



Universiteit
Leiden
The Netherlands

From NSD1 to Sotos syndrome : a genetic and functional analysis

Visser, R.

Citation

Visser, R. (2011, May 26). *From NSD1 to Sotos syndrome : a genetic and functional analysis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17673>

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/1887/17673>

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

Chapter 13

Samenvatting



Samenvatting

Sotos syndroom is een overgroeisyndroom dat gekenmerkt wordt door een toegenomen lengte en/of grote hoofdomtrek, typische schedel- en gelaatskenmerken en vertraagde verstandelijke ontwikkeling. De typische schedel- en gelaatskenmerken zijn een lange schedel (dolichocephalie) en een driehoekig gelaat met een breed en hoog voorhoofd en een prominente kin. Verdere kenmerken zijn een hoge voorste haargrens en (ogenschijnlijk) wijd uiteenstaande ogen die hoger staan aan de neuszijde dan aan de oorzijde (antimongoloïde oogstand). Sotos syndroom wordt veroorzaakt door afwijkingen van het *NSD1* gen dat gelokaliseerd is op chromosoom 5q35.2- 5q35.3.

In dit proefschrift werd een “Van *NSD1* naar Sotos syndroom” analyse uitgevoerd. Deze analyse richtte zich op drie belangrijke, maar nog onopgeloste vraagstukken. Het eerste vraagstuk betreft de moleculaire achtergrond van de typische microdeletie welke *NSD1* en de naburige genen omvat. Deze microdeletie met een uniforme grootte komt veel vaker voor in Japanse Sotos syndroom patiënten dan bij niet-Japanse Sotos syndroom patiënten. Afwijkingen van het *NSD1* gen worden gevonden in 60-90% van de Sotos syndroom patiënten. Het tweede vraagstuk betreft daarom het aanzienlijke aantal patiënten met fenotypische (uiterlijke) kenmerken van het Sotos syndroom (karakteristiek of Sotos syndroom-*like*) maar zonder een genetische diagnose. Een vergelijkbare situatie bestaat voor patiënten met karakteristieke en niet-karakteristieke kenmerken van het Marfan syndroom, maar zonder afwijkingen van het *FBN1* gen. Het derde vraagstuk betreft het genen netwerk en de daaraan gerelateerde signaaltransductieroutes via welke *NSD1* zijn activiteit moduleert.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding gegeven. Tevens wordt de opzet van dit proefschrift besproken. De volgende doelen van dit proefschrift werden geformuleerd:

- het ophelderen van de moleculaire achtergrond en de mechanismes welke microdeleties in Sotos syndroom veroorzaken
- het identificeren van causale genetische afwijkingen in patiënten met kenmerken van het Sotos syndroom of Marfan syndroom, maar zonder afwijkingen in *NSD1* of *FBN1*
- het ontrafelen van de signaaltransductieroutes via welke *NSD1* functioneert en het identificeren van eiwitten waarmee het een interactie vertoont

In **hoofdstuk 2** wordt een uitgebreid overzicht gegeven van de klassieke en nieuwe overgroeisyndromen. Het uitgangspunt is de identificatie van de genetische oorzaken van overgroeisyndromen. Door deze ontwikkeling in recente jaren is niet alleen onze kennis van deze overgroeisyndromen toegenomen, maar ook de diagnostische mogelijkheden. De syndromen welke besproken worden zijn klassieke syndromen zoals bijvoorbeeld het Beckwith-Wiedemann, Simpson-Golabi-Behmel, Marfan en Sotos syndroom, maar ook recent ontdekte syndromen zoals bijvoorbeeld het CATSHL syndroom en patiënten met een overproductie van het C-type Natriuretisch Peptide. Elk syndroom wordt in detail besproken met aandacht voor het onderscheid tussen karakteristieke en niet-karakteristieke manifestaties, fenotype-genotype correlaties en onderliggende pathofysiologische mechanismes.

Hoofdstuk 3 bevat een review over het Sotos syndroom. Hierin worden de klinische kenmerken alsmede de diagnostische criteria voor het Sotos syndroom besproken. Verder bevat het de resultaten van de genetische analyse van *NSD1* in verschillende etnische populaties en worden fenotype-genotype correlaties bediscussieerd. Ook *NSD1* mutaties in andere patiëntenpopulaties zoals Weaver, Beckwith-Wiedemann en Nevo syndroom worden besproken.

Hoofdstuk 4 is de eerste van twee studies (hoofdstuk 4 en 5) die zich richten op de uniforme microdeletie waarbij *NSD1* en de naburige genen zijn verdwenen. Deze uniforme microdeletie komt veel vaker voor bij Japanse Sotos syndroom patiënten en aan weerszijden van de deletie worden vrijwel identieke DNA blokken gevonden, de zogenaamde “low-copy repeats” (LCRs). In dit hoofdstuk wordt de ontdekking van een recombinatie hotspot in deze LCRs beschreven. In deze hotspot werden de breekpunten van bijna 80% van de Sotos syndroom patiënten met een uniforme microdeletie gelokaliseerd. Daarnaast werd aangetoond dat “non-allelic homologous recombination” (NAHR) tussen DNA regio’s met een zelfde oriëntatie (dit zijn de blokken PLCR-B en DLCR-2B) het oorzakelijk mechanisme is voor de microdeleties. Een heterozygote inversie van het DNA interval tussen de LCRs werd gevonden in alle vaders van de Japanse patiënten met een deletie in het van de vader overgeërfde chromosoom. Of deze inversie de hogere prevalentie van de uniforme microdeletie in Japanse Sotos syndroom patiënten verklaart, moet nog worden opgehelderd.

In **hoofdstuk 5** wordt een moleculaire genetische analyse beschreven van 10 Sotos syndroom patiënten met een uniforme microdeletie, maar zonder breekpunt in de recombinatie hotspot (zie hoofdstuk 4). In twee patiënten werden de breekpuntregio's gelokaliseerd in de buurt van de hotspot, terwijl in twee andere patiënten de breekpuntregio's op een grotere afstand werden gevonden. Om een verklaring te kunnen vinden waarom recombinatie bij voorkeur optreedt binnen de hotspot, werden de breekpuntregio's en hotspots van Sotos syndroom en de hotspots van vergelijkbare "genomic disorders" geanalyseerd voor hun DNA stabiliteit en de aanwezigheid van zogenaamde scaffold/matrix attachment regio's. Alle recombinaties in de vier patiënten uit deze studie bleken te zijn opgetreden binnen of vlak naast gebieden met instabiel DNA en een hoge waarschijnlijkheid op aanwezigheid van scaffold/matrix attachment regio's. Daarentegen bleken de Sotos syndroom hotspot en de recombinatie hotspots van vergelijkbare aandoeningen juist te vallen in regio's met stabiel DNA en een lage waarschijnlijkheid op de aanwezigheid van scaffold/matrix attachment. Deze resultaten suggereren dat een specifieke configuratie van het chromatine predisponeert voor de recombinatie hotspot in Sotos syndroom.

In **hoofdstuk 6, 7 en 8** worden patiënten met kenmerken van het Sotos syndroom, maar zonder afwijkingen in *NSD1*, moleculair genetisch onderzocht. In **hoofdstuk 6** wordt de hypothese uitgewerkt dat afwijkingen van de promoter regio van *NSD1* de genetische oorzaak vormen in deze patiënten. In 18 patiënten wordt de *NSD1* promoter regio geanalyseerd voor afwijkingen in de DNA sequentie en voor zogenaamde epigenetische afwijkingen (hemizygote hypermethylatie). Er worden echter geen afwijkingen gevonden. Alhoewel onze patiëntengroep slechts 18 patiënten omvatte, lijkt het onwaarschijnlijk dat afwijkingen van de *NSD1* promoter regio een belangrijke oorzaak zijn in patiënten met karakteristiek Sotos syndroom.

In **hoofdstuk 7** wordt een nieuw kandidaat gen, het *RNF135* gen, gescreend in 160 patiënten die verwezen waren voor *NSD1* analyse, maar waarin geen afwijkingen waren gevonden. *RNF135* is gelokaliseerd in de Neurofibromatosis type 1 microdeletie regio en recent werden *RNF135* mutaties gevonden in kinderen met een fenotype dat overlapt met Sotos syndroom. Er werden echter geen afwijkingen in *RNF135* gevonden in de 160 patiënten. In een patiënt van 4 jaar oud werd een klassieke Neurofibromatosis type 1 microdeletie gevonden. Daarom moet deze klinische presentatie overwogen worden in de differentiaal diagnose van jonge patiënten met een Sotos syndroom-like fenotype.

In **hoofdstuk 8** wordt een andere strategie gevolgd dan de kandidaat gen methode. In dit hoofdstuk wordt de eerste genom-brede hoge resolutie SNP array analyse beschreven in patiënten met kenmerken van het Sotos syndroom, maar zonder afwijkingen van het *NSD1* gen. In 26 Sotos syndroom-*like* patiënten worden 4 mogelijk pathogene afwijkingen gevonden: 3 deleties en 1 duplicatie. Dit brengt het detectie percentage op 15% nieuwe afwijkingen waarmee de genom-brede hoge resolutie SNP array een krachtige methode is om tot een diagnose te komen in de Sotos syndroom-*like* patiënten. Verder werden de afwijkingen onderzocht bij de ouders van de patiënten. Een mogelijk kandidaat-gen voor overgroei (*PLXDC2*) werd gevonden in één van de deleties. Screening van dit gen in een grotere patiëntenpopulatie is geïndiceerd om het mogelijk geassocieerde fenotype verder in kaart te brengen.

In **hoofdstuk 9** wordt een functionele studie van *NSD1* beschreven. Expressieprofielen van huidfibroblasten van negen Sotos syndroom patiënten met een bewezen *NSD1* afwijking worden vergeleken met normale individuen. Een significante associatie werd gevonden met de Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. Daarnaast was de expressie van Ras Interacting Protein 1 (*RASIP1*), een downstream effector van Ras, omhoog gereguleerd in Sotos syndroom. Met fosforyleringsstudies van essentiële kinases werd een mogelijk verminderde activiteit van de MAPK/ERK pathway gevonden in Sotos syndroom. Echter, transfectie experimenten met *RASIP1* lieten een mogelijk toegenomen activiteit van de pathway zien. Door onderzoek naar syndromen met een kleine gestalte zoals hypochondroplasia en Noonan syndroom, is bekend dat het activatieniveau van FGF-MAPK/ERK in de epifyseale groeischijven een bepalende factor is voor lengtegroei. In dit hoofdstuk werd *NSD1* expressie aangetoond in de terminaal gedifferentieerde hypertrofe chondrocyten van normale humane epifyseale groeischijven op verschillende leeftijden. Hieruit afleidend wordt voorgesteld dat deregulatie van de MAPK/ERK pathway in Sotos syndroom leidt tot een veranderde hypertrofe differentiatie van *NSD1* tot expressie brengende chondrocyten en dat dit een bepalende factor kan zijn in de toegenomen lengtegroei en voorlopende skeletleeftijd in Sotos syndroom.

In tegenstelling tot Sotos syndroom, zijn in Marfan syndroom meerdere verantwoordelijke genen ontdekt. **Hoofdstuk 10** bevat de resultaten van mutatie-onderzoek naar 4 genen (*FBN1*, *FBN2*, *TGFBR1*, en *TGFBR2*) in 49 patienten met kenmerken van het Marfan syndroom. In totaal worden 27 *FBN1* mutaties, een *TGFBR1* mutatie en twee *TGFBR2*

mutaties geïdentificeerd. Er werden geen *FBN2* mutaties gevonden. Deze resultaten tonen aan dat in patiënten met Marfan syndroom voornamelijk *FBN1* mutaties als oorzaak worden gevonden, maar dat *TGFBR* mutaties verantwoordelijk zijn voor 5-10% van de patiënten. De klinische kenmerken van de patiënten worden bediscussieerd aan de hand van de literatuur en de resultaten.

In **hoofdstuk 11** worden de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift kritisch bekeken en worden voorstellen voor toekomstig onderzoek gedaan. Ten eerste is NAHR de onderliggende oorzaak van de uniforme microdeleties in Sotos syndroom. Ten tweede is genoom-brede hoge resolutie SNP array een krachtige methode om een moleculaire genetische diagnose te verkrijgen in vergelijking met de kandidaat-gen methode. Ten derde is de ontdekte associatie van de MAPK/ERK pathway met Sotos syndroom een belangrijke stap om een verband te leggen tussen *NSD1* afwijkingen en de fenotypische kenmerken van het Sotos syndroom. Een model wordt voorgesteld waarin deregulatie van de MAPK/ERK pathway in Sotos syndroom leidt tot een veranderde hypertrofe differentiatie van *NSD1* tot expressie brengende chondrocyten en dat dit een bepalende factor kan zijn in de toegenomen lengtegroei en voorlopende skeletleeftijd in Sotos syndroom.

