IEC, Waisman A, Drijfhout JW, Melief CJ, Verbeek JS, Ossendorp F (2012), *Circulating specific antibodies enhance systemic cross-priming by delivery of complexed antigen to dendritic cells in vivo*. Eur J Immunol; 42: 598-606.





## Dankwoord

Uiteraard wil ik hier op de laatste, maar zeker niet onbelangrijke, bladzijde van mijn proefschrift iedereen bedanken die mij tijdens mijn promotieperiode praktisch geholpen heeft dan wel op een andere manier ondersteund heeft.

Allereerst mijn promotor Gertjan van Ommen en copromotor Annemieke Aartsma-Rus voor het mogelijk maken van mijn promotie en ook voor de inhoudelijke ondersteuning, goede suggesties en feedback.

Daarnaast iedereen van het lab die een bijdrage aan mijn verschillende projecten en artikelen geleverd heeft. Hans, met wie ik tijdens mijn stage en het begin van mijn promotie samengewerkt heb aan de prednisolone-experimenten. Christa, voor de hulp bij de muizenproeven en Laura bij de western blots. Maaïke, voor alle hulp met de kleuringen en de samenwerking tijdens de MRI-studies. Dwi, for all your help with the TGF- $\beta$  related experiments and the western blots, especially those for pSmad2. Pietro, for working together on the western blots for the wild type mice. Maarten, voor de statistische ondersteuning. Melvin, voor de tips over Illustrator en InDesign, zeker belangrijk voor de totstandkoming van het boekje. Verder, mijn kamergenoot van de eerste jaren: Ivo, voor alle keren dat er weer een computerprobleem opgelost moest worden. Furthermore, all the other members of the exon skip group, labJ and the Human Genetics department, who I have not mentioned and who have helped me during the past years.

Bovendien wil ik ook mijn familie en vrienden bedanken die me naast mijn werk altijd gesteund hebben.