



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards therapies for muscular dystrophies associated with the dystrophin-glycoprotein complex

Engelbeen, S.A.Y.

Citation

Engelbeen, S. A. Y. (2025, March 4). *Towards therapies for muscular dystrophies associated with the dystrophin-glycoprotein complex*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4196517>

Version: 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/1887/4196517>

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

Nederlandse samenvatting

Spierdystrofieën geassocieerd met het dystrofine-glycoproteïnecomplex (DGC) zijn een groep ziekten met verschillende oorzaken, die gekenmerkt worden door het verlies van spierweefsel en -functie. Het DGC bevindt zich in de celwand van de spiervezel en vormt een verbinding tussen de binnenkant van de cel en de omgeving daarbuiten waardoor het de spiervezel stabiliteit geeft tijdens het samentrekken van de spier. Wanneer één of meerdere van de DGC-eiwitten afwezig zijn in het complex, of maar deels functioneel zijn, worden spiervezels vatbaar voor schade tijdens samentrekkingen. Spierdystrofieën die geassocieerd zijn met het DGC delen gemeenschappelijke pathologische mechanismen en omvatten de dystrofinopathieën en de sarcoglycanopathieën. De dystrofinopathieën worden veroorzaakt door mutaties in het *DMD* gen, wat codeert voor het dystrofine eiwit, waardoor er een niet-functioneel dystrofine eiwit wordt aangemaakt bij Duchenne spierdystrofie (DMD), terwijl er een korter, deels functioneel dystrofine eiwit geproduceerd wordt bij Becker spierdystrofie, wat resulteert in een milder ziektepatroon dan bij DMD. De sarcoglycanopathieën worden veroorzaakt door mutaties in één van de genen, *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* of *SGCD*, die respectievelijk coderen voor α -, β -, γ -, and δ -sarcoglycan. Tot op heden is er geen genezing beschikbaar voor deze ziekten. Echter worden er verschillende inspanningen geleverd om therapieën te ontwikkelen die zich richten op het herstellen van het primaire defect, namelijk het herstellen van de eiwitproductie, of op het vertragen en/of verbeteren van de secundaire pathologie die ontstaat door de instabiliteit van het DGC, wat voordelig zou kunnen zijn voor diverse patiëntengroepen.

Hoofdstuk 1 bevat een inleiding tot spierdystrofieën die geassocieerd zijn met het DGC, hun gemeenschappelijke pathologische mechanismen, en geeft een overzicht van de therapeutische inspanningen voor het herstellen van eiwitproductie en voor het vertragen en/of verlichten van de secundaire pathologie die geassocieerd is met deze ziekten.

Hoofdstukken 2 tot 5 beschrijven preklinisch werk voor therapieën die gericht zijn op het primaire defect (Hoofdstuk 2) of de secundaire pathologie (Hoofdstukken 3 en 5) in DMD, of de secundaire pathologie in α -sarcoglycanopathie (LGMDR3, Hoofdstuk 4).

In **Hoofdstuk 2**, hebben we verschillende chemisch gemodificeerde antisense oligonucleotiden (AON's) geëvalueerd op hun vermogen om dystrofine eiwitproductie te herstellen. AON-gemedieerde exon skipping therapieën in DMD hebben als doel om een deels functioneel dystrofine te laten produceren door de genetische code te herstellen door een specifiek exon te verbergen in het pre-mRNA met AON's waardoor dit wordt geskipt/overgeslagen bij de omzetting van pre-mRNA naar mRNA. Hierdoor kan een korter, Becker-achtig dystrofine eiwit gemaakt worden. We evalueerden mens-specifieke AON's op hun stabiliteit, of ze de skeletspieren konden bereiken, en op hun vermogen om het doel-exon (exon 53) te skippen in het gehumaniseerde muis model; de hDMDdel52/*mdx* muis. Terwijl we eerst zagen dat AON's die gemodificeerd waren met gesloten nucleïneazuren (LNA) hoge levels van exon skippen konden induceren, bleek later dat dit niet leidde tot meer herstel van dystrofine eiwitproductie. We ontdekten bij het evalueren van exon skippen in RNA, dat onze analyse werd verstoord door de aanwezigheid en sterke hechting van LNA-gemodificeerde AON's op het doel-exon. Hierdoor konden we het RNA dat het doel-exon nog bevatte niet detecteren en werd de mate van exon skipping te hoog ingeschat. We konden deze overschatting (gedeeltelijk) voorkomen

door onze RNA-monsters te verhitten, waardoor LNA-gemodificeerde AON's loskwamen van het doel-exon. Concluderend, hoewel onze verschillende chemisch-gemodificeerde AON's niet in staat waren om hogere exon skip levels te induceren vergeleken met de standaard 2'O-methyl gemodificeerde AON's, hebben we kunnen aantonen dat chemische modificaties van AON's die de hechting van AON's op RNA verhogen ervoor kunnen zorgen dat er tijdens RNA-analyses een kunstmatige overschatting van exon skipping is. Hierdoor raden we andere onderzoekers aan om hier mee rekening te houden bij het beoordelen van de effectiviteit van AON's tijdens RNA-analyses.

Hoofdstuk 3 beschrijft een proof-of-concept studie waarbij we de levering van chemisch gemodificeerde en geconjugeerde kleine interfererende RNA's (siRNA's) aan dystrofische spieren hebben beoordeeld, evenals hun vermogen om *Alk4* mRNA levels te verlagen. *Alk4* codeert voor een interactiepartner van myostatine, een negatieve regulator van spiergroei. Een enkele intraveneuze of intraperitoneale injectie met de *Alk4*-siRNA's in *mdx* muizen zorgde voor verlaging van het *Alk4* transcript. Bovendien werd langdurige behandeling met de *Alk4*-siRNA's goed verdragen, op basis van markers voor lever- en nierfunctie, en resulteerde de behandeling in efficiënte verlaging van *Alk4* in de skeletspieren. Helaas werd het tijdens deze studie duidelijk dat *Alk4* niet een therapeutisch doelwit was aangezien ander werk binnen onze groep aantoonde dat het verlagen van *Alk4* transcripten met behulp van AON's leidde tot spieratrofie in *mdx* muizen. Echter, de efficiënte levering die we zagen voor de chemisch gemodificeerde en geconjugeerde siRNA's naar (dystrofische) spieren suggereert dat de behandeling met siRNA's met vergelijkbare modificaties nuttig kunnen zijn bij het verlagen van genen die betrokken zijn bij de secundaire pathologie, zoals ontsteking en fibrose.

In **Hoofdstuk 4** bestudeerden we het effect van behandeling met een oplosbare activine type IIB-receptor (sActRIIB), op het voorkomen dat myostatine kan binden op endogeen ActRIIB, alsook de effecten die dit heeft op de spierpathologie van *Sgca*-null muizen, een muis model voor LGMDR3. Wanneer de sActRIIB behandeling werd gestart in 3 weken oude muizen waarvan de spierpathologie nog niet begonnen was, zagen we een verhoging van de spiermassa als een gevolg van hypertrofie van de spiervezels. Echter leidde dit ook tot een sneller afnemen van de spierfunctie in vergelijking met *Sgca*-null muizen die behandeld waren met fysiologisch zoutwater. Bovendien, wanneer de behandeling met sActRIIB werd gestart op een leeftijd van 9 weken, op het moment dat de spierpathologie al aanwezig is, verhoogde dit ook de spiermassa, maar in mindere mate. Het negatieve effect van de sActRIIB-behandeling op spierfunctie was minder uitgesproken op deze leeftijd, omdat de spierfunctie van *Sgca*-null muizen al verminderd was voor de start van de behandeling. Deze resultaten geven aan dat myostatine-remming met sActRIIB spiergroei kan stimuleren, maar dat dit niet nuttig is als een op zichzelf staande behandeling in LGMDR3, gezien het negatieve effect op de spierfunctie.

In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht wat het effect is van supplementatie met vertakte keten aminozuren (BCAA), een vrij verkrijgbaar voedingssupplement, op de spierpathologie en regeneratie in twee DMD-muismodellen. Daarnaast keken we ook of BCAA-supplementatie veilig is in combinatie met corticosteroïdbehandeling, wat onderdeel is van de huidige standaardzorg voor DMD. De DMD-muismodellen die werden onderzocht waren de *mdx* muis, die een mild ziektebeeld heeft vergeleken met DMD-patiënten, en de *D2-mdx* muis, die op een jonge leeftijd een ernstig ziektebeeld vertoont, maar waarbij het ziektebeeld verbetert



met leeftijd. We hebben geen gunstige effecten op spierpathologie waargenomen van BCAA- en/of corticosteroïdbehandeling in beide muismodellen, maar BCAA-supplementatie leek veilig te zijn in combinatie met corticosteroïdbehandeling. We constateerden dat de twee muismodellen verschillende aspecten weerspiegelen van de pathologie in DMD-patiënten, waarbij het D2-*mdx* muismodel de spierpathologie beter weerspiegelt terwijl het *mdx*-muismodel de glucosetolerantie nauwkeuriger weerspiegelt. Dit geeft aan dat beide muismodellen nuttig kunnen zijn voor het bestuderen van behandelingen, afhankelijk van het behandeldoel, voor DMD.

Tot slot, vat **Hoofdstuk 6** de bevindingen van Hoofdstukken 2 tot 5 samen en bespreekt het de huidige ontwikkelingen die worden geëvalueerd in klinische onderzoeken, alsook de noodzaak om therapieën te beoordelen in combinatie met corticosteroïden, en het potentieel van combinatietherapieën die zich richten op het primaire defect en de secundaire pathologie, of meerdere therapieën die zich focussen op de secundaire pathologie voor de behandeling van spierziekten geassocieerd met het DGC.