

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20555> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Putten, Maaïke van

Title: The influence of low dystrophin levels on disease pathology in mouse models for Duchenne Muscular Dystrophy

Issue Date: 2013-02-26

Samenvatting voor niet ingewijden

Duchenne spierdystrofie (DMD) is de meest voorkomende neuromusculaire aandoening die 1 op de 4000 jongens treft. De eerste symptomen zijn zichtbaar vanaf het 3^e levensjaar en omvatten moeite met rennen, traplopen en opstaan. Door verlies van spiervezels worden de jongens rond hun 12^e rolstoelafhankelijk en overlijden ze rond hun 30^e veelal als gevolg van ademhalings en hartfalen. Ondanks dat de levensverwachting in de Westerse wereld is gestegen door verbeterde zorg en in het bijzonder beademingsondersteuning, is er tot op heden geen therapie.

DMD wordt veroorzaakt door mutaties in het *DMD* gen welke codeert voor het eiwit dystrofine. Dystrofine vormt een brug tussen het sarcolemma en de extracellulaire matrix en geeft zo stabiliteit aan spiervezels tijdens contracties. In afwezigheid van dystrofine zijn deze vatbaarder voor schade tijdens beweging. Dit resulteert in een chronisch verlies van spiervezels wat tot op zekere hoogte wordt opgevangen door regeneratie. Wanneer de regeneratie capaciteit van de spier is uitgeput worden ze vervangen door bindweefsel en vet.

In gezonde personen wordt het *DMD* gen afgeschreven volgens een leesraam waarbij elke drie mRNA bouwstenen de informatie bevatten voor één aminozuur (LEO EET EEN KIP). DMD patiënten hebben mutaties die het leesraam vertoren wat leidt tot een voortijdige stop van de eiwit synthese (LEO EET ENK IP). Mutaties waarbij het leesraam intact blijft, zoals die bij Becker spierdystrofie (BMD) patiënten, resulteren in de synthese van een kleiner maar functioneel eiwit gezien zowel het begin als eind van het eiwit aanwezig is (LEO EET KIP). BMD patiënten brengen kleine hoeveelheden dystrofine tot expressie en zijn daardoor minder ernstig aangedaan.

In DMD patiënten kan met behulp van antisense oligonucleotiden (AON) het leesraam worden hersteld waardoor een korter maar deels functioneel Becker-achtig dystrofine wordt aangemaakt. Hoogstwaarschijnlijk zullen deze en andere klinische interventies niet resulteren in het herstel van dystrofine expressie op wild type niveau. Gelukkig is dat waarschijnlijk ook niet nodig gezien zowel mensen als muizen die -50% dystrofine tot expressie brengen niet zijn aangedaan. Op basis van een case report is het bekend dat zelfs 30% dystrofine kan leiden tot een mild fenotype. Gedetailleerde studies naar welke hoeveelheden dystrofine leiden tot verbeterde spier integriteit, bescherming tegen spierschade en verbetering van spierfunctie zijn beschreven in dit proefschrift.

Allereerst hebben we een functioneel test regime opgezet bestaande uit vier functionele testen om spierfunctie in *mdx* muizen te bepalen zonder daarbij het natuurlijk ziektebeloop te beïnvloeden (Hoofdstuk 2). Met behulp hiervan hebben we de spierfunctie van verschillende muismodellen voor DMD bepaald (Hoofdstuk 3). We zagen dat de spierfunctie van muizen die geen utrofine tot expressie brengen of op één allel een significant slechtere spierfunctie hebben in vergelijking tot *mdx* muizen. Daarnaast hebben we bewezen dat MMP-9 en TIMP-1 geschikte serum biomarkers zijn om het ziektebeloop in mens en muis te bepalen (Hoofdstuk 4). Gezien patiënten herhaaldelijk moeten worden behandeld met AONs en het effect van behandeling niet continu via biopten kan worden bepaald is het essentieel om te beschikken over goede biomarkers.

Zowel het functionele test regime als de serum biomarkers werden vervolgens gevalideerd en gebruikt in twee nieuwe innovatieve muis modellen die lage hoeveelheden dystrofine tot expressie brengen. Het eerste model werd gegenereerd door muizen met een mutatie in het *Xist* gen (*Xist^{Ahs}*) te kruisen met *mdx* muizen. In de vrouwelijke *mdx-Xist^{Ahs}* embryo's werd voornamelijk het X-chromosoom geïnactiveerd dat het gemuteerde *Xist* gen bevatte, maar dat intact dystrofine tot expressie bracht. Dit resulteerde in expressie van een laag percentage dystrofine in een utrofine positieve achtergrond (Hoofdstuk 5). We zagen dat spierfunctie significant verbeterde in muizen met <15% dystrofine, terwijl histopathologie sterk afnam bij >15% dystrofine. Meer dystrofine (>22%) is nodig om spieren te beschermen tegen schade die wordt geïnduceerd door blootstelling aan rennen op een loopband op een chronische basis. Hoewel AONs succesvol opgenomen worden door skeletspieren blijkt het hart moeilijker te behandelen. Deels herstelde dystrofine expressie in skeletspieren verhoogt vrijwillige activiteit in muizen wat voor een grotere belasting voor het hart zorgt. In *mdx-Xist^{Ahs}* muizen werd bepaald of lage hoeveelheden dystrofine in het hart het ontstaan van gedilateerde cardiomyopathie kan uitstellen of zelfs voorkomen (Hoofdstuk 6). Tussen de 3 en 21% dystrofine was al afdoende om gedilateerde cardiomyopathie te voorkomen op een leeftijd van 10 maanden.

Mdx muizen zijn veel minder ernstig aangedaan dan DMD patiënten doordat zij de dystrofine homologe utrofine tot overexpressie brengen, wat compenseert voor de afwezigheid van dystrofine. Muizen die beide eiwitten missen hebben een vergelijkbaar fenotype als DMD patiënten en sterven al voor ze de leeftijd van 12 weken bereiken. Om te bepalen wat het effect van lage hoeveelheden dystrofine in deze muizen is hebben we *mdx/utrn^{+/-}* muizen gekruist met *utrn^{-/-} Xist^{Ahs}* muizen (Hoofdstuk 7). Ook bij deze muizen resulteert niet-random X-inactivatie in dystrofine levels van <50%. We observeerden dat <10% dystrofine levensverwachting en spierfunctie verbeterd in deze muizen. Om histopathologie te verbeteren was >10% dystrofine nodig.

Gebaseerd op deze resultaten kan worden geconcludeerd dat <10% dystrofine het fenotype al tot op zekere hoogte verbeterd. Echter is >10% dystrofine noodzakelijk om spieren te beschermen tegen pathologie. Deze bevindingen zijn zeer bemoedigend voor gaande en toekomstige klinische studies.